

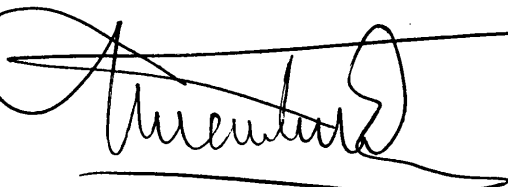
VNIVERSITAT ID VALÈNCIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA  
FACULTAD DE FARMACIA

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES**  
***UBI3 Y UBI4 DE *Candida albicans****

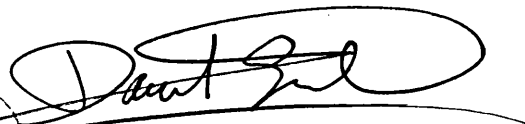
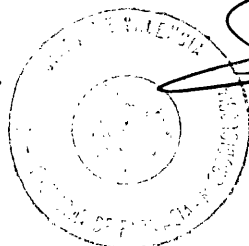
Memoria para optar al título de  
Doctora en Farmacia  
presentada por  
Dña. Patricia Roig Montoya  
Valencia, abril de 2001.

Vº Bº

Directores del trabajo



Dr. Jose Pedro Martínez García



Dr. Daniel Gozalbo Flor

UMI Number: U607771

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607771

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346

|                      |            |
|----------------------|------------|
| FACULTAD DE FARMACIA |            |
| BIBLIOTECA           |            |
| VALENCIA             |            |
| Fecha de entrada     | 25-07-01   |
| Signatura            | TD-FARM 65 |
| Registro:            | 10397      |

L. 1380/93

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE FARMACIA

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,  
acordó otorgar, a esta Tesis doctoral de

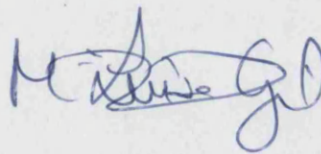
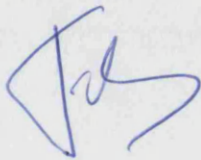
D. Patricio Roig Montoya

la calificación de  sobresaliente Cum Laude

Valencia, a 19 de Julio de 2001

El Secretario,

El Presidente,





**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES**

***UBI3 Y UBI4 DE Candida albicans***





50001380193  
Farmàcia





FEDERICO URUBURU FERNÁNDEZ, CATEDRÁTICO Y DIRECTOR DEL  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE LA UNIVERSITAT DE  
VALÈNCIA,

CERTIFICA: que Dña. Patricia Roig Montoya ha  
realizado en este departamento el trabajo titulado  
"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS  
GENES *UBI3* Y *UBI4* DE *Candida albicans*".

Y para que así conste, extiende el presente  
certificado en Valencia, a cuatro de abril de dos mil uno.

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'F' followed by a horizontal line and a downward stroke, resembling the initials 'FU'.

Federico Uruburu Fernández



*Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Daniel Gozalbo, Profesor Titular de Microbiología, y al Dr. José Pedro Martínez, Catedrático de Microbiología, ambos del Departamento de Microbiología y Ecología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia, por la dirección de este trabajo.*

*Así mismo, quiero agradecer a todos los miembros de la Sección de Farmacia del Departamento de Microbiología, especialmente a mis compañeros de laboratorio, la ayuda y el apoyo que me han prestado durante todo este tiempo.*

*Además, quiero agradecer la ayuda prestada por todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido a la realización del presente trabajo. En concreto, agradezco al Dr. D. Finley, de la Escuela de Medicina de Harvard, Boston, la cesión de las cepas SUB 62, SUB 60 y SUB 121 de *Saccharomyces cerevisiae*.*

*Quiero también dar las gracias a las personas que siempre han estado a mi lado, me han ayudado, apoyado y han confiado en mí. Gracias a mis padres, por todo, a mi hermano, por su optimismo y sentido del humor, y especialmente a Fede por su cariño y apoyo en todo momento.*

*Finalmente agradezco a la Consellería de Cultura, Educación y Ciencia de la Generalitat Valenciana, la concesión de una beca de formación de personal investigador.*



La realización de este trabajo ha sido posible gracias a las subvenciones concedidas por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (proyecto número SAF95-0595 de la Secretaría General del Plan Nacional I+D), y por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (proyecto número PM97-0098 del Programa Sectorial de Promoción General del Conocimiento).



## ABREVIATURAS

|        |  |
|--------|--|
| aa:    | aminoácidos  |
| DEPC:  | dietil pirocarbonato                                   |
| dNTPs: | deoxinucleótidos trifosfato                            |
| DO:    | densidad óptica  |
| FOA:   | ácido 5-fluoroorótico                                  |
| GOD:   | glucosa oxidasa  |
| IPTG:  | isopropil $\beta$ -D-tiogalactopiranosido              |
| kb:    | kilobase   |
| kDa:   | kilodalton   |
| M:     | molaridad  |
| mM:    | milimolar  |
| mU:    | miliunidades   |
| nm:    | nanometros   |
| ORF:   | "open reading frame" = marco abierto de lectura        |
| pm:    | picomoles  |
| PEG:   | polietilenglicol                                       |
| POD:   | peroxidasa   |
| ppm:   | partes por millón                                      |
| rpm:   | revoluciones por minuto                                |
| SDS:   | dodecil sulfato sódico                                 |
| SMC:   | sitio múltiple de clonaje                              |
| Tris:  | tris (hidroximetil) amino metano                       |
| UAS:   | "upstream activation site"                             |
| UFC:   | unidades formadoras de colonias                        |
| UV:    | ultravioleta   |
| X-Gal: | 5-bromo-4-cloro-3-indolil $\beta$ -D-galactopiranosido |





*A mis padres,  
a mi hermano  
y a Fede,  
con todo mi cariño*



# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I.- INTRODUCCIÓN</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.- Biología de <i>Candida albicans</i>: aspectos generales.</b>                  | <b>3</b>  |
| 1.1.- <i>C. albicans</i> como agente patógeno.                                       | 4         |
| 1.1.a.- Candidiasis.   | 4         |
| A.- Tipos de candidiasis.  | 5         |
| B.- Diagnóstico.   | 6         |
| C.- Tratamiento.   | 7         |
| 1.1.b.- Factores de virulencia.  | 9         |
| 1.- Dimorfismo.  | 10        |
| 2.- Adhesión.  | 12        |
| 3.- Secreción de enzimas hidrolíticas.   | 16        |
| 4.- Proteína inmunosupresora y mitogénica de células B (ISM).                        | 17        |
| 5.- Cambio fenotípico o "switching".   | 18        |
| 1.2.- Genética de <i>C. albicans</i> .   | 21        |
| 1.2.a.- El genoma de <i>C. albicans</i> .  | 21        |
| 1.2.b.- Manipulación genética de <i>C. albicans</i> y análisis de la función génica. | 22        |
| <b>2.- Ubiquitina y ubiquitinación.</b>  | <b>26</b> |
| 2.1.- Ubiquitina.  | 27        |
| 2.2.- Ubiquitinación.  | 29        |
| 2.2.a.- Conjugados ubiquitina-proteína.  | 29        |
| 2.2.b.- Enzimas de activación y unión de ubiquitina.                                 | 31        |
| 2.3.- Desubiquitinación.   | 33        |
| 2.4.- Sistemas de degradación proteica dependientes de ubiquitina.                   | 34        |
| 2.4.a.- Sistema lisosomal.   | 35        |
| 2.4.b.- Sistema proteasomal.   | 36        |
| 2.5.- Otros procesos dependientes del sistema de la ubiquitina.                      | 41        |
| 2.5.a.- Reparación de DNA.   | 41        |
| 2.5.b.- Control del ciclo celular.   | 42        |
| 2.5.c.- Respuesta al calor y otros tipos de estrés.                                  | 43        |
| 2.5.d.- Biogénesis del ribosoma.   | 44        |
| 2.5.e.- Biogénesis del peroxisoma.   | 45        |
| 2.5.f.- Regulación de receptores de superficie celular.                              | 45        |
| 2.5.g.- Regulación de la transcripción.  | 46        |
| 2.5.h.- Infección viral.   | 46        |



|   |           |
|---|-----------|
| 2.5.i.- Diferenciación celular.   | 46        |
| 2.5.j.- Transducción de señal.  | 47        |
| 2.5.k.- Apoptosis.  | 47        |
| 2.6.- Implicación del sistema de ubiquitina en la patogénesis de enfermedades.  | 47        |
| 3.- Objetivos de este trabajo.  | 48        |
| <br>  |           |
| <b>II.- MATERIALES Y MÉTODOS</b>  | <b>51</b> |
| <br>  |           |
| 1.- Cepas utilizadas.   | 53        |
| 1.1.- Cepas bacterianas.  | 53        |
| 1.2.- Cepas fúngicas.   | 53        |
| 2.- Medios de cultivo.  | 53        |
| 2.1.- Bacterias.  | 53        |
| 2.2.- Levaduras.  | 55        |
| 3.- Condiciones de cultivo.   | 56        |
| 4.- Plásmidos.  | 57        |
| 5.- Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). | 60        |
| 6.- Electroforesis de DNA.  | 61        |
| 7.- Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.             | 62        |
| 8.- Cuantificación de DNA.  | 62        |
| 9.- Digestión de DNA con enzimas de restricción.                                | 63        |
| 10.- Ligamiento de fragmentos de DNA.   | 64        |
| 11.- Transformación de <i>E. coli</i> .   | 65        |
| 11.1.- Obtención de células competentes.  | 65        |
| 11.2.- Transformación.  | 65        |
| 11.3.- Selección de transformantes.   | 65        |
| 11.4.- Análisis de transformantes.  | 66        |
| 12.- Purificación de DNA.   | 66        |
| 12.1.- Purificación de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .                       | 66        |
| 12.1.a.- Purificación a pequeña escala ("minipreps").                           | 66        |
| 12.1.b.- Purificación a gran escala ("maxipreps").                              | 67        |
| 12.1.c.- Purificación para secuenciación.                                       | 68        |



|  |    |
|--|----|
| 12.2.- Purificación de DNA cromosomal de levaduras.  | 68 |
| 12.2.a.- Purificación a pequeña escala.  | 68 |
| 12.2.b.- Purificación a gran escala.   | 69 |
| 13.- Marcaje no radiactivo de sondas de DNA.   | 70 |
| 14.- Transferencia de DNA a filtros de Nylon (Southern blot).  | 71 |
| 14.1.- Por capilaridad.  | 71 |
| 14.2.- Mediante vacío.   | 72 |
| 15.- Fijación de DNA a filtros de Nylon.   | 72 |
| 16.- Hibridación DNA/DNA y revelado.   | 73 |
| 16.1.- Prehibridación.   | 73 |
| 16.2.- Hibridación.  | 73 |
| 16.3.- Lavados.  | 74 |
| 16.4.- Revelado inmunológico.  | 74 |
| 17.- Purificación de RNA de levadura.  | 75 |
| 18.- Electroforesis de RNA.  | 77 |
| 19.- Transferencia de RNA a filtros de Nylon (Northern blot).  | 77 |
| 19.1.- Por capilaridad.  | 77 |
| 19.2.- Mediante vacío.   | 78 |
| 20.- Fijación de RNA a filtros de Nylon.   | 78 |
| 21.- Hibridación RNA/DNA y revelado.   | 79 |
| 21.1.- Prehibridación.   | 79 |
| 21.2.- Hibridación.  | 79 |
| 21.3.- Lavados.  | 80 |
| 21.4.- Revelado inmunológico.  | 80 |
| 22.- Secuenciación de DNA.   | 81 |
| 23.- Análisis de secuencias de DNA.  | 81 |
| 23.1.- Búsqueda en bases de datos.   | 81 |
| 23.2.- Cálculo de la divergencia entre dos secuencias de nucleótidos.                                      | 81 |
| 23.3.- Análisis del uso de codones en las secuencias nucleotídicas.  | 82 |
| 24.- Rastreo de una librería genómica.   | 82 |
| 25.- Interrupción génica en <i>C. albicans</i> .   | 83 |
| 25.1.- Técnica de interrupción secuencial de los dos alelos mediante el cassette <i>hisG::URA3::hisG</i> . | 83 |
| 25.2.- Técnica de obtención de un mutante nulo condicional a partir del mutante heterocigótico.            | 86 |





|   |           |
|---|-----------|
| 26.- Transformación de levaduras.   | 87        |
| 26.1.- Transformación rápida.   | 87        |
| 26.2.- Transformación mediante choque térmico.  | 88        |
| 26.3.- Selección de transformantes.   | 89        |
| 26.4.- Análisis de los transformantes.  | 89        |
| 26.4.a.- Transformación no integrativa.   | 89        |
| 1.- Comprobación de los marcadores genéticos.   | 89        |
| 2.- Test de estabilidad del plásmido.   | 89        |
| 26.4.b.- Transformación integrativa: análisis de la integración de DNA exógeno en el cromosoma.   | 90        |
| 27.- Determinación de la actividad invertasa.   | 90        |
| 28.- Determinación del porcentaje de supervivientes (viabilidad celular) en experimentos de estrés térmico.                                   | 92        |
| 28.1.- Medio de cultivo sólido.   | 92        |
| 28.2.- Medio de cultivo líquido.  | 92        |
| <br>  |           |
| <b>III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>   | <b>95</b> |
| <br>  |           |
| 1.- Aislamiento y caracterización del gen <i>UBI4</i> de <i>C. albicans</i> .   | 97        |
| 1.1.- Rastreo de una librería genómica empleando un cDNA de poliubiquitina como sonda.  | 97        |
| 1.2.- Análisis del DNA cromosomal de los clones aislados.   | 97        |
| 1.2.a.- Mapa de restricción de pPR1.  | 98        |
| 1.2.b.- Secuenciación del gen <i>UBI4</i> y análisis de la secuencia.   | 101       |
| 1.3.- Análisis mediante Northern blot de la expresión de <i>UBI4</i> en <i>C. albicans</i> .  | 108       |
| 1.3.a.- Transición morfológica levadura-micelio.  | 108       |
| 1.3.b.- Efecto del estrés nutricional.  | 110       |
| 1.3.c.- Efecto del estrés térmico.  | 111       |
| 1.4.- Caracterización funcional del gen <i>UBI4</i> de <i>C. albicans</i> : complementación del mutante <i>ubi4</i> de <i>S. cerevisiae</i> . | 112       |
| 1.5.- Estudio del promotor del gen <i>UBI4</i> : control de la producción de invertasa en <i>S. cerevisiae</i> .                              | 115       |
| 1.5.a.- Construcción del plásmido pINV4.  | 115       |
| 1.5.b.- Transformación de <i>S. cerevisiae</i> con pINV4 y análisis fenotípico de los transformantes: producción de invertasa extracelular.   | 117       |



|   |         |
|---|---------|
| 1.6.- Interrupción del gen <i>UBI4</i> en <i>C. albicans</i> .  | 124     |
| 1.6.A.- Interrupción secuencial mediante el "cassette"<br><i>hisG::URA3::hisG</i> .   | 124     |
| 1.- Construcción de los "cassettes" de interrupción.  | 125     |
| 2.- Transformación integrativa y análisis de los<br>transformantes.   | 127     |
| 1.6.B.- Obtención del mutante nulo condicional a partir del<br>heterocigótico <i>UBI4/Δubi4::hisG</i> .   | 133     |
| 1.- Construcción del "cassette" de integración a partir del<br>plásmido pCaDis.   | 134     |
| 2.- Transformación integrativa y aislamiento de los<br>transformantes.  | 136     |
| 3.- Análisis fenotípico del mutante nulo <i>ubi4</i> .  | 144     |
| 3.a.- Efecto del estrés térmico.  | 144     |
| 3.b.- Morfología celular y colonial.  | 147     |
| <br>2.- Aislamiento y caracterización del gen <i>UBI3</i> de <i>C. albicans</i> .   | <br>161 |
| 2.1.- Rastreo de una librería genómica empleando un cDNA de<br>poliubiquitina como sonda.   | 161     |
| 2.2.- Análisis del DNA cromosomal de los clones aislados.   | 161     |
| 2.2.a.- Mapa de restricción de pPR2.  | 161     |
| 2.2.b.- Secuenciación del gen <i>UBI3</i> y análisis de la secuencia.   | 162     |
| 2.2.c.- Distribución de los cambios nucleotídicos entre las<br>diferentes secuencias de ubiquitina de <i>UBI3</i> y <i>UBI4</i> .                 | 168     |
| 2.2.d.- Southern blot.  | 172     |
| 2.3.- Análisis mediante Northern blot de la expresión de <i>UBI3</i> en<br><i>C. albicans</i> .   | 174     |
| 2.3.a.- Transición morfológica levadura-micelio.  | 174     |
| 2.3.b.- Efecto del estrés nutricional.  | 176     |
| 2.3.c.- Efecto del estrés térmico.  | 176     |
| 2.4.- Caracterización funcional del gen <i>UBI3</i> de <i>C. albicans</i> :<br>complementación del mutante <i>ubi3</i> de <i>S. cerevisiae</i> .  | 178     |
| 2.5.- Estudio del promotor del gen <i>UBI3</i> : control de la producción de<br>invertasa en <i>S. cerevisiae</i> .                               | 180     |
| 2.5.a.- Construcción del plásmido pINV3.  | 181     |
| 2.5.b.- Transformación de <i>S. cerevisiae</i> con pINV3 y análisis<br>fenotípico de los transformantes: producción de invertasa<br>extracelular. | 182     |
| 2.6.- Interrupción del gen <i>UBI3</i> en <i>C. albicans</i> .  | 189     |
| 2.6.A.- Interrupción secuencial mediante el "cassette"<br><i>hisG::URA3::hisG</i> .   | 189     |
| 1.- Construcción de los "cassettes" de interrupción.  | 190     |



|  |            |
|--|------------|
| 2.- Transformación integrativa y análisis de los transformantes.                                     | 192        |
| 2.6.B.- Obtención del mutante nulo condicional a partir del heterocigótico <i>UBI3/Δubi3::hisG</i> . | 198        |
| 1.- Construcción del "cassette" de integración a partir del plásmido pCaDis.                         | 199        |
| 2.- Transformación integrativa y aislamiento de los transformantes.                                  | 200        |
| 3.- Análisis fenotípico del mutante nulo condicional.  | 203        |
| <br>   |            |
| <b>IV.- CONCLUSIONES</b>   | <b>209</b> |
| <br>   |            |
| <b>V.- REFERENCIAS</b>   | <b>215</b> |



## **I. INTRODUCCIÓN**





## 1.- BIOLOGÍA DE *Candida albicans*: ASPECTOS GENERALES.

El género *Candida* ha sido clasificado en el orden *Cryptococcales* perteneciente al grupo de los *Deuteromycetes* u hongos imperfectos. Dicho grupo comprende un importante conjunto de hongos en los que no se ha descrito fase sexual, reproduciéndose de modo asexual mediante la formación de conidios (Carile & Watkinson, 1994).

Unas 200 especies de levaduras se engloban dentro del género *Candida*; estas especies se dividen generalmente por gemación multilateral, creciendo habitualmente en forma de levadura (blastospora o blastoconidio) (Fig. I.1 A), aunque son capaces de formar pseudomicelio por gemación a partir de blastosporas, y algunas especies, como *Candida albicans*, bajo ciertas condiciones (temperatura, composición del medio, etc.) 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, 1985) (Fig. I.1 B). Las distintas especies difieren por su capacidad de asimilar distintos compuestos, por la formación de polisacáridos de las paredes celulares, y por la capacidad de presentar diferentes morfologías (Kurtz *et al.*, 1990a; Meyer *et al.*, 1984).

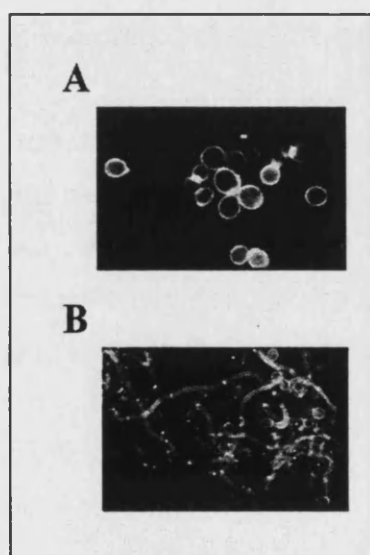


Fig. I.1. Morfología celular de *C. albicans*: levadura (A) y micelio (B).

La especie *C. albicans* se caracteriza, además de por su patrón de asimilación de azúcares, por la capacidad de formar verdaderos micelios y clamidosporas, esporas asexuales de forma redondeada generadas a partir del micelio bajo determinadas condiciones desfavorables (Ainsworth, 1961; Bakerspiegel & Burke, 1974; Poulain *et al.*, 1985). Esta especie tiene, por tanto, la capacidad de adoptar diferentes morfologías (levaduras que crecen por gemación, pseudomicelio, hifas septadas, clamidosporas), por lo que

*C. albicans* se considera actualmente un hongo polimórfico más que una especie dimórfica (Odds, 1994).

*C. albicans* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, hallándose frecuentemente como comensal inocuo en la piel, mucosa bucal, faríngea y vaginal, y en el tracto gastrointestinal del hombre y otros animales de sangre caliente. 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. Tradicionalmente se ha relacionado la forma de levadura con el estado saprofítico de *C. albicans* y la micelial con la forma patógena, debido a que en tejidos sanos se encuentran únicamente levaduras, mientras que en tejidos infectados, se observan además formas miceliales (Gow *et al.*, 1994; Odds, 1988, 1994; Poulain *et al.*, 1985).

### **1.1.- *C. albicans* como agente patógeno.**

#### **1.1.a.- Candidiasis.**

*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 saprofitos se conviertan en patógenos oportunistas, como: (i) el empleo de materiales terapéuticos y diagnósticos agresivos (catéteres, sondas, etc.) que favorecen la entrada del microorganismo; (ii) la utilización de antibióticos antibacterianos 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, sobretodo en pacientes con las defensas disminuidas; (iii) tratamientos inmunosupresores, como las terapias anticancerosas ó las que se aplican tras realizar trasplantes de órganos, y los tratamientos con corticosteroides. Por último, hay que mencionar que otras enfermedades subyacentes (como diabetes, enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal,

pancreatitis, quemaduras, etc.), así como el estado de inmunodepresión general inherente a ciertos cuadros clínicos y enfermedades (como el SIDA, hemopatías malignas, etc.), son factores que favorecen claramente la aparición de la candidiasis (Agabian *et al.*, 1994; Bodey, 1993; Dixon *et al.*, 1996; Kurtz *et al.*, 1990a; Odds, 1988).

Por lo tanto, la relación entre el hongo y los mecanismos de defensa del hospedador es crucial en el establecimiento de la candidiasis. De hecho la patogenicidad resulta esencialmente de las modificaciones en los mecanismos de defensa del hospedador que podrían inducir transformaciones en el comportamiento del hongo (Senet, 1996).

### **A. Tipos de candidiasis.**

Dependiendo de estas modificaciones del hospedador, *C. albicans* puede causar una gran variedad de infecciones, que abarcan desde candidiasis superficiales a graves infecciones sistémicas o invasivas. Los principales tipos de candidiasis se indican a continuación.

**1) Candidiasis superficiales.** El hongo coloniza fundamentalmente las mucosas del tracto gastrointestinal, vagina y cavidad oral, afectando, a veces, otras zonas, como las uñas o el cuero cabelludo. En ocasiones, estas infecciones se hacen crónicas, pero en la mayoría de los casos se pueden resolver con agentes antifúngicos. Aunque en el tracto gastrointestinal y en la vagina puede encontrarse *C. albicans* sin que exista ninguna patología, puede producirse una infección por trauma físico ó estrés fisiológico. La candidiasis intertriginosa, que aparece en pliegues y zonas de la piel sometidas al calor, humedad y roces, es la forma más frecuente de infección superficial (Bodey, 1993; Kurtz *et al.*, 1990a; Odds, 1988; Tsuboi *et al.*, 1994). La candidiasis oral (muguet) es más frecuente en el neonato, a consecuencia de una infección durante el parto, y en personas en etapas terminales de enfermedades debilitantes (cáncer, SIDA, etc.) (Dupont *et al.*, 1994; Odds, 1988). La candidiasis genital, que comprende un 20% de los casos de vaginitis, puede desencadenarse por el uso de antibióticos, que disminuyen la flora microbiana normal de la vagina, el embarazo, por una disminución del pH, la diabetes no controlada, por la alta concentración de azúcar, o los anticonceptivos orales, por su alto nivel de estrógenos (Bodey, 1993; Dixon *et al.*, 1996; Gentry & Price, 1985; Kurtz *et al.*, 1990a; Odds, 1988), y puede convertirse en recurrente produciéndose varios episodios al año (Fidel & Sobel, 1996). Por último, existe una forma de candidiasis mucocutánea crónica que afecta a uñas, boca, labios, cuero cabelludo etc., asociada a fallos en la inmunidad celular;

este tipo de infecciones son resistentes a tratamientos tópicos, aunque no tienen tendencia a provocar infección sistémica (Kurtz *et al.*, 1990a; Odds, 1988).

**2) Candidiasis sistémicas.** Se diagnostican cuando se encuentran microorganismos del género *Candida* en sangre, afectando o no a los tejidos, o cuando la infección se ha extendido y afecta a uno o varios órganos internos. Se presenta en individuos con las defensas naturales disminuidas por diferentes causas, o bien debilitados por otras enfermedades, tal como se ha indicado anteriormente (Bodey, 1993; Kurtz *et al.*, 1990a; Odds, 1988; Senet, 1997). Se pueden producir lesiones agudas o crónicas, localizadas o ampliamente diseminadas que pueden afectar a distintos órganos. Entre ellas destaca la candidiasis broncopulmonar, la endocarditis y miocarditis candidiásica, septicemias agudas, etc. Son enfermedades muy graves que representan una de las causas principales de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos (Dupont *et al.*, 1994; Meunier *et al.*, 1992; Pfaler, 1989, 1994; Walsh *et al.*, 1994).

### **B. Diagnóstico.**

Las infecciones fúngicas invasivas representan una de las causas principales de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos (Dupont *et al.*, 1994; Musial *et al.*, 1988; Walsh *et al.*, 1994). Un método rápido y preciso de identificación de hongos patógenos a nivel de especie es epidemiológicamente y clínicamente muy útil, particularmente en el caso de las candidiasis, la infección fúngica más frecuente en estos pacientes, ya que la patogenicidad y susceptibilidad antifúngica varía a menudo entre especies (Bodey, 1993; Meunier, 1989; Odds, 1988, 1992).

El diagnóstico de las candidiasis depende del tipo de infección de que se trate. La candidiasis superficial es fácil de diagnosticar por las manifestaciones clínicas de la infección, la observación al microscopio de la morfología, el cultivo en medio selectivo y la formación de tubo germinativo (micelio) y tests bioquímicos (Warren & Hazen, 1995). Sin embargo, las candidiasis sistémicas son más difíciles de diagnosticar, porque la mayoría de los pacientes no muestran manifestaciones clínicas específicas que hagan sospechar la existencia de una infección fúngica (Bodey, 1993; Hopwood & Warnock, 1986; Meunier, 1989; Musial *et al.*, 1988; Odds, 1979, 1988). El método de diagnóstico clásico consiste en demostrar la presencia del microorganismo en sangre mediante hemocultivo, pero es problemático por su baja

sensibilidad, y porque la presencia del microorganismo en sangre es transitoria; en cualquier caso, después del aislamiento del microorganismo mediante cultivo, es necesaria una identificación del mismo mediante varios métodos, como el test de germinación en suero y tests bioquímicos de asimilación de azúcares (Bodey, 1993; Meunier, 1989; Odds, 1988; Warren & Hazen, 1995). Alternativamente, los tests serológicos pueden ser útiles para el diagnóstico de candidiasis invasiva cuando los hemocultivos son negativos, aunque el diagnóstico basado en la detección de antígenos o anticuerpos en sangre presenta problemas de baja sensibilidad o baja especificidad (De Repentigny *et al.*, 1994; Pontón, 1996). En algunos casos, se puede realizar una identificación mediante observación al microscopio de la muestra patológica mediante técnicas de inmunofluorescencia empleando anticuerpos monoclonales que incrementan la sensibilidad (Pontón *et al.*, 1993; Pontón, 1996; Regúlez *et al.*, 1992). El empleo de dichas técnicas con anticuerpos específicos puede permitir además una identificación rápida de aislados clínicos de distintas especies del género *Candida*, como es el caso de *C. dubliniensis* (Bikandi *et al.*, 1998).

El creciente conocimiento de la genética molecular de *C. albicans* y la necesidad de un rápido método de diagnóstico han permitido el uso de técnicas de biología molecular para identificar especies de *Candida*. Desde la primera descripción de un método molecular para la identificación rápida de *C. albicans*, las técnicas de PCR han sido ampliamente utilizadas para detectar e identificar especies de *Candida*, así como otros hongos de importancia médica, empleando distintos genes (rRNAs, aspartil proteinasas, hsp90, actina, factor de elongación EF-1 $\beta$ , etc.) como dianas para la amplificación (Buchman *et al.*, 1990; Donnelly *et al.*, 1999; Maneu *et al.*, 2000a; Mitchell *et al.*, 1994).

### C. Tratamiento.

Las células fúngicas y las de mamífero presentan una gran similitud en su organización subcelular y molecular, lo que ha determinado que hasta el momento actual no se disponga de antifúngicos que actúen selectivamente sobre el hongo y presenten baja o nula toxicidad para el hospedador, y que además no induzcan la aparición de resistencias. Hay dos limitaciones importantes en el desarrollo de fármacos antifúngicos: (i) el limitado conocimiento de características biológicas específicas de la célula fúngica, y (ii) la carencia de información sobre los mecanismos moleculares básicos responsables de la virulencia de las especies patógenas (Gozalbo *et al.*, 1993). Por lo tanto, el desarrollo de fármacos

antifúngicos efectivos está limitado por la falta de dianas específicas, siendo la búsqueda de dianas potenciales para nuevos antifúngicos un campo de gran interés (García-Bustos *et al.*, 1998; Gozalbo *et al.*, 1993).

En la actualidad hay varios grupos de drogas que se utilizan en la terapia antifúngica por presentar relativa especificidad por las células fúngicas. Según el mecanismo de acción molecular podemos distinguir los siguientes grupos:

1. Antibióticos macrólidos poliénicos (Nistatina y Anfotericina B), que actúan sobre los esteroides de la membrana plasmática formando poros hidrofílicos por los que sale el material citoplasmático (protones) provocando la muerte celular (Kerridge, 1988a; Kurtz *et al.*, 1990a). Aunque los esteroides mayoritariamente presentes en la membrana plasmática de las células de mamíferos son diferentes de los de las células fúngicas, esta diferencia en la composición de esteroides no es absoluta, por lo que los polienos utilizados en clínica, que son muy activos frente a *C. albicans* y otros muchos hongos, tienen el inconveniente de que son tóxicos para las células del hospedador aunque se utilicen a bajas dosis. A pesar de su amplio uso, la aparición de resistencias es un fenómeno poco frecuente (Kerridge, 1988b; Vanden Bossche *et al.*, 1994).
2. La Flucitosina (5-fluorocitosina), que es el único compuesto inhibidor de la biosíntesis de macromoléculas que se emplea como antifúngico frente a *C. albicans* y otras levaduras. Este compuesto es transportado al interior de las células mediante una citosín-permeasa, y por acción de una citosín-desaminasa se transforma en su metabolito activo (5-fluorouracilo) que actúa impidiendo la biosíntesis de DNA (Polak, 1990; Vanden Bossche *et al.*, 1987, 1994). Al no existir actividad citosín-desaminasa en células de mamífero, este compuesto no presenta problemas de toxicidad, sin embargo, la aparición de resistencias compromete su utilidad clínica (Kurtz *et al.*, 1990a).
3. Los imidazoles y triazoles (Ketoconazol, Fluconazol, Miconazol, etc.), que interaccionan con el citocromo P450 interfiriendo en la biosíntesis de ergosterol, principal esteroide en hongos patógenos, y producen alteraciones en la estructura y función de la membrana plasmática (Kurtz *et al.*, 1990a); la aparición de cepas de *C. albicans* resistentes limita su uso clínico. Aunque su toxicidad relativa no es elevada, también originan la aparición de resistencias en cepas de *C. albicans* y otras especies (Odds, 1993; Vanden Bossche *et al.*, 1994). Las alil-aminas, otros

inhibidores de la biosíntesis de ergosterol a nivel de la esqualeno epoxidasa (Naftifina, Terbinafina, Tolnaftato, etc.), no son efectivos frente a las candidiasis probablemente por su dificultad para atravesar la membrana plasmática (Ryder *et al.*, 1986, 1992; Vanden Bossche *et al.*, 1994).

4. La Griseofulvina, que es el único compuesto de los que interfieren en la formación de microtúbulos que se emplea en clínica como antifúngico. El espectro de acción de esta droga es bastante limitado, habiendo especies resistentes, como *C. albicans*, por la falta de sistemas de transporte adecuados (Polak, 1990).

#### 1.1.b.- Factores de virulencia.

No existe un único factor responsable de la virulencia de *C. albicans*, sino que es la combinación de múltiples factores lo que la determina (Cutler, 1991; Hostetter, 1994; Odds, 1994). Las infecciones por *Candida* aparecen tras varias etapas secuenciales temporalmente. La adhesión a la superficie de los epitelios inicia el proceso, y la colonización de ésta, es la segunda etapa. Los factores fúngicos y del hospedador implicados en estas etapas, probablemente no son los mismos que los requeridos para la penetración de las superficies epiteliales. Esta penetración marca, en muchos casos, el límite del proceso infeccioso ( dando como resultado infecciones superficiales), ya que *C. albicans* normalmente no es capaz de proseguir el proceso invasivo en hospedadores inmunológicamente sanos. No obstante, en situaciones en las que el hongo es capaz de alcanzar la sangre, debe necesariamente expresar factores que lo protejan contra las defensas celulares del hospedador y contra los inhibidores fúngicos del plasma. Para causar una infección diseminada, las células fúngicas deben expresar los factores necesarios para atravesar los endotelios e invadir los tejidos (Agabian *et al.*, 1994).

Los factores de virulencia incluyen tanto la capacidad del hongo para provocar una infección (adherencia a epitelios y endotelios, penetración a través de los tejidos, etc.) como la respuesta del hospedador ante la invasión fúngica. En el caso de *C. albicans*, podemos clasificar los factores de virulencia más importantes en varios grupos: dimorfismo, adhesión, secreción de enzimas hidrolíticos, producción de una proteína ISM, y variación fenotípica.

## 1.- Dimorfismo.

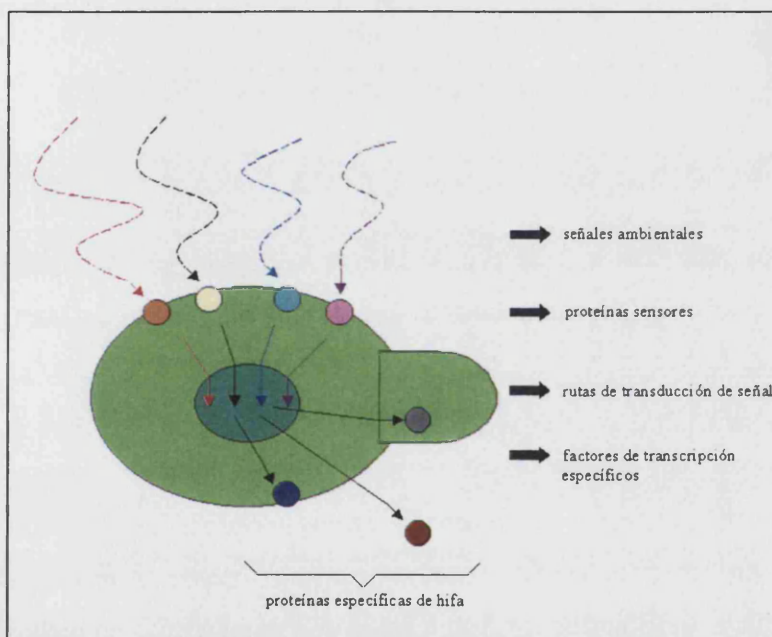
*C. albicans* presenta dos morfologías principales: puede crecer en forma de levaduras unicelulares que se dividen por gemación (Fig. I.1 A), o formar hifas septadas que originan un micelio (Fig. I.1 B). La transición morfológica levadura-micelio depende de factores ambientales (como el pH, la temperatura, la fuente de carbono, la hemina y otros), y se inicia mediante la formación del tubo germinativo a partir de las levaduras (Buffo *et al.*, 1984; Casanova *et al.*, 1997; Odds, 1988; Simoneti *et al.*, 1974; Soll, 1990). Se ha propuesto que dicha transición morfológica contribuye a la virulencia de este organismo, puesto que la forma micelial podría estar mejor adaptada que las levaduras para la adhesión y penetración de las capas epiteliales (Calderone., 1993; Gow *et al.*, 1994; Kretschmar *et al.*, 1999), aunque no existe una demostración inequívoca. En los tejidos infectados se pueden encontrar tanto levaduras como micelio y pseudomicelio y, además, algunos mutantes monomórficos parecen ser virulentos, lo que sugiere que la morfogénesis no es crítica para la virulencia de *C. albicans* (Odds, 1988). No obstante, también se ha descrito que mutantes monomórficos incapaces de miceliar son menos virulentos, lo que apoyaría la idea de la implicación de la transición levadura-micelio en la virulencia (Lo *et al.*, 1997; Sobel *et al.*, 1984; Soll, 1990). Estos datos confirman el carácter multifactorial de la virulencia de *C. albicans*.

En este contexto, la forma micelial parece tener un mayor carácter invasivo por varias causas como: (i) su mayor facilidad para penetrar en los tejidos; las hifas de *C. albicans* son tigmotrópicas, teniendo facilidad para penetrar las fisuras de las capas epiteliales, lo que sugiere que el dimorfismo aumenta la virulencia al favorecer ciertas etapas del proceso infectivo (Gow *et al.*, 1994; Sherwood *et al.*, 1992); por ejemplo durante la transición de infecciones superficiales a otras más profundas, la capacidad de penetración de las hifas podría ser importante para atravesar barreras epiteliales; (ii) una mayor resistencia de los filamentos miceliales a la fagocitosis, principalmente por impedimentos de tipo estérico, y (iii) cambios en las propiedades superficiales en las células miceliales, que aumentan el grado de adherencia de las células de *C. albicans* a las del huésped (Chaffin *et al.*, 1998; Kimura & Pearsall, 1980).

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 levadura-micelio en *C. albicans* es un proceso multifactorial cuya regulación no está todavía claramente determinada. Numerosas señales ambientales inducen



dicha transición morfológica. El desarrollo de las hifas a partir de las levaduras depende de dos factores: (i) la naturaleza, número e intensidad de estas señales ambientales, y (ii) la actividad de las rutas de transducción de señal, que incluyen factores de transcripción específicos (maquinaria de respuesta celular). De acuerdo con los modelos actuales (Fig. I.2), los factores ambientales activan a través de proteínas sensores diferentes rutas de transducción de señal. Estos sistemas de transducción de señal pueden converger en factores de transcripción distintos o idénticos que regulan la expresión de genes diana responsables de la transición morfológica (Ernst, 2000).



**Fig. I.2.** Esquema de la inducción de la formación de hifas. Diversos factores ambientales activan, a través de proteínas sensoras, diferentes rutas de transducción de señal 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 la hifa (Ernst, 2000).

La mayor parte de las señales ambientales convergen en dos rutas paralelas de transducción de señal, definidas por los factores de transcripción Efg1p y Cph1p. La inactivación de ambos factores bloquea el desarrollo de las hifas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Leng *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 1997). En *C. albicans* la actividad de Cph1p está bajo el control de la ruta de transducción de señal dependiente de la MAP quinasa (Csank *et al.*, 1997; Köhler & Fink, 1996; Leberer *et al.*, 1996). La ruta regulada por Efg1p es, probablemente, la más importante en la activación del desarrollo de las hifas ya que mutantes nulos *efg1* muestran mayores alteraciones en la formación de hifas que los mutantes nulos *cph1* (Lo *et al.*, 1997). Efg1p parece estar regulada por el sistema de transducción de señal mediado por cAMP en *C. albicans* (Brown & Gow, 1999; Ernst, 2000; Leng *et al.*, 2000).

La expresión diferencial de genes inducida por los sistemas de transducción de señal que activan la formación de hifas, es responsable de cambios en el ciclo de división celular y de cambios en la composición y organización de la pared celular fúngica, que originan el cambio morfológico. No obstante, muchos de los cambios en la expresión génica que acompañan al proceso de transición morfológica no están relacionados con el control de dicho proceso, sino con la respuesta o adaptación de la célula a los cambios ambientales que lo inducen (Gow *et al.*, 1995). En cualquier caso, las modificaciones que se producen en la pared celular durante la transición morfológica, confieren características particulares (adhesión, hidrofobicidad, etc.) a las hifas que pueden ser responsables de una mayor virulencia (Cannon *et al.*, 1994; Chaffin *et al.*, 1998; Soll, 1990).

## **2.- Adhesión.**

*C. albicans* es capaz de adherirse a células epiteliales y endoteliales, a la matriz extracelular, y a materiales inertes como prótesis, catéteres, etc. (Calderone & Braun, 1991; Chaffin *et al.*, 1998; Fukazawa & Kagaya, 1997; Klotz, 1994). Puesto que la pared celular es su estructura más externa, las interacciones fisicoquímicas responsables de la adhesión al hospedador tienen lugar a través de moléculas de la pared celular fúngica. Aunque componentes de la pared celular como la quitina,  $\beta$ -glucanos y lípidos pueden intervenir en el fenómeno de adhesión, son las proteínas y manoproteínas que forman parte de la superficie celular, las moléculas que tienen una función preponderante en la adhesión; a dichos componentes se les ha denominado genéricamente como "adhesinas" (Calderone, 1993; Chaffin *et al.*, 1998; Hostetter, 1994). Los tipos de interacción hongo/hospedador son muy variados (proteína/proteína, proteína/azúcar, proteína/glucoesfingolípidos, carbohidrato/proteína, etc.), y la expresión de factores de adhesión dependen tanto de la cepa estudiada, como de las condiciones ambientales. Esto, unido al hecho de que algunos de los receptores presentan la capacidad de unir distintos ligandos, hace que, en ocasiones, los resultados descritos por distintos grupos no coincidan. A continuación se citan los principales tipos de interacción implicados en la adhesión.

**1) Adhesión a proteínas séricas.** *C. albicans* se une *in vitro* a distintas proteínas séricas, entre las que se encuentran la **albúmina, transferrina, fibrinógeno y componentes del complemento** (Chaffin *et al.*, 1998; Page & Odds, 1988). La interacción con el

**fibrinógeno** es mayor en los tubos germinativos cortos y las hifas maduras de *C. albicans* y está mediada por distintas manoproteínas de la superficie del hongo (68, 60 kDa), las cuales también interaccionan con otros ligandos (laminina, C3d), sugiriéndose que un mismo receptor puede ser capaz de unirse a distintos ligandos así como su relación con las integrinas ( $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ) de mamífero (Chaffin *et al.*, 1998; Hynes, 1992). Las levaduras también se unen al fibrinógeno, habiéndose caracterizado una manoproteína de 58 kDa (mp58), presente en células levaduriformes y miceliales, como otro posible receptor específico del ligando en *C. albicans* (Casanova *et al.*, 1992; López-Ribot *et al.*, 1995); dicho receptor también se expresa *in vivo* en tejidos infectados, lo que apoya la idea de su implicación en la interacción con el hospedador (Chaffin *et al.*, 1998; López-Ribot *et al.*, 1996). Además se ha demostrado la presencia, tanto en células levaduriformes como miceliales de *C. albicans*, de proteínas de unión a componentes del complemento (**fragmentos C3d e iC3d**); dichos receptores se expresan *in vivo* y aunque su participación en virulencia ha sido demostrada, los mecanismos responsables no están determinados (Edwards *et al.*, 1986; Gilmore *et al.*, 1988; Heidenreich & Dierich, 1985; Kanbe *et al.*, 1991).

**2) Adhesión a proteínas de la matriz extracelular.** *C. albicans* también presenta la capacidad de unirse a componentes de la matriz extracelular de mamífero (**laminina, fibronectina, vitronectina, entactina, colágeno**). Se han escrito varios receptores fúngicos para la **laminina**: una proteína de 37 kDa y la enzima glicolítica GAPDH, que también se localiza en la superficie del hongo (Bouchara *et al.*, 1990; Casanova *et al.*, 1992; Gil-Navarro *et al.*, 1997; Glee *et al.*, 1996; Gozalbo *et al.*, 1998; López-Ribot *et al.*, 1994). Otra proteína a la que se adhiere *C. albicans*, es la **fibronectina**, habiéndose identificado numerosos receptores en *C. albicans* para dicho ligando (Klotz, 1987; Klotz *et al.*, 1983; Scheld *et al.*, 1985; Skerl *et al.*, 1984). *C. albicans* también es capaz de unirse a la **vitronectina**, proteína con la que las células fúngicas interaccionan mediante receptores proteicos y carbohidratos como el glucano (Jakab *et al.*, 1993; Limper & Standing, 1994; Olson *et al.*, 1996). Esta proteína se adsorbe a biomateriales, por lo que podría ser la responsable de la unión de *C. albicans* a catéteres de plástico y prótesis (Jakab *et al.*, 1993). Células levaduriformes y miceliales de *C. albicans*, también se unen a la **entactina** (López-Ribot & Chaffin, 1994). El **colágeno** también es susceptible de ser fijado por *C. albicans*, describiéndose su unión a colágeno de tipo I y IV (Klotz, 1990; Koltz & Smith, 1995), aunque aún no se han identificado los receptores fúngicos implicados en esta interacción (Chaffin *et al.*, 1998).

Muchos de los ligandos reconocidos por receptores fúngicos contienen el motivo con la secuencia RGD (arginina-glicina-aspártico), que puede ser la diana reconocida por los receptores fúngicos, aunque no todas las adhesinas reconocen estos dominios de los ligandos (Ruoslahti & Pierschbacher, 1987). Por lo tanto, las adhesinas de *C. albicans* presentan ciertas similitudes, en cuanto a su estructura y función, con las integrinas de mamífero, habiéndose sugerido un modelo evolutivo para explicar su origen (Annaix *et al.*, 1990; Chaffin *et al.*, 1998; Hostetter, 1994, 1999; Hynes, 1992). La expresión de dichas adhesinas depende de factores ambientales, y en algunos casos está asociada a la transición morfológica, por lo que su función en adhesión, virulencia y dimorfismo es difícil de discernir. No obstante, se ha descrito una integrina (adhesina) en *C. albicans* implicada en virulencia, adhesión y transición morfológica, lo que indica una estrecha relación entre estos fenómenos (Gale *et al.*, 1998).

Por otro lado, la presencia de subunidades de ubiquitina en receptores fúngicos para ligandos del hospedador (laminina, fibrinógeno, componentes del complemento) puede participar en la modulación de la funcionalidad de los mismos, tal como se ha descrito en receptores superficiales en células de mamífero (Ciechanover, 1994; Hicke & Riezman, 1996; Kölling & Hollenberg, 1994; Paolini & Kinet, 1993; Roth & Davis, 1996; Sepúlveda *et al.*, 1996a,b; Shih *et al.*, 2000).

### **3) Otros factores de adhesión.**

**Mananos.** El manano, parte azucarada de las manoproteínas de la pared celular, también está implicado en la adhesión al hospedador, habiéndose descrito algunos dominios oligosacáridicos responsables de la interacción con algunas células (epitelios, macrófagos, etc.) del hospedador (Chaffin *et al.*, 1993; Kanbe *et al.*, 1993; Li & Cutler, 1993). Es el caso de los oligosacáridos del receptor manoproteico de 58 kDa para el fibrinógeno, que están implicados en la unión al ligando (Casanova *et al.*, 1992).

**Proteínas hidrofóbicas.** Las interacciones hidrofóbicas entre la superficie celular de *C. albicans* y las células epiteliales humanas, y también el material plástico utilizado en clínica, contribuyen a la adherencia, favoreciendo el contacto adhesina-ligando entre el parásito y la superficie celular, así como la entrada del hongo a regiones internas del hospedador (sondas, catéteres, etc). Además, esta hidrofobicidad de la superficie celular ayuda al parásito a evadir la acción de las células fagocitarias del hospedador y a favorecer la captación de algunas sustancias del medio (Braun, 1994; Chaffin *et al.*, 1998; Ener & Douglas, 1992; Hazen, 1989, 1990; Hazen *et al.*, 1991; Hazen & Hazen, 1988; Hazen &

LeMelle, 1990; Klotz & Penn, 1987; Macura, 1987; Vespa *et al.*, 1995). En las propiedades hidrofóbicas de levaduras y micelios influyen diferentes proteínas de la pared celular, aunque los micelios son invariablemente hidrofóbicos independientemente del carácter de las levaduras de las que procedan, lo que concuerda con el hecho de que los componentes hidrofóbicos son más abundantes en los extractos de pared de tubos germinativos que en los de levadura (Hazen, 1990; Hazen *et al.*, 1988; Hazen & Hazen, 1987, 1988; López-Ribot *et al.*, 1991, 1994). Las proteínas menores de 50 kDa suelen ser hidrofóbicas, mientras que las hidrofílicas suelen superar los 90 kDa (Hazen & Hazen, 1992, 1993), debido posiblemente a una diferente glicosilación (Hazen & Glee, 1994). Además las células hidrofílicas presentan diferencias estructurales con las hidrofóbicas, ya que poseen una capa de fibrillas densa, compuesta de manoproteínas de alto peso molecular fundamentalmente (Hazen & Hazen, 1992). El paso de una superficie hidrofílica a una hidrofóbica podría deberse a cambios en la longitud y concentración de las estas fibrillas presentes en la capa externa de la pared de la célula, o a modificaciones en los niveles de glicosilación de las manoproteínas de la pared celular (Hazen & Hazen, 1992, 1993; Hazen & Glee, 1994). También se ha descrito que las proteínas hidrofóbicas presentan adherencia al plástico y a ligandos del hospedador, como la laminina, el fibrinógeno, la fibronectina, y el colágeno de tipo IV (Chaffin *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 1995), lo que facilita la interacción de las células hidrofóbicas con el hospedador, y puede explicar, en parte, el mayor carácter virulento de las células miceliales.

**Fimbrias.** Son apéndices filamentosos largos presentes en la superficie celular de *C. albicans*, formados por una glicoproteína de 66 kDa que presentan la capacidad de unirse a células epiteliales bucales del hospedador; dicha glicoproteína parece reconocer específicamente ligandos glicolipídicos del hospedador (Jiménez-Lucho *et al.*, 1990; Yu *et al.*, 1994a,b).

**Proteínas de unión a material plástico.** La capacidad que presenta *C. albicans* para adherirse a materiales clínicos de plástico, como son los catéteres, prótesis, etc., contribuye a la aparición de muchas infecciones nosocomiales. Tras la adhesión, el microorganismo puede formar biofilms que favorecen o inician la aparición de infecciones diseminadas. Se han descrito numerosas especies proteicas y manoproteicas implicadas en la adhesión a material plástico, cuya expresión depende de múltiples factores ambientales (Chaffin *et al.*, 1998).

**Lectinas.** Son manoproteínas de la superficie celular de *C. albicans* que interaccionan con carbohidratos específicos (L-fucosa, N-acetilglucosamina) de las células

epiteliales del hospedador (interacción proteína/carbohidrato), siendo responsables en gran medida de la adhesión a células del epitelio bucal y vaginal. La expresión de dichas lectinas parece depender también de condiciones ambientales, como la fuente de carbono. La unión de *C. albicans* a los eritrocitos, mediada por lectinas fúngicas, puede estar implicada en la adquisición de hierro (Brassart *et al.*, 1991; Cameron & Douglas, 1996; Tosh & Douglas, 1992).

**Aglutininas.** Se han identificado genes de *C. albicans* que presentan homología con genes de aglutininas fúngicas, cuyos productos génicos podrían estar implicados en la interacción hongo-hospedador (Chaffin *et al.*, 1998; Hoyer *et al.*, 1995).

**Adherencia a proteínas salivares, *Streptococcus sp.* y otras bacterias.** *C. albicans* como comensal de la cavidad oral, se adhiere, además de al epitelio bucal, a proteínas salivares y a bacterias de este hábitat (*Streptococcus*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, etc.) para prevenir el aclaramiento por la acción limpiadora de la saliva (Chaffin *et al.*, 1998).

### **3.- Secreción de enzimas hidrolíticas.**

Los enzimas extracelulares son secretados al exterior de la célula donde se encuentran sus substratos. Cuando la acción de estos enzimas afecta a la función y viabilidad del hospedador, los enzimas se consideran factores de virulencia que contribuyen al establecimiento de la infección, puesto que facilitan la progresión fúngica (Chaffin *et al.*, 1998).

**1) Proteasa ácida.** La actividad proteolítica extracelular de *C. albicans* es debida a los enzimas aspartil-proteasas (Saps: secreted aspartyl proteinases). La secreción de estos enzimas aumenta la capacidad del microorganismo de colonizar y penetrar tejidos del hospedador y de evadir la respuesta inmune de éste. Existe una correlación entre la virulencia y los niveles secretados de estos enzimas en cepas de *C. albicans* (De Bernardis *et al.*, 1990; Ghannoum & Abu-Elteen, 1986; Kwong-Chung *et al.*, 1985; McDonald & Odds, 1983; Ross *et al.*, 1990), y además cepas no productoras de Saps son menos virulentas (Kwong-Chung *et al.*, 1985; McDonald, 1984; McDonald & Odds, 1983). Estos enzimas degradan proteínas defensivas del hospedador (inmunoglobulinas, complemento), y pueden hidrolizar mucina, lo que facilitaría la penetración del hongo a través de la mucosa gastrointestinal (Colina *et al.*, 1996; Kaminishi *et al.*, 1995; Rùchel, 1986; Rùchel *et al.*, 1992). Se ha comprobado, además,

que inhibidores de estas enzimas inhiben la unión a células endoteliales (Frey *et al.*, 1990; Ray & Paine, 1988). Esta actividad proteolítica de *C. albicans* se asocia a una carboxilproteínasa ácida de 42-45 kDa, con gran variedad de sustratos, siendo activa a un pH óptimo de 2,5 a 4,5 (Chaffin *et al.*, 1998; Douglas, 1988; Rùchel *et al.*, 1992). Se han clonado y caracterizado nueve genes (*SAP*) que codifican Saps en *C. albicans*, y se ha demostrado que mutantes nulos en estos genes muestran una disminución en la virulencia en modelos animales de candidiasis diseminada, lo que aporta más evidencias de su implicación en la virulencia de *C. albicans* (Hube *et al.*, 1997; Krestchmar, *et al.*, 1999; Sanglard *et al.*, 1997).

**2) Fosfolipasas.** Son otras enzimas hidrolíticas extracelulares implicadas en la patogénesis de *C. albicans*. Se ha demostrado una mayor actividad fosfolipasa en aislados clínicos de *C. albicans* que en aislados de levaduras comensales. Aislados con gran actividad de este enzima son invasivos en un modelo animal de candidiasis, mientras que los que presentan baja actividad de esta proteína no lo son, correlacionándose los niveles de actividad fosfolipasa con la mortalidad (Chaffin *et al.*, 1998; Ibrahim *et al.*, 1995).

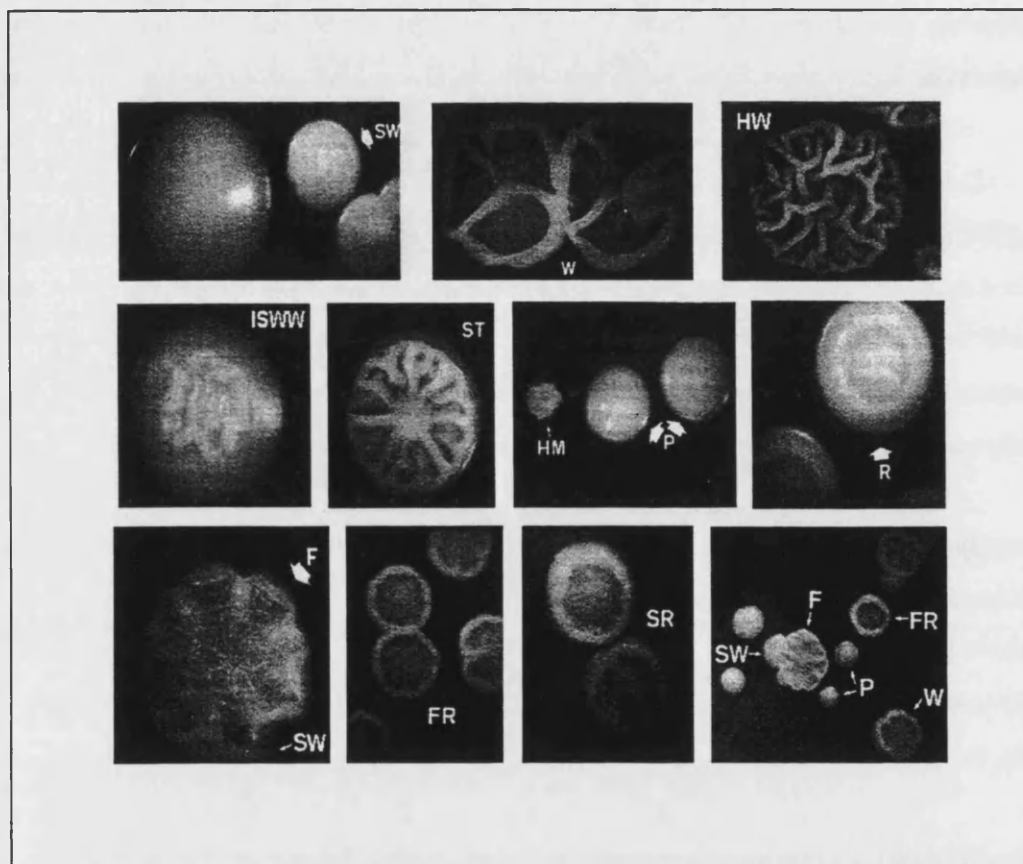
**3) Otras enzimas extracelulares con actividad hidrolítica.** Se ha sugerido la posible implicación de otras enzimas extracelulares hidrolíticas, como son la esterasa (Tsuboi *et al.*, 1996), la glucoamilasa (Cohen *et al.*, 1986), la fosfatasa ácida (Odds, 1988; Shepherd *et al.*, 1985) y el factor hemolítico (Bullen, 1981; Manns *et al.*, 1994; Otto *et al.*, 1992; Weinberg, 1978), en la virulencia de *C. albicans*, aunque aún no se ha demostrado (Chaffin *et al.*, 1998).

#### **4.- Proteína inmunosupresora y mitogénica de células B (ISM).**

A partir del sobrenadante de cultivos de *C. albicans* se ha purificado una proteína de unos 43 kDa, relacionada con la virulencia, ya que (i) el tratamiento de ratones con esta proteína, facilita el desarrollo de las candidiasis, (ii) la pérdida de la capacidad de producirla conlleva a la pérdida de la virulencia de la cepa, y (iii) la inmunización con ella protege completamente a los ratones frente a la infección (Tavares *et al.*, 1993, 1995). Proteínas ISM se han descrito también en virus y bacterias y son factores de virulencia por su efecto inmunosupresor como consecuencia de una sobreestimulación de las células B (Martínez *et al.*, 1998).

### 5.- Cambio fenotípico o "switching".

Muchas cepas de *C. albicans* son capaces de cambiar de manera espontánea, reversible y a alta frecuencia entre diferentes fenotipos distinguibles por la morfología colonial (Fig. I.3), fenómeno denominado "switching" (Soll *et al.*, 1993).



**Fig. I.3.** Diferentes fenotipos coloniales presentados por la cepa de *C. albicans* ATCC 26555. SW (smooth-white), W (wrinkled), HW (hyper-wrinkled), ISWW (intermediate smooth-white-wrinkled), ST (star), HM (heavy-myceliated), P (smooth-white-petite), R (ring), F (fuzzy), FR (flat-ring), SR (stippled-ring); (Martínez *et al.*, 1990).

El "switching" en *C. albicans* es pleiotrópico, afectando a diferentes parámetros morfológicos y fisiológicos. Diferentes cepas pueden presentar un repertorio de morfologías coloniales distintas, pero las características básicas del "switching" son similares en cada



caso. Algunos de los sistemas de "switching" descritos son: 1) la transición liso (S: smooth)-rugoso (R: rough), 2) el "switching" tipo 3153A, que incluye siete morfologías coloniales, 3) la transición liso (S: smooth)-micelio denso (HM: heavy myceliated), y 4) la transición blanca (W: white)-opaca (O: opaque) (Soll *et al.*, 1993). Las morfologías coloniales pueden variar tanto que pueden dar la impresión de que pertenecen a diferentes cepas o incluso a diferentes especies. Una misma cepa puede generar ocho o más tipos de colonias cuya morfología es heredable e interconvertible (Slutsky *et al.*, 1985, 1987). La morfología colonial refleja cambios espaciales en la proporción de células en forma de levadura, hifa o pseudohifa en diferentes partes de la colonia. Estos patrones espaciales de células con diferente forma generan diferentes morfologías coloniales (smooth, wrinkled, fuzzy, stippled, ring, star, fried-egg, etc.). En la transición white-opaque de la cepa WO-1, las células de las regiones "opaque" son más grandes, alargadas y tienen una especie de protuberancias granuladas distribuidas a lo largo de la superficie celular, mientras que las de las regiones "white" son levaduras con forma esférica normal, y ambos tipos varían además en muchas otras propiedades bioquímicas (Soll, 1992).

El cambio fenotípico o "switching" afecta a la antigenicidad, morfología y tamaño celular, adhesión, secreción de proteasa ácida, sensibilidad a las drogas, etc., lo que puede proporcionar a las células una variabilidad análoga a la recombinación en una población que posee ciclo sexual (Soll, 1990, 1992, 1997; Soll *et al.*, 1993). El "switching fenotípico" debe distinguirse de la transición levadura-micelio porque ocurre de manera espontánea, reversible, interconvertible, y a bajas frecuencias, se identifica por variaciones en la morfología de las colonias, es heredable y en muchos casos implica más de dos morfologías diferentes (Soll *et al.*, 1993). *C. albicans* no tiene ciclo sexual conocido, por lo que carece de la variabilidad que proporciona la meiosis. Debido a ello, la capacidad que posee para cambiar entre diferentes fenotipos es un camino alternativo para obtener la variabilidad necesaria para adaptarse a cambios ambientales, lo que podría considerarse como un factor de virulencia. El "switching" podría jugar, por lo tanto, un papel importante en la manifestación del carácter patógeno, al conferir a la célula la capacidad para, (i) desarrollar resistencia a los agentes antifúngicos, (ii) invadir nuevos tejidos o localizaciones en el individuo infectado, (iii) detectar cambios desfavorables en las condiciones ambientales del organismo afectado, y (iv) evadir la acción del sistema inmunitario, al inducir cambios en la composición antigénica, probablemente a nivel de la superficie (pared) celular (Pérez-Martín *et al.*, 1999; Soll, 1992, 1997; Soll *et al.*, 1993). A partir de una única célula *C. albicans* tiene la capacidad de generar diferentes

variantes fenotípicas en pocas generaciones. La resultante heterogeneidad de la población es adecuada para cambios ambientales bruscos: si unas pocas células de la población presentan el fenotipo necesario para la supervivencia, pueden proliferar y a la vez regenerar de nuevo una población diversa.

La frecuencia de "switching" entre una forma colonial y otra, es muy alta ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  por generación), y puede aumentar por radiación UV y temperatura. Se desconoce el mecanismo molecular subyacente responsable del fenómeno del "switching" en *C. albicans*. Este fenómeno no puede explicarse por recombinación meiótica, pues *C. albicans*, siendo diploide, carece de ciclo sexual conocido. La alta frecuencia de reversión, la existencia de múltiples fenotipos y la alta frecuencia de interconversión con la que las colonias cambian de un fenotipo a otro, observadas en los sistemas de "switching" de *C. albicans*, descartan mecanismos normales de mutación y de recombinación mitótica (Gow, 1994; Soll, 1992). Deben existir, por lo tanto, unos mecanismos genéticos que le proporcionen a la célula un nivel de variación fenotípica elevado (Soll, 1990). Se han postulado varias hipótesis que implican fenómenos de transposición reversible o reordenamientos genómicos que producen cambios electroforéticos en el cariotipo; dichos cambios están asociados con variantes morfológicas coloniales (Chen & Fonzi, 1992; Cutler *et al.*, 1988; Iwaguchi *et al.*, 1992; Lasker *et al.*, 1991, 1992; Rustchenko-Bulgac & Howard, 1993; Sadhu *et al.*, 1991; Scherer & Magee, 1990; Scherer & Stevens, 1988; Suzuki *et al.*, 1989). Sin embargo, ni la recombinación entre secuencias repetidas ni la inestabilidad cromosómica, parecen ser el mecanismo regulador del "switching fenotípico" (Gow, 1994; Soll, 1990). Una hipótesis más reciente indica que el "switching" en *C. albicans* podría estar controlado de manera similar a los genes que controlan el tipo sexual en *S. cerevisiae*, de manera que los genes que controlan la morfología colonial estarían localizados en posiciones cromosómicas que pueden existir en dos estados alternativos: estado silencioso y estado activo, dependiendo de la estructura de la cromatina. La transición entre los dos estados parece depender de los genes *SIR* (silent information regulator), que se requieren para establecer el estado silencioso (Loo & Rine, 1994; Ramsey *et al.*, 1994). Recientemente se ha clonado y caracterizado el gen *SIR2* de *C. albicans*, y se ha descrito que mutantes nulos en dicho gen presentan niveles anormalmente elevados de variación morfológica colonial y de cambios en el cariotipo, lo que indica que la frecuencia de "switching" en *C. albicans* y la estabilidad cromosómica, están bajo el control de dicho gen mediante la organización de la estructura de la cromatina (Pérez-Martín *et al.*, 1999). Dichos cambios afectan a la expresión de genes específicos de fase (morfología

colonial), algunos de los cuales están implicados en la patogénesis, como los *SAP* y genes de resistencia a drogas (Balan *et al.*, 1997; Pérez-Martín *et al.*, 1999).

## **1.2.- Genética de *C.albicans*.**

### **1.2.a.- El genoma de *C. albicans*.**

*C. albicans* es una levadura diploide cuyo contenido en DNA es aproximadamente de 32 Mb (por genoma diploide), con una composición de G+C entre 34,3 - 37,3 % (Chu *et al.*, 1993; De Backer *et al.*, 2000; Riggsby, 1990; Sherer & Magee, 1990). Mediante técnicas de electroforesis de campo pulsante se han identificado 8 pares de cromosomas homólogos, de tamaños comprendidos entre 4,3 y 1,03 Mb; estos cromosomas se denominan con números del 1 (el mayor) al 7 (el menor), denominándose R el cromosoma que contiene el DNA ribosomal (rDNA), cuyo tamaño y movilidad electroforética varía entre cepas dependiendo del número de repeticiones de rDNA (De Baker *et al.*, 2000).

El mapa físico y la secuencia completa del genoma de *C. albicans* están siendo determinados. El proyecto de secuenciación realizado en el Stanford Genome Center está prácticamente terminado (17.4 Mb) e indica que hay más de 8000 ORFs por genoma haploide; esta densidad génica es similar a la de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en la que se han identificado unas 6000 ORFs por genoma haploide (12 Mb). La secuenciación del genoma completo de *C. albicans* permitirá la identificación rápida de la función de muchos genes que aportará información muy importante para conocer las bases moleculares de la patogenicidad de *C. albicans* (De Baker *et al.*, 2000).

Existe un notable polimorfismo en la longitud de los cromosomas entre distintas cepas de *C. albicans* (Lott *et al.*, 1987; Magee *et al.*, 1988; Magee & Magee, 1987; Merz *et al.*, 1988; Snell *et al.*, 1987), siendo también muy frecuente encontrar en una misma cepa cromosomas homólogos que pueden separarse por electroforesis de campo pulsante, lo que indica que su tamaño debe diferir en decenas de kilobases (Riggsby, 1990; Scherer & Magee, 1990). Se han identificado tres modos de variación cariotípica: aneuploidía, translocación, y polimorfismos de tamaño de secuencias homólogas. La primera cepa aneuploide estable fue una variante de la cepa WO-1 que carece de un cromosoma 7 y de parte de los cromosomas 5 y 6 (Magee & Magee, 1997). Posteriormente, se ha descrito que condiciones de estrés (nutricionales o presencia de antifúngicos) conducen a la pérdida de algún homólogo de algún

cromosoma; estas cepas tienen tendencia a recuperar el estado diploide por reduplicación del homólogo restante (Perepnikhatka *et al.*, 1999; Rustchenko, *et al.*, 1997). Las translocaciones y polimorfismos ocurren a nivel de un elemento repetitivo (MRS: major repeat sequence region) que se encuentra en todos los cromosomas. Las translocaciones podrían originarse por entrecruzamiento entre estas regiones en cromosomas no homólogos. Los polimorfismos se originan por el número de copias de un elemento central de 2 kb de la región MRS, denominado RPS, que está repetido de una a más de veinticinco veces; cromosomas homólogos de diferente longitud difieren en el número de RPSs en una o más MRSs. El significado funcional de estas translocaciones o cambios polimórficos no está claro, no habiéndose relacionado, por el momento, con cambios en la expresión génica. Del mismo modo, los cambios observados en los fragmentos aneuploides parecen tener lugar a nivel de MRS o del cromosoma completo. Deleciones e inserciones y/o reorganizaciones en secuencias únicas del genoma parecen ser bastante infrecuentes (De Backer *et al.*, 2000). Del mismo modo, la secuencia de DNA de *C. albicans* varía significativamente entre cepas; el estudio de algunos genes (*ERG11*, *HSP90*) sugiere que puede haber variaciones genómicas significativas entre distintas cepas de *C. albicans* (De Backer *et al.*, 2000; Swoboda *et al.*, 1995; White, 1997).

Al carecer de ciclo sexual, y por tanto, de la variabilidad genética consiguiente, la inestabilidad genómica de *C. albicans* (aneuploidía, translocación, polimorfismos) puede facilitar la aparición de variantes con distintas características (antigénicas y de virulencia) y favorecer su éxito como patógeno (Kirsch *et al.*, 1990; Wickes & Petter, 1996).

### **1.2.b.- Manipulación genética de *C. albicans* y análisis de la función génica.**

El primer requisito para la manipulación genética es la disponibilidad de métodos adecuados para introducir DNA exógeno en la célula. Dos de los métodos más ampliamente utilizados en levaduras, como son el empleo de acetato de litio y de esferoplastos, presentan limitaciones cuando se aplican a *C. albicans*. El primero, es rápido y simple pero resulta en una baja eficiencia; el segundo es más eficiente pero es más laborioso y pueden generarse fusiones celulares que resultan en poliploidía (Herreros *et al.*, 1992; Sanglard *et al.*, 1996). Del mismo modo, la transformación de *C. albicans* mediante electroporación tampoco presenta una elevada eficiencia (Brown *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1998).

Aunque la transformación integrativa es una herramienta importante para la obtención de transformantes estables y el desarrollo de estrategias de interrupción génica, el empleo de vectores autoreplicativos es conveniente en muchos otros casos. *C. albicans* carece de plásmidos naturales, similares al plásmido 2  $\mu$ m de *S. cerevisiae*. Se han identificado y empleado secuencias de orígenes de replicación cromosómico de *C. albicans* (CARS1-3) para la construcción de vectores autorreplicativos (Cannon *et al.*, 1992; Plá *et al.*, 1995). La eficiencia de transformación con estos plásmidos es buena pero presentan problemas de estabilidad. Dada la gran inestabilidad de estos plásmidos, que produce amplias variaciones en el número de copias entre células y la pérdida del mismo en condiciones no selectivas, se están realizando estudios para diseñar sistemas más estables (De Backer *et al.*, 2000).

Por otro lado, la introducción de DNA exógeno exige el empleo de cepas con marcadores genéticos adecuados que permitan una fácil selección de los transformantes. Aunque se han descrito distintos marcadores auxotróficos, el más empleado tradicionalmente ha sido *URA3* (Plá *et al.*, 1996). La manipulación de cepas sin auxotrofías obliga al empleo de marcadores dominantes. Puesto que *C. albicans* es resistente a drogas habitualmente utilizadas en otros sistemas eucarióticos (cicloheximida, higromicina B, metotrexato, etc.), se han descrito un reducido número de candidatos, como por ejemplo la resistencia a la tricodermina conferida por el gen de *S. cerevisiae* *RPL3*, o la resistencia al ácido micofenólico conferida por el gen *IMH3* de *C. albicans*, aunque el empleo de este marcador presenta el problema de su integración en el locus cromosómico homólogo (Herreros *et al.*, 1992; Köhler *et al.*, 1997; Staib *et al.*, 1999).

Para determinar la función de genes individuales son esenciales las estrategias genéticas. La manera clásica de determinar la función biológica de un gen incluye su inactivación por delección de la ORF. Debido a la diploidía de *C. albicans*, al menos dos etapas consecutivas se requieren para la inactivación génica. El limitado número de marcadores que se pueden usar dificulta la creación de cepas con delecciones múltiples. Este problema se ha resuelto mediante la reutilización de un mismo marcador, que es facilitada por la introducción de repeticiones directas flanqueando el mismo; dichas repeticiones permiten la pérdida del marcador por recombinación intracromosomal. Un sistema de selección adecuado de estos clones es requerido para la nueva reutilización del marcador, como es el caso de los genes *URA3* y *GALI* (Alani *et al.*, 1987; Boeke *et al.*, 1984; Gorman *et al.*, 1991; Langle-Rouault & Jacobs, 1995).

Otro aspecto importante es el empleo de cepas adecuadas para la interrupción génica. Aunque se han usado distintas cepas de *C. albicans* (De Backer *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 1987, 1988; Kurtz *et al.*, 1988), la mayor parte de estudios recientes emplean la cepa CAI-4, un mutante *ura3* obtenido por manipulación genética a partir de un aislado clínico (Fonzi & Irwin, 1993), que permite el empleo de *URA3* como marcador. Aunque el empleo de una única cepa facilita la comparación de resultados entre distintos laboratorios, tiene el inconveniente de que el fenotipo observado corresponde a un único fondo genético. Además el empleo de cepas con auxotrofías (*ura3*, *ade2*, etc.) limita el estudio de la virulencia, pues dichos mutantes presentan una menor virulencia en modelos animales (De Backer *et al.*, 2000; Kirsch & Whitney, 1991). En las estrategias de interrupción génica tienen que considerarse algunas cuestiones (De Backer *et al.*, 2000):

- 1) La integración por recombinación homóloga en la primera etapa de transformación es variable (5-90%) y depende de varios factores (localización cromosomal, regiones flanqueantes del "cassette" de interrupción, cepa, etc.).
- 2) La delección de genes esenciales o que den lugar a mutantes con muy baja viabilidad es imposible o muy difícil. La identificación de genes esenciales depende, por lo tanto, de una evidencia negativa por lo que la interpretación nunca es concluyente.
- 3) Algunos genes están en más de una copia por genoma haploide, por lo tanto, son necesarias más de dos rondas de interrupción génica.
- 4) De modo parecido, la existencia de familias génicas puede conducir a la delección de un gen distinto al deseado en función de las secuencias empleadas en la construcción del "cassette".
- 5) La comprobación de que la integración ha ocurrido en el sitio correcto requiere el análisis mediante PCR con oligonucleótidos adecuados y mediante Southern blot.

El método más ampliamente utilizado con éxito para la interrupción de genes en *C. albicans* ha sido la interrupción secuencial de ambos alelos mediante el empleo de la estrategia "URA-Blaster" (Fonzi & Irwin, 1993). Dicha estrategia, se describe detalladamente en el apartado 25.1 de "Materiales y Métodos" de esta tesis, puesto que ha sido la empleada para interrumpir los genes estudiados. No obstante, se han descrito también otras estrategias alternativas de interrupción génica (URA-Flipper, interrupción basada en el empleo de la

green fluorescent protein, interrupción en etapa única en cepas con dos auxotrofias, métodos basados en técnicas de PCR, etc.) (De Backer *et al.*, 2000).

Otras alternativas como el "gene silencing mediante interferencia con RNA antisentido", técnica empleada para interferir la expresión génica por interferencia a nivel de los promotores en células eucariotas, no ha sido descrita en levaduras, incluyendo las especies de *Candida* (De Backer *et al.*, 2000; Del Rosario *et al.*, 1996).

Un modo de estudiar la función de un gen es modificar su expresión. En *C. albicans*, no existen métodos eficientes para bloquear completamente la expresión génica, por lo que las técnicas de interrupción génica, anteriormente comentadas, son esenciales para el análisis de la función génica. No obstante un importante problema planteado en este organismo asexual diploide es la determinación de la esencialidad de genes específicos. Normalmente un alelo es inactivado fácilmente, aunque en algunos casos el acúmulo de mutaciones en un alelo de un gen esencial evita la interrupción del alelo intacto. Una estrategia para el estudio de genes esenciales es hacer que la expresión del alelo intacto dependa de un promotor regulable. En estos casos, el empleo de vectores o "cassettes" de integración que permitan la expresión condicional de genes, permite estudiar fenotipos terminales en condiciones en las que el gen no es expresado, así como analizar el efecto de la sobreexpresión en la fisiología celular. Esta estrategia también permite el análisis funcional de cambios en la expresión de genes no esenciales que causan un fenotipo detectable (Mendoza *et al.*, 1999; Stoldt *et al.*, 1997). Se han descrito algunos promotores de *C. albicans* útiles para la construcción de vectores (integrativos y replicativos), algunos que expresan constitutivamente a distintos niveles el gen de interés (*ADH1*, *ACT1*, *TEF3*, *EF1- $\alpha$ 2*) y otros que lo expresan de manera inducible (*GAL1*, *PCK1*, *SAP2*, *MRP1*, *HEX1*, *MAL2*, *MET3*) (De Backer *et al.*, 2000).

Para estudiar la regulación génica y la localización de productos génicos es muy importante el empleo de genes "reporter". Uno de los problemas que se plantean en este caso, es que la expresión heteróloga de genes en *C. albicans* es a veces difícil debido a que *C. albicans* presenta desviaciones del código genético canónico. Esta desviación, descrita en especies del género *Candida*, consiste en traducir el codón CUG como serina en lugar de leucina; esta modificación es la única alteración conocida del código genético en mRNAs citoplásmicos tanto de eucariotas como procariotas que implica una nueva reasignación a un codón con sentido (Santos *et al.*, 1997; Santos & Tuite, 1995). Aunque los genes de *C. albicans* se expresan normalmente en *S. cerevisiae*, lo que ha permitido el aislamiento de genes de *C. albicans* por complementación en *S. cerevisiae* (De Backer *et al.*, 2000; Maneu *et*

*al.*, 2000b), el caso contrario es poco frecuente (De Backer *et al.*, 2000; Kirsch *et al.*, 1990). Distintos genes "reporter" se han descrito, tanto heterólogos (*LAC4* de *Kluyveromyces lactis*, el gen de la luciferasa de *Renilla reniformis*) como homólogos (*URA3*, *XOG1*, *MET15*, etc.) (De Backer *et al.*, 2000). Un gen "reporter" muy útil es el de la proteína fluorescente verde (GFP: green fluorescent protein) de medusa (Cubitt *et al.*, 1995); este gen ha sido modificado genéticamente para adaptarlo a su uso en *C. albicans* (Cormack *et al.*, 1997). Este sistema tiene la ventaja de que la inducción puede ser detectada en organismos vivos mediante la observación de la fluorescencia conferida por la expresión del gen, y permite la localización subcelular del producto génico cuando se expresa en forma de proteína de fusión con la GFP (Cormack, 1998).

Como se ha comentado anteriormente, la disponibilidad del genoma completo de *C. albicans*, plantea la determinación de la función de los genes descritos. Esto representa un reto para la comunidad científica pública y privada, que tendrá que abordar a gran escala la inactivación de los genes (ambos alelos), y el estudio de los fenotipos correspondientes, tanto in vivo como in vitro, con objeto de determinar las bases moleculares de la virulencia de *C. albicans*; no hay que olvidar que la razón más importante para el estudio de *C. albicans* es su función como patógeno humano. Otra cuestión que amplía el campo de trabajo, es el número de cepas a estudiar, que debe ser muy amplio, si se quieren obtener resultados válidos. El empleo de chips de DNA o microarrays de DNA inmovilizado, empleados con éxito en otros organismos, pueden permitir en *C. albicans* la detección simultánea de la expresión de miles de genes, descubrimiento de genes a gran escala, búsqueda de polimorfismos y mapeo genómico. Una alternativa para estudiar la expresión génica es la construcción de fusiones génicas con la GFP en cada uno de los genes de *C. albicans*. Una ventaja de este método es la estabilidad del gen "reporter", que permite la identificación de genes que se expresen transitoriamente durante la infección (De Backer *et al.*, 2000).

## **2.- UBIQUITINA Y UBIQUITINACIÓN.**

La ubiquitina es una pequeña proteína, de aproximadamente 8.5 kDa, presente en todas las células eucariotas, que puede encontrarse en forma libre o unida covalentemente, a través de la glicina C-terminal, a una gran variedad de especies proteicas citoplasmáticas, nucleares y de membrana, incluyendo receptores de superficie celular. La ubiquitinación de



proteínas interviene en una gran variedad de mecanismos reguladores y está implicada en muchos procesos celulares importantes: reparación de DNA, control del ciclo celular, diferenciación y desarrollo, respuesta celular a estímulos extracelulares como el calor y otros tipos de estrés, biogénesis de orgánulos subcelulares como el ribosoma y el peroxisoma, modulación de receptores de superficie celular y canales iónicos, regulación de la respuesta inmune e inflamatoria, regulación de la transcripción, infección viral, muerte celular programada, patogénesis de ciertas enfermedades degenerativas, presentación de antígenos, transducción de señales, etc. (Ciechanover, 1998; Ciechanover *et al.*, 2000a; Finley & Chau, 1991; Hershko *et al.*, 2000; Hershko & Ciechanover, 1992, 1998). Muchas de estas funciones están mediadas por mecanismos degradativos, ya que la ubiquitina actúa marcando las proteínas que han de ser degradadas, y de esta manera se eliminan las proteínas dañadas o defectuosas, y se modulan los niveles de proteínas específicas. No obstante, la ubiquitinación de ciertas proteínas no siempre implica la participación de un proceso proteolítico (Ciechanover, 1998, Ciechanover *et al.*, 2000a); en este sentido, se ha descrito que la ubiquitinación tiene también funciones no proteolíticas como direccionar algunas proteínas a compartimentos subcelulares específicos. La lista de proteínas celulares marcadas por ubiquitina está incrementándose rápidamente (reguladores de ciclo celular, supresores tumorales y moduladores del crecimiento, activadores transcripcionales y sus inhibidores, receptores de superficie y proteínas de retículo endoplásmico). Además, proteínas mutadas o dañadas son reconocidas específicamente por el sistema de la ubiquitina, y a diferencia de sus formas nativas, son rápidamente eliminadas (Ciechanover, 1998; Ciechanover *et al.*, 2000a; Hershko & Ciechanover, 1998).

## **2.1.- Ubiquitina.**

La ubiquitina, es una proteína de 76 aminoácidos, aparentemente presente en todas las células eucariotas, y extremadamente conservada en la evolución; el análisis de la estructura primaria de varias ubiquitinas y sus genes correspondientes revela una marcada conservación entre especies, mostrando las variantes de ubiquitina de animales, plantas y levaduras, diferencias en sólo tres o menos aminoácidos (Finley & Chau, 1991; Özkaynak *et al.*, 1987). La estructura terciaria de la ubiquitina, altamente compacta y fuertemente hidrogenada, es esencialmente idéntica entre la ubiquitina humana, la de levaduras y la de avena (Vijay-Kumar *et al.*, 1987). Únicamente los 4 aminoácidos C-terminales están desestructurados,

sobresaliendo del principal dominio globular de la ubiquitina, para formar el sitio de ubiquitinación (Finley & Chau, 1991).

En la molécula de ubiquitina se han identificado dos sitios funcionales (i) el extremo C-terminal (glicina), por el que la ubiquitina se une a proteínasceptoras a través de los grupos amino de la lisina, y (ii) la lisina en posición 48, que puede servir como lugar aceptor para la multiubiquitinación, del mismo modo que la lisina de otras proteínas; la unión de una ubiquitina a la lisina-48 de la ubiquitina, proporciona una nueva lisina-48 susceptible de ser ubiquitinada, lo que puede llevar a la formación de una cadena de grupos de ubiquitina, aunque las lisinas en las posiciones 63 y 29 también pueden participar en este tipo de enlaces (Ciechanover, 1998; Finley & Chau, 1991; Hershko & Ciechanover, 1992, 1998).

La ubiquitina interacciona con un gran número de enzimas responsables de la formación y procesamiento de conjugados ubiquitina-proteína, lo que podría explicar su alto grado de conservación; sin embargo, no se han identificado, a parte de los sitios funcionales citados antes, otros aminoácidos estrictamente esenciales para desempeñar su actividad (Ciechanover, 1998; Hershko & Ciechanover, 1998; Monia *et al.*, 1990; Wilkinson, 1988).

La estructura rígida de la ubiquitina podría contribuir a disminuir su susceptibilidad a la degradación y aumentar su eficiencia de reciclaje tras ser degradada la proteína de los conjugados ubiquitina-proteína por acción de hidrolasas específicas (Ciechanover, 1998; Ciechanover *et al.*, 2000a; Hershko & Ciechanover, 1998).

La ubiquitina está codificada por una familia de genes. En *S. cerevisiae* se han descrito cuatro genes (*UBI1-4*) que codifican ubiquitina. La característica más importante de estos genes es que codifican proteínas de fusión en las que la ubiquitina está unida a sí misma (poliubiquitina) o a otras secuencias peptídicas distintas. El gen *UBI4* codifica para la poliubiquitina, que está formada por cinco subunidades de ubiquitina, unidas cabeza-cola, sin espacios intermedios, presentando la última copia de ubiquitina un aminoácido extra en su extremo C-terminal. La función de dicho gen es aportar la ubiquitina necesaria para adaptarse a condiciones de estrés. Mutantes nulos para este gen, crecen bien en condiciones normales, pero son muy sensibles a distintos tipos de estrés (térmico, nutricional, etc.). En dichas condiciones, se produce un rápido incremento de proteínas dañadas o anómalas, tóxicas para la célula, cuya eliminación requiere un gran aporte de ubiquitina, que proviene de la poliubiquitina; de hecho, la expresión de *UBI4* experimenta un gran aumento tras choque térmico y otras condiciones de estrés, y su promotor contiene secuencias o motivos que responden a factores transcripcionales de respuesta a estrés (Mager & Moradas-Ferreira,

1993; Özkaynak *et al.*, 1987; Simon *et al.*, 1999). Los genes *UBI1* y *UBI2* codifican una subunidad de ubiquitina seguida de un péptido de 52 aminoácidos, idéntico en ambos casos, y funcionalmente intercambiable, que corresponde a una proteína ribosomal que reside en la subunidad mayor de los ribosomas. Ambos genes contienen un intrón situado en la zona próxima al inicio de la ubiquitina. El gen *UBI3*, también codifica una proteína de fusión formada por ubiquitina unida en su extremo C-terminal a un péptido de 76 aminoácidos que corresponde a una proteína (S34) de la subunidad pequeña del ribosoma. A diferencia de la delección del gen *UBI4*, la interrupción de los genes *UBI1-3* produce fenotipos de crecimiento lento, especialmente la delección de *UBI3*; la delección de *UBI1* o *UBI2* tiene un menor efecto, al codificar ambos genes productos idénticos, mientras que el doble mutante *ubil ubi2* no es viable. La biosíntesis de estas proteínas ribosomales en forma de fusiones con ubiquitina favorece su incorporación a los ribosomas nacientes o en formación, y es requerida para la eficiente biogénesis de los ribosomas (Finley *et al.*, 1989; Finley & Chau, 1991). La expresión de estos genes (*UBI1-3*) está coordinadamente regulada con la de otros componentes implicados en la biogénesis del ribosoma, y en sus secuencias promotoras están presentes motivos reguladores similares a los de otros genes de proteínas ribosomales (Finley *et al.*, 1989; Planta, 1997). El estrés térmico, entre otros, reduce rápida y transitoriamente los niveles celulares de dichas proteínas, lo que sugiere que además de la regulación de la transcripción, también está implicada la activación de un mecanismo de degradación específica de mRNAs (López *et al.*, 1999; Mager & Moradas-Ferreira, 1993).

## **2.2.- Ubiquitinación.**

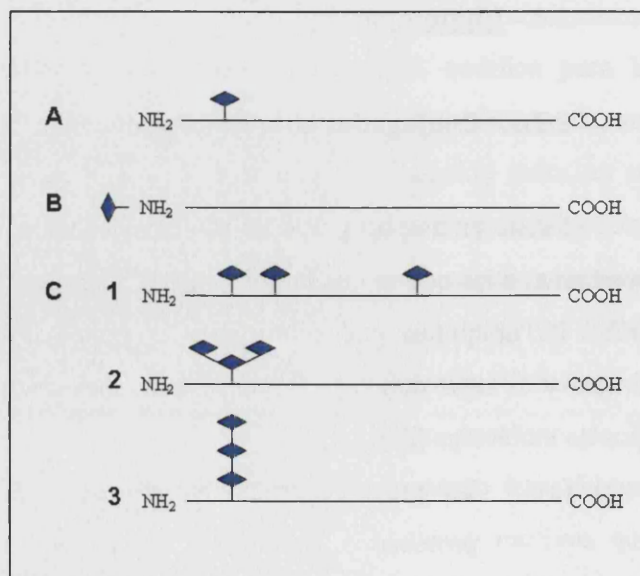
### **2.2.a.- Conjugados ubiquitina-proteína.**

Existe un amplio grupo de proteínas celulares (nucleares, citoplásmicas, y asociadas a membrana) a las que se une la ubiquitina (Ciechanover *et al.*, 2000a; Hershko & Ciechanover, 1998). La ubiquitina puede unirse a las proteínas en diferentes configuraciones, según el número y el lugar donde se forman las uniones ubiquitina-ubiquitina, dando lugar a distintos tipos de moléculas (Fig. I.4):

- (a) las proteínas monoubiquitinadas, también llamadas conjugados ubiquitina-proteína o conjugados monoubiquitinados, en los que se une una sola ubiquitina a la proteína.

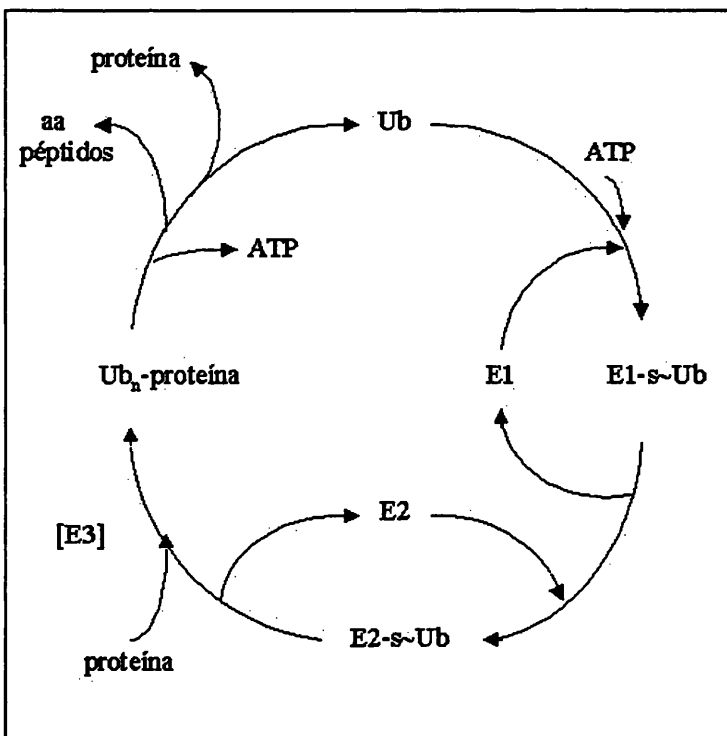
- (b) en caso de que la ubiquitina se una al extremo N-terminal de la proteína, se originan proteínas de fusión, que son moléculas lineales formadas como productos primarios de traducción y no por modificación post-traduccional de proteínas; estas moléculas sirven como precursoras de ubiquitina, y la presencia de ubiquitina sirve aparentemente para aumentar la eficiencia de expresión del componente de la fusión diferente a ubiquitina.
- (c) en caso de que se unan varias unidades de ubiquitina a la proteína, se obtienen distintos tipos de proteínas multiubiquitinadas: (i) cuando varias subunidades de ubiquitina se unen a diferentes lisinas de la proteína, ésta queda monoubiquitinada en varios puntos; (ii) si la ubiquitina unida a la proteína se une a otras subunidades de ubiquitina mediante la lisina-48 y otras lisinas que puedan servir como sitios aceptores de ubiquitina, la proteína queda multiubiquitinada en un punto; y por último, (iii) cuando varias subunidades de ubiquitina se unen formando cadenas en la que cada ubiquitina se une por su extremo C-terminal (glicina) a la lisina-48 de la ubiquitina anterior, se originan proteínas multiubiquitinadas por la presencia de cadenas lineales de ubiquitina (Finley & Chau, 1991).

**Fig. I.4.** Tipos de proteínas ubiquitinadas. La proteína está representada como una línea en la que se indican los grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) y carboxilo ( $\text{COOH}$ ) terminales. La molécula de ubiquitina se representa como un rombo. (A): proteínas monoubiquitinadas; (B): proteínas de fusión; (C): proteínas multiubiquitinadas: (1) monoubiquitinadas en varios puntos, (2 y 3) multiubiquitinadas en un punto por una cadena ramificada o lineal de ubiquitina (Finley & Chau, 1991).



2.2.b.- Enzimas de activación y unión de ubiquitina.

La unión de ubiquitina a las proteínas para formar conjugados ubiquitina-proteína, es un proceso complejo que requiere varias etapas (Fig. I.5): 1) activación del extremo C-terminal de la glicina de la ubiquitina, mediante la unión covalente con una cisteína del enzima activador de ubiquitina (E1, proteína activadora), a través de la formación de un enlace tiol-éster de alta energía y la hidrólisis de ATP; 2) transferencia de la ubiquitina activada a varios enzimas transportadores de ubiquitina (E2, enzimas transportadores o conjugadores de ubiquitina) y, finalmente, 3) transferencia de la ubiquitina de E2 a proteínas sustrato específicamente unidas a miembros de la familia ubiquitin protein ligasa (E3); la transferencia de ubiquitina puede hacerse directamente al sustrato o a través de la formación de un intermedio tiol-éster con la proteína E3. La primera unidad de ubiquitina es transferida al grupo amino de una lisina interna o bien al extremo amino-terminal del sustrato para generar un enlace isopeptídico o un enlace peptídico-lineal, respectivamente. En sucesivas reacciones se sintetizan cadenas de poliubiquitina (multiubiquitina) por la transferencia adicional de unidades de ubiquitina a la ubiquitina inicialmente unida a la lisina (Ciechanover *et al.*, 2000a; Hershko & Ciechanover, 1998).



**Fig. I.5.** Sistema de ubiquitina. La ubiquitina (Ub), a través de los sistemas enzimáticos E1, E2 y/o E3, es transferida a las proteínasceptoras (véase texto para más detalle). La actividad E3 se indica entre paréntesis porque está implicada sólo en algunas reacciones de ubiquitinación. El conjugado Ub<sub>n</sub>-proteína tiene dos posibles rutas alternativas: la degradación a péptidos o aminoácidos, o la simple desubiquitinación de la proteína (Ciechanover *et al.*, 2000a; Finley & Chau, 1991; Hershko & Ciechanover, 1998).

**Enzimas de activación de ubiquitina (E1).** Se han clonado los genes que codifican para este enzima en levaduras, plantas y humanos. Como en el caso de otros enzimas del sistema de la ubiquitina, E1 está muy conservado en la evolución. La delección del gen que codifica E1 en levadura (*UBA1*) es letal, por lo que este enzima es indispensable en levadura, ocurriendo lo mismo para sus homólogos en ratón y humano, lo que indica que la formación de conjugados de ubiquitina es esencial para la viabilidad de la célula. Mutantes de E1 no pueden degradar proteínas de vida corta ni proteínas anormales, sin embargo la tasa de degradación de proteínas de vida larga no se afecta. Esto indica que las primeras se degradan por un sistema dependiente de ubiquitina, mientras que las segundas lo hacen por uno independiente de esta proteína (Ciechanover *et al.*, 2000a; Hershko & Ciechanover, 1992, 1998).

**Enzimas transportadores de ubiquitina (E2).** Se denominan también *UBCs* ("Ubiquitin-Carrier Proteins") y constituyen una familia de enzimas estructural y funcionalmente heterogénea. Se han aislado varios genes codificantes de estos enzimas en una misma especie; en levaduras se han caracterizado 11 genes que codifican distintos enzimas E2 (Ubc 1-8, 10, 11, 13), y muchos más se han descrito en mamífero. El gran número de miembros que compone esta familia de genes refleja los requerimientos para el reconocimiento de diferentes proteínas, así como el reconocimiento de un gran número de enzimas E3. La función de algunos enzimas E2 en *S. cerevisiae* es aún desconocida, mientras que otros participan en procesos celulares específicos. El producto génico de *RAD6/UBC2* participa en la degradación de sustratos reconocidos mediante la regla N-terminal y también en la reparación del DNA; los productos génicos de *UBC1*, *UBC4* y *UBC5* son responsables de la degradación de muchas proteínas de vida corta tanto normales como anormales; los de *UBC6* y *UBC7* juegan un papel importante en la degradación del regulador transcripcional *MAT $\alpha$ 2*; el de *CDC34/UBC3*, puede catalizar la monoubiquitinación de histonas, es esencial para la viabilidad, y es requerido para la transición G1→S, probablemente mediante la degradación de reguladores de ciclo celular; E2-C, participa también en la degradación de algunos reguladores de ciclo celular; etc. (Ciechanover, 1994, 1998; Hershko & Ciechanover, 1998). Probablemente la especificidad funcional de las enzimas E2s se debe a su asociación con distintas proteínas E3, y no al reconocimiento directo del sustrato (Hershko & Ciechanover, 1998).

**Ligasas ubiquitina-proteína (E3).** La especificidad del sistema de la ubiquitina está conferida por las ligasas E3, aunque son los componentes menos conocidos del mismo. Las ligasas son proteínas o complejos proteicos que se unen a las proteínas E2 y al sustrato. La interacción del sustrato puede ser directa o a través de proteínas auxiliares. Frecuentemente la proteína E3 sirve como soporte proteico para la unión de E2 y el sustrato. En algunos casos la ubiquitina activada se transfiere de E2 a una cisteína interna de E3 antes de su conjugación con el sustrato, actuando, por lo tanto, E3 como proteína catalítica. Las ligasas E3 pueden dividirse en 6 subtipos en función de la estructura y/o del tipo de señales que reconocen, estando implicadas en procesos específicos en función de los sustratos reconocidos (Ciechanover *et al.*, 2000a).

### **2.3.- Desubiquitinación.**

Una etapa importante en el sistema de la ubiquitina es la liberación de ubiquitina de sus conjugados. Dicha liberación es esencial para dos procesos: degradación proteica y biosíntesis de ubiquitina. En la degradación proteica es importante para (i) eliminar la ubiquitina de los residuos de lisina de los productos de proteólisis, (ii) desensamblar las cadenas de poliubiquitina y (iii) corregir proteínas erróneamente ubiquitinadas. En la biosíntesis de ubiquitina, la desubiquitinación es necesaria para generar nuevas moléculas de ubiquitina a partir de sus precursores biosintéticos. La ubiquitina se sintetiza en distintas formas funcionales. Una de ellas, poliubiquitina, es una proteína precursora formada por varias ubiquitinas unidas directamente cabeza-cola sin espacios intermedios; la liberación de ubiquitina libre implica la proteólisis enzimática específica entre las subunidades fusionadas. La última subunidad de ubiquitina contiene un aminoácido extra C-terminal que debe ser eliminado para liberar el extremo activo C-terminal (glicina) de la ubiquitina. En otros precursores, la ubiquitina se sintetiza como proteína de fusión conteniendo en su extremo C-terminal proteínas ribosomales y sirve como chaperona covalente para su incorporación al ribosoma, siendo posteriormente liberada (Ciechanover, 1998; Ciechanover *et al.*, 2000a).

En general, los enzimas que reciclan ubiquitina son tior-proteasas que reconocen el aminoácido o residuo C-terminal de la ubiquitina (Hochstrasser, 1996a; Wilkinson, 1997). Pueden dividirse en dos clases, según liberen moléculas de ubiquitina unidas mediante enlaces peptídicos lineales o conjugadas vía enlace isopeptídico: hidrolasas C-terminales de ubiquitina (UCHs), y proteasas específicas de ubiquitina (UBPs, isopeptidasas). Las UCHs son enzimas de

unos 25 kDa que participan en el procesamiento de los productos génicos cotraduccionales de proubiquitina y en la liberación de ubiquitina de conjugados con pequeñas moléculas (grupos amino y tiol). Las UBPs son enzimas de unos 100 kDa que catalizan la liberación de ubiquitina de conjugados con proteínas celulares o de cadenas libres de multiubiquitina después de la degradación del sustrato. Una gran cantidad de UBPs están codificadas en el genoma de levaduras y eucariotas superiores, lo que indica que pueden tener funciones específicas como el reconocimiento de sustratos marcados distintamente. Estas enzimas difieren, además, en sus características: (i) algunos se encuentran en forma libre mientras que otros están asociados con el complejo proteasomal 19S; (ii) algunos requieren ATP para su actividad y otros son independientes de aporte energético, y (iii) su mecanismo de acción también difiere pues algunos son sensibles a ubiquitin-aldehído mientras que otros no lo son (Wilkinson, 1997).

La inactivación de estas enzimas desubiquitinadores produce una inhibición de la proteólisis mediada por ubiquitina. Esto, probablemente, es consecuencia de dos efectos: agotamiento del "pool" intracelular de ubiquitina libre y la saturación del proteasoma con cadenas de poliubiquitina cortadas, libres de sustrato. La desubiquitinación también puede acelerar la proteólisis por recorte de las cadenas de poliubiquitina a una longitud más eficientemente reconocida por el proteasoma. La desubiquitinación también puede servir como función correctora liberando ubiquitina de sustratos erróneamente conjugados, inhibiendo así su proteólisis (Ciechanover, 1998; Ciechanover *et al.*, 2000a; Wilkinson, 1997). Como se ha mencionado anteriormente, la desubiquitinación también puede tener funciones reguladoras específicas, por ejemplo, enzimas específicos desubiquitinadores regulan el silenciamiento transcripcional en *S.cerevisiae*: el producto del gen *UBP3* interacciona específicamente con la proteína SIR4, que es un inhibidor de este proceso (Moazed & Johnson, 1996).

#### **2.4.- Sistemas de degradación proteica dependientes de ubiquitina.**

La degradación proteica intracelular controla los niveles de proteínas específicas y la eliminación de proteínas dañadas. Este proceso es altamente selectivo ya que algunas proteínas son degradadas en minutos, mientras que otras son muy estables (Hershko & Ciechanover, 1992). Las funciones de la proteólisis se resumen en: 1) recambio continuo de muchas proteínas reguladoras; 2) eliminación de ciertas proteínas reguladoras en respuesta a señales específicas; 3) eliminación de proteínas defectuosas por mutaciones, condiciones de estrés, etc., y 4) recambio rápido del exceso de proteínas en forma libre, que normalmente



forman parte de complejos multi-subunidad (Finley & Chau, 1991). En células eucariotas (mamíferos y levaduras) existen dos sistemas distintos de degradación proteica: el sistema lisosomal y el sistema proteasomal dependiente de ubiquitina, que actúan sobre substratos diferentes a consecuencia de su diferente localización subcelular, aunque probablemente existe alguna interconexión entre ambos (Ciechanover, 1994; Roth & Davis, 1996).

#### **2.4.a.- Sistema lisosomal.**

Las hidrolasas lisosomales (proteasas, lipasas, fosfatasas, etc.) se encuentran dentro de los lisosomas (vacuolas), por lo que la degradación lisosomal requiere el transporte de las proteínas sustrato al interior de estos orgánulos, y esto debe ocurrir por endocitosis (que permite la internalización de material extracelular y de proteínas de membrana), o por autofagia (degradación de proteínas intracelulares), mediante la formación de lisosomas secundarios (fagosomas y autofagosomas) (Hicke & Riezman, 1996; Roth & Davis, 1996; Seglen & Bohley, 1992). El sistema lisosomal en levaduras corresponde a la vacuola, orgánulo donde se localizan las hidrolasas correspondientes (Jones, 1991). Esta vía de degradación parece ser la principal para las proteínas de membrana plasmática, como es el caso de los dos receptores de feromonas de levadura: receptor del factor  $\alpha$  (Ste3p) (Roth & Davis, 1996), y el receptor del factor  $\alpha$  (Ste2p) (Hicke & Riezman, 1996); permeasas para el uracilo (Roth & Davis, 1996; Volland *et al.*, 1994) e inositol (Lai *et al.*, 1995; Roth & Davis, 1996); el transportador ABC Ste6 del factor  $\alpha$  (Kölling & Hollenberg, 1994); la proteína transportadora Pdr5p (Egner & Kuchler, 1996; Roth & Davis, 1996); etc. Sin embargo, muchas proteínas citoplásmicas pueden ser degradadas también por esta vía bajo condiciones de estrés celular, ya que mediante autofagia son incorporadas al lisosoma (vacuola) (Roth & Davis, 1996; Seglen & Bohley, 1992).

La ubiquitinación está implicada en esta vía actuando como señal para la endocitosis y consiguiente degradación en el lisosoma/vacuola de complejos receptor-ligando (Finley & Chau, 1991; Gilon *et al.*, 1998; Hicke & Riezman, 1996; Hochstrasser, 1996b; Swaminathan *et al.*, 1999). Esta ubiquitinación de receptores de membrana plasmática se induce como consecuencia de la unión a sus respectivos ligandos (Cenciarelli *et al.*, 1992; Hicke & Riezman, 1996; Mori *et al.*, 1992; Paolini & Kinet, 1993; Roth & Davis, 1996), y a su vez es necesaria para que se produzca la endocitosis y aumenten las tasas de turnover vacuolar, siendo la ubiquitinación un factor limitante para la internalización (Hicke & Riezman, 1996;

Roth & Davis, 1996; Shih *et al.*, 2000). Por tanto, la ubiquitinación es una señal para la endocitosis de proteínas de membrana, y para su degradación por vía lisosomal. No obstante, no todas las proteínas de membrana se degradan por esta vía, ya que también lo hacen por la vía proteasomal. Parece ser que la distinta ubiquitinación de dichas proteínas es el factor que discrimina entre ambas; así, la mutiubiquitinación es requerida para la degradación proteasomal, mientras que la monoubiquitinación es suficiente para la endocitosis y posterior degradación lisosomal (Hicke & Riezman, 1996; Lucero *et al.*, 2000; Shih *et al.*, 2000).

Por otra parte, se ha sugerido que la ubiquitinación de los receptores de membrana plasmática, además estar implicada en endocitosis y degradación, actúa modulando la funcionalidad del receptor mediante procesos reversibles de ubiquitinación/desubiquitinación (Paolini & Kinet, 1993; Roth & Davis, 1996).

En los procesos de autofagia, la ubiquitina también está implicada, bien porque la ubiquitinación es necesaria para el marcaje de las proteínas destinadas a la degradación lisosomal (Doherty *et al.*, 1989; Hershko & Ciechanover, 1992; László *et al.*, 1990), o bien porque la ubiquitinación es requerida para la biogénesis de las vacuolas autofágicas (Ciechanover, 1994; Finley & Chau, 1991; Hershko & Ciechanover, 1992).

#### **2.4.b.- Sistema proteasomal.**

##### **El proteasoma: estructura y función.**

El proteasoma es el principal sistema de degradación proteica selectiva en células eucariotas. Las proteínas destinadas a ser degradadas por este sistema son ligadas a varios polipéptidos de ubiquitina (cadenas de multiubiquitina), y degradadas por el proteasoma, un complejo proteolítico específico que actúa sobre las proteínas ubiquitinadas. Este complejo proteolítico 26S degrada la proteína de los conjugados ubiquitina-proteína hasta pequeños péptidos y aminoácidos, en un proceso que requiere la hidrólisis de ATP, y libera las moléculas de ubiquitina para su reutilización, por acción de varias isopeptidasas (UBPs) (Ciechanover, 1998; Ciechanover *et al.*, 2000a; Hershko & Ciechanover, 1998; Voges *et al.*, 1999).

Los proteasomas son estructuras que aparecen en gran número en el núcleo y citoplasma celular, pudiendo difundir libremente entre ambos compartimentos (Ciechanover, 1994; Finley & Chau, 1991; Glickman *et al.*, 1998; Hershko & Ciechanover, 1992). Las

proteínas sustrato que son degradadas por este sistema son, por lo tanto, proteínas nucleares y citosólicas principalmente, entre las cuales destacan proteínas anormales y proteínas de vida corta, tanto en condiciones normales como de estrés (Ciechanover, 1994; Finley & Chau, 1991; Hershko & Ciechanover, 1992; Hicke & Riezman, 1996; Roth & Davis, 1996). También son degradadas por el proteasoma algunas proteínas de membrana, pero en este caso para ser reconocidas por el proteasoma, deben ser multiubiquitinadas y no monoubiquitinadas, puesto que la monoubiquitinación media la internalización y reconocimiento preferencial por la maquinaria endocítica con la consiguiente degradación lisosomal (Ciechanover, 1994; Finley & Chau, 1991; Hicke & Riezman, 1996). Sin embargo, la degradación de las proteínas de membrana es un proceso más complejo que la acción del sistema proteasomal dependiente de ubiquitina, ya que los componentes del proteasoma no tienen acceso al dominio ectoplásmico de estas moléculas (Ciechanover, 1994). Es posible que los receptores de membrana se puedan marcar para ser degradados por ambas vías: lisosomal y proteasomal dependiente de ubiquitina; estas proteínas tienen dominios citosólicos que están expuestos al proteasoma, pero también tienen dominios ectoplásmicos que no pueden ser degradados por las proteasas citosólicas, por no quedar accesibles a ellas, pero que pueden quedar en el interior de endosomas o lisosomas secundarios durante el reciclaje de la membrana o la endocitosis mediada por receptor. Esto supone la existencia de una relación entre los dos sistemas proteolíticos (Ciechanover, 1994; Hicke & Riezman, 1996); de hecho la inactivación del sistema proteasomal provoca una inhibición de la degradación lisosomal inducida por estrés y una detención en la maduración de los fagolisosomas (Ciechanover, 1994; Gropper *et al.*, 1991; Lenk *et al.*, 1992).

La multiubiquitinación de las proteínas sustrato necesaria para la degradación por el sistema del proteasoma, puede realizarse mediante adición covalente de moléculas de ubiquitina a diferentes lisinas de la proteína sustrato, o bien a una única formando una cadena de multiubiquitina, siendo esta segunda opción la más probable para la degradación por este sistema, seguramente porque debe producirse un reconocimiento de la cadena de multiubiquitina por la proteasa antes de la degradación (Finley *et al.*, 1994; Finley & Chau, 1991).

El proteasoma 26S, es un complejo multicomponente de aproximadamente 2 MDa, formado por el ensamblaje de tres multisubunidades, de 250-650 kDa, designadas CF-1, CF-2 y CF-3, por un proceso dependiente de ATP. El componente CF-3 (o CP "core particle") fue identificado como el complejo de proteasas "multicatalítico" 20S, muy conservado en la

evolución desde levaduras a mamíferos. Se trata de una partícula cilíndrica que constituye el cuerpo central del complejo 26S, organizada como una pila de cuatro anillos (dos exteriores denominados  $\alpha$  y dos interiores  $\beta$ ) formados por siete subunidades polipeptídicas diferentes ( $\alpha_{1-7}$ ,  $\beta_{1-7}$ ) de masa molecular comprendida entre 15 y 30 kDa, que contiene en su cara interna o lumen los sitios catalíticos activos (subunidades  $\beta$ ). Los otros dos componentes del proteasoma, son subunidades reguladoras (RP, "regulatory particles", o CF-1 y CF-2, o complejos 19S) que se unen a los extremos del CP (20S) dando lugar a un complejo en forma de pesa (26S) (Ciechanover, 1994; Coux *et al.*, 1996; Finley & Chau, 1991; Glickman *et al.*, 1998, 1999; Hershko & Ciechanover, 1992). Existen complejos en que el proteasoma está doblemente flanqueado por dos subunidades reguladoras (RP<sub>2</sub>CP), y otros que sólo tienen una subunidad reguladora en uno de los extremos (RP<sub>1</sub>CP). Las multisubunidades CF-1 y CF-2 están formadas a su vez por subunidades de más de 30 kDa, contienen los sitios de unión de ATP necesarios para la conversión de los conjugados de ubiquitina en pequeños péptidos por las proteasas del complejo (Hershko & Ciechanover, 1992). Cada RP está formada por 17 proteínas diferentes, formando dos subcomplejos: el subcomplejo "base", que consiste en 6 ATPasas y tres proteínas adicionales, y el subcomplejo "tapa", que está formado por 8 subunidades. Estas subunidades reguladoras confieren la especificidad del complejo para las proteínas ubiquitinadas, lo que sugiere que deben contener sitios de unión específicos para los conjugados ubiquitina-proteína; se ha descrito en levaduras una proteína de unión a ubiquitina en la partícula 19S, aunque probablemente deben existir más componentes con esta capacidad puesto que dicha subunidad proteica no es esencial (Rubin *et al.*, 1997; van Nocker *et al.*, 1996). Una segunda función del complejo 19S, conferida probablemente por las subunidades ATPasa, es crear una puerta de entrada en el anillo  $\alpha$  a través de la que los conjugados ubiquitina-proteína pueden ser transferidos desde las subunidades RP a los sitios proteolíticos contenidos en el componente 20S (CP) para su posterior degradación. Por tanto, la entrada de substratos en el interior del proteasoma está gobernada por las subunidades reguladoras (19S), que controlan la entrada al interior de la multisubunidad central (Gröll *et al.*, 1997). Además dicho complejo actúa desnaturalizando las cadenas polipeptídicas para que puedan insertarse en la cámara proteolítica (complejo 20S). Las multisubunidades reguladoras del proteasoma de levaduras y células de mamífero son muy similares, lo que sugiere que las características mecánicas específicas del proteasoma se han conservado a lo largo de la evolución (Ciechanover, 1994, 1998; Ciechanover *et al.*, 2000a; Glickman *et al.*, 1998, 1999; Hershko & Ciechanover, 1998; Voges *et al.*, 1999).

No obstante, la ubiquitinación no es siempre esencial para el reconocimiento por el proteasoma. Algunas proteínas, como el enzima de vida corta ornitina-descarboxilasa, son degradados por el complejo 26S de un modo independiente de ubiquitina (Murakami *et al.*, 1992). Lo mismo ocurre con proteínas de vida larga, que son degradadas por el proteasoma pero por una vía independiente de ubiquitina (Ciechanover, 1994), aunque la mayor parte de éstas se degradan en los lisosomas (Finley & Chau, 1991; Rechsteiner, 1987). Por tanto, el proteasoma puede reconocer y degradar de un modo específico proteínas no-ubiquitinadas, y las subunidades reguladoras pueden tener funciones adicionales, además del reconocimiento específico de los conjugados ubiquitinados (Ciechanover, 1994).

La interrupción de genes que codifican para diferentes subunidades del proteasoma en levaduras es letal, lo que indica que los proteasomas son esenciales para la viabilidad celular (Finley & Chau, 1991; Fujiwara *et al.*, 1990). Algunos ejemplos de proteínas celulares que son degradadas por el sistema proteasomal dependiente de ubiquitina son: ciclinas mitóticas; oncoproteínas (E6, c-Fos, c-Mos, c-Jun, etc.); la proteína supresora de tumores p53; varios receptores de superficie celular (receptor MEL-14 de linfocitos, receptor PDGF, receptor de la hormona de crecimiento, receptor de células T, receptor de la inmunoglobulina E, etc.), aunque en ninguno de éstos se ha demostrado una clara correlación entre ubiquitinación y degradación proteasomal; reguladores transcripcionales, como el represor MAT $\alpha$ 2 de levadura; proteínas dañadas y mutadas; etc. (Ciechanover, 1994; Finley & Chau, 1991; Hershko & Ciechanover, 1992; Hochstrasser *et al.*, 1999; Kölling & Hollenberg, 1994).

El sistema proteasomal dependiente de ubiquitina no está implicado sólo en la destrucción completa de sus proteínas sustrato, sino también en la proteólisis limitada y procesamiento post-traducciona en el que se generan fragmentos o péptidos biológicamente activos, como el procesamiento de antígenos de Clase I (Ciechanover, 1994).

Por tanto, mediante el sistema proteasomal se degradan proteínas reguladoras específicas, por lo que este tipo de proteólisis juega un papel importante en muchos procesos celulares, incluyendo control metabólico, progresión del ciclo celular, transducción de señal, etc. tal y como se ha citado anteriormente (Ciechanover, 1994, 1998; Ciechanover *et al.*, 2000a; Gilon *et al.*, 1998). Algunos de estos procesos se resumen en el apartado 2.5.

### Señales para la ubiquitinación

En esta ruta de degradación proteica dependiente de ubiquitina la etapa crítica es el reconocimiento de secuencias específicas dentro del sustrato por los enzimas ubiquitinadores. Numerosos sustratos del sistema proteasomal son reconocidos por las diferentes ligasas (E3) a través de motivos específicos. El motivo mejor estudiado es la denominada regla del aminoácido N-terminal: algunas proteínas son marcadas para la conjugación y consiguiente degradación por esta vía según la naturaleza de su aminoácido de la posición N-terminal, de manera que según cuál sea este aminoácido, la vida media de la proteína puede variar en un amplio rango (más de 20 h a menos de 3 min), por lo que la estabilidad metabólica de una proteína puede ser dependiente de la identidad de su aminoácido N-terminal (Finley & Chau, 1991; Hershko & Ciechanover, 1992; Varshavsky, 1992, 1996; Varshavsky *et al.*, 2000). Esta regla refleja la especificidad de los sitios de unión del enzima E3 $\alpha$  para los aminoácidos del extremo N-terminal de las proteínas sustrato.

Sin embargo, existen otras vías de reconocimiento de los sustratos para su ubiquitinación. Por ejemplo, muchas proteínas de vida extremadamente corta (como algunas ciclinas de levadura y el activador transcripcional GCN4), contienen regiones con secuencias PEST (prolina, ácido glutámico, serina, y treonina), normalmente flanqueadas por grupos de aminoácidos con carga positiva, cuya fosforilación sirve de señal para el reconocimiento por los enzimas E3 (Kornitzer *et al.*, 1994; Yaglom *et al.*, 1995). No obstante, la fosforilación de ciertas proteínas en aminoácidos no pertenecientes a secuencias PEST también pueden servir como señal para la degradación por esta vía (Diehl *et al.*, 1997).

Otro ejemplo de secuencia diana para la ubiquitinación es la denominada "destruction box", inicialmente descrita en ciclinas mitóticas y otros reguladores del ciclo celular, que consiste en un motivo de 9 aminoácidos (consenso R<sub>1</sub>(A/T)<sub>2</sub>(A)<sub>3</sub>L<sub>4</sub>(G)<sub>5</sub>X<sub>6</sub>(I/V)<sub>7</sub>(G/T)<sub>8</sub>(N)<sub>9</sub>) (Ciechanover, 1998).

Normalmente los residuos de lisina que sirven como sitios de ubiquitinación no son específicos, o no forman parte, de los motivos de reconocimiento (Ciechanover, 1998).

La presencia de los motivos anteriormente citados en la estructura primaria de una proteína no implica necesariamente la degradación constitutiva de la misma. Estos motivos pueden estar inaccesibles y sólo ser expuestos al sistema de la ubiquitina cuando la proteína se desnaturaliza o los complejos proteicos se disocian en subunidades. Por ejemplo, el enmascaramiento de una señal de degradación por heterodimerización bloquea la proteólisis

del factor de transcripción heterodimérico MAT $\alpha$ 2· MAT $\alpha$ 1 (Johnson *et al.*, 1998). De manera similar la unión del factor MyoD a su promotor específico bloquea su degradación. Algunos substratos únicamente son reconocidos por sus ligasas si están asociados a una proteína auxiliar o chaperona que actúa como elemento de reconocimiento en *trans* (Hershko & Ciechanover, 1998). Del mismo modo, la fosforilación, simple o múltiple, de algunas proteínas impide su ubiquitinación y, por lo tanto, su degradación (Ciechanover, 1998; Musti *et al.*, 1997; Nishizawa *et al.*, 1992). Por otro lado, la fosforilación de ciertos receptores de membrana unidos a sus ligandos, en aminoácidos pertenecientes a la señal de internalización SINNDKSS, es necesaria para la ubiquitinación y posterior internalización del complejo receptor-ligando (Hicke *et al.*, 1998). Como se ha comentado anteriormente, la fosforilación de las secuencias PEST pueden ser necesarias para la ubiquitinación y degradación de ciertas proteínas (Kornitzer *et al.*, 1994; Yaglom *et al.*, 1995).

## **2.5.- Otros procesos dependientes del sistema de la ubiquitina.**

Como se ha indicado anteriormente, la ubiquitina puede unirse covalentemente a muchas proteínas celulares, tanto para servir de señal para la degradación de las mismas, como con otros fines, algunos no conocidos todavía. La ubiquitina es una molécula central en el mecanismo de regulación de la célula, que controla, mediante el sistema de la ubiquitinación, los niveles de proteínas específicas, siendo este proceso esencial para la regulación de muchos procesos celulares de gran importancia. Según cuál sea la función de las proteínas a las que se une la ubiquitina, la ubiquitinación puede intervenir en una gran variedad de mecanismos reguladores, pudiendo muchos de ellos implicar mecanismos degradativos (Finley & Chau, 1991; Hershko & Ciechanover, 1992; Roth & Davis, 1996). A continuación se describen brevemente algunos de estos procesos.

### **2.5.a.- Reparación de DNA.**

Mutantes de levaduras deficientes en enzimas conjugadores de ubiquitina (E2) (mutaciones en *RAD6/UBC2*) presentan una serie de defectos en el metabolismo del DNA (hipersensibilidad a la radiación UV, rayos X y mutágenos químicos; crecimiento lento; recombinación meiótica y esporulación defectivas; etc.) (Finley & Chau, 1991; Spence *et al.*, 1995). *RAD6* es inducido por daño en el DNA y durante la esporulación, aunque su expresión

basal es también relativamente elevada durante el ciclo celular mitótico (Madura *et al.*, 1990). Por tanto, la actividad conjugadora de ubiquitina de RAD6 tiene funciones de reparación del DNA, que implica la ubiquitinación localizada de proteínas cromosomales (histonas) que flanquean el lugar dañado (Robzyk *et al.*, 2000; Spencer & Davie, 1999). La ubiquitinación por RAD6 puede activar la reparación del DNA, mediante: a) alteración de la estructura de la cromatina del lugar dañado, b) marcaje del lugar dañado para la unión de enzimas reparadores, o c) exposición del DNA dañado a estas enzimas tras la degradación de proteínas cromosomales ubiquitinadas (Finley & Chau, 1991).

Por otro lado, el gen *UBI4* también se induce en presencia de agentes que dañan el DNA, por lo que la poliubiquitina podría desempeñar un papel en la reparación de éste; sin embargo no está claro, ya que mutantes *ubi4* no son sensibles a la luz UV (Finley & Chau, 1991).

#### **2.5.b.- Control del ciclo celular.**

El control de la proliferación y progresión del ciclo celular, tanto en células normales como cancerosas, es ejercido por cambios en los niveles de proteínas reguladoras, de vida corta, muchas de las cuales (ciclinas mitóticas, p53, etc.) son degradadas por la vía del proteasoma dependiente de ubiquitina. Las ciclinas presentan características estructurales requeridas para la degradación por esta vía, siendo la regulación de la progresión mitótica el papel mejor caracterizado de la ubiquitina en el ciclo celular (Finley & Chau, 1991). Por tanto, la ubiquitinación regula el ciclo celular a través de la degradación de las ciclinas (A, B, D, E), mediante el control de su multiubiquitinación llevada a cabo por los enzimas conjugadores E2 (*CDC34/UBC3*). Mutantes *cdc34* presentan un bloqueo en la transición G1/S o en la fase G2/M del ciclo celular, como consecuencia de su incapacidad de formar cadenas de multiubiquitina, y por tanto degradar ciclinas mitóticas (Baumer *et al.*, 2000; Finley *et al.*, 1994; Finley & Chau, 1991). Inhibidores de la ciclin-quinasa (CKI) también están regulados por ubiquitinación (King *et al.*, 1996; Koepp *et al.*, 1999; Shirane *et al.*, 1999). Además, la oncoproteína E6 induce la proliferación celular porque promueve la degradación, mediante ubiquitinación, del activador transcripcional p53, que tiene actividad supresora de tumores y está implicado en mecanismos de control negativo del crecimiento en células normales (Band *et al.*, 1991; Ciechanover *et al.*, 1991; Finley & Chau, 1991; Scheffner *et al.*, 1990).



Por otro lado, la expresión del gen de la poliubiquitina (*UBI4*) en levaduras está regulada durante la meiosis. Los niveles de transcrito de *UBI4* aumentan significativamente cuando las células diploides de levadura se exponen a condiciones de esporulación, seguramente porque la ubiquitina es necesaria para la degradación de proteínas intracelulares durante este proceso (Treger *et al.*, 1988). Además, los mutantes diploides *ubi4/ubi4* son incapaces de esporular, y las esporas haploides con la mutación *ubi4* son incapaces de germinar (Finley *et al.*, 1987), lo que indica que la poliubiquitina es necesaria en ambos procesos (esporulación y germinación de la espora).

### 2.5.c.- Respuesta al calor y otros tipos de estrés.

Todas las células presentan una respuesta rápida a condiciones ambientales adversas (aumentos de temperatura, estrés metabólico, agentes oxidantes, análogos de aminoácidos, etc., colectivamente conocidas como "condiciones de estrés"), que consiste en inducir la síntesis de un grupo de proteínas, conocidas como proteínas de estrés o proteínas de choque térmico (hsps, "heat shock proteins"), una de las cuales es la ubiquitina (Barnes *et al.*, 1987; Finley & Chau, 1991; Mager & Moradas-Ferreira, 1993). En condiciones de estrés se produce un aumento en los niveles de proteínas dañadas o desnaturalizadas que son tóxicas para la célula y cuya degradación es dependiente de ubiquitina (Raboy *et al.*, 1991). Como consecuencia de ello, se necesita un exceso de ubiquitina para compensar la depleción debida a la formación de conjugados ubiquitina-proteínas tóxicos, y mantener los niveles de ubiquitina libre en las células (Finley *et al.*, 1987; Mager & Moradas-Ferreira, 1993).

En la levadura *S. cerevisiae* el gen responsable de proporcionar esta ubiquitina es el gen de la poliubiquitina (*UBI4*), cuyo promotor presenta elementos de respuesta a estrés (STRE) y elementos de choque térmico (HSEs); la expresión de *UBI4* es muy baja en células en crecimiento exponencial, y se induce por diferentes condiciones de estrés (Finley & Chau, 1991; Moskvina *et al.*, 1999; Ruis & Schuller, 1995; Simon *et al.*, 1999). Además los genes que codifican para los enzimas conjugadores de ubiquitina *UBC4* y *UBC5*, cuya presencia es requerida para la degradación selectiva de muchas proteínas de levadura, también se inducen por estrés, y el doble mutante en estos genes presenta una fuerte reducción en la tasa de degradación proteica en estas condiciones (Finley & Chau, 1991).

La importancia de la ubiquitinación en la respuesta celular al estrés se deduce no sólo por el hecho de que los genes *UBI4*, *UBC4* y *UBC5* sean inducibles por condiciones de estrés,

sino también por el fenotipo sensible a estrés presentado por los mutantes en estos genes (Finley & Chau, 1991). El mutante *ubi4* y el doble mutante *ubc4 ubc5* son más sensibles que la cepa salvaje al estrés por calor crónico (incubación prolongada a 38°C) (Bao & Fukuhara, 2000; Finley *et al.*, 1987; Finley & Chau, 1991).

#### **2.5.d.- Biogénesis del ribosoma.**

En levaduras en crecimiento exponencial la ubiquitina se genera mediante el procesamiento de los productos génicos *UBI1-3*, que codifican proteínas híbridas formadas por una subunidad de ubiquitina unida en su extremo C-terminal a un péptido distinto (véase apartado 2.2.a de esta introducción). El procesamiento proteolítico de dichas proteínas genera la liberación de los componentes peptídicos diferentes a ubiquitina, que son proteínas ribosomales. La asociación transitoria entre la ubiquitina y estas proteínas promueve su incorporación al ribosoma naciente y es necesaria para una eficiente biogénesis del mismo y el ensamblaje de sus subunidades. Los péptidos unidos a ubiquitina de los productos génicos *UBI1* y *UBI2*, cuya secuencia es idéntica, residen en la subunidad grande del ribosoma (subunidad 60S), mientras que el de *UBI3* reside en la pequeña (subunidad 40S) y corresponde a la proteína ribosomal de levadura S34 (Finley *et al.*, 1989; Finley & Chau, 1991; Redman & Rechsteiner 1989). Los genes que codifican para estas proteínas ribosomales se han encontrado en muchas especies eucariotas, siempre asociadas a secuencias de ubiquitina (Finley & Chau, 1991).

El mecanismo por el cual la ubiquitina aumenta la eficiencia con la que las proteínas ribosomales alcanzan su destino final se puede comparar con el de las proteínas conocidas como "chaperonas moleculares", por el que su asociación no covalente con otras proteínas promueve su incorporación a estructuras oligoméricas más complejas (Ellis, 1990). La asociación covalente cotraduccional de una chaperona a su ligando, como es el caso de la ubiquitina a estas proteínas ribosomales, tiene varias ventajas potenciales: (1) la chaperona N-terminal está unida, y puede proteger a su ligando, desde el momento en que éste es sintetizado; (2) no es necesaria la presencia de un sitio específico de reconocimiento en el ligando para que la chaperona se una a él, y (3) la chaperona puede bloquear transitoriamente, o proteger, el extremo N-terminal de su ligando, que puede actuar como señal para su degradación (Finley *et al.*, 1989; Finley & Chau, 1991).

### **2.5.e.- Biogénesis del peroxisoma.**

En *S. cerevisiae* y otras especies fúngicas se han identificado algunos genes necesarios para la biogénesis del peroxisoma, cuya secuencia es similar a la de los enzimas conjugadores de ubiquitina. La ubiquitinación podría estar implicada en el ensamblaje del peroxisoma y en la translocación proteica a través de la membrana peroxisomal (Crane *et al.*, 1994; Koller *et al.*, 1999; van der Klei *et al.*, 1998; Wiebel & Kunau, 1992).

### **2.5.f.- Regulación de receptores de superficie celular.**

Como ya se ha comentado anteriormente, la monoubiquitinación de receptores de superficie celular está implicada en su degradación por vía lisosomal (Ste3p, Ste2p, Ste6, etc.) (Hicke & Riezman, 1996; Kölling & Hollenberg, 1994; Roth & Davis, 1996). La ubiquitinación de estos receptores de membrana plasmática se induce como consecuencia de la unión a sus respectivos ligandos, y es necesaria para que se produzca la endocitosis y aumenten las tasas de turnover vacuolar (Cenciarelli *et al.*, 1992; Hicke & Riezman, 1996; Kölling & Hollenberg, 1994; Mori *et al.*, 1992; Paolini & Kinet, 1993; Roth & Davis, 1996; Shih *et al.*, 2000). Además, también se ha descrito que receptores de membrana pueden ser degradados por la vía proteasomal cuando son multiubiquitinados (véase apartado 2.4.a de esta introducción) (Hicke & Riezman, 1996). Por tanto, la ubiquitinación es una señal tanto para la endocitosis de proteínas de membrana, con la consiguiente degradación por la vía del lisosoma, como para su degradación por la ruta del proteasoma (Hicke & Riezman, 1996).

Sin embargo, existen varios receptores de superficie celular (receptor MEL-14 de linfocitos, receptor PDGF, receptor de la hormona de crecimiento, receptor de células T, receptor de la inmunoglobulina E, etc.) en los que no se ha demostrado una clara correlación entre la ubiquitinación y la degradación (Ciechanover, 1994; Hicke & Riezman, 1996; Kölling & Hollenberg, 1994; Roth & Davis, 1996), por lo que la función de la ubiquitinación de estas proteínas de superficie celular no está determinada claramente. Se ha sugerido que la ubiquitina (ubiquitinación/desubiquitinación reversible) puede actuar modulando la funcionalidad de los receptores (Paolini & Kinet, 1993; Roth & Davis, 1996).

### **2.5.g.- Regulación de la transcripción.**

En células de mamífero se han encontrado histonas ubiquitinadas asociadas a DNA (Robzyk *et al.*, 2000; Spencer & Davie, 1999). Aunque la ubiquitinación podría participar en la regulación de la transcripción mediante cambios locales de las histonas, de modo parecido a su participación en la reparación del DNA (véase apartado 2.5.a), su función en este proceso no está clara, pudiendo ser simplemente intermediarios de la degradación (Finley & Chau, 1991). El sistema de la ubiquitina controla la transcripción de determinados grupos de genes mediante la modulación de distintos factores de transcripción (E2F-1, p53, c-Jun, etc.), cuyos niveles están regulados por ubiquitinación (Hateboer *et al.*, 1996; Scheffner *et al.*, 1990; Treier *et al.*, 1994).

### **2.5.h.- Infección viral.**

Las infecciones virales se caracterizan por alteraciones globales en el metabolismo celular, en los que la ubiquitina y la ubiquitinación juegan un papel importante, tanto en el desarrollo de la infección, como en los mecanismos de defensa de la célula infectada (Chelbi-Alix & de The, 1999; Everett *et al.*, 1998a,b; Strack *et al.*, 2000). El sistema proteasomal de la ubiquitina también está implicado en el fenómeno de la oncogénesis viral (Band *et al.*, 1991; Scheffner *et al.*, 1990).

### **2.5.i.- Diferenciación celular.**

Diferentes observaciones indican que el sistema de la ubiquitina está implicado en la diferenciación celular: (1) se ha descrito la expresión diferencial de enzimas del sistema de la ubiquitina dependiendo del tipo celular (Bachmair *et al.*, 1990); (2) alteraciones en el sistema de la ubiquitina producen anomalías en ciertos tejidos (Pickart & Vella, 1988), y (3) la implicación de la ubiquitina en procesos diferenciativos simples, como la germinación y esporulación en levaduras, se ha descrito en el apartado 2.5.b de esta introducción (Finley *et al.*, 1987).

### **2.5.j.- Transducción de señal.**

Esta función es consecuencia de la participación del sistema de la ubiquitina en la regulación de los receptores de membrana, o bien a nivel de otros componentes del sistema de transducción (Gereben *et al.*, 2000; Isaksson *et al.*, 1996).

### **2.5.k.- Apoptosis.**

Recientemente se ha demostrado la implicación del sistema proteasomal de la ubiquitina en la regulación de la apoptosis en diferentes células (Mimnaugh *et al.*, 2000; Naujokat *et al.*, 2000; Pasquini *et al.*, 2000). También se ha demostrado que el sistema proteasomal regula la degradación de survivina de manera dependiente del ciclo celular. Dicha proteína es un regulador de la división celular y se requiere para proteger a las células de la apoptosis durante el ciclo mitótico. De esta manera, el sistema proteasomal participa en el control de la apoptosis y del ciclo celular (Deveraux & Reed, 1999; Zhao *et al.*, 2000).

Un caso extremo es el de la degeneración programada de los músculos intersegmentales (ISMs) en la mariposa *Manduca sexta* (Myer & Schwartz, 1996; Schwartz *et al.*, 1990) que eventualmente lleva a muerte celular; la inducción del gen de la poliubiquitina acompaña la degeneración, presumiblemente porque la ubiquitina se requiere en mayor cantidad en la proteólisis asociada a la degeneración (Finley & Chau, 1991), lo que indica la participación de la ubiquitina/ubiquitinación en los procesos de muerte celular programada.

## **2.6.- Implicación del sistema de la ubiquitina en la patogénesis de enfermedades.**

Teniendo en cuenta el amplio rango de sustratos y procesos en los que el sistema de la ubiquitina está implicado, no es sorprendente que alteraciones en dicho sistema estén implicadas en la patogénesis de ciertas enfermedades tanto hereditarias como adquiridas (Ciechanover, 1998; Ciechanover *et al.*, 2000b; Schwartz & Ciechanover, 1999). Estas patologías pueden clasificarse en los siguientes grupos:

1. **Tumores**. En ciertos tumores de origen vírico se ha demostrado una correlación entre la patología y los bajos niveles de supresores (p53, v-Jun, etc.), o bien los altos niveles de oncoproteínas víricas, debiéndose, ambos casos, a alteraciones en la tasa de degradación de

los mismos mediada por el sistema de la ubiquitina (Aviel *et al.*, 2000; Band *et al.*, 1991; Reinstein *et al.*, 2000; Scheffner *et al.*, 1990, 1993; Storey *et al.*, 1998; Treier *et al.*, 1994).

2. Enfermedades genéticas. Algunas patologías de origen genético se deben a la síntesis de proteínas mutantes que son procesadas por el sistema de la ubiquitina de manera distinta a la proteína salvaje, lo que contribuye a la patología de la enfermedad (fibrosis quística, síndrome de Liddle, etc.) (Staub *et al.*, 1997; Ward *et al.*, 1995). En otros casos (síndrome de Angelman) la proteína afectada es directamente un enzima del sistema de la ubiquitina (E6-AP) (Kishino *et al.*, 1997).

3. Respuesta inmune. Algunos virus, (Epstein-Barr, citomegalovirus, etc.) han desarrollado sutiles mecanismos para escapar al sistema inmunológico, que implican la participación del sistema de la ubiquitina (Levitskaya *et al.*, 1997; Wiertz *et al.*, 1996).

4. Enfermedades neurodegenerativas. Mediante técnicas de inmuno-histoquímica se ha demostrado el enriquecimiento de conjugados de ubiquitina en placas seniles, lisosomas, endosomas y en varios cuerpos de inclusión y fibras degenerativas en muchas enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson, Creutzfeld-Jakob, etc. De estos estudios morfológicos no se puede deducir la función del sistema de la ubiquitina en el desarrollo de estas patologías. Aunque un defecto o alteración en alguno de los enzimas del sistema podría estar implicado, parece más probable que la causa sea una alteración, hereditaria o adquirida, en una de las proteínas substrato, que la hace resistente a la proteólisis con la consiguiente acumulación del substrato y/o del conjugado resultante en agregados y cuerpos de inclusión (Andersen, 2000; López-Salon *et al.*, 2000; Lowe & Mayer, 1990; Mayer *et al.*, 1996; Suenegawa *et al.*, 1990).

5. Degeneración muscular. La pérdida de músculo esquelético, que acompaña a diversos estados patológicos, se produce como consecuencia de una aceleración de la proteólisis mediada por el sistema de la ubiquitina, aunque los estímulos extracelulares y la transducción de señal para activar el sistema de la ubiquitina en las diferentes patologías es aún desconocido (Mitch & Goldberg, 1996).

### **3.- OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.**

Las líneas generales de investigación de nuestro grupo se centran en el estudio y caracterización de las moléculas y/o estructuras fúngicas implicadas en la interacción

parásito-hospedador, bien por representar factores de virulencia o por modular la respuesta inmune (Chaffin *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 1998). Como se ha indicado anteriormente, la adhesión de *C. albicans* a las células o tejidos del hospedador es un factor de virulencia que contribuye al establecimiento y desarrollo de la infección. Debido a que la estructura más externa de *C. albicans* es su pared celular, las interacciones físico-químicas entre la célula fúngica y el hospedador tienen lugar mediante moléculas de la misma, siendo, por tanto, proteínas y manoproteínas de la pared celular fúngica los principales mediadores de la adhesión. Nuestro grupo ha caracterizado un receptor de 37 kDa para la laminina (López-Ribot *et al.*, 1994). Al intentar clonar el gen para este receptor por inmunorastreo de una librería de cDNA de *C. albicans*, se aisló un clon de 0.9 kb correspondiente al gen de la poliubiquitina. Estudios posteriores demostraron la presencia de ubiquitina en la superficie celular de *C. albicans* (Sepúlveda *et al.*, 1996a), y el análisis mediante electroforesis bidimensional e inmunotransferencia con anticuerpos frente a ubiquitina y frente a distintos receptores de *C. albicans* (las especies mp58 y p37, y el receptor para C3d), indicó que estos receptores podrían estar ubiquitinados. Por lo tanto, al igual que se ha descrito en células eucariotas superiores, la ubiquitina podría modular la funcionalidad de estos receptores y por tanto la interacción de *C. albicans* con los tejidos del hospedador (Sepúlveda *et al.*, 1996b).

Por otro lado, el sistema de la ubiquitina es prácticamente desconocido en *C. albicans*, habiéndose descrito únicamente un cDNA que codifica un enzima conjugador de ubiquitina (*UBC4*) (Damagnez, *et al.*, 1995).

Con estos antecedentes, se planteó como objetivo el estudio del sistema de la ubiquitina en *C. albicans*, incluyéndose en una primera etapa el aislamiento y caracterización de genes que codifican ubiquitina, para posteriormente estudiar su expresión, caracterizar los productos génicos mediante interrupción de las secuencias codificadoras, y determinar la función de los mismos mediante el análisis fenotípico de los mutantes nulos.





## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1.- CEPAS UTILIZADAS.

### 1.1.- Cepas bacterianas.

En este trabajo se han utilizado dos cepas de la especie bacteriana *Escherichia coli*, cuyas características más relevantes se resumen en la tabla II.1.

| CEPA  | GENOTIPO RELEVANTE   | UTILIZACIÓN EN ESTE TRABAJO                           | REFERENCIA                           |
|-------|--|---|--------------------------------------|
| DH5á  | F, $\phi$ 80d, <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_k^-$ , $m_k^+$ ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , $d^-$ , <i>gyrA96</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ), U169   | Transformación y purificación de vectores plasmídicos | Hanahan, 1983                        |
| JM109 | <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>syra96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_k^-$ , $m_k^+$ ), <i>relA1</i> <i>supE44</i> $\lambda^-$ , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lac1</i> <sup>q</sup> $\Delta$ M15] | Transformación y purificación de vectores plasmídicos | Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985. |

Tabla II.1. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

### 1.2.- Cepas fúngicas.

Las cepas de *Candida albicans* empleadas para la realización de este trabajo se indican en la tabla II.2, y las de *Saccharomyces cerevisiae* en la tabla II.3.

## 2.- MEDIOS DE CULTIVO.

### 2.1.- Bacterias.

Medio LB (Luria-Bertani) (Miller, 1972):

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Triptona (Pronadisa)     | 10 g    |
| Extracto de levadura     | 5 g     |
| NaCl                     | 5 g     |
| Agua destilada c.s.p.    | 1 litro |
| pH 7 - 7.4               |         |
| Agar (para medio sólido) | 15 g    |

| CEPA              | GENOTIPO RELEVANTE  | CEPA PARENTERAL  | UTILIZACIÓN EN ESTE TRABAJO | REFERENCIA                 |
|-------------------|---|------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 26555             |   |                  | habitual                    | ATCC                       |
| WO-1              |   |                  | librería genómica           | Soll, <i>et al.</i> , 1987 |
| CAI-4             | $\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$   | SC5314           | interrupción génica         | Fonzi & Irwin, 1993        |
| $\Delta UBI4-H1$  | $\Delta ubi4::hisG-URA3-hisG/UBI4$<br>$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$         | CAI-4            | interrupción génica         | este trabajo               |
| $\Delta UBI4-H2$  | $\Delta ubi4::hisG/UBI4$<br>$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$                   | $\Delta UBI4-H1$ | interrupción génica         | este trabajo               |
| $\Delta UBI4-6^*$ | $\Delta ubi4::hisG/\Delta ubi4::MET3-URA3$<br>$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ | $\Delta UBI4-H2$ | interrupción génica         | este trabajo               |
| $\Delta UBI4-7$   | $\Delta ubi4::hisG/\Delta ubi4::MET3-URA3$<br>$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ | $\Delta UBI4-H2$ | interrupción génica         | este trabajo               |
| $\Delta UBI3-H1$  | $\Delta ubi3::hisG-URA3-hisG/UBI3$<br>$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$         | CAI-4            | interrupción génica         | este trabajo               |
| $\Delta UBI3-H2$  | $\Delta ubi3::hisG/UBI3$<br>$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$                   | $\Delta UBI3-H1$ | interrupción génica         | este trabajo               |
| $\Delta UBI3-33$  | $\Delta ubi3::hisG/\Delta ubi3::MET3-URA3$<br>$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ | $\Delta UBI3-H2$ | interrupción génica         | este trabajo               |

**Tabla II.2.** Cepas de *C. albicans* utilizadas en este trabajo. (\* El promotor *MET3* de esta cepa no es funcional. Véase "Resultados y Discusión" para más detalle).

| CEPA    | GENOTIPO RELEVANTE  | CEPA PARENTERAL | UTILIZACIÓN EN ESTE TRABAJO           | REFERENCIA                  |
|---------|---|-----------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| SEY2101 | $MAT\alpha ura3-52 leu2-3 leu2-112$<br>$ade2 suc2-\Delta 9$                             |                 | transformación con pLC7, pINV4, pINV3 | Emr <i>et al.</i> , 1983    |
| SUB60   | $MAT\alpha ubi4-\Delta 2::LEU2 lys2-801$<br>$leu2-3,112 ura3-52 his3-\Delta 200 trp1-1$ | DF5             | transformación con pPR1               | Finley <i>et al.</i> , 1987 |
| SUB121  | $MAT\alpha \Delta ubi3::HIS3 lys2-801 leu2-3,112$<br>$ura3-52 his3-\Delta 200 trp1-1$   | DF5             | transformación con pPR2               | Finley <i>et al.</i> , 1989 |
| SUB62   | $MAT\alpha lys2-801 leu2-3,112 ura3-52$<br>$his3-\Delta 200 trp1-1$                     | DF5             | control                               | Finley <i>et al.</i> , 1987 |

**Tabla II.3.** Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo. Las cepas SUB 60, 121 y 62 fueron cedidas por el Dr. D. Finley (Harvard Medical School, Boston, USA).

### **Medio LB-ampicilina**

Para la selección y cultivo de cepas transformadas con plásmidos, se suplementó el medio LB con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml, a partir de una solución concentrada (0.1 g/ml) previamente esterilizada por filtración.

### **Medio LB-ampicilina-IPTG-X-gal**

Para diferenciar entre los transformantes sin actividad β-galactosidasa (con plásmidos recombinantes) de aquellos con actividad β-galactosidasa (con plásmido sin inserto), el medio de cultivo LB-ampicilina se suplementó con IPTG (a partir de una solución 100 mM en agua) a una concentración final de 0.5 mM, y X-gal (a partir de una solución de 20 mg/ml en N,N-dimetil-formamida) a una concentración final de 0.05 mg/ml. Los clones con actividad β-galactosidasa originan colonias azules por hidrólisis enzimática del X-gal.

### **Medio TB (Terrific Broth):**

Preparado según las instrucciones del fabricante (Sigma). Este medio se utilizó adicionado de ampicilina (100 µg/ml) para el crecimiento de transformantes bacterianos y posterior purificación del DNA plasmídico.

## **2.2.- Levaduras.**

### **Medio sintético de Lee (Lee *et al.*, 1975):**

|   |         |
|---|---------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 5 g     |
| MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O          | 0.2 g   |
| HK <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anhidro         | 2.5 g   |
| NaCl  | 5 g     |
| Glucosa   | 12.5 g  |
| Prolina   | 0.5 g   |
| Biotina   | 0.001 g |
| Agua destilada c.s.p.                           | 1 litro |

pH 6.8 - 7.0

Agar (para medio sólido) 15 g

### **Medio YPD**

|                      |      |
|----------------------|------|
| Extracto de levadura | 10 g |
| Triptona (Pronadisa) | 20 g |
| Glucosa              | 20 g |

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Agua destilada c.s.p.    | 1 litro |
| pH 6 - 7                 |         |
| Agar (para medio sólido) | 15 g    |

En algunos casos, indicados en el texto, se utilizó este mismo medio con sacarosa al 2% (medio YPS), en lugar de glucosa, y Antimicina A a una concentración final de 2 ppm (a partir de una solución de 10 mg/ml en etanol) para inhibir la respiración.

#### **Medio SD**

|                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| Base nitrogenada de levadura (YNB) | 1.7 g   |
| Sulfato amónico                    | 5 g     |
| Glucosa                            | 20 g    |
| Agua destilada c.s.p.              | 1 litro |
| pH 6 - 7                           |         |
| Agar (para medio sólido)           | 15 g    |

Para el cultivo de cepas con auxotrofias, se adicionaron al medio mínimo (SD) los nutrientes correspondientes a la concentración final de 20 mg/l, (en el caso de adenina, uracilo, triptófano e histidina), y de 30-40 mg/l (en el de leucina y lisina).

El medio de cultivo se suplementó con uridina (a partir de una solución de 15 mg/ml, esterilizada por filtración), a una concentración final de 25-50 µg/ml para el crecimiento de las cepas Ura<sup>-</sup> de *C. albicans* (CAI-4 y derivadas).

### **3.- CONDICIONES DE CULTIVO.**

Las bacterias (*E. coli*) se cultivaron rutinariamente a 37°C en estufa (medio sólido) o en incubador orbital a 200 rpm (medio líquido).

Las levaduras (*C. albicans* y *S. cerevisiae*) se cultivaron a 28°C, también en estufa o incubador orbital a 200 rpm, según se tratara de un medio sólido o líquido, respectivamente. La obtención de *C. albicans* en forma de micelio se realizó a partir de levaduras en ayuno metabólico, según el método descrito por Casanova *et al.*, (1989). Para ello, *C. albicans* se creció en medio de Lee, a 28°C, hasta fase exponencial tardía de crecimiento. Las células se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min, se lavaron con agua destilada

estéril y se resuspendieron en un volumen de agua destilada estéril. Esta suspensión se incubó a 28°C con agitación durante 3 h y seguidamente se mantuvo durante 48-72 horas a 4°C (ayuno metabólico o estrés nutricional). Posteriormente, estas células se recogieron por centrifugación y se diluyeron 1:5 en medio de Lee precalentado a 37°C. Esta suspensión se incubó a 37°C con agitación hasta la obtención de micelio (aproximadamente el 90% de las células forman tubo germinativo después de 3 h de inducción). De manera similar, se obtiene un cultivo de células levaduriformes incubando células en reposo metabólico en medio de Lee a 28°C.

El crecimiento celular se valoró midiendo la  $DO_{600}$  en un espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 UV/Visible, y la cantidad de células se determinó, cuando fue necesario, utilizando una curva patrón en la que se relaciona la  $DO_{600}$  con el peso seco y/o número de células por ml de cultivo.

#### **4.- PLÁSMIDOS.**

**pGEM-T (Promega):**

**Utilización:** clonaje de productos de PCR.

**Características:** entre otros elementos destacan los siguientes:

- una timina 3' terminal a ambos lados de la molécula lineal, que permite el ligamiento directo de productos de PCR
- el gen que confiere resistencia a la ampicilina, lo que permite la selección de los transformantes con este plásmido en un medio que contenga este antibiótico
- un fragmento de DNA que comprende el promotor del gen *lacZ* y la secuencia que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa (péptido  $\alpha$ ). Dentro de esta secuencia codificante contiene además un sitio de clonaje múltiple que no interrumpe el marco de lectura del gen. Cuando se transforma con este vector una cepa de *E. coli* que no tiene actividad  $\beta$ -galactosidasa porque tiene una delección en el gen *lacZ* del operón lac en la zona próxima al operador (región del péptido  $\alpha$ ), se complementa dicha deficiencia y se recupera la actividad ( $\alpha$ -complementación). En un medio que contenga IPTG (isopropil-

$\beta$ -D-tiogalactopiranosido), inductor de la síntesis de la  $\beta$ -galactosidasa, y el sustrato cromogénico X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido), aparecerán colonias azules por la hidrólisis del X-gal. Si se incorpora DNA exógeno en el sitio de clonaje múltiple del vector, las colonias aparecerán blancas, puesto que el inserto interrumpe el gen *lacZ* plasmídico e impide la complementación. Por tanto, las bacterias que llevan los plásmidos recombinantes darán lugar a colonias blancas y las que no los lleven, colonias azules (selección azul-blanca).

**pEMBLYe23 (Baldari & Cesareni, 1985):**

Utilización: vector empleado para construir la librería genómica utilizada en este estudio. Es útil para transformar tanto bacterias como levaduras.

Características: entre otros elementos contiene:

- el gen que proporciona resistencia a la ampicilina
- el fragmento de DNA del gen *lacZ* y su promotor, descrito anteriormente, que permite la selección de los transformantes por el color de las colonias
- el gen *URA3* de *S. cerevisiae*, que se puede utilizar como marcador selectivo para la selección de transformantes por complementación
- el replicón del plásmido de 2  $\mu$ m de *S. cerevisiae*, fragmento de DNA plasmídico que permite la replicación autónoma del plásmido en la levadura y su mantenimiento en alto número de copias.

**pUC18 y pUC19 (Messing, 1983):**

Utilización: subclonaje de fragmentos de DNA.

Características: entre otras destacan:

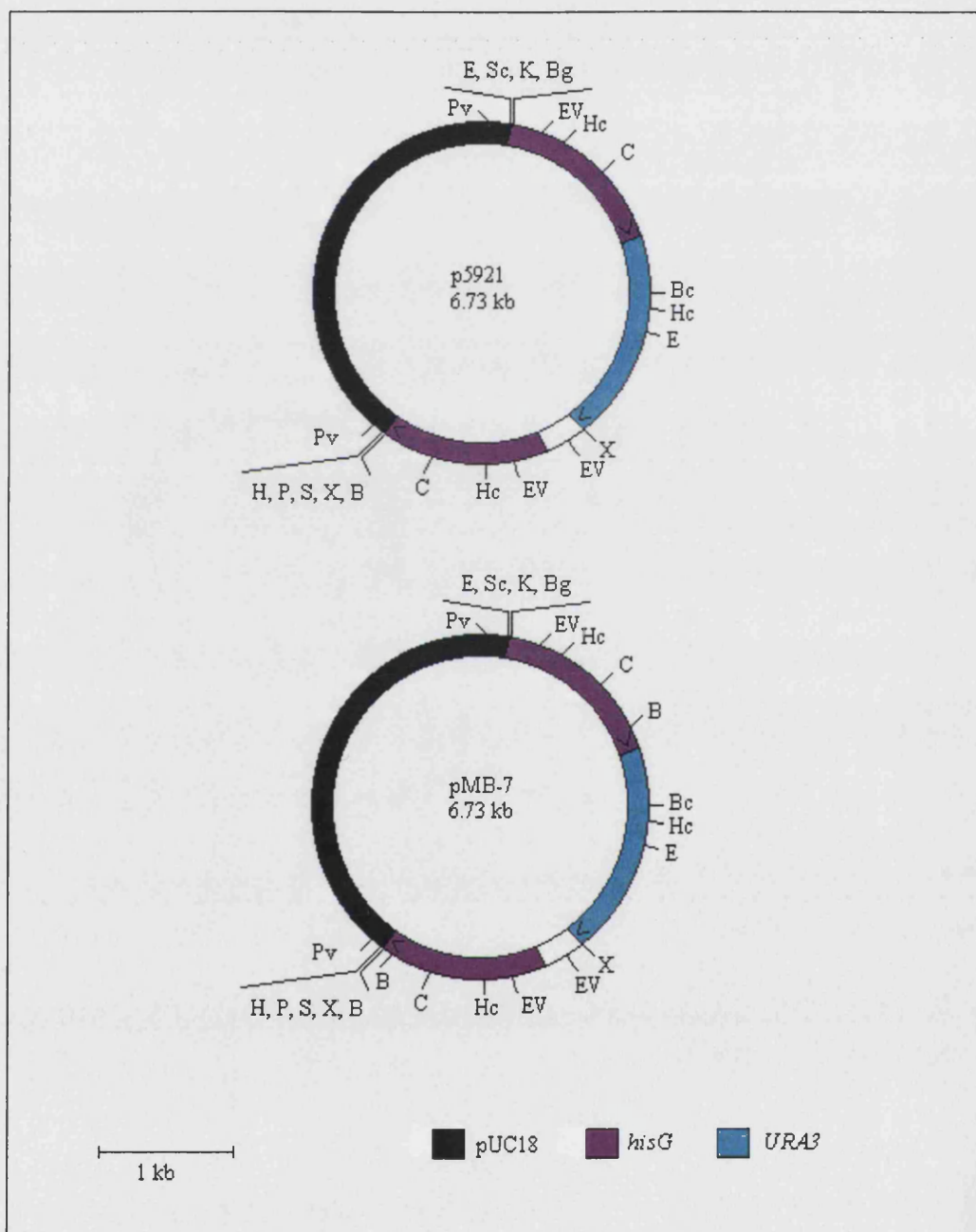
- el gen que proporciona resistencia a la ampicilina
- el fragmento de DNA del gen *lacZ* y su promotor, descrito anteriormente, que permite la selección de los transformantes por el color de las colonias.

**pMB7 y p5921 (Fonzi & Irwin, 1993):**

Utilización: experimentos de interrupción génica secuencial de los dos alelos en *C. albicans*.



**Características** (Fig. II.1): estos plásmidos contienen el cassette *hisG::URA3::hisG* (Fonzi & Irwin, 1993) consistente en el gen *URA3* de *C. albicans* flanqueado por repeticiones directas del gen *hisG* de *Salmonella typhimurium*. El plásmido p5921 es el precursor de pMB7 y sólo difieren uno de otro en un sitio de restricción *Bam*HI presente únicamente en la secuencia *hisG* de pMB7.



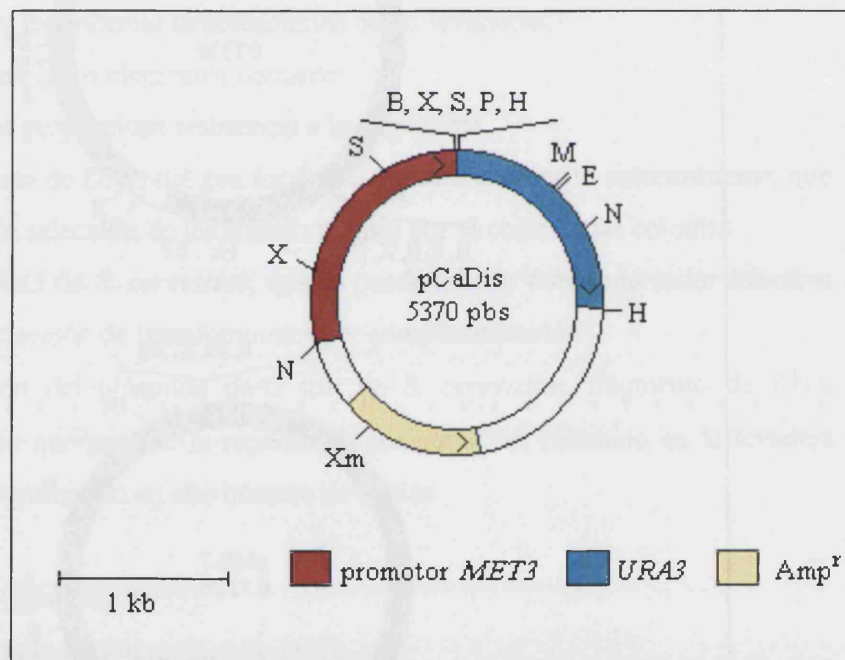
**Fig. II.1.** Plásmidos p5921 y pMB7. Dianas de enzimas de restricción: H (*Hind*III), P (*Pst*I), S (*Sal*I), X (*Xba*I), B (*Bam*HI), Pv (*Pvu*II), E (*Eco*RI), Sc (*Sac*I), K (*Kpn*I), Bg (*Bgl*II), EV (*Eco*RV), Hn (*Hinc*II), C (*Cl*aI), Bc (*Bc*II).

**pCaDis (Care et al., 1999):**

Utilización: interrupción de un alelo de un gen y colocación simultánea de una copia intacta del gen bajo el control del promotor regulable *MET3*, para la obtención de mutantes nulos condicionales.

Características (Fig. II.2): entre otros elementos contiene:

- el gen que proporciona resistencia a la ampicilina
- el gen *URA3* de *S. cerevisiae*, que se puede utilizar como marcador para selección de transformantes por complementación
- el promotor *MET3* con un sitio múltiple de clonaje en su extremo 3' para subclonar el extremo 5' del gen a interrumpir.



**Fig. II.2.** Plásmido pCaDis. Dianas de enzimas de restricción: B (*Bam*HI), P (*Pst*I), H (*Hind*III), B (*Bam*HI), X (*Xba*I), S (*Sal*I), M (*Mun*I), N (*Nde*I), Xm (*Xmn*I).

**5.- AMPLIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).**

En general, la amplificación se realizó en tubos de 0.2 ml con un volumen final de reacción de 50  $\mu$ l, que contenía 1ng-1 $\mu$ g del DNA a amplificar, 5  $\mu$ l de tampón de reacción 10x (Promega), 7  $\mu$ l de  $MgCl_2$  25mM, 1  $\mu$ l de solución concentrada de dNTPs (10 mM en cada nucleótido), 20-40 pm de cada oligonucleótido (2  $\mu$ l de una solución a una concentración

de 10-20 pm/ $\mu$ l), 0.5  $\mu$ l de *Taq* DNA polimerasa (Promega) (5 unidades/ $\mu$ l) y agua destilada estéril (c.s.p. 50  $\mu$ l). El enzima se adicionó después de la primera etapa de 1 min a 95°C según el protocolo de amplificación. En caso de amplificar DNA a partir de células enteras, éstas se tomaron con un palillo estéril a partir de la colonia de interés, y se resuspendieron directamente en la mezcla de reacción (Jenowski *et al.*, 1995). Antes de iniciar el protocolo de amplificación, se adicionaron 30-40  $\mu$ l de aceite mineral estéril sobre cada reacción para evitar la evaporación.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Gene-E (Techne), de acuerdo con el siguiente programa: en primer lugar se desnaturizó el DNA manteniéndolo 1 min a 95°C, y a continuación, después de añadir la *Taq* polimerasa, se realizaron 29 ciclos de tres etapas, la primera de 40 seg a 95°C, para desnaturizar el DNA, la segunda de 30 seg a 60°C, para la hibridación de los oligonucleótidos al DNA y por último, la tercera de 2 min a 72°C, de elongación o extensión de las cadenas de DNA. A continuación, se realizó un último ciclo con esas tres etapas en el que la etapa de extensión fue de 15 min, en lugar de 2 min, a 72°C.

## **6.- ELECTROFORESIS DE DNA.**

La separación electroforética de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa a una concentración variable entre 0.7 y 1.5% según el tamaño de los fragmentos a separar, utilizándose rutinariamente una concentración de 0.8%, que se aumentó cuando se requería una separación de fragmentos de DNA pequeños.

Los geles se prepararon solubilizando en caliente la agarosa (Pronadisa) en el tampón de electroforesis (TAE).

Antes de cargar las muestras a analizar en el gel, se les añadió 1/6 de su volumen de tampón de carga, para darles densidad y visualizar el frente de la electroforesis.

En cada electroforesis se cargaba una muestra de fragmentos de DNA de tamaño conocido (1  $\mu$ g de DNA del fago lambda digerido con *EcoRI/HindIII*, Boehringer-Mannheim) que se utilizó como patrón para determinar el tamaño de los fragmentos de DNA.

Las electroforesis se realizaron a voltaje constante (50-100 V) durante 2-3 horas. Finalizada la electroforesis, los geles se sumergieron en una solución acuosa de bromuro de etidio a una concentración de 10  $\mu$ g/ml durante 20-30 min. Los fragmentos de DNA se

visualizaron en un transiluminador de luz UV (360 nm) fotografiándose utilizando un equipo Polaroid MP-4.

➡ **TAE 10x:** 48.4 g Tris, 11.42 ml ácido acético glacial, 3.8 g EDTA-Na<sub>4</sub> , pH 8.0, agua destilada c.s.p. 1 litro.

➡ **Tampón de carga:** azul de bromofenol 0.25% (p/v), glicerol 40% (v/v), en TAE.

## **7.- PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.**

Después de la separación de los fragmentos de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Pronadisa), las bandas de DNA de interés detectadas con ayuda del transiluminador de luz UV, se cortaron de gel con un escalpelo estéril y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga (300 µl de agarosa como máximo, por tubo). El DNA se purificó utilizando el kit Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, los tubos de microcentrífuga, que contenían las porciones de agarosa con el DNA de interés, se introdujeron en un baño de agua a 65°C hasta la fusión de la agarosa, y a continuación se les añadió 1 ml de resina a cada tubo, y se mezclaron bien. La mezcla DNA/resina fue pipeteada al interior de una jeringuilla y pasada a través de una minicolumna donde queda retenida. Después de pasar 2 ml de isopropanol al 80% frío para lavar la mezcla DNA/resina y, tras secar ésta por centrifugación (20 seg a 12.000 rpm), el DNA se eluyó introduciendo 50 µl de TE o agua estéril (cuando el DNA iba a utilizarse para ligamientos) y centrifugando, al cabo de 1 min, durante 20 seg a 12.000 rpm. El eluido se recogió en tubos de microcentrífuga estériles.

➡ **TE:** Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM.

## **8.- CUANTIFICACIÓN DE DNA.**

La estimación aproximada de la cantidad de DNA de una muestra se realizó mediante separación electroforética de una alícuota de la misma y la posterior comparación de la

intensidad de la banda obtenida con la intensidad de las bandas de los patrones de peso molecular, cuyo tamaño (y cantidad) son conocidos.

Una cuantificación más exacta se realizó espectrofotométricamente. Se midió la absorbancia a 260 nm de 2 y 4 µl de muestra diluidos en 1 ml de tampón TE o agua. La cantidad de DNA se calcula teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia equivale a una concentración de 50 µg/ml. Así la concentración de DNA de la muestra viene dada por la siguiente fórmula:

$$\text{DNA muestra } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{[A (2 \mu\text{l}) + A (4 \mu\text{l})] \cdot 50 \mu\text{g}/\text{ml} \cdot 1,006 \text{ ml}}{6 \mu\text{l}}$$

Este método espectrofotométrico también cuantifica RNA, por lo que el contenido de DNA de algunas muestras (DNA plasmídico) puede estar sobreestimado. Para determinar la posible contaminación de la muestra por proteínas, se midió también la absorbancia de las mismas alícuotas de muestra a 280 nm. Si la relación A (260 nm)/A (280 nm) es próxima a 2, la contaminación por proteínas podía considerarse despreciable.

Cuando la concentración de DNA de una muestra era baja, **el DNA se concentró por precipitación**. Para ello, se añadió NaCl a la muestra (concentración final de 0.3 M), y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, dejándola un mínimo de 2 h a -20°C. Después de centrifugar 15 min a 15.000 rpm, lavar con etanol frío al 70% y secar en bomba de vacío, se disolvió en el volumen apropiado de agua destilada estéril o TE.

## **9.- DIGESTIÓN DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.**

Las reacciones de digestión se realizaron en un volumen final de 20-30 µl conteniendo:

- DNA plasmídico (1-3 µg), o DNA cromosomal (10 µg)
- enzima (5-10 unidades) (Boehringer-Mannheim o Promega)
- 2-3 µl del tampón (10x)
- 1 µl de RNasa A (10 µg/µl)
- agua destilada estéril para completar el volumen.

La mezcla de reacción se incubó 1-3 horas a 37°C en caso de digestión de DNA plasmídico, o toda la noche a 37°C en caso de digerir DNA cromosomal.

Cuando en una misma reacción se emplearon dos enzimas de restricción diferentes, el tampón utilizado fue uno compatible para los dos enzimas.

➔ **RNasa A:** RNasa pancreática (RNasa A) al 1% (p/v) en TE, NaCl 25 mM. La posible presencia de DNasas se eliminó por calentamiento (20 min a 95°C). Tras enfriamiento a temperatura ambiente se dispensó en alicuotas y se guardó a -20°C.

### **10.- LIGAMIENTO DE FRAGMENTOS DE DNA.**

La unión entre fragmentos de DNA con extremos cohesivos o romos se realizó con el enzima T4 DNA ligasa (Boehringer Mannheim o Promega). La relación molar vector/inserto utilizada habitualmente fue 1/5. La reacción se realizó en un volumen final de 10 µl en tubos estériles de 0.2 ml, conteniendo las cantidades apropiadas de DNA de vector e inserto (0.1-0.5 µg) calculadas según la fórmula:

$$\frac{C_i \cdot V_i \cdot Kb_v}{C_v \cdot V_v \cdot Kb_i} = \frac{I}{V}$$

siendo:

$C_i$  y  $C_v$  → concentración original de inserto y de vector

$V_i$  y  $V_v$  → volumen de inserto y de vector en la reacción de ligamiento

$kb_v$  y  $kb_i$  → tamaño del vector y del inserto

$I/V$  → relación molar inserto/vector en la reacción de ligamiento

Además del DNA la mezcla de reacción contenía 1 µl del tampón de la ligasa (10x), 3 unidades de T4 DNA ligasa y agua destilada estéril hasta un volumen final de 10 µl. La reacción se incubó a 14°C durante toda la noche, y al día siguiente se utilizó para transformar células competentes de *E. coli*.

En los casos en que el vector podía religar consigo mismo, la reacción se calentó a 50-55°C durante 5 min antes de adicionar la ligasa y el tampón.

## **11.- TRANSFORMACIÓN DE *E.coli*.**

### **11.1.- Obtención de células competentes.**

Se sembró la cepa adecuada de *E. coli* (DH5 $\alpha$  o JM109) en 5 ml de medio LB, y se cultivó toda la noche a 37°C hasta fase estacionaria. Seguidamente, se inoculó un matraz con 100 ml de LB precalentado a 37°C con 0.5 ml de ese cultivo, y se incubó a 37°C hasta la fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} = 0.6$ ) (unas 2-2.5 horas). Las células se recogieron por centrifugación a 7.000 rpm durante 10 min a 0-4°C, y el sedimento se resuspendió en 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío. Tras mantenerlo a 0-4°C durante 5-6 horas, se recogieron las células por centrifugación durante 5 min a 7.000 rpm a 0-4°C, y se resuspendieron en 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío. Se transformaron alícuotas de 200  $\mu$ l de esta suspensión.

### **11.2.- Transformación.**

Para transformar células de *E. coli* con DNA exógeno (plásmido purificado o el producto de una reacción de ligamiento), se mezclaron 200  $\mu$ l de células competentes con el DNA exógeno (10-20  $\mu$ l, 0.1-1  $\mu$ g) en un tubo de microcentrífuga estéril, y esta mezcla se mantuvo a 0-4°C durante un mínimo de 30 min. A continuación se dió un choque térmico a 42°C durante 90 seg, y pasado este tiempo se enfrió el tubo en hielo durante 2 min.

### **11.3.- Selección de transformantes.**

Después de la transformación, se añadió 1 ml de LB a los tubos con las células transformadas y, tras mezclar por inversión, se incubó la suspensión a 37°C durante 1 hora para que las células transformadas expresaran la resistencia a ampicilina. Alícuotas de 100  $\mu$ l de esta suspensión se sembraron en placas de medio selectivo (LB- ampicilina), ya que los plásmidos utilizados confieren resistencia a este antibiótico, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Para poder diferenciar los transformantes que habían incorporado el plásmido con el inserto de aquellos que lo habían hecho sin el inserto, a las placas de LB-ampicilina se les añadieron 100  $\mu$ l de IPTG 100 mM y 50  $\mu$ l de X-Gal 20 mg/ml, con lo que los transformantes con el plásmido intacto aparecían de color azul, mientras que los que habían incorporado el plásmido recombinante aparecían de color blanco (véase apartado 4).

#### **11.4.- Análisis de transformantes.**

Habitualmente los transformantes (6-12) se analizaron sembrando cada colonia en 5 ml de LB-ampicilina, incubándose a 37°C durante toda la noche. Seguidamente se purificó el DNA plasmídico por un método rápido ("minipreps") (véase apartado 12.1.a), se digirió con enzimas de restricción adecuados y los fragmentos de DNA resultantes se separaron por electroforesis en un gel de agarosa. Analizando el tamaño de los fragmentos de DNA obtenidos se determinó si los transformantes contenían la construcción plasmídica deseada.

### **12.- PURIFICACIÓN DE DNA.**

#### **12.1.- Purificación de DNA plasmídico de *E. coli*.**

##### **12.1.a.- Purificación a pequeña escala ("minipreps").**

Se utilizó para analizar rápidamente el DNA plasmídico de los clones transformantes. Se inocularon 5 ml de LB-ampicilina con cada transformante seleccionado, y se incubó a 37°C durante toda la noche. Las células de 0.5-1 ml de cultivo se recogieron por centrifugación a 10.000 rpm durante 5 min en tubos de microcentrífuga, y se resuspendieron en 200 µl de tampón STET, manteniéndose a 0°C (en hielo). A continuación se añadieron 40 µl de una solución de lisozima (10 mg/ml) a cada tubo, y tras mezclarse por inversión, se introdujeron rápidamente en agua hirviendo, donde se mantuvieron durante 50-60 seg, para provocar la lisis celular y liberación del DNA plasmídico de las células. A continuación los tubos se enfriaron en hielo (0°C), donde se mantuvieron durante 10 min. Pasado este tiempo, se centrifugaron 15 min a 12.000 rpm, y se eliminó de cada tubo cuidadosamente, con ayuda de un palillo estéril, el sedimento (con los restos celulares y el DNA cromosómico). A cada sobrenadante se añadieron 400 µl de isopropanol 100% frío (-20°C) y se mantuvo 15 min a -20°C para precipitar el DNA. El precipitado se recogió por centrifugación a 12.000 rpm 10 min y se precipitó de nuevo el DNA plasmídico resuspendiendo el sedimento en 200 µl de TE/NaCl 0,3 M, añadiendo 200 µl de isopropanol 100% frío (-20°C) y manteniendo la mezcla un mínimo de 15 min a -20°C. Después se recogió el precipitado por centrifugación durante 10 min a 12.000 rpm, se lavó el sedimento con 500 µl de etanol al 80% frío (-20°C), y se secó



a vacío durante 15 min. El DNA plasmídico así purificado se resuspendió en agua destilada estéril (20-50  $\mu$ l).

➔ **Tampón STET:** Tris-HCl 50 mM pH 8.0, Triton 5% (v/v), sacarosa 8% (p/v), EDTA 50 mM.

### **12.1.b.- Purificación a gran escala ("maxipreps").**

Se utilizó el método de la lisis alcalina, originariamente descrito por Birnboim y Doly (1979), con algunas modificaciones. Se inocularon 500 ml de medio LB-ampicilina con una colonia del transformante de *E. coli* cuyo plásmido se deseaba purificar y se incubó a 37°C durante 6-7 horas (hasta fase exponencial tardía). A continuación se añadieron 80 mg de cloramfenicol y se siguió incubando a la misma temperatura y agitación durante toda la noche. Este tratamiento inhibe la síntesis proteica y detiene el crecimiento celular sin impedir que el plásmido se replique. Las células se recogieron por centrifugación durante 10 min a 5.000 rpm a 0°C. El sedimento se resuspendió en 10 ml de tampón GTE, y seguidamente se añadieron 15 ml de NaOH 0.2 N / SDS 1% (p/v) recién preparado, y se agitó suavemente (para no romper el DNA cromosomal durante la lisis celular) por inversión durante 10-15 min, hasta homogeneidad y transparencia y se mantuvo en hielo durante 15 min. A continuación, se neutralizó la solución alcalina añadiendo 15 ml de acetato potásico 3 M pH 4.8, se mezcló por inversión y se mantuvo en hielo durante 15 min. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 0°C para eliminar los restos celulares y el DNA cromosomal precipitado. Al sobrenadante se le añadió RNasa A a una concentración final de 20  $\mu$ g/ml y se incubó a 37°C durante 20 min, tras lo cual se realizaron dos extracciones con 20 ml de cloroformo. A la fase acuosa resultante se le añadió un volumen de isopropanol 100% frío (-20°C), y se mantuvo a -20°C durante 10 min para precipitar el DNA. Se recogió el precipitado por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C, se lavó con etanol frío (-20°C) al 70%, y se secó a vacío. El precipitado se disolvió en 3.2 ml de agua destilada estéril y se precipitó de nuevo el DNA plasmídico añadiendo 0.8 ml de NaCl 4 M y 4 ml de PEG<sub>8000</sub> al 13% (p/v) y manteniéndose la mezcla en hielo durante 20 min. El DNA plasmídico precipitado se recogió por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C, y el sedimento se lavó con etanol frío (-20°C) al 70%, se secó a vacío y se resuspendió en 1.5 ml de TE o agua destilada estéril.

- ➔ **Tampón GTE:** Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0.
- ➔ **Acetato potásico 3 M, pH 4.8:** 29.4 g acetato potásico, 11.5 ml ácido acético, y agua c.s.p. 100 ml.

### **12.1.c.- Purificación para secuenciación.**

Se siguió el mismo método que el descrito en el apartado anterior, pero adaptado a un volumen inicial de 5 ml de cultivo del transformante. El medio de cultivo utilizado preferentemente fue "Terrific Broth" (Sigma), en el que se consigue un rendimiento superior puesto que se incrementa en 4-8 veces el nº de bacterias/ml.

### **12.2.- Purificación de DNA cromosomal de levaduras.**

#### **12.2.a.- Purificación a pequeña escala.**

Se creció la cepa de levadura (*C. albicans* o *S. cerevisiae*) en 10 ml de medio líquido YPD o SD, suplementado con los aminoácidos requeridos en cada caso, a 28°C, durante toda la noche hasta fase estacionaria. Las células del cultivo se recogieron por centrifugación a 3.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. El sedimento celular se resuspendió en 0.5 ml de agua destilada estéril y se transfirió a un tubo de microcentrífuga. Tras centrifugar las células para eliminar el sobrenadante, se añadieron perlas de vidrio (0.5 g, diámetro 425-600 µm) y se agitó en "vórtex" a alta velocidad, durante 5-10 intervalos de 1 min cada uno, intercalados con períodos de 1 min en hielo, hasta comprobar mediante exámen microscópico que se había conseguido una rotura del 80-90% de las células. A continuación se añadieron 200 µl de "breaking buffer", 200 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1, v/v) y 200 µl de TE, y se agitó con ayuda del "vórtex" durante 15-30 seg. A continuación se centrifugó durante 5 min a 12.000 rpm a temperatura ambiente, y se transfirió la fase acuosa a un tubo de microcentrífuga nuevo, al que se añadió 1 ml de etanol 100% frío (-20°C), se mezcló bien por inversión y se mantuvo a -20°C durante 30 min. Después se centrifugó durante 5 min a 12.000 rpm a 4°C, y el precipitado se resuspendió en 400 µl de TE, y se incubó con RNasa A (3 µl, 10 mg/ml) a 37°C durante 5 min para degradar el RNA. A continuación se añadieron 30 µl de NaCl 4 M y 1 ml de etanol 100% frío (-20°C), se mezcló bien por inversión y se mantuvo a -20°C durante 30 min para precipitar el DNA cromosomal.

El precipitado de DNA cromosomal se recogió por centrifugación a 12.000 rpm a 4°C durante 5 min, se lavó dos veces con etanol al 70% frío (-20°C), y a continuación se secó a vacío. El sedimento de DNA cromosomal se disolvió suavemente en 100 µl de TE manteniéndolo durante una noche a 4°C y posterior homogeneización de la disolución mediante pipeteo suave, para evitar la fragmentación del mismo. Por esta misma razón el DNA cromosomal ya disuelto era mantenido a 4°C.

➔ **"breaking buffer"**: Triton X-100 2% (v/v), SDS 1% (p/v), NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0.

### **12.2.b.- Purificación a gran escala.**

Se siguió el método descrito por Rothstein (1985) que implica la obtención de protoplastos. Se sembró la cepa de levadura en 2 litros de medio de Lee y se incubó a 28°C hasta fase exponencial de crecimiento. Las células se recogieron por centrifugación durante 5 min a 5.000 rpm, se lavaron con 40 ml de agua destilada estéril, y a continuación con 20 ml de tampón A. Después de los lavados, el sedimento celular se resuspendió en 40 ml de tampón A y se adicionaron 0.5 mg/ml de Zimoliasa 20T (ICN Biomedicals, Inc.) (preparación enzimática comercial con actividad β-glucanasa) y 0.5 ml de β-mercaptoetanol, incubándose a 37°C con agitación suave (70 rpm) hasta la obtención de protoplastos (unos 45-60 min). Una vez formados los protoplastos, se recogieron por centrifugación durante 5-10 min y se resuspendieron suavemente en 5 ml de tampón A, con ayuda de una pipeta Pasteur. A continuación se completó el volumen a 45 ml con este mismo tampón, los protoplastos se homogeneizaron suavemente y se centrifugaron durante 10 min a 3.000 rpm, resuspendiéndose, de nuevo, en 10 ml de tampón A. Después esta suspensión concentrada de protoplastos se fue añadiendo lentamente sobre 50 ml de TCES, con 10 µl de β-mercaptoetanol, en un vaso de precipitados estéril con agitación continua pero suave, para lisar los protoplastos sin romper el DNA cromosomal. Posteriormente se incubó a 65°C, en baño de agua, durante 15 min para completar la lisis y destruir las DNAsas. Al lisado, una vez enfriado en hielo durante 10 min, se añadieron 30 ml de acetato potásico 3 M pH 4.8, se mezcló suavemente y la mezcla se mantuvo 1 hora en hielo para que precipitar el SDS y las proteínas. El precipitado fue eliminado mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 20 min a 4°C, y el DNA del sobrenadante se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol frío

(-20°C), durante 10 min en hielo. El DNA se recogió mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min, se lavó con etanol al 70%, se secó a temperatura ambiente y se resuspendió suavemente en 25 ml de tampón TE manteniéndose en agitación (85 rpm) durante toda la noche a temperatura ambiente. Para eliminar el RNA contaminante se añadió 0.5 ml de RNasa al 1% y se incubó a 37°C durante 0.5-1 hora. A continuación se realizaron dos extracciones con un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1, v/v). El DNA presente en la fase acuosa fue precipitado con acetato de sodio 3 M (a una concentración final de 0.3 M), y 0.6 volúmenes de isopropanol frío (-20°C), mezclándose bien y manteniéndose en hielo durante unos minutos. El sedimento de DNA se recogió por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min, se lavó con etanol al 70%, se secó al aire y se resuspendió en 2 ml de tampón TE mediante agitación suave (90 rpm) durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, el DNA se reprecipitó con 4.5 ml de EtAcAm mezclándolo suavemente por inversión a temperatura ambiente. Las fibras de DNA formadas se recogieron enrollándolas en una pipeta Pasteur estéril, se lavaron con etanol al 70% frío (-20°C), se secaron al aire a temperatura ambiente y se resuspendieron en 1 ml de tampón TE, a una concentración final de 1-5 µg/µl. Alicuotas de esta solución se guardaron a 4°C en tubos de microcentrífuga.

➔ **Tampón A:** KCl 0.6 M, EDTA 100 mM pH 8.0.

➔ **TCES:** Tris-HCl 0.2 M pH 8.0, NaCl 0.2 M, EDTA 50 mM pH 8.0, SDS 2% (p/v).

➔ **EtAcAm:** 6 volúmenes de etanol 100%, 1 volumen de acetato amónico 7.5 M. Guardar a 4°C.

### **13.- MARCAJE NO RADIATIVO DE SONDAS DE DNA.**

Los fragmentos de DNA utilizados como sondas en experimentos de hibridación fueron marcados de forma no radiactiva, mediante el "DIG DNA Labeling and Detection Kit" de Boehringer Mannheim, que utiliza la digoxigenina, un hapteno esteroide, para marcar el DNA. Las sondas de DNA marcadas con digoxigenina se sintetizan enzimáticamente mediante el fragmento Klenow de la DNA Polimerasa I de *E. coli* y oligonucleótidos de secuencia corta y aleatoria que sirven como cebadores. Para ello, el DNA a marcar se desnaturaliza por calor y posteriormente el fragmento Klenow sintetiza las cadenas complementarias al molde a partir de los cebadores, en presencia de una mezcla de dNTPs.

Uno de estos nucleótidos (el dUTP) está marcado con digoxigenina. (DIG-dUTP), por lo que las cadenas de DNA de nueva síntesis incorporan la digoxigenina a su estructura.

El DNA para ser utilizado como sonda, se purificó a partir de gel de agarosa (véase apartado 7) y fue marcado de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit. El DNA (0.5-3 µg), diluido en agua destilada estéril hasta un volumen de 15 µl, se desnaturalizó durante 10 min a 100°C, tras lo que se enfrió rápidamente en hielo-etanol. A continuación se añadieron 2 µl de una mezcla de hexanucleótidos concentrada (10x), 2 µl de una mezcla de dNTPs concentrada (10x) en la que el dUTP está marcado con DIG, y 1 µl del enzima de Klenow (2 U/µl), todo ello suplementado por el kit. Tras incubar esta mezcla toda la noche a 37°C, se añadieron 2 µl de una solución de EDTA 0.2 M pH 8.0 para parar la reacción de marcaje.

#### **14.- TRANSFERENCIA DE DNA A FILTROS DE NYLON (SOUTHERN BLOT).**

##### **14.1.- Por capilaridad.**

Se realizó según el método descrito por Southern (1975) y modificado por Sambrook *et al.* (1989). Después de separar los fragmentos de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa, y tinción con bromuro de etidio para visualizarlos, se lavó el gel con agua destilada y se sumergió en una bandeja con HCl 0.25 M durante 30 min (renovando la solución a los 15 min), con agitación suave. Después de este tratamiento, el gel se lavó en agua destilada, y fue sumergido en una solución desnaturalizante (NaOH 0.5 M y NaCl 1.5 M) durante 30 min en agitación suave (renovando la solución a los 15 min). A continuación se lavó el gel con agua destilada y se sumergió en una solución neutralizante de Tris-HCl 0.5 M pH 7, NaCl 1.5 M, manteniéndose en agitación durante 30 min (renovando la solución a los 15 min), para neutralizar el pH. Finalmente el gel se sumergió durante 15 min en tampón SSC 20x, el mismo tampón que se utilizó para realizar la transferencia. Seguidamente el DNA se transfirió por capilaridad durante toda la noche a temperatura ambiente a una membrana de Nylon cargada positivamente (Borhinger-Mannheim). El montaje utilizado se describe a continuación. Sobre una bandeja en la que se colocará el tampón de transferencia SSC 20x, se disponen los siguientes elementos de abajo a arriba: un soporte sobre el que se colocan 2 tiras de papel de filtro embebidas en el tampón de transferencia y en contacto con el fondo de la

bandeja, 3 papeles de filtro Whatman 3MM impregnados de tampón de transferencia, el gel con el DNA a transferir, la membrana de Nylon, otros 3 papeles de filtro Whatman 3MM, papel absorbente y un peso de 0.5-1 kg. El tampón de transferencia se coloca en la bandeja y por capilaridad asciende hasta el papel absorbente, transfiriendo el DNA desde el gel al filtro. Entre el gel y el filtro se sellaron los bordes con parafilm para que todo el flujo del tampón se realizara únicamente a través del sistema. El peso se colocó para asegurar un contacto adecuado entre todos los elementos de la transferencia. La transferencia se realizó durante toda la noche y el día siguiente la membrana de Nylon se lavó con SSC 2x, se secó a temperatura ambiente y posteriormente el DNA se fijó covalentemente a la misma (véase apartado 15).

➔ SSC 20x : NaCl 3 M, citrato- $\text{Na}_3$  0.3 M, pH 7.0.

#### **14.2.- Mediante vacío.**

Se realizó con el equipo Vacuum Blotter (modelo 785) de Bio-Rad, siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se depurinizó el gel manteniéndolo sumergido durante 15 min en una bandeja con HCl 0.25 M con agitación suave. A continuación se lavó dos veces con agua destilada para eliminar el HCl, y se desnaturalizó el DNA sumergiendo el gel en una solución de NaOH 0.5 M, y manteniéndolo en agitación durante 30 min. Posteriormente se mantuvo sumergido en SSC 10x (durante 5-10 min a temperatura ambiente) y se transfirió a un filtro de Nylon (Boehringer-Mannheim) utilizando esta misma solución como tampón de transferencia, durante 90 min a una presión de 5 pulgadas de mercurio. Tras la transferencia, el filtro de Nylon se lavó con SSC 2x durante 5 min, posteriormente se secó a temperatura ambiente, y se procedió a fijar covalentemente el DNA al mismo (véase apartado 15).

#### **15.- FIJACIÓN DE DNA A FILTROS DE NYLON.**

El DNA se fijó normalmente a los filtros de Nylon por calor, manteniéndolos durante 30 min a 120°C en horno Pasteur, o bien, durante 5 min en microondas a máxima potencia.

## **16.- HIBRIDACIÓN DNA/DNA Y REVELADO.**

Para la hibridación DNA/DNA y detección de la misma se utilizó el "DIG DNA Labeling and Detection Kit" (Boehringer-Mannheim), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **16.1.- Prehibridación.**

La prehibridación tiene por objeto bloquear los lugares del filtro donde no se han unido ácidos nucleicos para evitar que la sonda se una de forma inespecífica. Se realizó poniendo en un tubo de hibridación la membrana de Nylon junto con el tampón de hibridación (20 ml/100 cm<sup>2</sup> de membrana), incubándose a continuación a 68°C durante al menos 1 hora en el horno de hibridación, con movimiento constante de rotación.

➡ **Tampón de hibridación:** SSC 5x, agente bloqueante 1% (a partir de la solución de bloqueo concentrada al 10%, p/v), N-lauroylsarcosina 0.1% (a partir de una solución al 10%, p/v), SDS 0.02% (a partir de una solución al 10%, p/v).

➡ **solución de bloqueo concentrada:** agente bloqueante (Boehringer-Mannheim) en tampón 1 a una concentración de 10% (p/v). La disolución se prepara en caliente y se guarda a 4°C.

➡ **Tampón 1:** ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5 (ajustado con NaOH sólido).

### **16.2.- Hibridación.**

Una vez finalizada la prehibridación, el tampón de hibridación se sustituyó por nuevo tampón de hibridación (5 ml/100 cm<sup>2</sup> de membrana) con la sonda marcada (0.25 µg/ml de tampón), previamente desnaturalizada por calentamiento a 100°C durante 10 min. Los filtros se incubaron a 68°C durante toda la noche en el horno de hibridación. Durante este proceso, la sonda de DNA marcada con digoxigenina, hibrida específicamente con las cadenas complementarias de DNA fijadas a la membrana de Nylon.

### **16.3.- Lavados.**

Tras la hibridación, los filtros se lavaron dos veces durante 5 min a temperatura ambiente con SSC 2x, SDS 0.1% (p/v) (100 ml/100 cm<sup>2</sup> de membrana). A continuación se realizaron otros dos lavados de 15 min a 68°C con SSC 0.1x, SDS 0.1% (p/v) (100 ml/100 cm<sup>2</sup> de membrana). Estos lavados se realizan para eliminar la sonda de aquellas zonas del filtro en que la hibridación no es completamente específica (homología parcial de las secuencias).

\* Cuando el objetivo de la hibridación fue detectar secuencias relacionadas pero no idénticas a la sonda (homología parcial), las condiciones de hibridación se modificaron ligeramente para detectar este tipo de hibridación. En este caso, la temperatura de prehibridación e hibridación fue de 65°C y los dos últimos lavados del filtro se eliminaron. Las hibridaciones realizadas en estas condiciones se han denominado "no estrictas" para diferenciarlas de las usuales, denominadas "estrictas". Alternativamente se mantuvieron condiciones de hibridación "no estrictas" realizando los dos últimos lavados a temperatura ambiente en lugar de 68°C.

### **16.4.- Revelado inmunológico.**

El revelado se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Boehringer-Mannheim). Los filtros se lavaron durante 1 min con 100 ml de tampón 1 para equilibrar la membrana. A continuación los filtros se bloquearon manteniéndolos sumergidos en tampón 2 durante 30 min. Después cada filtro se incubó durante 30 min con 20 ml de la solución de anticuerpo diluido, para que éste se uniese a la sonda marcada. El anticuerpo empleado era un anticuerpo policlonal anti-digoxigenina, obtenido en oveja y conjugado con fosfatasa alcalina; este anticuerpo se empleó diluido en tampón 2 (dilución 1:5000, 150 mU de fosfatasa alcalina/ml). El anticuerpo conjugado no unido se eliminó lavando dos veces durante 15 min con 100 ml de tampón de lavado. A continuación los filtros se equilibraron durante 2 min con 20 ml de tampón 3 y, por último, los filtros se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad con 10 ml de solución de revelado recién preparada. Las bandas de hibridación se detectaron debido al precipitado coloreado que se forma como consecuencia de la reacción



catalizada por la fosfatasa alcalina. Para parar la reacción, las membranas se lavaron con 50 ml de TE o agua durante 5 min.

➔ **Tampón 2 (solución bloqueante):** solución concentrada de bloqueo diluida 1:10 en tampón 1 (concentración final 1% de agente bloqueante).

➔ **Tampón de lavado:** tween 20 0.3% (v/v) en tampón 1

➔ **Tampón 3 (tampón de revelado):** Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, pH 9.5.

➔ **Solución de revelado (se utiliza recién preparado):** 45 µl de solución NBT (nitroblue tetrazolium) (suministrado por el kit), 35 µl de solución X-fosfato (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato) (suministrado por el kit), 10 ml de tampón 3.

## **17.- PURIFICACIÓN DE RNA DE LEVADURA.**

El RNA total de *C. albicans* se purificó básicamente siguiendo la técnica descrita por Denis *et al.*, (1981) para *S. cerevisiae*. El RNA se obtuvo a partir de cultivos de la cepa de *C. albicans* en las condiciones requeridas en cada caso (fase de levadura, tras la inducción de micelio, o tras choque térmico), que se especifican en "Resultados y Discusión". Los cultivos en 500 ml de medio de Lee o YPD, se enfriaron rápidamente en hielo y las células se recogieron por centrifugación durante 5 min a 5.000 rpm a 4°C. El sedimento se lavó con agua destilada estéril fría y se resuspendió en 1.5 ml de tampón LETS frío (en hielo). Esta suspensión se pasó a un tubo Corex (de 30 ml de capacidad) que contenía 11 g de perlas de vidrio (diámetro 425-600 µm) estériles, y se le añadieron 1.5 ml de fenol/LETS. A continuación se rompieron las células realizando una serie de 10 ciclos de un minuto de agitación en "vórtex" seguido de otro minuto de reposo en hielo, hasta conseguir que las células estuvieran rotas en más de un 90%. Después se añadieron 3.5 ml de tampón LETS y, tras agitar, se centrifugó durante 10 min a 5.000 rpm a 4°C. Las proteínas de la fase acuosa se eliminaron mediante cuatro extracciones con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1, v/v), y otra más con cloroformo. Finalmente, el RNA de la fase acuosa se precipitó añadiendo un volumen de LiCl 5 M y manteniéndolo la mezcla a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, el precipitado de RNA se recogió por centrifugación durante 40 min a 10.000 rpm,

se lavó con etanol al 80%, se secó a vacío y se disolvió en 200 µl de agua destilada estéril o TE. Posteriormente se hicieron alícuotas que se guardaron a -20°C.

Para evitar la actuación de RNasas, todos los tampones y soluciones utilizados fueron tratados previamente con DEPC (0.1%, v/v) durante 2 horas a 37°C y autoclavados después. El material de plástico se trató de igual modo con una solución de DEPC a la misma concentración y se autoclavó posteriormente. El material de vidrio se esterilizó durante un mínimo de 4 horas en horno Pasteur a 180°C.

El RNA presente en las muestras se cuantificó espectrofotométricamente de igual modo que se cuantifica el DNA (véase apartado 8), pero teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia equivale a una concentración de 40 µg/ml de RNA (Sambrook *et al.*, 1989).

➔ **LETS:** LiCl 0.1 M, EDTA 0.01 M, Tris-HCl 0.01 M pH 7.4, SDS 0.2% (p/v).

➔ **Fenol/LETS:** Fenol equilibrado con LETS

Para obtener RNA de levadura tras choque térmico siguiendo el método anteriormente descrito, se incubó la cepa *C. albicans* ATCC 26555 en un litro de YPD a 28°C hasta la fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} = 0.35$ ) y se tomaron 200 ml de cultivo, que constituirían la muestra a tiempo 0. A los 800 ml restantes se les añadieron 800 ml de agua estéril a 56°C, con lo que se obtuvo un volumen total de 1600 ml a una temperatura de 42°C, temperatura a la que se llevaron a incubar rápidamente. A los 5, 15 y 30 min se tomaron 400 ml de muestra para purificar el RNA total. Las muestras de RNA correspondientes al choque térmico a 23°C, se obtuvieron de un modo similar, pero en este caso, al cultivo de *C. albicans* ATCC 26555 en YPD a 28°C en fase exponencial de crecimiento, se le añadieron 400 ml de agua estéril a 4°C para obtener 1200 ml a 23°C. De este volumen se tomaron 300 ml de muestra a los tiempos 5, 15 y 30 min, para purificar el RNA total (Maneu *et al.*, 1997).

En cuanto a la obtención de las muestras de RNA de *C. albicans* ATCC 26555 en **condiciones de ayuno metabólico a 37°C**, levaduras en fase exponencial de crecimiento en medio de Lee, se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en agua, y se incubaron a 37°C durante 3 h, tomándose 400 ml de muestra en este momento, para posteriormente purificar el RNA. A continuación el resto de células se mantuvieron a 4°C durante 24 h, tomándose 400 ml de muestra para purificar el RNA total.

## **18.- ELECTROFORESIS DE RNA.**

Las moléculas de RNA fueron separados en geles de agarosa desnaturalizantes conteniendo agarosa 1% y formaldehído 2.5% (v/v) en tampón NBC. La agarosa se solubilizó en caliente en el tampón, se enfrió a 65°C durante 5 min, se añadió el formaldehído y se mezcló mediante agitación.

Para preparar las muestras, el RNA total (5-10 µg) se adicionó a un tubo de microcentrífuga que contenía 2 µl de NBC 10x, 3 µl de formaldehído, 10 µl de formamida y agua en c.s.p. 20 µl. La mezcla se incubó durante 5 min a 65°C para desnaturalizar el RNA, y, tras enfriar en hielo, se añadieron 5 µl de tampón de carga y 0.5 µl de bromuro de etidio 10 mg/ml. Como tampón de electroforesis se utilizó NBC. Tras cargar las muestras en el gel, se realizó la electroforesis a un voltaje constante de 100 V durante 90 min. Cuando las muestras entraron en el gel, se mantuvo el tampón en agitación durante el resto de la electroforesis, con ayuda de dos agitadores magnéticos.

El RNA presente en las muestras se observó, al igual que el DNA, en un transiluminador de luz UV (360 nm).

Todas las soluciones, material de plástico y material de vidrio que iba a entrar en contacto con el RNA, fueron tratados tal y como se ha descrito en el apartado 17, para evitar la presencia de RNasas.

➡ **NBC 10x:** ácido bórico 0.5 M, citrato-Na<sub>3</sub> 10 mM, NaOH 50 mM, pH 7.5.

## **19.- TRANSFERENCIA DE RNA A FILTROS DE NYLON (NORTHERN BLOT).**

### **19.1.- Por capilaridad.**

Antes de transferir el RNA del gel de agarosa a la membrana de Nylon, el gel se lavó en primer lugar con agua destilada estéril durante 5 min para eliminar el formaldehído. A continuación, el gel se mantuvo 30 min en una solución de NaOH 0.05 M, para hidrolizar parcialmente el RNA y mejorar la transferencia, y después otros 30 min en Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 para neutralizar. Posteriormente, se sumergió en tampón SSC, y se procedió a realizar la transferencia a una membrana de Nylon cargada positivamente (Boehringer-Mannheim)

equilibrada con tampón SSC en un montaje similar al descrito para la transferencia de DNA en el apartado 14.1, utilizando SSC como tampón de transferencia. El gel se dejó transferir por capilaridad a temperatura ambiente durante toda la noche. Una vez transferido el RNA a la membrana de Nylon, ésta se enjuagó con agua, y las bandas de RNA ribosomal se observaron con un transiluminador de luz UV, marcándose su posición con un lápiz graso (ya que servirían después como referencia para determinar el tamaño de las bandas de hibridación). A continuación se dejó secar la membrana a temperatura ambiente y se fijó covalentemente el RNA a la misma (véase apartado 20).

Todas las soluciones, material de plástico y material de vidrio fueron tratados según se ha descrito anteriormente.

### **19.2.- Mediante vacío.**

Se realizó con el equipo Vacuum Blotter (modelo 785) de Bio-Rad, siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se lavó el gel con agua destilada estéril. A continuación se sumergió el gel en una solución de NaOH 50 mM, manteniéndolo en agitación durante 15 min, para hidrolizar parcialmente el RNA y mejorar la eficiencia de la transferencia. Posteriormente a este tratamiento, se enjuagó en agua, se mantuvo sumergido en SSC 10x y se transfirió a un filtro de Nylon (Boehringer-Mannheim), utilizando esta solución como tampón de transferencia, durante 90 min a una presión de 5 pulgadas de mercurio. Tras la transferencia, el filtro de Nylon se sumergió en SSC 2x y se mantuvo durante 5 min. Se marcó la posición de las bandas de RNA ribosomal con un lápiz graso, tras visualización al transiluminador de luz UV. Posteriormente, se secó la membrana de Nylon a temperatura ambiente y se procedió a fijar covalentemente el RNA a la misma (véase apartado 20).

### **20.- FIJACIÓN DE RNA A FILTROS DE NYLON.**

El RNA se fijó a los filtros de Nylon mediante calor, de igual modo al descrito para el DNA, manteniéndolo 30 min a 120°C (horno Pasteur), o bien durante 5 min en microondas a máxima potencia.

## **21.- HIBRIDACIÓN RNA/DNA Y REVELADO.**

Para la hibridación RNA/DNA se utilizó, al igual que en la hibridación DNA/DNA, el "DIG DNA Labeling and Detection Kit" (Boehringer-Mannheim), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para llevar a cabo la detección se utilizó el Lumigen PPD kit (Boehringer-Mannheim).

### **21.1.- Prehibridación.**

Previamente a la prehibridación, la membrana de Nylon fue lavada dos veces en 100 ml de SSC 0.1x, 0.5% SDS (p/v) durante 15 min a 65°C, para eliminar todo el formaldehído, lo que ayudó a disminuir considerablemente el "background" en el revelado.

Se prehibridó para bloquear los lugares reactivos del filtro y evitar que la sonda se una de forma inespecífica. Para ello, el filtro se incubó con tampón de hibridación (1 ml/10 cm<sup>2</sup> de membrana) a 50°C durante 1-3 horas en el horno de hibridación.

➔ **Tampón de hibridación:** formamida 50% (v/v), SSC 5x, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 7.2, lauroylsarcosina 0.1% (a partir de una solución al 10%, p/v), SDS 7% (p/v), agente bloqueante (proporcionado por el fabricante) 2% (p/v). Una vez disueltos los componentes calentando a 60-70°C se añadieron 50 µl de DNA de timo de ternera (Sigma) (10 mg/ml), desnaturalizado por calor (10 min a 100°C) y 20 µl de RNA<sub>t</sub> de levadura (25 mg/ml). Se trataron con DEPC las soluciones de SSC, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y lauroylsarcosina.

### **21.2.- Hibridación.**

Una vez finalizada la prehibridación, el tampón de hibridación se sustituyó por nuevo tampón de hibridación (1 ml/10 cm<sup>2</sup> de membrana) con la sonda marcada (0.25 µg/ml de tampón), previamente desnaturalizada por calentamiento a 100°C durante 10 min. Los filtros se incubaron a 50°C durante toda la noche en el horno de hibridación. Durante este proceso, la sonda de DNA marcada con digoxigenina, se une a las moléculas de RNA complementarias fijadas a la membrana de Nylon.

### **21.3.- Lavados.**

Tras la hibridación, los filtros se lavaron dos veces con SSC 2x, SDS 0.1% (p/v) (100 ml/100 cm<sup>2</sup> de membrana), durante 5 min a temperatura ambiente, y otras dos veces con SSC 0.2x, SDS 0.1% (p/v) (100 ml/100 cm<sup>2</sup> de membrana) durante 20 min a 65°C.

### **21.4.- Revelado inmunológico.**

El revelado se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Boehringer-Mannheim). El fundamento del método es el mismo descrito para el revelado de la hibridación DNA/DNA (apartado 16.4), si bien en este caso, se realizó una detección quimioluminiscente, utilizándose como sustrato para la visualización de las bandas el CSPD<sup>®</sup> (Lumigen PPD kit, Boehringer-Mannheim). Este método es más sensible ya que la sonda se detecta mediante impresión quimioluminiscente en una placa de autorradiografía (Kodak). El procedimiento seguido fue el siguiente: cada filtro se lavó durante 5 min con 40 ml de tampón 1, a temperatura ambiente, para equilibrar la membrana; a continuación se bloquearon los filtros manteniéndolos sumergidos en tampón 2 (40 ml/filtro) durante 30 min. El anticuerpo policlonal de oveja anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina se diluyó a 150 mU/ml (1:5000) en tampón 2 y cada filtro se incubó durante 30 min con 10 ml de la solución de anticuerpo diluido (sobre una pieza de parafilm y con agitación moderada), para que éste se uniese a la sonda marcada. El anticuerpo conjugado no unido se eliminó lavando dos veces durante 30 min con 40 ml de tampón 1. A continuación los filtros se equilibraron durante 5 min con 20 ml de tampón 3, y se incubaron a temperatura ambiente con 1 ml de tampón 3 con CSPD<sup>®</sup> diluido 1:100 durante 5 min, sobre una pieza de parafilm en oscuridad. A continuación se eliminó el exceso de líquido de los filtros, y cada filtro se envolvió en plástico, se selló y se incubó durante 15 min a 37°C. Seguidamente el filtro se puso en contacto con una placa de autorradiografía (Kodak) para detectar la señal quimioluminiscente de la sonda.

- ➔ **Tampón 1:** Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, NaCl 0.15 M, Tween 20 0.1% (v/v).
- ➔ **Tampón 2:** agente bloqueante (suministrado por el fabricante) 1% (p/v) en tampón 1.
- ➔ **Tampón 3:** Tris-HCl 0.1 M pH 9.5, NaCl 0.1 M, MgCl<sub>2</sub> 40 mM.

## **22.- SECUENCIACIÓN DE DNA.**

Todas las reacciones de secuenciación se realizaron por el método de terminación de cadena descrito por Sanger *et al.*, (1977), empleando el kit "Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing" (Applied Biosystems, Inc), de acuerdo con sus instrucciones. Las secuencias se determinaron con el secuenciador automático modelo 370A de Applied Biosystems. Se secuenciaron las dos hebras complementarias de cada fragmento de DNA utilizando oligonucleótidos forward y reverse universales (Promega), así como oligonucleótidos sintéticos deducidos de la secuencia (suministrados por Pharmacia Biotech y GIBCO BRL).

Tanto las reacciones de secuenciación como la determinación de las secuencias se realizaron en el servicio de secuenciación de DNA del SCSIE (Universitat de València).

## **23.- ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE DNA.**

### **23.1.- Búsqueda en bases de datos.**

Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos se analizaron y compararon con otras secuencias de las bases de datos (EMBL, GeneBank, Stanford, etc.) utilizando los programas FASTA (Genetics Computer Group, Madison, WI) y BLAST (National Center for Biotechnology Information) (Pearson & Lipman, 1988).

### **23.2.- Cálculo de la divergencia entre dos secuencias de nucleótidos.**

La divergencia entre dos secuencias nucleotídicas correspondientes a secuencias codificantes, se calculó siguiendo la fórmula de Kimura & Ohta (1972). Esta fórmula corrige la sustitución nucleotídica observada por posibles múltiples sucesos en una posición determinada.

$$K^o = - (3/4) \ln [ 1 - (4/3) K ]$$

siendo:  $K^{\circ}$  → divergencia

$K$  → número de sustituciones nucleotídicas en lugares que no afectan a la traducción (cambios silenciosos), dividido por el número total de dichos lugares.

Un codón presenta por término medio 2.25 lugares en que una sustitución nucleotídica afectan a la traducción, y 0.75 lugares en los que una sustitución no afecta la traducción (Hohmann & Gozalbo, 1989).

### **23.3.- Análisis del uso de codones en las secuencias nucleotídicas.**

Se determinó el uso relativo de codones en cada uno de los genes de *C. albicans* estudiados en el presente trabajo determinando la frecuencia relativa (expresada en tanto por ciento) de los distintos codones para cada aminoácido.

### **24.- RASTREO DE UNA LIBRERÍA GENÓMICA.**

A partir de una librería genómica de *C. albicans* (cepa WO-1) en la que los fragmentos de DNA (5-10 kb) fueron clonados entre los sitios *Hind*III y *Bam*HI del vector plasmídico pEMBLYe23 (cedida por la Dra. B. B. Magee, Universidad de Minnesota, EEUU), se realizó una dilución 1:10.000, de la cual se sembraron diferentes cantidades de células (200, 100 y 50  $\mu$ l) en placas de LB-ampicilina que se incubaron a 37°C hasta la aparición de colonias. Se eligieron las cuatro placas que contenían el mayor número de colonias posible con una separación suficiente para el posterior análisis (aproximadamente 2.000-4.000 colonias por placa Petri de diámetro 15 cm). Estas cuatro placas fueron empleadas para el rastreo siguiendo básicamente los métodos de Grunstein y Hogness (1975) y Hanahan y Meselson (1983): se colocó una membrana de Nylon (Boehringer-Mannheim) sobre la superficie de cada placa marcando bien la posición y orientación de cada filtro en cada placa, y se mantuvo durante 5 min a temperatura ambiente, tras lo cual se retiraron cuidadosamente los filtros de las placas y se dejaron secar al aire. Las placas, una vez retirados los filtros, se incubaron a 37°C durante 4-16 horas, para permitir que siguieran creciendo las colonias y poder identificar y recuperar mejor las que se detecten positivas tras el rastreo. Las membranas se colocaron boca arriba



sobre un papel Whatman 3MM y 8 papeles de filtro, empapados con una solución desnaturalizante (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M), y se mantuvieron durante 5 min para lisar las bacterias. A continuación los filtros se trataron de manera similar, durante otros 5 min, con una solución neutralizante (Tris-HCl 0.5 M pH 7.0, NaCl 1.5 M). Finalmente, los filtros se saturaron de manera similar con tampón 6x SSC, tras lo cual se dejaron secar al aire. El DNA se fijó a los filtros de Nylon mediante calor (30 min a 120°C en horno Pasteur, o bien durante 5 min en microondas a máxima potencia). A continuación los filtros se prehibridaron a 65°C tal y como se ha descrito en el apartado 16.1. Antes de hibridar con la sonda se eliminaron los restos de células no fijadas sobre el filtro. A continuación se hibridaron a 65°C con la sonda, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 16.2. Como sonda se utilizó el fragmento de 0.9 kb de cDNA que codifica la poliubiquitina de *C. albicans* (Sepúlveda *et al.*, 1996a). Los lavados de los filtros se realizaron tal y como se explica en el apartado 16.3, realizándose los dos últimos lavados bien a 65°C (2 filtros) o a temperatura ambiente (los otros 2 filtros), y la detección inmunológica se realizó según el apartado 16.4. A continuación se localizaron en las placas originales las colonias que dieron una reacción positiva en la hibridación, se tomaron con un palillo estéril, se sembraron en 5 ml de medio LB-ampicilina y se incubaron a 37°C durante toda la noche. En aquellos casos en que la presencia de colonias muy próximas no garantizaba haber realizado la siembra sólo con el clon positivo, se realizó un segundo rastreo a partir de estos cultivos para aislar definitivamente los clones positivos. Para ello, se aislaron colonias a partir de los mismos en placas de LB-ampicilina y seguidamente se realizó un segundo rastreo siguiendo el mismo método que el utilizado para realizar el primero. De igual modo, una vez identificados los clones positivos, se sembraron en 5 ml de medio LB-ampicilina incubándose a 37°C. A partir de estos cultivos se purificaron los plásmidos de cada uno de los clones positivos obtenidos tras el rastreo de la genoteca.

## **25.- INTERRUPCIÓN GÉNICA EN *C. albicans*.**

### **25.1.- Técnica de interrupción secuencial de los dos alelos mediante el cassette *hisG::URA3::hisG*.**

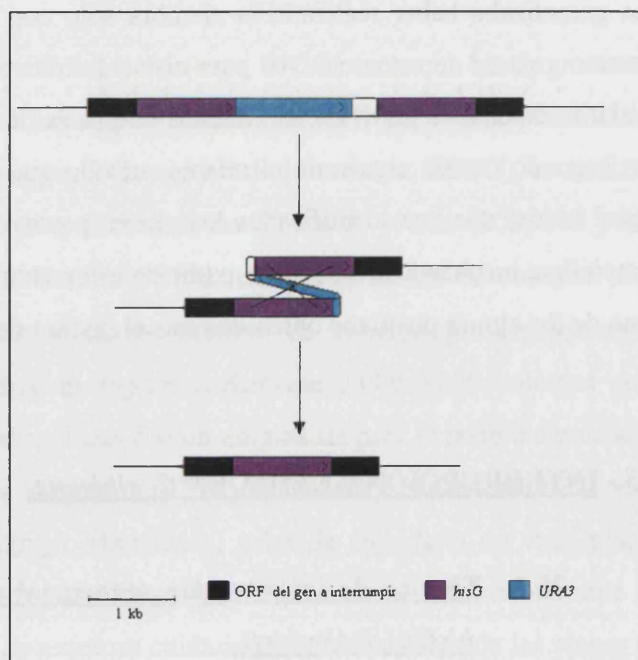
Esta estrategia de interrupción génica fue desarrollada inicialmente para *S. cerevisiae* (Alani *et al.*, 1987) y modificada posteriormente para su aplicación en *C. albicans* (Cervera *et*

*al.*, 1998; Fonzi & Irwin, 1993), y obtener mutantes nulos con las dos copias de un determinado gen interrumpidas. Este método emplea un "cassette" que consta del gen *URA3* de *C. albicans* flanqueado por repeticiones directas del gen *hisG* de *Salmonella typhimurium*. Este "cassette" se empleó para reemplazar la mayor parte de la región codificante del gen de *C. albicans* a interrumpir, tal y como se describe en los apartados 1.6.A y 2.6.A de "Resultados y Discusión". Dada la naturaleza diploide de las cepas de *C. albicans*, el procedimiento de interrupción de un gen consiste básicamente en los siguientes pasos:

1) interrupción de un alelo del gen en una cepa  $Ura^-$  de *C. albicans* (cepa CAI-4) mediante la transformación integrativa con la construcción de interrupción adecuada (el "cassette" *hisG::URA3::hisG* flanqueado por los extremos 5' y 3' del gen a interrumpir).

2) eliminación del gen *URA3* de los transformantes  $Ura^+$  (con un alelo interrumpido) para restaurar el fenotipo  $Ura^-$ , lo que permite de nuevo el uso de *URA3* como marcador selectivo. Esto se consigue mediante recombinación intracromosomal entre las secuencias *hisG*, lo que da lugar a la escisión del marcador *URA3*, y de una copia de *hisG*, con lo que el alelo queda interrumpido por una copia de *hisG*, tal y como se representa en la Fig. II.3. Los segregantes  $Ura^-$  se seleccionaron en medio con ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) a una concentración de 0.1% (p/v) (Boeke *et al.*, 1984), y con uridina para permitir su crecimiento. En estas condiciones las células  $Ura^+$  no crecen debido a la toxicidad del 5-FOA. El producto del gen *URA3* (orotidina-5-fosfotod Descarboxilasa) transforma el ácido 5-fluoroorótico en 5-fluorouracilo, un compuesto tóxico para la célula, por lo que las cepas  $Ura^+$  mueren en presencia de este compuesto.

3) interrupción del segundo alelo del gen mediante una estrategia similar a la seguida en la interrupción del primer alelo.



**Fig. II.3.** Recombinación intracromosomal entre las secuencias *hisG* del "cassette" de interrupción secuencial *hisG::URA3::hisG*. Véase texto para más detalle.

En la Fig. II.4 se muestra un diagrama esquemático del proceso de interrupción secuencial de un gen.

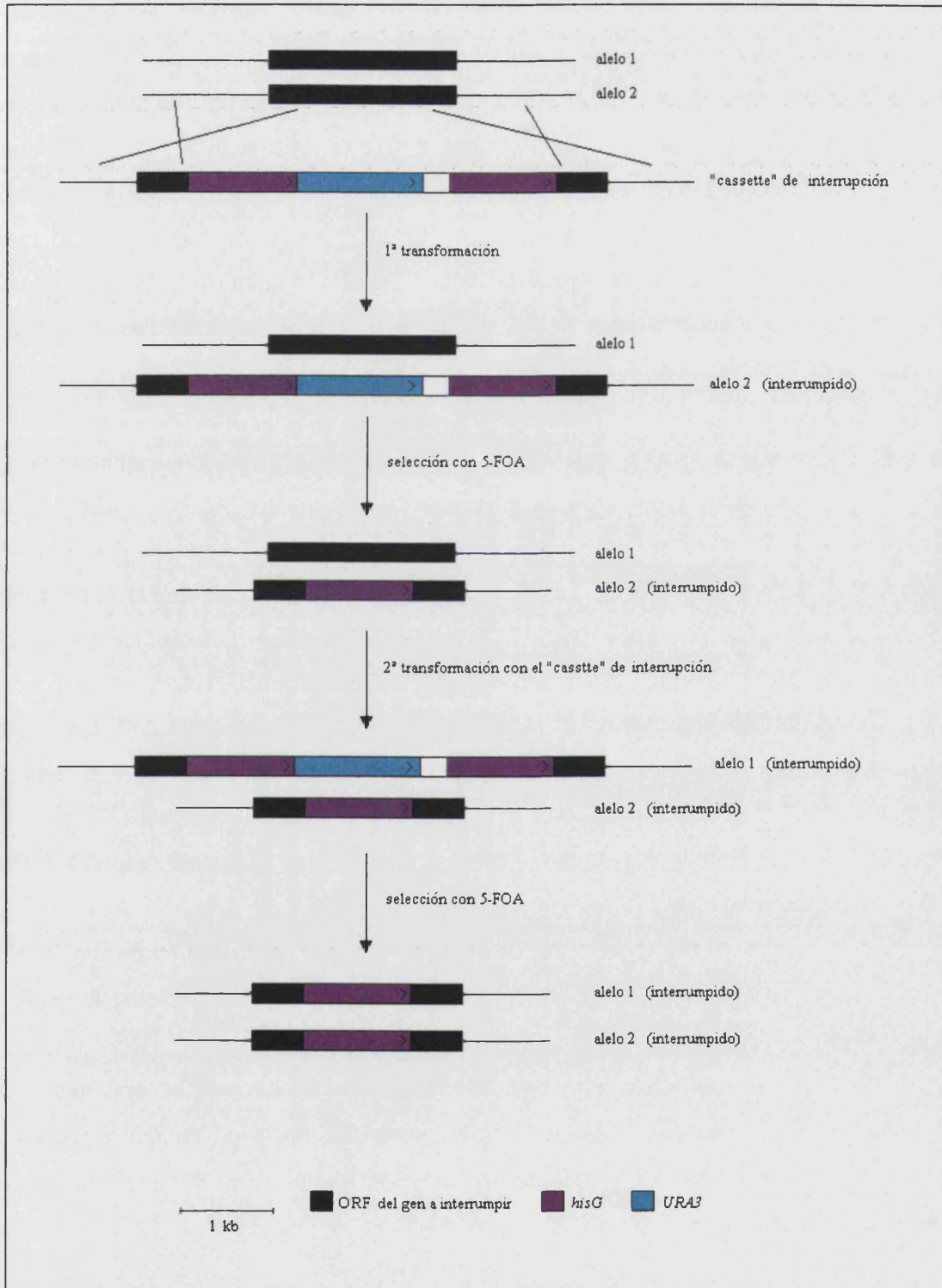


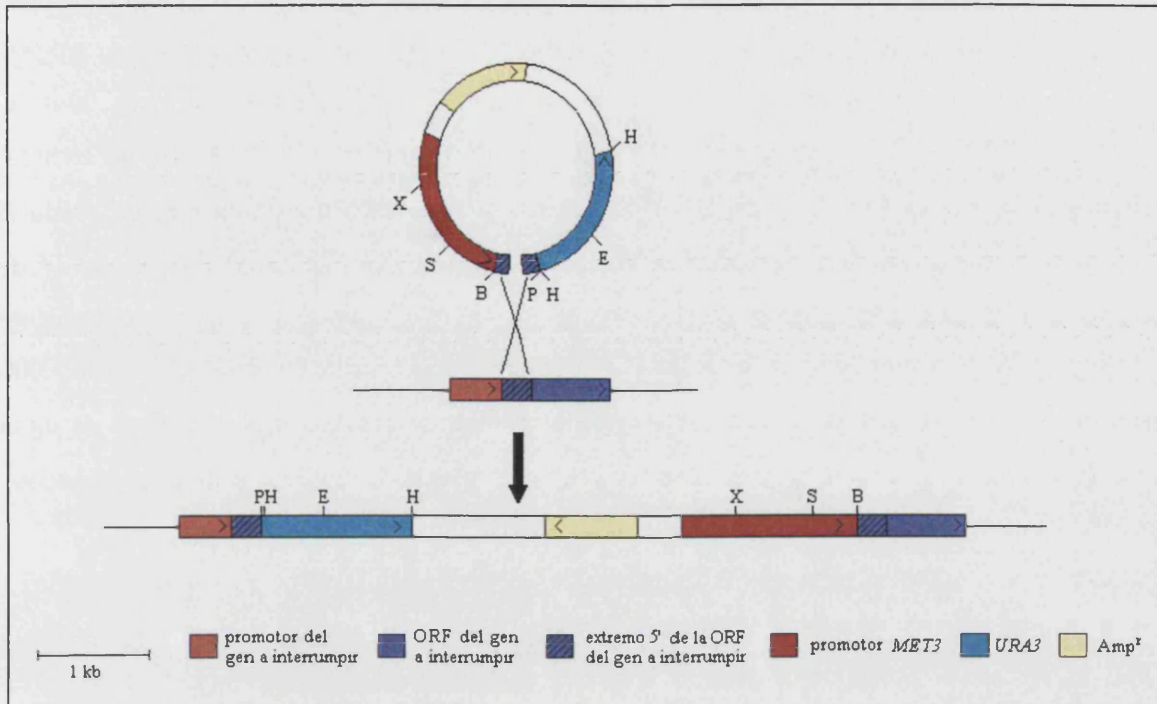
Fig. II.4. Diagrama esquemático del proceso de interrupción secuencial de los dos alelos de un gen mediante el empleo del "cassette" *hisG::URA3::hisG*. Véase texto para más detalle.

## **25.2.- Técnica de obtención de un mutante nulo condicional a partir del mutante heterocigótico.**

Esta técnica sirve para discernir si la imposibilidad de obtención de un mutante nulo para un determinado gen mediante la técnica descrita en el apartado anterior, es debida a una baja eficiencia de transformación, o bien a que el gen que se intenta interrumpir es esencial para la viabilidad de *C. albicans*. Esta técnica permite la construcción, a partir del mutante heterocigótico para el gen en estudio, de una cepa en la que la única copia del gen está bajo el control de un promotor regulado estrictamente, lo que permite estudiar no sólo el carácter esencial del gen, en cuyo caso la cepa sería viable sólo en condiciones en las que el promotor esté activado, sino que, en caso de no ser esencial, permite observar las consecuencias fenotípicas de la ausencia de función cuando la expresión del gen esté reprimida (Care *et al.*, 1999). El promotor regulable utilizado es el del gen *MET3* de *C. albicans*. El gen homólogo de *S. cerevisiae* codifica para el enzima ATP sulfuro-liasa (ATP: sulfato adeniltransferasa, EC 2.7.7.4) que cataliza la producción de adenosina 5'-fosfosulfato (APS) a partir de sulfato inorgánico y ATP, el primer paso en la asimilación de sulfato inorgánico (Marzluf, 1997; Thomas & Surdin-Kerjan, 1997). La expresión del gen *MET3* es reprimida por metionina, cisteína y por S-adenosil metionina (SAM), aunque la naturaleza del verdadero represor es controvertida (Mountain *et al.*, 1991; Ono *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1989).

Esta metodología utiliza el plásmido pCaDis (véase apartado 5) que permite interrumpir un gen y colocar simultáneamente una copia intacta del mismo bajo el control del promotor *MET3*. El procedimiento consiste básicamente en los siguientes pasos:

- 1) subclonar el extremo 5' del gen a interrumpir a continuación del promotor *MET3* en el plásmido pCaDis
- 2) linearización del plásmido obtenido cortando dentro del fragmento 5' del gen a interrumpir, bien utilizando un único sitio de restricción o bien mediante PCR con oligonucleótidos divergentes
- 3) recombinación homóloga del plásmido linearizado con la copia intacta de la cepa Ura<sup>-</sup> heterocigótica para el gen en cuestión, generando una copia completa del gen bajo el control del promotor *MET3*, y quedando el extremo 5' del gen bajo el control del promotor homólogo (Fig. II.5).



**Fig. II.5.** Diagrama del proceso de interrupción para la obtención de un mutante nulo condicional utilizando el plásmido pCaDis para transformar integrativamente una cepa heterocigótica para el gen en cuestión. Dianas de enzimas de restricción: B (*Bam*HI), P (*Pst*I), H (*Hind*III), E (*Eco*RI), X (*Xba*I), S (*Sal*I). Véase texto para más detalle.

La eliminación del marcador *URA3* por recombinación de regiones homólogas (regiones 5' del gen), con la consiguiente reversión al mutante heterocigótico ( $Ura^-$ ), debe evitarse mediante el cultivo de la cepa transformante siempre en medio selectivo, sin uridina.

La represión completa del promotor *MET3* requiere una combinación de metionina 2.5 mM y cisteína 0.5 mM, aunque siempre hay una mínima expresión basal (del 1% aproximadamente) (Care *et al.*, 1999).

## 26.- TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS.

### 26.1.- Transformación rápida.

Este método se utilizó normalmente para la transformación no integrativa de DNA plasmídico en levaduras (*C. albicans* o *S. cerevisiae*). Se utilizó el método descrito por Elble (1992). La cepa adecuada de levadura se cultivó en YPD a 28°C durante toda la noche, hasta

alcanzar la fase tardía de crecimiento exponencial o la fase estacionaria de crecimiento. Las células de 5 ml de medio de cultivo se recogieron por centrifugación durante 5 min a 5.000 rpm, en tubos de microcentrífuga estériles. El sedimento celular se resuspendió en 200  $\mu$ l de tampón TE/LiAc/PEG, y se adicionaron 100  $\mu$ g de DNA "carrier" (DNA de timo de ternera, Sigma) desnaturalizado y 1  $\mu$ g del DNA plasmídico que se deseaba introducir en la levadura. A continuación se adicionaron 0.5 ml de tampón TE/LiAc/PEG y se homogeneizó con ayuda de un "vórtex". La suspensión se incubó toda la noche (16-20 horas) a temperatura ambiente sin agitación, y posteriormente las células se recogieron por centrifugación (5 min a 5.000 rpm) y se lavaron con TE estéril. El sedimento celular se resuspendió en 200  $\mu$ l de agua destilada estéril y alícuotas de 100  $\mu$ l se sembraron en placas de medio selectivo, incubándose a 28°C hasta la aparición de transformantes (2-5 días).

➔ **Tampón TE/LiAc/PEG:** Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, LiAc 0.1 M, PEG<sub>4000</sub> 40% (p/v).

### **26.2.- Transformación mediante choque térmico.**

Esta técnica se utilizó para la transformación integrativa de *C. albicans* con DNA exógeno. Se utilizó el método descrito por Sanglard *et al.* (1996), que se describe a continuación. Se sembró la cepa a transformar en 5 ml de YPD y se incubó durante toda la noche a 28°C. El cultivo se diluyó en 50 ml de YPD hasta una  $DO_{600} = 0.1$ , y se incubó a 28°C hasta una  $DO_{600} = 0.5$  ( $10^7$  UFC/ml). A continuación, las células se recogieron por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min a 4°C y se lavaron 2 veces con 10 ml de TE y una vez con 1 ml de TE/LiAc recién preparado. El sedimento celular ( $5 \times 10^8$  UFC) se resuspendió en 200  $\mu$ l de TE/LiAc y se guardó en hielo hasta la transformación. En un tubo de microcentrífuga se añadió por este orden: 300  $\mu$ l de solución PEG recién preparada, 50  $\mu$ l de la suspensión de levaduras, 50  $\mu$ g de DNA "carrier" (DNA de timo de ternera, Sigma) desnaturalizado (en un volumen no superior a 5  $\mu$ l), 20-30  $\mu$ g del DNA plasmídico que se desea introducir en la levadura linearizado (en un volumen no superior a 5  $\mu$ l). Se mezcló por inversión varias veces y se incubó un mínimo de 1 hora a 28°C. A continuación se dió un choque térmico en baño de agua a 42°C durante 15 min, y tras enfriar a temperatura ambiente, las células se recogieron por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min. El sedimento celular

se lavó con tampón TE y se resuspendió en 200 µl del mismo tampón. Se sembraron alícuotas de 100 µl en placas de medio selectivo, que se incubaron a 28°C hasta la aparición de transformantes (2-5 días).

- ➔ **LiAc 10x** : LiAc 1M pH 7.5 (ajustado con ácido acético).
- ➔ **TE/LiAc** (preparar justo antes de su uso): 2 ml TE 10x, 2 ml LiAc 10x, 16 ml agua.
- ➔ **solución PEG** (preparar justo antes de su uso): 1.6 ml PEG<sub>4000</sub> 50% (p/v, esterilizado por filtración), 0.2 ml TE 10x, 0.2 ml LiAc 10x.

### **26.3.- Selección de transformantes.**

Los transformantes se seleccionaron por su crecimiento en medio mínimo (SD) suplementado con los requerimientos necesarios, determinados por el genotipo de la cepa empleada y la auxotrofia complementada por el DNA utilizado para transformar (medio selectivo).

### **26.4.- Análisis de los transformantes.**

#### **26.4.a.- Transformación no integrativa.**

##### **1.- Comprobación de los marcadores genéticos.**

Para comprobar el fenotipo (auxotrofías) de los transformantes, se observó el crecimiento en medio mínimo (SD) suplementado con todos los requerimientos necesarios, excepto el que se examinaba cada vez.

##### **2.- Test de estabilidad del plásmido.**

Esta prueba permite comprobar si un determinado carácter (pérdida de una auxotrofia) se debe ó no a la presencia de un plásmido. El método se basa en que al crecer el transformante de interés en condiciones no selectivas (medio rico), el plásmido se pierde en parte de la población microbiana en cada división celular, de manera que la proporción de células sin plásmido aumenta en cada generación puesto que las células están creciendo en medio no selectivo y la presencia del plásmido no les confiere ninguna ventaja en estas condiciones. Por lo tanto, la detección de colonias sin un determinado marcador genético tras

el crecimiento en condiciones no selectivas, indica la asociación entre dicho marcador y el plásmido.

Para ello, se sembró el transformante a analizar en 5 ml de medio YPD, y se incubó durante toda la noche a 28°C hasta fase estacionaria de crecimiento. De ese cultivo se tomaron 15 µl para inocular otros 5 ml de YPD, que se incubaron igualmente toda la noche a 28°C hasta fase estacionaria de crecimiento. De este segundo cultivo se sembró por estría una placa de YPD que se incubó a 28°C hasta la aparición de colonias (24 horas). Seguidamente se realizaron réplicas en placas del medio selectivo adecuado y de medio rico (YPD). Las colonias crecidas en YPD que no contengan el plásmido, recuperan la auxotrofia complementada por el mismo, y por lo tanto no son capaces de crecer en el medio selectivo. A continuación se calculó el porcentaje de células que habían perdido el plásmido, lo cual depende del tipo de plásmido y de la cepa empleada.

#### **26.4.b.- Transformación integrativa: análisis de la integración de DNA exógeno en el cromosoma.**

La integración de DNA exógeno en el cromosoma de *C. albicans* fue analizada mediante reacciones de PCR con oligonucleótidos deducidos de la secuencia (tanto del DNA insertado como de secuencias adyacentes al sitio de integración). También se analizó mediante **Southern blot**, tras digestión del DNA cromosomal con enzimas de restricción adecuados, separación de los fragmentos obtenidos en geles de agarosa, e hibridación con la sonda. En ambos casos, a partir del tamaño de los fragmentos amplificados y/o detectados con la sonda, se puede demostrar el sitio de integración del DNA exógeno.

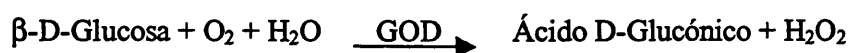
#### **27.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INVERTASA.**

La actividad invertasa presente en la pared celular (espacio periplásmico) de la levadura se determinó en células intactas (Gascón & Lampen, 1968; Mormeneo & Sentandreu, 1982). Se trata de un enzima extracelular que hidroliza determinados azúcares (como sacarosa y rafinosa) para utilizar los monosacáridos obtenidos como fuente de carbono (Carlson, 1987; Gozalbo & del Castillo, 1994). Una unidad de actividad invertasa se define



como la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu\text{mol}$  de sacarosa por minuto de reacción. La actividad relativa se expresa como mU invertasa/mg peso seco de células.

El método para determinar la actividad invertasa consiste en poner en contacto las células con el substrato (sacarosa), de manera que si hay actividad invertasa extracelular, se hidrolizará la sacarosa en glucosa y fructosa. A continuación la glucosa formada se cuantifica mediante el método de la glucosa-oxidasa, midiéndose a 540 nm el color desarrollado (Gascón & Lampen, 1968; Mormeneo & Sentandreu, 1982). Las reacciones bioquímicas responsables de la aparición de color se indican a continuación:



El método seguido para determinar la actividad invertasa fue el siguiente: se recogió la cantidad de células adecuada por centrifugación durante 5 min a 5.000 rpm a 4°C. Seguidamente, el sedimento celular se lavó varias veces con acetato potásico 0.1 M pH 4.5 frío. A continuación, se añadieron al sedimento 80  $\mu\text{l}$  de ese mismo tampón y 20  $\mu\text{l}$  de sacarosa 0.5 M en tampón acetato. Se agitó bien y se incubó a 30°C en baño de agua durante el tiempo deseado en cada caso, para que actuara la invertasa. Posteriormente, se añadieron 2 ml de la solución C, recién preparada, y se siguió incubando durante 20 min a la misma temperatura. Pasado ese tiempo, la reacción se paró añadiendo 2.5 ml de HCl 6 N. Las muestras se centrifugaron para eliminar las células, y se midió la DO de los sobrenadantes a 540 nm.

Para poder determinar la cantidad de glucosa formada durante la reacción, es necesario construir una curva patrón con distintas cantidades de glucosa (0-140  $\mu\text{g}$ ). Además, la cantidad de células empleada y el tiempo de reacción, deben ajustarse con objeto de obtener absorbancias dentro de escala. En caso de levaduras con poca actividad invertasa, se recogieron muestras de 10 ml de cultivo y el tiempo de reacción fue de 20 min. En el caso de levaduras con una actividad invertasa intermedia, se recogieron alícuotas de 0.5-1 ml y se mantuvieron durante 10 min en contacto con la sacarosa. En el caso de levaduras con mucha

actividad invertasa, se recogieron alícuotas de 0.25-0.5 ml de cultivo y el tiempo de reacción fue de 10 min.

- ➡ **Solución C:** mezcla de las soluciones A y B en proporción 2:1.
- ➡ **Solución A:** 100 ml fosfato potásico 0.1 M pH 6.5, 600 U peroxidasa (POD) (Sigma), 1.300 U glucosa oxidasa (GOD) (Sigma).
- ➡ **Solución B:** 100 ml fosfato potásico 0.1 M pH 6.5, 90 mg o-Dianisidina (Sigma).

## **28.- DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE SUPERVIVIENTES (VIABILIDAD CELULAR) EN EXPERIMENTOS DE ESTRÉS TÉRMICO**

### **28.1.- Medio de cultivo sólido.**

Se utilizó este tipo de medio cuando la temperatura utilizada en el choque térmico podía permitir el crecimiento de las células. Se crecieron las cepas a estudiar en diferentes medios de cultivo a 28°C hasta fase exponencial o fase estacionaria, y se calculó la concentración de microorganismos (n° microorganismos/ml). A continuación se hicieron las diluciones adecuadas en cada caso para obtener una suspensión en agua destilada estéril con 2000 UFC/ml. Alícuotas de 100 µl de esa suspensión (200 UFC) se sembraron, por triplicado, en placas con el medio de cultivo adecuado y posteriormente las placas se sometieron a un choque térmico a la temperatura deseada (38-40°C) durante diferentes tiempos. Tras el choque térmico, las placas se incubaron a 28°C para permitir la formación de colonias por las células viables. Al cabo de 2-3 días se contaron las colonias crecidas en cada una de las placas, se hizo la media de los triplicados con su desviación estándar y se calculó el porcentaje de supervivientes tomando como valor de referencia (100% de supervivientes) el obtenido para el tiempo 0 de tratamiento.

### **28.2.- Medio de cultivo líquido.**

Se utilizó este tipo de medio cuando la temperatura de choque utilizada era lo suficientemente elevada como para no permitir el crecimiento de las células, o bien cuando se trabajó con células en fase estacionaria cuyo crecimiento se encontraba ya detenido. En todos

los casos se comprobó que no había aumento de la población microbiana durante el choque térmico. Se crecieron las cepas a estudiar en diferentes medios de cultivo a 28°C hasta fase exponencial o fase estacionaria, y se calculó la concentración de microorganismos (n° microorganismos/ml). A estos cultivos líquidos se les dió un choque térmico en baño de agua a la temperatura deseada y a diferentes tiempos de tratamiento se fueron tomando alícuotas que se diluyeron para obtener una suspensión en agua destilada estéril con 2000 UFC/ml. Alícuotas de 100 µl (200 UFC) de esas suspensiones se sembraron, por triplicado, en placas Petri con el medio de cultivo adecuado que fueron incubadas a 28°C para permitir la formación de colonias por las células viables. Al cabo de 2-3 días se contaron las colonias crecidas en cada una de las placas, se hizo la media de los triplicados con su desviación estándar, y se calculó el porcentaje de supervivientes tomando como valor de referencia (100% de supervivientes) el obtenido para el tiempo 0 de tratamiento.



### **III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## **1.- AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN *UBI4* DE *C. albicans*.**

### **1.1.- Rastreo de una librería genómica empleando un cDNA de poliubiquitina como sonda.**

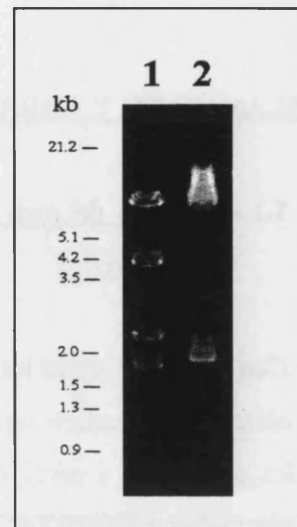
Con objeto de aislar los genes que codificasen proteínas relacionadas con la ubiquitina en *C. albicans*, se realizó un rastreo, en condiciones de baja astringencia, de una librería genómica construida a partir de DNA cromosomal de la cepa WO-1 de *C. albicans* en el vector plasmídico pEMBYe23 (Baldari & Cesareni, 1985), empleando como sonda el cDNA de 0.9 kb de la poliubiquitina de *C. albicans*, previamente aislado y subclonado en el vector plasmídico pGEM-T (Promega) (Sepúlveda *et al.*, 1996a).

Se analizaron aproximadamente unas 24.000 colonias (lo que representa aproximadamente unas 8 vueltas al genoma), obteniéndose quince posibles clones positivos, de los que tras un segundo rastreo se confirmaron trece verdaderos positivos.

### **1.2.- Análisis del DNA cromosomal de los clones aislados.**

Con objeto de examinar el número de clones diferentes de que disponíamos, se purificó el DNA plasmídico de los trece clones aislados y se digirió con los enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*, para separar el inserto, correspondiente al fragmento genómico aislado, del vector plasmídico mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. En todos los clones se detectó un fragmento de 7.3 kb, correspondiente al vector pEMBYe23, encontrándose además, cuatro fragmentos (de 4, 2.3, 1.8 y 0.8 kb), en doce de los trece clones analizados (Fig. III.1, calle 1), siendo, por lo tanto, el tamaño total del inserto genómico de estos clones de unas 9 kb. En el clon restante se encontraron sólo dos fragmentos además del correspondiente al vector plasmídico, (de 0.95 y 1.85 kb) (Fig. III.1, calle 2), siendo el tamaño total del inserto genómico de 2.8 kb. Por lo tanto, de los trece clones positivos se tenían sólo dos distintos: doce plásmidos de un mismo clon que contenía el fragmento de DNA de 9 kb y que se denominó pPR1, y el único plásmido del clon que contenía el inserto de 2.8 kb, denominado pPR2.

**Fig. III.1.** Análisis de restricción del DNA plasmídico de los clones positivos obtenidos tras el rastreo de la librería genómica con el cDNA de la poliubiquitina como sonda. El DNA plasmídico (1 µg) se digirió con los enzimas de restricción *Hind*III y *Bam*HI y los fragmentos obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. En la calle 1 se muestra el resultado obtenido en doce de los trece clones analizados (pPR1); en la calle 2 se muestra el resultado obtenido en el clon restante (pPR2). A la izquierda se muestra la migración de los estándares de peso molecular (DNA del fago λgt11 digerido con los enzimas de restricción *Eco*RI y *Hind*III).



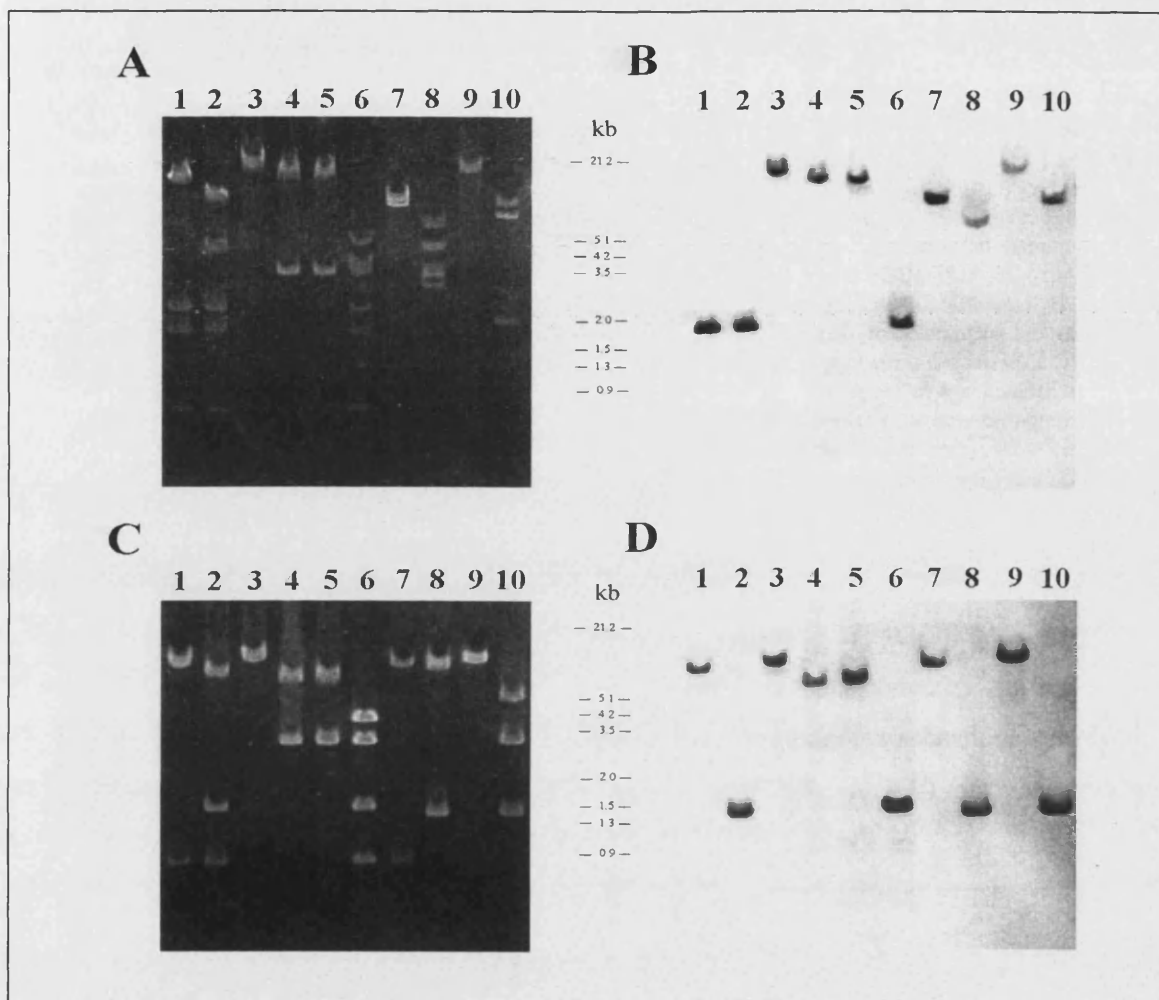
Con el fin de averiguar si los dos clones diferentes correspondían al mismo gen o a genes distintos, se purificaron ambos plásmidos y se procedió a determinar los mapas de restricción de los mismos. Para ello se hicieron digestiones simples, con diferentes enzimas de restricción, y dobles, con distintas combinaciones de éstos, y a continuación se analizaron los fragmentos de DNA resultantes (Fig. III.2 A y C), construyéndose los mapas de restricción de ambos insertos genómicos (véase Fig. III.3 A y Fig. III.30 A). La determinación de las bandas o fragmentos que hibridaron con la sonda de cDNA utilizada en el rastreo, permitió localizar los genes dentro de los insertos correspondientes (Fig. III.2 B y D). Los resultados obtenidos permitieron concluir que se trataba de dos genes diferentes.

#### 1.2.a.- Mapa de restricción de pPR1.

Como se ha citado anteriormente, se determinó el mapa de restricción del inserto genómico de pPR1. Dicho inserto contiene tres sitios de corte *Hind*III, además del presente en el sitio múltiple de clonaje del vector (Fig. III.3 A).

El análisis mediante Southern blot de los fragmentos de restricción que hibridaban con la sonda de cDNA, permitió localizar el gen en el fragmento de restricción *Hind*III/*Hind*III de 1.8 kb (Fig. III.2 B, calle 1). La correcta ubicación de los sitios de restricción *Hind*III dentro del inserto genómico, así como la orientación del gen se determinó mediante PCR, utilizando el oligonucleótido universal de pUC/M13 "reverse" (que hibridaba en el extremo *Hind*III del

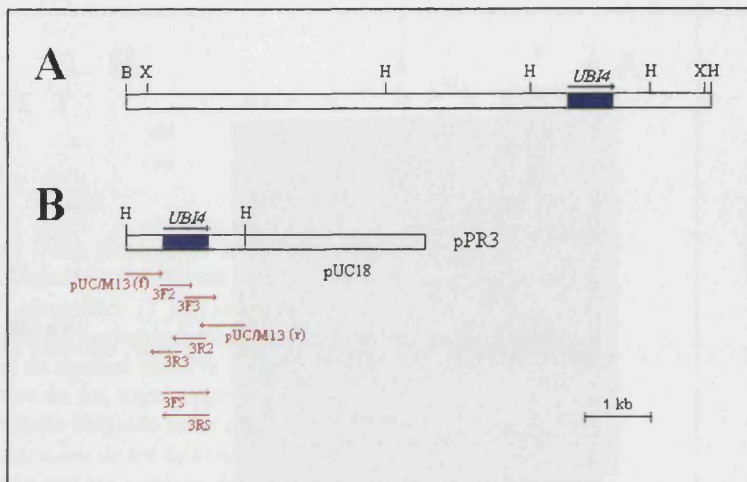




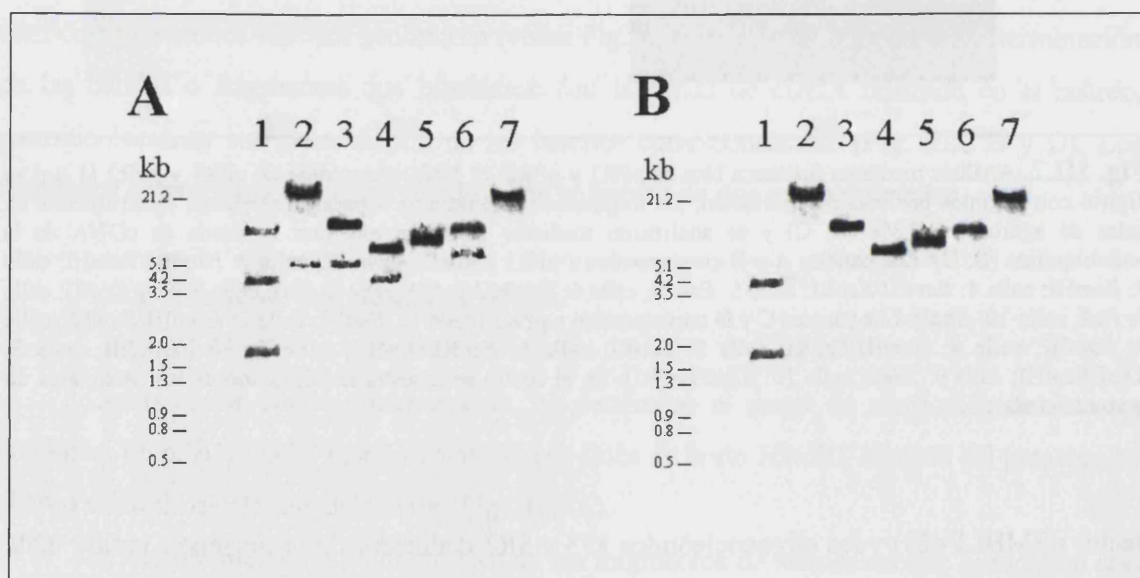
**Fig. III.2.** Análisis mediante Southern blot de pPR1 y pPR2. El DNA plasmídico de pPR1 y pPR2 (1  $\mu$ g) se digirió con distintos enzimas de restricción, los fragmentos obtenidos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (A, C) y se analizaron mediante Southern blot con la sonda de cDNA de la poliubiquitina (B, D). Los paneles A y B corresponden a pPR1 (calle 1: *Hind*III; calle 2: *Hind*III/*Bam*HI; calle 3: *Bam*HI; calle 4: *Bam*HI/*Eco*RI; calle 5: *Eco*RI; calle 6: *Eco*RI/*Hind*III; calle 7: *Sal*I; calle 8: *Sal*I/*Eco*RI; calle 9: *Pst*I; calle 10: *Xba*I). Los paneles C y D corresponden a pPR2 (calle 1: *Hind*III; calle 2: *Hind*III/*Bam*HI; calle 3: *Bam*HI; calle 4: *Bam*HI/*Eco*RI; calle 5: *Eco*RI; calle 6: *Eco*RI/*Hind*III; calle 7: *Xho*I/*Hind*III; calle 8: *Xho*I/*Bam*HI; calle 9: *Xho*I; calle 10: *Xho*I/*Eco*RI). En el centro se muestra la migración de los estándares de peso molecular.

vector pEMBLye23) y los oligonucleótidos 3F3 y 3R3 deducidos de la secuencia (véase tabla III.1), obteniéndose un amplificado de 1.9 kb en el primer caso y ausencia de amplificado en el segundo. Por lo tanto, la zona del promotor del gen correspondía al extremo *Bam*HI del inserto genómico del plásmido (dicha información no se obtiene por la secuenciación del gen debido a que se secuenció sólo el fragmento *Hind*II/*Hind*III de 1.8 kb).

**Fig. III.3.** Panel A: Mapa de restricción del fragmento de DNA genómico de *C. albicans* clonado en el plásmido pPR1. La región codificante (ORF) del gen *UBI4* aparece en color azul. La flecha indica el mRNA transcrito. Dianas de enzimas de restricción: H (*HindIII*), X (*XbaI*), B (*BamHI*). Panel B: Estrategia de secuenciación del gen *UBI4*. Las flechas indican el inicio, la dirección y la longitud de los tramos secuenciados. Los oligonucleótidos empleados se describen en la tabla III.1.



Para confirmar el mapa de restricción, se realizó un análisis del DNA cromosomal de *C. albicans* ATCC 26555 mediante Southern blot, empleando como sonda el cDNA de la poliubiquitina, en condiciones de hibridación estrictas y no estrictas (Fig. III.4). En todas las digestiones realizadas se obtuvieron dos señales de hibridación, excepto para *PstI* que dió una señal única (Fig. III.4 A, calle 5), y *HindIII* que dió tres señales (Fig. III.4 A, calle 1), en



**Fig. III.4.** Análisis mediante Southern blot de DNA cromosomal de *C. albicans* ATCC 26555. Cada calle contiene 10 µg de DNA cromosomal digerido con *HindIII*, *BamHI*, *EcoRV*, *EcoRI*, *XbaI*, *SalI*, y *PstI* (calles 1-7 respectivamente). Como sonda se utilizó el fragmento de 0.9 kb de cDNA de la poliubiquitina de *C. albicans*, en condiciones de hibridación no estrictas (panel A) y estrictas (panel B).

condiciones de hibridación no estrictas. Estos resultados indican que en el genoma de *C. albicans* se encuentran otras secuencias que codifican proteínas relacionadas con la ubiquitina, además de la poliubiquitina. En condiciones de hibridación estrictas (Fig. III.4 B) sólo se obtuvo una señal de hibridación para cada digestión, excepto para *Hind*III que dió dos señales. Estos resultados indican la existencia de una sólo copia del gen de la poliubiquitina en el genoma de *C. albicans*; y que la cepa de *C. albicans* ATCC 26555 presenta un polimorfismo de restricción, encontrándose cada alelo del gen en un fragmento *Hind*III diferente: uno de 1.8 kb, que concuerda con el mapa de restricción obtenido para el fragmento clonado de la cepa WO-1 de *C. albicans*, y otro de 4.2 kb, que también concuerda con el mapa de restricción obtenido si eliminamos uno de los sitios de restricción *Hind*III. Por lo tanto, pPR1 contiene el gen de la poliubiquitina de *C. albicans*, que se denominó *UBI4*, de acuerdo con la nomenclatura utilizada en *S. cerevisiae*.

#### **1.2.b.- Secuenciación del gen *UBI4* y análisis de la secuencia.**

El fragmento *Hind*III de 1.8 kb del plásmido pPR1 que contenía el gen de interés (*UBI4*) se subclonó en el sitio *Hind*III del plásmido pUC18, obteniéndose un nuevo plásmido que se denominó pPR3.

La doble cadena del fragmento de 1.8 kb que contiene el gen se secuenció completamente, empleando en primer lugar los oligonucleótidos universales de pUC/M13 "forward" y "reverse", y posteriormente, nuevos oligonucleótidos sintéticos, deducidos de la región secuenciada (tabla III.1). La estrategia de secuenciación se indica en la figura III.3 B.

La región secuenciada consta de 1.791 pb y contiene el gen *UBI4* y sus secuencias adyacentes. Su análisis demostró la existencia de un marco abierto de lectura de 687 nucleótidos que codifica los 229 aminoácidos de la poliubiquitina de *C. albicans*. Dicha proteína está formada por tres subunidades idénticas de ubiquitina, de 76 aminoácidos cada una, unidas directamente cabeza-cola, sin espacios intermedios, teniendo la última subunidad un aminoácido de más en el extremo C-terminal. Esta organización concuerda con el fragmento de cDNA de poliubiquitina previamente caracterizado por nuestro grupo, y empleado como sonda (Sepúlveda *et al.*, 1996a).

| NOMBRE | SECUENCIA                     | LOCALIZACIÓN EN LA SECUENCIA GENÓMICA |            |
|--------|-------------------------------|---------------------------------------|------------|
|        |                               | extremo 5'                            | extremo 3' |
| 3F2    | GTCGTGACCTTACGTACAGCACAC      | - 220                                 | - 197      |
| 3F3    | CGCCGGTAAACAATTAGAAGATGGC     | 135                                   | 159        |
| 3FS    | CATATATATAÇAAATCTACAAGCAATGC  | - 24                                  | 4          |
| 3R3    | GTTGTAGTCAGACAAGGTTCTACC      | 408                                   | 385        |
| 3R2    | GTTTAGGCGAAAATAAGTTTGCC       | 917                                   | 893        |
| 3RS    | GCAGCAATGATTATAAAAAATTAGAAACC | 710                                   | 682        |

**Tabla III.1.** Oligonucleótidos sintéticos utilizados como cebadores en la secuenciación del gen *UBI4* de *C. albicans*. La posición de los extremos 5' y 3' está numerada respecto al sitio de inicio de la traducción. Nótese que los oligonucleótidos F y R hibridan con cadenas complementarias.

La secuencia de aminoácidos codificada por cada subunidad de ubiquitina del gen *UBI4* de *C. albicans* es idéntica a la codificada por la ubiquitina de *S. cerevisiae*, lo que confirma que se trata de una proteína extremadamente conservada entre especies (Finley & Chau, 1991; Finley & Varshavsky, 1985; Özkaynak *et al.*, 1987). El gen *UBI4* de *S. cerevisiae* contiene cinco subunidades de ubiquitina en lugar de las tres que tiene el gen en *C. albicans*, y el aminoácido extra que presenta la última ubiquitina del gen *UBI4* en su extremo carboxi-terminal también es diferente, siendo fenilalanina en *C. albicans* y asparagina en *S. cerevisiae*. Se ha descrito que este último aminoácido difiere en poliubiquitinas de diferentes especies (Finley & Varshavsky, 1985; Özkaynak *et al.*, 1987). El uso de codones del gen *UBI4* en *C. albicans* (Tabla III.2), sigue el patrón descrito para los genes muy expresados (Lloyd & Sharp, 1992), lo que indica preferencia por aquellos codones que son traducidos más eficientemente (Bennetzen & Hall, 1982; Ikemura, 1982; Sharp *et al.*, 1986). La secuencia del gen *UBI4* de *C. albicans* (Fig. III.5) se encuentra depositada en la base de datos del GenBank/EMBL con el número de acceso Y17558.

**Tabla III.2.** (Página siguiente). Uso de codones del gen *UBI4* de *C. albicans*. Se muestra el número de veces que aparece cada codón y el uso relativo en %.

| AMINOÁCIDO | CODÓN | Nº | USO (%) | AMINOÁCIDO | CODÓN | Nº   | USO (%) |
|------------|-------|----|---------|------------|-------|------|---------|
| Arg (R)    | AGA   | 12 | 100     | Gly (G)    | GGA   | 18   | 11,1    |
|            | AGG   | 12 |         |            | GGC   | 0    |         |
|            | CGA   | 0  |         |            | GGG   | 2    |         |
|            | CGG   | 0  |         |            | GGT   | 0    |         |
|            | CGT   | 0  |         |            |       | 16   |         |
|            | CGC   | 0  |         |            |       | 88,8 |         |
| Ser (S)    | TCA   | 15 | 20      | Val (V)    | GTA   | 12   | 58,3    |
|            | TCC   | 0  |         |            | GTC   | 7    |         |
|            | TCG   | 3  |         |            | GTG   | 0    |         |
|            | TCT   | 0  |         |            | GTT   | 5    |         |
|            | AGT   | 12 |         |            |       | 41,6 |         |
|            | AGC   | 0  |         |            |       |      |         |
| Asn (N)    | AAT   | 6  | 100     | Gln (Q)    | CAA   | 18   | 100     |
|            | AAC   | 0  |         |            | CAG   | 18   |         |
|            |       | 6  |         |            |       | 0    |         |
|            |       |    |         |            |       |      |         |
|            |       |    |         |            |       |      |         |
|            |       |    |         |            |       |      |         |
| Lys (K)    | AAA   | 21 | 76,2    | His (H)    | CAC   | 3    | 33,3    |
|            | AAG   | 16 |         |            | CAT   | 1    |         |
|            |       | 5  |         |            |       | 2    |         |
| Met (M)    | ATG   | 3  | 100     | Leu (L)    | CTA   | 27   | 37      |
|            |       | 3  |         |            | CTC   | 0    |         |
| Ile (I)    | ATA   | 21 | 61,9    | Pro (P)    | CTT   | 0    | 100     |
|            | ATC   | 13 |         |            | TTA   | 10   |         |
|            | ATT   | 8  |         |            | TTG   | 17   |         |
| Thr (T)    | ACA   | 21 | 38,1    | Tyr (Y)    | TAC   | 3    | 100     |
|            | ACC   | 0  |         |            | TAT   | 3    |         |
|            | ACG   | 8  |         |            |       | 0    |         |
|            | ACT   | 0  |         |            |       |      |         |
| Ala (A)    | GCA   | 3  | 66,6    | Cys (C)    | TGC   | 0    |         |
|            | GCC   | 0  |         |            | TGT   |      |         |
|            | GCG   | 2  |         |            |       |      |         |
|            | GCT   | 0  |         |            |       |      |         |
| Asp (D)    | GAC   | 18 | 61,1    | Trp (W)    | TGG   | 0    |         |
|            | GAT   | 11 |         |            |       |      |         |
|            |       | 7  |         |            |       |      |         |
| Glu (E)    | GAA   | 15 | 100     | Phe (F)    | TTC   | 7    | 71,4    |
|            | GAG   | 15 |         |            | TTT   | 5    |         |
|            |       | 0  |         |            |       | 2    | 28,5    |

```

- 573          GCCAAGCTTAATTTGTTATTCAA
                HindIII
- 550  TTGCTAATAAGATCGAAGAGGTTATGAACACAACACTATTTTCATACATTGGG
- 500  TAGGTCATTCATATCAATTGATAGATGCAAGCTAATTGGAATGAAAAATC
- 450  CATCTTGTATCAAAACCCTTTGTTCCCTCATAGTTAATCCGACTAAAGAAG
- 400  TGTTTTTTTTTTCTTTTCTTTTTTGCTATATCCTAGTTGCCTTAACGACA
- 350  GTAATAGTTAAAGCGTTGGAAAGTAATGGTGAACCTCGAACCATTTGGTTG
- 300  ACGCTGACGATTAATAATGTGAATTTCTTTTTTTTTTGCTTATAGTAATT
- 250  GGTTTGTTTGTGCTAAATTAAGAAAATGTCGTGACCTTACGTACAGC
- 200  ACACACATACCACTGTCCGTGCACTGACCAACAACAATGCGGTGTTAATC
- 150  GATAACCAAAGATTATAAATAGGGGGTGGAAGGTCCGCCCTGTTTGAAAT
- 100  GAATCAACACACCCTTTTTTTTTCTTCTTGCTTTTTCTTTCTATTTTACAT
- 50   TACAAATTCTGACAATCGTCAACTAACATATATATACAAATCTACAAGCA
                ⇒
   1   ATG CAA ATT TTC GTT AAA ACT TTG ACT GGT AAA ACC
   1   M  Q  I  F  V  K  T  L  T  G  K  T

  37   ATT ACC TTA GAA GTC GAA TCT TCT GAC ACC ATC GAT
  13   I  T  L  E  V  E  S  S  D  T  I  D

  73   AAC GTC AAA TCC AAG ATC CAA GAC AAA GAA GGT ATT
  25   N  V  K  S  K  I  Q  D  K  E  G  I

 109   CCA CCA GAC CAA CAA AGA TTG ATT TTC GCC GGT AAA
   37   P  P  D  Q  Q  R  L  I  F  A  G  K

 145   CAA TTA GAA GAT GGC AGA ACC TTG TCT GAC TAC AAC
   49   Q  L  E  D  G  R  T  L  S  D  Y  N

 181   ATC CAA AAA GAA TCT ACT TTA CAT TTG GTT TTA AGA
   61   I  Q  K  E  S  T  L  H  L  V  L  R

 217   TTG AGA GGT GGT ATG CAA ATC TTT GTT AAA ACT TTA
   73   L  R  G  G  M  Q  I  F  V  K  T  L

 253   ACT GGT AAG ACT ATC ACT TTG GAA GTC GAA TCT TCT
   85   T  G  K  T  I  T  L  E  V  E  S  S

 289   GAC ACC ATC GAT AAC GTC AAA TCC AAG ATC CAA GAC
   97   D  T  I  D  N  V  K  S  K  I  Q  D
    
```

325 AAA GAA GGT ATT CCA CCA GAT CAA CAA AGA TTG ATT  
 109 K E G I P P D Q Q R L I

361 TTC GCC GGT AAA CAA TTA GAA GAT GGC AGA ACT TTG  
 121 F A G K Q L E D G R T L

397 TCT GAC TAC AAC ATC CAA AAA GAA TCT ACT TTA CAT  
 133 S D Y N I Q K E S T L H

433 TTG GTT TTA AGA TTG AGA GGT GGT ATG CAA ATC TTT  
 145 L V L R L R G G M Q I F

469 GTT AAA ACT TTA ACT GGT AAG ACT ATC ACT TTG GAA  
 157 V K T L T G K T I T L E

505 GTC GAA TCT TCT GAC ACC ATC GAT AAC GTC AAA TCC  
 169 V E S S D T I D N V K S

541 AAG ATC CAA GAC AAA GAA GGT ATT CCA CCA GAC CAA  
 181 K I Q D K E G I P P D Q

577 CAA AGA TTG ATT TTC GCT GGT AAA CAA TTA GAA GAT  
 193 Q R L I F A G K Q L E D

613 GGT AGA ACC TTG TCT GAC TAC AAC ATC CAA AAA GAA  
 205 G R T L S D Y N I Q K E

649 TCT ACC TTG CAC TTG GTC TTG AGA TTG AGA GGT GGT  
 217 S T L H L V L R L R G G

685 TTC TAA TTTTTATAATCATTGCTGCTAAATAGTTTTGTTTTATAGAC  
 229 F \*

733 TAGGCTTTAATTTATTATGAGGGTCCAATTCAGGTCCCATTGATTATGAG

783 AGTATCTTACATTTGTAATAATAATTTTTTTTCAGCTTAAACTGACAT ←

833 TTATAAACTCTATAAAGAATTGATTGATAATTGTGTGCATGAAATGCAAA

883 TGTTGGTATTGGCAAACCTTTAGTTTTTCGCCTAAACTCATTTTTTTCTTCT

933 TCTGTTGTAACCAAAATTTTGCCACTATTTTTACTTTTACCAAAAACA

983 CCTAAAAACAACCAAACTTCTCCTTACTTATGTCCTTCTCAAGAATTAGC

1033 TTTGGTTAATAAGGTAGAGCTTAGAATAGCTTTAGCTGAAAACGACAAGC

1083 AATTCGAGAATGCCTTAAACATATATCTTGCTCCAGTCCTATTAAAGTTA

```
1133   GCCAGTCCTCACATTGAAGTGAGACAAGCTGTACTCAAAATCATTTCAGCA
1183   TATAGTACCAAGAATAACGGCAGCAAGGACAATTAAACTCCCAGTGGAAAG
                                           HindIII
1233   CTT
```

**Fig III.5.** Secuencia nucleotídica del gen *UBI4* de *C. albicans* y regiones adyacentes, introducida en la base de datos del GenBank/EMBL con el número Y17558. La secuencia está numerada respecto al lugar de inicio de la traducción. En la zona promotora se muestra una posible caja TATA (en color rojo y subrayada), una zona rica en CT seguida por la secuencia CAAG (en color verde y subrayado), dos elementos de respuesta a estrés (STRE) (en color violeta y subrayados) y una secuencia cosenso de unión del complejo HAP (subrayada). El codón de terminación de la traducción se indica con un asterisco. Las posibles señales de terminación de la transcripción y poliadenilación se muestran subrayadas. La secuencia de aminoácidos de la proteína codificada se indica con el código de una sola letra, numerándose desde el codón de inicio de la traducción. El extremo carboxi-terminal de cada secuencia de ubiquitina (glicina) está indicado con una flecha vertical. El aminoácido extra en el extremo carboxi-terminal de la última ubiquitina se indica en color azul. La posición de los sitios de restricción *HindIII* que flanquean la región secuenciada también se indican. Los sitios de restricción *Clal* dentro de la secuencia codificante, se indican en rojo. Los extremos 5' y 3' del cDNA de 0.9 kb empleado como sonda están señalados con flechas horizontales (-16, 782).

Las secuencias nucleotídicas de las diferentes subunidades de ubiquitina difieren unas de otras en unas pocas bases (Fig. III.6), obteniéndose una homología del 93-96% al comparar las tres subunidades entre sí. Entre la primera y segunda ubiquitina se encontraron 10 diferencias nucleotídicas (homología del 95.6%), 9 diferencias entre la segunda y la tercera (homología del 96%), y 15 diferencias entre la primera y la tercera copia de ubiquitina (homología del 93.4%). Curiosamente, estas diferencias están desigualmente distribuidas, de manera que las encontradas entre la primera y segunda secuencia de ubiquitina se encuentran localizadas principalmente (8 de 10) en el extremo 5' de la secuencia; las diferencias entre la segunda y la tercera copia se encuentran en la mitad 3' de la secuencia, concentrándose en el extremo 3' (5 de 9); y las diferencias entre la primera y la tercera se concentran en ambos extremos: 8 de 15 en el extremo 5' y 6 de 15 en el extremo 3'. Todas las diferencias se encuentran lógicamente en sitios que no afectan al aminoácido codificado (cambios silenciosos). La distribución heterogénea de diferencias nucleotídicas (mutaciones espontáneas) entre secuencias repetidas de la región codificante y, por lo tanto, la divergencia entre distintas partes de un mismo gen, puede sugerir posibles mecanismos que dieron lugar a su aparición. Del mismo modo, el estudio de la distribución de diferencias nucleotídicas espontáneas en la secuencia de ubiquitina de diferentes genes podría ayudar a establecer posibles relaciones filogenéticas para la familia de genes de ubiquitina de levadura (véase apartado 2.2.c), tal como ya se ha realizado previamente para otras familias de genes de levadura (Hohmann & Gozalbo, 1989).



|          |   |
|----------|---|
| UBI4 (1) | ATG CAA AT <b>T</b> TTC GTT AAA ACT TTG ACT GGT AAA ACC |
| UBI4 (2) | ATG CAA ATC TTT GTT AAA ACT TTA ACT GGT AAG ACT         |
| UBI4 (3) | ATG CAA ATC TTT GTT AAA ACT TTA ACT GGT AAG ACT         |
| UBI4 (1) | AT <b>T</b> ACC TTA GAA GTC GAA TCT TCT GAC ACC ATC GAT |
| UBI4 (2) | ATC ACT TTG GAA GTC GAA TCT TCT GAC ACC ATC GAT         |
| UBI4 (3) | ATC ACT TTG GAA GTC GAA TCT TCT GAC ACC ATC GAT         |
| UBI4 (1) | AAC GTC AAA TCC AAG ATC CAA GAC AAA GAA GGT ATT         |
| UBI4 (2) | AAC GTC AAA TCC AAG ATC CAA GAC AAA GAA GGT ATT         |
| UBI4 (3) | AAC GTC AAA TCC AAG ATC CAA GAC AAA GAA GGT ATT         |
| UBI4 (1) | CCA CCA GAC CAA CAA AGA TTG ATT TTC GCC GGT AAA         |
| UBI4 (2) | CCA CCA GAT CAA CAA AGA TTG ATT TTC GCC GGT AAA         |
| UBI4 (3) | CCA CCA GAC CAA CAA AGA TTG ATT TTC GCT GGT AAA         |
| UBI4 (1) | CAA TTA GAA GAT GGC AGA ACC TTG TCT GAC TAC AAC         |
| UBI4 (2) | CAA TTA GAA GAT GGC AGA ACT TTG TCT GAC TAC AAC         |
| UBI4 (3) | CAA TTA GAA GAT GGT AGA ACC TTG TCT GAC TAC AAC         |
| UBI4 (1) | ATC CAA AAA GAA TCT ACT TTA CAT TTG GTT TTA AGA         |
| UBI4 (2) | ATC CAA AAA GAA TCT ACT TTA CAT TTG GTT TTA AGA         |
| UBI4 (3) | ATC CAA AAA GAA TCT ACC TTG CAC TTG GTC TTG AGA         |
| UBI4 (1) | TTG AGA GGT GGT   |
| UBI4 (2) | TTG AGA GGT GGT   |
| UBI4 (3) | TTG AGA GGT GGT TTC                                     |

**Fig. III.6.** Comparación de las tres secuencias de ubiquitina del gen *UBI4* de *C. albicans*. Las diferencias nucleotídicas encontradas en sólo una de las tres secuencias están indicadas en color rojo. Nótese que la tercera copia de ubiquitina contiene un codón adicional.

El análisis de la zona promotora permitió la identificación de una posible caja TATA (Guarante, 1984; Struhl, 1987) situada en la posición -137 con respecto al inicio de la traducción (Fig. III.5), que podría actuar como señal de iniciación de la transcripción. Además, se identificó en la posición -89 una zona rica en CT seguida, a cierta distancia, por la secuencia CAAG en la posición -6, elementos que forman una secuencia nucleotídica bipartita encontrada en la región promotora de muchos genes de levadura (Dobson *et al.*, 1982; Klebl & Tanner, 1989). En las posiciones -130 y -114 se han identificado secuencias consenso (AGGGG y CCCCT) de elementos de respuesta a estrés (STRE), encontradas en los promotores de varios genes (Cervera *et al.*, 1998; Ruis & Schüller, 1995), entre ellos el gen *UBI4* de *K. lactis* (Bao & Fukuhara, 2000); otro elemento conocido de respuesta a estrés, el HSE (CNNGAANN TTCNNG), sitio de unión del factor de transcripción HSF (heat shock

factor) (Wu, 1995), encontrado en el promotor de genes de levadura inducibles por choque térmico (Mager & Moradas-Ferreira, 1993), incluyendo el gen *UBI4* de *S. cerevisiae* (Özkaynak *et al.*, 1987; Watt & Piper, 1997), no se encuentra en el de *C. albicans*, ni en el de *K. lactis* (Bao & Fukuhara, 2000). Por otro lado, en la posición -253 se encuentra la secuencia ATTGGT, que también se encuentra en el promotor del gen *UBI4* de *K. lactis* (Bao & Fukuhara, 2000), que corresponde a la secuencia consenso (TNA/GTTGGT) de unión del complejo HAP2/HAP3/HAP4 (Hahn & Guarente, 1988), complejo activador heteromérico que regula la expresión de algunos genes en respuesta a oxígeno y/o grupos hemo (Chantrel *et al.*, 1998; Zitomer & Lowry, 1992).

En la región 3' no traducida, aparecen las secuencias TAG...TAGG...TTT, en las posiciones 715, 733 y 738, presentes en muchos genes de levadura, y que actúan como posibles señales de terminación de la transcripción y poliadenilación del mRNA (Maneu *et al.*, 1996, 1997; Zaret & Sherman, 1982) (Fig. III.5).

### **1.3.- Análisis mediante Northern blot de la expresión de UBI4 en C. albicans.**

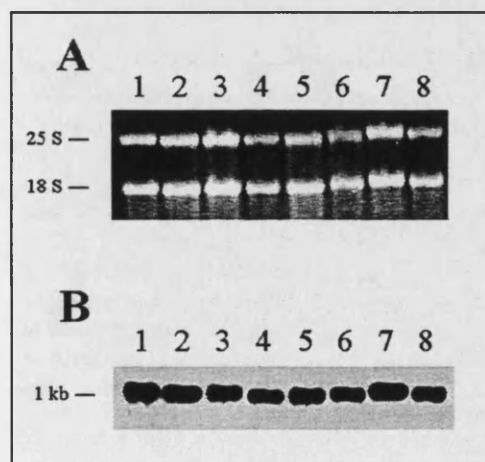
La expresión del gen *UBI4* en distintas condiciones ambientales se determinó en la cepa *C. albicans* ATCC 26555 mediante análisis por Northern blot, utilizando como sonda el cDNA de la poliubiquitina (Sepúlveda *et al.*, 1996a). En todos los casos estudiados se detectó un sólo transcrito de aproximadamente 1 kb, cuyo tamaño concuerda con los datos obtenidos en la secuenciación de *UBI4*, aunque en ocasiones también se detectaba una señal débil de 0.6 kb correspondiente al mRNA transcrito de otros genes *UBI* (*UBI3* probablemente, véase apartado 2.3).

#### **1.3.a.- Transición morfológica levadura-micelio.**

En primer lugar se estudió la expresión del gen *UBI4* de *C. albicans* en las dos morfologías del hongo: levadura y micelio. El transcrito detectado fue similar cuantitativamente en ambas morfologías, obtenidas a partir de células en reposo metabólico tras cuatro horas de incubación, a 28°C (levadura) y 37°C (micelio) en medio de Lee (Fig. III.7, calles 4 y 8).

Como ya se ha comentado, la ubiquitina es un componente esencial del sistema de respuesta a estrés en levaduras, y la poliubiquitina está considerada como una proteína de choque térmico cuya síntesis aumenta en respuesta a estrés (Finley *et al.*, 1987; Fraser *et al.*, 1991; Mager & Moradas-Ferreira, 1993). Debido a que el método empleado para inducir el tubo germinativo (Casanova *et al.*, 1989), implica un cambio brusco de temperatura desde levaduras en reposo metabólico (mantenidas al menos 24 h a 4°C), bien a 28°C para obtener levaduras, o a 37°C para inducir el tubo germinativo, se decidió determinar la expresión de *UBI4* durante este proceso.

Para ello, se obtuvo RNA a distintos tiempos (0, 15 y 90 min) durante el proceso de transición morfológica a partir de células en reposo metabólico incubadas en medio de Lee a 28°C (levadura) y a 37°C (micelio). Dicho RNA se analizó mediante Northern blot con el cDNA de la poliubiquitina como sonda. Como puede observarse en la figura III.7, se detectaron transcritos cuantitativamente similares en todos los casos, lo que indica que los niveles de mRNA de *UBI4* se mantienen constantes durante ambos procesos, tanto en el crecimiento levaduriforme a 28°C, como en la inducción del tubo germinativo a 37°C. Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que se parte de células que se encuentran ya estresadas por estar en ayuno metabólico (24 h a 4°C en agua), y por tanto deben tener una expresión relativamente elevada del gen *UBI4* (Finley *et al.*, 1987; Fraser *et al.*, 1991), o bien, a que este tratamiento no representa realmente un estrés térmico, ya que *C. albicans* crece bien a ambas temperaturas (28°C y 37°C). De hecho, los mutantes *ubi4* de *S. cerevisiae* son hipersensibles al ayuno metabólico, lo que indica que la poliubiquitina es necesaria para la supervivencia en estas condiciones (Finley *et al.*, 1987). El choque térmico en estas condiciones supone pues unas condiciones de estrés añadido, que no permiten ver diferencias significativas en los niveles de mRNA de *UBI4*.

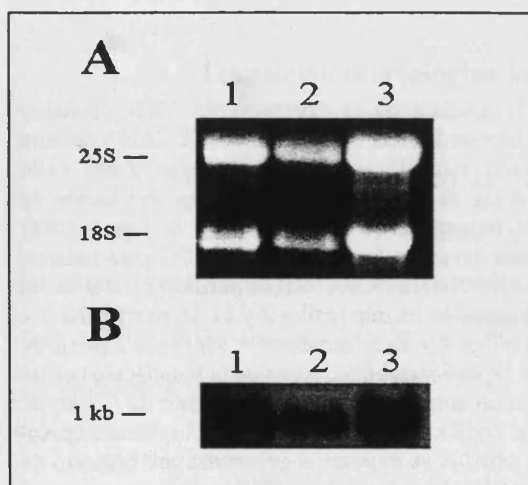


**Fig. III.7.** Análisis de la expresión de *UBI4* mediante Northern blot en la cepa *C. albicans* ATCC 26555 durante la transición morfológica levadura-micelio. Cada calle contiene 6 µg de RNA total obtenido tras incubación de células en reposo metabólico, en medio de Lee, a 28°C para obtener levadura (calles 1-4), y a 37°C para obtener micelio (calles 5-8). El RNA total se purificó a partir de las células después de 15 min (calles 2 y 6), 90 min (calles 3 y 7) y 3 h (calles 4 y 8) de incubación, así como a partir de células en reposo metabólico antes de la incubación (calles 1 y 5). Como sonda se utilizó el fragmento de 0.9 kb de cDNA que codifica la poliubiquitina de *C. albicans* (panel B). En el panel A se muestra el gel teñido con bromuro de etidio para visualizar los rRNAs (25S y 18S).

### 1.3.b.- Efecto del estrés nutricional.

Debido a que el estudio de la expresión del gen *UBI4* de *C. albicans* durante el proceso de transición morfológica levadura-micelio implica someter a las células a condiciones de ayuno metabólico (estrés nutricional), se procedió a estudiar a continuación, la expresión del gen en dichas condiciones.

El efecto del estrés nutricional se determinó a partir de RNA de células levaduriformes en fase tardía de crecimiento exponencial a 28°C en medio de Lee, células mantenidas durante 3 h a 37°C en agua estéril, y células mantenidas posteriormente durante 24 h a 4°C también en agua estéril. En todos los casos se detectaron niveles de transcrito similares al hibridar las muestras con el cDNA de *UBI4* (Fig. III.8), aunque los niveles de mRNA detectados en levaduras en fase exponencial tardía, parecían mayores que los que se detectaron en células en fase temprana de crecimiento exponencial (véase Fig. III.9). Esto puede deberse al diferente momento de la fase exponencial de crecimiento (fase temprana o tardía) en que se recogieron las células, puesto que podría ocurrir algo parecido a lo descrito en *S. cerevisiae*, donde *UBI4* es inducido bajo condiciones de alta densidad celular (Finley *et al.*, 1987; Tanaka *et al.*, 1988). La expresión del gen *UBI4* en *C. albicans* en la fase exponencial tardía de crecimiento, sería, por lo tanto, superior a la de las células al principio de la fase exponencial, permaneciendo estables estos niveles durante el estrés nutricional. Un posible aumento no sería detectado mediante Northern blot, puesto que se parte de células con una expresión elevada, y por otra parte los niveles de ubiquitina libre en condiciones de reposo metabólico no se deplecionan a alta velocidad, por lo que no cabe esperar un aumento importante de expresión de *UBI4* (Finley *et al.*, 1987).



**Fig. III.8.** Efecto del ayuno metabólico sobre los niveles de mRNA de *UBI4*: análisis mediante Northern blot. Cada calle contiene 6 µg de RNA total de la cepa *C. albicans* ATCC 26555. Dicho RNA se obtuvo a partir de células levaduriformes en fase tardía de crecimiento exponencial ( $DO_{600} = 0.75$ ) a 28°C en medio de Lee (calle 1), mantenidas posteriormente durante 3 h a 37°C en agua estéril (calle 2), y posteriormente durante 24 h a 4°C también en agua estéril (calle 3). Como sonda se utilizó el fragmento de 0.9 kb de cDNA que codifica la poliubiquitina de *C. albicans* (panel B). En el panel A se muestra el gel teñido con bromuro de etidio para visualizar los rRNAs (25S y 18S).

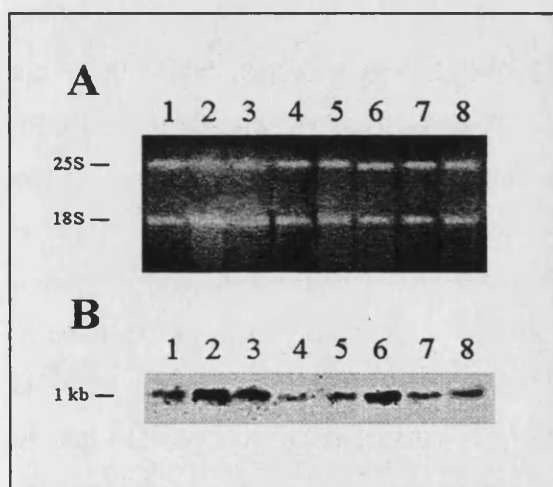
Esta observación indica que la ausencia de aumento significativo de mRNA durante la transición morfológica levadura-micelio (Fig. III.7) se debe a que las células de partida presentan niveles elevados de mRNA de *UBI4*, posiblemente debido no a las condiciones de estrés nutricional, sino a que se trata de células en la fase tardía de crecimiento exponencial.

No obstante, no puede descartarse un aumento transitorio de los niveles de mRNA durante etapas iniciales del proceso. En cualquier caso, los resultados obtenidos indican que los niveles de mRNA de *UBI4* se mantienen estables en condiciones de estrés nutricional.

### 1.3.c.- Efecto del estrés térmico.

A continuación se determinó el efecto de distintos choques térmicos sobre los niveles de mRNA transcrito a partir del gen *UBI4*.

Para ello, en primer lugar, se obtuvo RNA a partir de células levaduriformes en fase exponencial temprana de crecimiento tras ser sometidas durante 0, 5, 15 y 30 min a un choque térmico de 28°C a 42°C, y de 28°C a 23°C, respectivamente. El análisis mediante Northern blot de las distintas muestras de RNA hibridadas con la sonda de cDNA de la poliubiquitina, mostró un aumento transitorio de los niveles de mRNA de la poliubiquitina tras ambos choques térmicos (Fig. III.9). Los mayores niveles de mensajero se detectaron tras 5 minutos de choque térmico, decreciendo la señal en las muestras posteriores, mientras que la señal encontrada a tiempo 0 (células en fase exponencial de crecimiento) fue débil. Estos resultados confirman que en *C. albicans*, la poliubiquitina es una proteína de choque térmico, cuya



**Fig. III.9.** Efecto del estrés térmico sobre la expresión de *UBI4*: análisis mediante Northern blot. Cada calle contiene 6  $\mu$ g de RNA total de la cepa *C. albicans* ATCC 26555. Dicho RNA se obtuvo a partir de células levaduriformes cultivadas a 28°C en YPD hasta fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} = 0.35$ ) y sometidas posteriormente a un choque térmico de 28°C a 23°C (calles 1-4), y de 28°C a 42°C (calles 5-8), durante 5 min (calles 2 y 6), 15 min (calles 3 y 7) y 30 min (calles 4 y 8), así como de células antes del choque (control) (calles 1 y 5). Como sonda se utilizó el fragmento de 0.9 kb de cDNA que codifica la poliubiquitina de *C. albicans* (panel B). En el panel A se muestra el gel teñido con bromuro de etidio para visualizar los rRNAs (25S y 18S).

expresión es baja durante la fase temprana de crecimiento exponencial a 28°C, mientras que se incrementa, aunque transitoriamente, tras estrés térmico, tanto por aumento como por disminución de la temperatura. Su función, por lo tanto, es proporcionar ubiquitina a las células bajo condiciones de estrés, al igual que ocurre en *S. cerevisiae* (Finley *et al.*, 1987; Finley & Chau, 1991; Hersko & Ciechanover, 1992; Özkaynak *et al.*, 1987). Estos resultados concuerdan con lo descrito para el gen *HSP70* de *C. albicans*, que codifica para una Hsp70 de *C. albicans*, cuyos niveles de expresión aumentan transitoriamente tras 5 min de choque térmico, decreciendo a tiempos más largos (Eroles *et al.*, 1995).

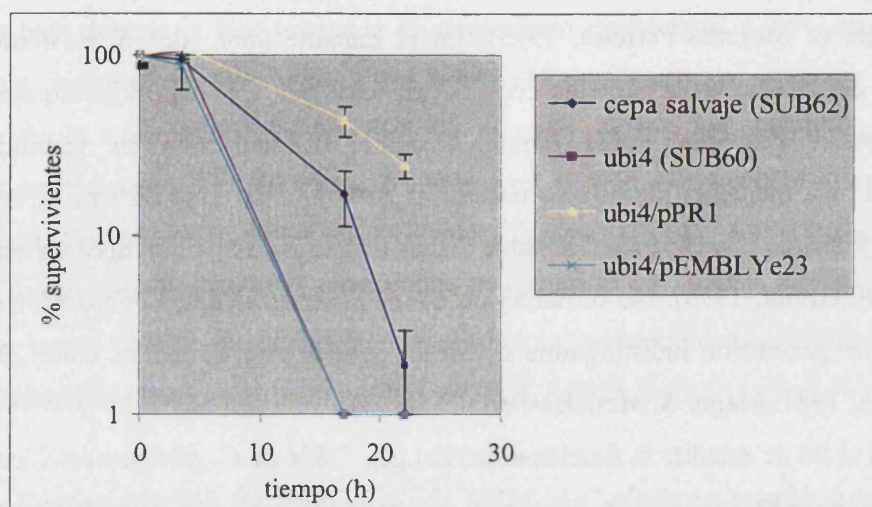
#### **1.4.- Caracterización funcional del gen *UBI4* de *C. albicans*: complementación del mutante *ubi4* de *S. cerevisiae*.**

Debido a la similitud existente entre las especies fúngicas *C. albicans* y *S. cerevisiae*, la mayoría de los genes de la primera pueden ser expresados y son funcionales en la segunda, lo que se ha utilizado en ocasiones para comprobar la función de determinados genes, e incluso clonarlos, por complementación en mutantes de *S. cerevisiae* (Kurtz *et al.*, 1990b; Maneu *et al.*, 2000b; Scherer & Magee, 1990).

Para comprobar la función del producto codificado por el gen *UBI4* de *C. albicans* se determinó su capacidad para complementar el fenotipo de la cepa SUB60 de *S. cerevisiae*, cepa haploide en la que la única copia del gen *UBI4* ha sido interrumpida insertando el gen *LEU2* en su secuencia (Finley *et al.*, 1987). La ubiquitina es un componente esencial del sistema de respuesta a distintas condiciones de estrés (térmico fundamentalmente). La ubiquitina se une a proteínas dañadas, tóxicas para la célula, cuyo nivel aumenta como consecuencia del estrés, para facilitar su eliminación y evitar su acumulación en la célula, siendo esta proteína absolutamente necesaria para la resistencia de las células en estas condiciones (Finley *et al.*, 1987; Finley & Chau, 1991; Mager & Moradas-Ferreira, 1993). Como consecuencia del estrés, aumenta, por lo tanto, la demanda de ubiquitina, siendo necesario que la tasa de síntesis de la misma se incremente para mantener los niveles de ubiquitina libre, y que éstos no disminuyan al formarse los conjugados ubiquitina-proteína (Finley *et al.*, 1987; Finley & Chau, 1991; Özkaynak *et al.*, 1987). La principal función, en *S. cerevisiae*, de la proteína codificada por el gen *UBI4*, la poliubiquitina, precursora de la ubiquitina, es proporcionar ubiquitina a las células en condiciones de estrés por lo que su expresión sufre una rápida inducción en estas condiciones (Finley *et al.*, 1987; Fraser *et al.*,

1991; Mager & Moradas-Ferreira, 1993). En el mutante *ubi4* de *S. cerevisiae*, la cepa SUB60, la deficiencia en la proteína codificada por el gen *UBI4*, la poliubiquitina, provoca una hipersensibilidad por estrés térmico crónico, disminuyendo su viabilidad por la incapacidad para mantener los niveles necesarios de ubiquitina libre durante el estrés (Finley *et al.*, 1987), siendo una cepa muy sensible a altas temperaturas y otros tipos de estrés (Mager & Moradas-Ferreira, 1993). No obstante, en condiciones normales, la cepa SUB60 presenta un tiempo de generación indistinguible del de la cepa salvaje, al menos entre 23°C y 36°C (Finley *et al.*, 1987; Mager & Moradas-Ferreira, 1993).

Con el fin de estudiar la funcionalidad del gen *UBI4* de *C. albicans* en *S. cerevisiae*, la cepa *S. cerevisiae* SUB60 (Ura<sup>-</sup>), fue transformada con los plásmidos pEMBLYe23 (control) y pPR1 (pEMBLYe23 con un inserto de 9 kb que contiene el gen *UBI4* de *C. albicans* y sus regiones adyacentes). Los transformantes (Ura<sup>+</sup>) se seleccionaron en medio mínimo con lisina, histidina y triptófano, sin uracilo. Tras comprobar los marcadores genéticos (Lis<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>) de varios de los transformantes, se determinó que la prototrofia para el uracilo (carácter Ura<sup>+</sup>) estaba asociada a la presencia del plásmido, dada su inestabilidad en condiciones no selectivas: después de crecer los transformantes en medio rico (YPD) en dos cultivos sucesivos, se recuperaron un 30-40% de clones Ura<sup>-</sup>. Se seleccionó un transformante de cada tipo (pEMBLYe23 y pPR1) y se determinó su sensibilidad al estrés por calor crónico, tal como se describe en la figura III.10. Los resultados obtenidos demostraron que tanto la cepa mutante *ubi4* de *S. cerevisiae* (SUB60), como la cepa transformada con el plásmido pEMBLYe23, presentaban hipersensibilidad al estrés térmico, puesto que tras 17 h de tratamiento, no hubo ninguna célula superviviente. Este fenotipo fue complementado por el gen *UBI4* de *C. albicans*, ya que la cepa mutante *ubi4* de *S. cerevisiae* (SUB60) transformada con el plásmido pPR1, no sólo recuperó el fenotipo salvaje, sino que el porcentaje de supervivientes superó al de la cepa salvaje ( $43.67 \pm 8.27$  y  $17.01 \pm 5.78$  tras 17 h de tratamiento, y  $24.36 \pm 3.86$  y  $1.86 \pm 1.07$  tras 22 h de tratamiento). La diferencia entre el porcentaje de supervivientes de las cepas *ubi4* de *S. cerevisiae* (SUB60) y/o la cepa transformada con el plásmido pEMBLYe23, y el porcentaje de supervivientes de la cepa salvaje SUB62, y/o la cepa transformada con pPR1, tras 17 h de tratamiento, es estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ). Del mismo modo, la diferencia entre el porcentaje de supervivientes de la cepa transformada con pPR1 y el de la cepa salvaje, tras 22 h de tratamiento, es igualmente significativa ( $P < 0.05$ ).



**Fig. III.10.** El gen *UBI4* de *C. albicans* complementa el fenotipo de hipersensibilidad al estrés térmico del mutante *ubi4* de *S. cerevisiae* mediante transformación con pPR1. Cultivos en medio mínimo en fase exponencial tardía de crecimiento de la cepa *S. cerevisiae* SUB60 (*ubi4*), de los transformantes SUB60 con pPR1 y pEMBLye23, así como de la cepa salvaje SUB62, fueron diluidos apropiadamente y las células se extendieron en placas del mismo medio (200 UFC/placa). A continuación, las placas se sometieron a un choque térmico a 40°C durante distintos tiempos (3.5, 17 y 22 h) y se incubaron a 28°C para permitir la formación de colonias por las células viables. Cada determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresan como la media del porcentaje (%) de supervivientes  $\pm$  desviación estándar.

Estas diferencias en el porcentaje de supervivientes entre la cepa salvaje (SUB 62) y el transformante de la cepa mutante *ubi4* de *S. cerevisiae* (SUB60) con el plásmido pPR1 indican que este transformante responde mejor al estrés por calor crónico que la cepa salvaje. Esto puede deberse a que la cepa salvaje dispone únicamente de la poliubiquitina que le proporciona una sola copia del gen *UBI4* de *S. cerevisiae*, mientras que el transformante de la cepa mutante *ubi4* de *S. cerevisiae* (SUB60) con el plásmido pPR1, dispone de la poliubiquitina proporcionada por la expresión del gen *UBI4* de *C. albicans* que, aunque sólo consta de tres subunidades de ubiquitina, se encuentra en un plásmido episomal, y por tanto, en un alto número de copias por célula; esta mayor disponibilidad de poliubiquitina puede conferir a los transformantes una mayor capacidad de respuesta a este tipo de estrés que la cepa salvaje.

Los resultados obtenidos demuestran que la expresión heteróloga del gen *UBI4* de *C. albicans* en el mutante *ubi4* de *S. cerevisiae* complementa el fenotipo (hipersensibilidad al calor crónico) conferido por dicha mutación, restaurando el fenotipo salvaje. Este resultado confirma que el plásmido pPR1 contiene el gen *UBI4* de *C. albicans*, que este gen es expresado correctamente en *S. cerevisiae*, y que su producto génico tiene una función similar a la descrita en *S. cerevisiae* (Finley *et al*, 1987), siendo por lo tanto una de sus funciones



proporcionar y mantener los niveles de ubiquitina libre en condiciones de estrés (Finley *et al.*, 1987).

### **1.5.- Estudio del promotor del gen *UBI4*: control de la producción de invertasa en *S. cerevisiae*.**

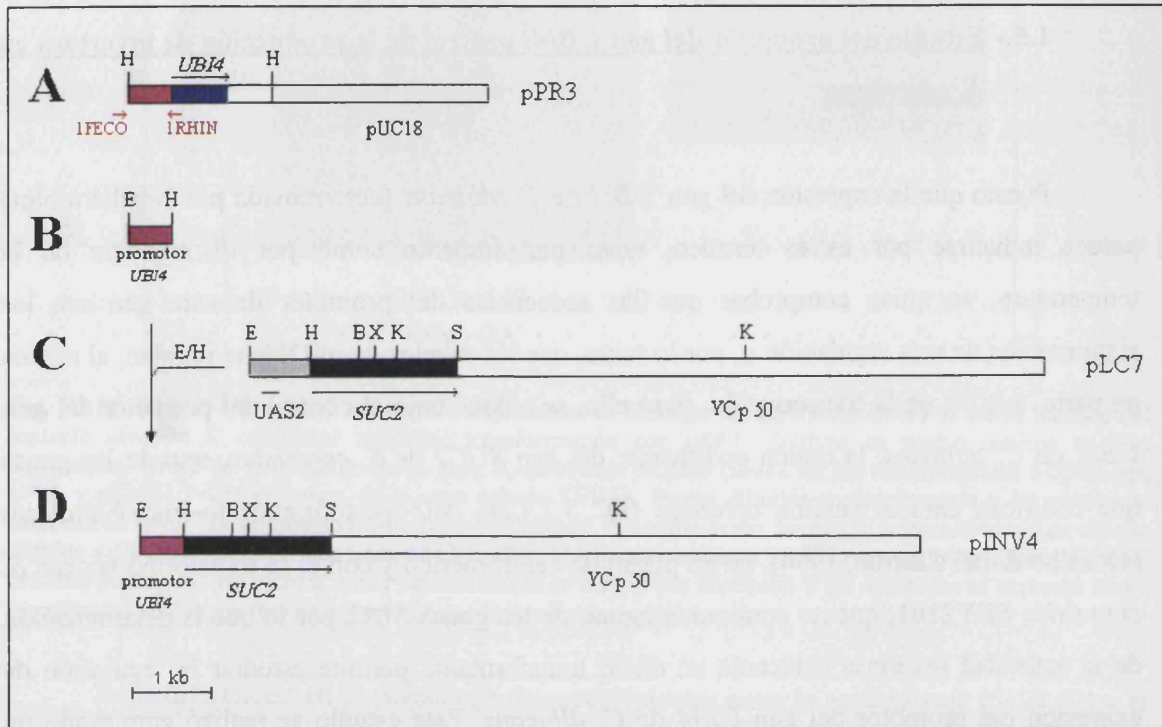
Puesto que la expresión del gen *UBI4* de *C. albicans* (determinada por Northern blot) parece inducirse por estrés térmico, tanto por aumento como por disminución de la temperatura, se quiso comprobar que las secuencias del promotor de este gen son las responsables de esta regulación y, por lo tanto, que los niveles de mRNA se regulan, al menos en parte, a nivel de la transcripción. Para ello, se colocó bajo el control del promotor del gen *UBI4* de *C. albicans*, la región codificante del gen *SUC2* de *S. cerevisiae*, uno de los genes que codifican para el enzima invertasa (EC 3.2.1.26,  $\beta$ -D-fructofuranósido-fructohidrolasa) (Gozalbo & del Castillo, 1994), en un plásmido centromérico y con él se transformó la cepa *S. cerevisiae* SEY2101, que no contiene ninguno de los genes *SUC*, por lo que la determinación de la actividad invertasa detectada en dicho transformante permite estudiar la regulación de expresión del promotor del gen *UBI4* de *C. albicans*. Este estudio se realizó empleando un plásmido centromérico (bajo número de copias por célula), ya que un exceso de regiones reguladoras (promotores) puede titular factores transcripcionales específicos y modificar la regulación de la expresión génica (Gozalbo, 1992).

El enzima invertasa cataliza en levaduras la hidrólisis extracelular de algunas fuentes de carbono, como la sacarosa o la rafinosa. Todos los genes *SUC* codifican para una invertasa externa, que se secreta a la pared celular, y otra interna, citoplasmática, de función no determinada (Carlson & Botstein, 1982; Perlman *et al.*, 1982). La invertasa externa está implicada en la hidrólisis de la sacarosa y la rafinosa, estando regulada su expresión exclusivamente por represión catabólica por glucosa (Carlston & Botstein, 1982; Grossmann & Zimmermann, 1979; Perlman & Halvorson, 1981; Rodríguez *et al.*, 1981).

#### **1.5.a.- Construcción del plásmido pINV4.**

Para realizar este estudio, se utilizó el plásmido centromérico pLC7, un derivado de YCp50, que contiene el gen *SUC2* de *S. cerevisiae* (del Castillo *et al.*, 1992). En este plásmido, se sustituyó el fragmento *EcoRI/HindIII* que contiene el promotor del gen *SUC2*

por un fragmento que contiene las secuencias del promotor del gen *UBI4* de *C. albicans* (Fig. III.11).



**Fig III.11.** Construcción del plásmido pINV4. A partir de pPR3 (A), se amplificó por PCR, con los oligonucleótidos 1FECO y 1RHIN, un fragmento de 0.56 kb que contiene las secuencias reguladoras 5' no-codificantes de este gen (B) y se subclonó en pLC7 digerido con *EcoRI* y *HindIII* para sustituir el promotor del gen *SUC2* de *S. cerevisiae* (C) por el del gen *UBI4* de *C. albicans* y originar pINV4 (D). Dianas de enzimas de restricción: H (*HindIII*), X (*XbaI*), B (*BamHI*), K (*KpnI*), E (*EcoRI*), S (*SalI*). Véase texto para más detalle.

En primer lugar, a partir de pPR3, que contiene el gen *UBI4* con sus secuencias adyacentes (Fig. III.11 A), se amplificó por PCR un fragmento de DNA que contiene las secuencias reguladoras 5' no-codificantes del gen *UBI4*. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos sintéticos 1FECO, que contiene la diana de restricción *EcoRI*, y 1RHIN, que contiene la diana de restricción *HindIII* (Tabla III.3). El producto amplificado, un fragmento de 0.56 kb que contiene el promotor del gen *UBI4* de *C. albicans*, se digirió con los enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI* (Fig. III.11 B), y se ligó al plásmido pLC7, digerido con los mismos enzimas para eliminar el fragmento que contiene el promotor del gen *SUC2* (Fig. III.11 C), y sustituirlo así por el promotor de *UBI4*. De este modo se obtuvo la construcción adecuada (pINV4) para el estudio de la expresión del gen *SUC2* en *S. cerevisiae* bajo el control del promotor del gen *UBI4* de *C. albicans* (Fig. III.11 D).

| NOMBRE | SECUENCIA                                      | LOCALIZACIÓN EN LA SECUENCIA GENÓMICA |            |
|--------|--|---------------------------------------|------------|
|        |  | extremo 5'                            | extremo 3' |
| 1FECO  | <i>GGTCGAATTCCAATGCTAATAAGATCGAAGAGG</i>       | - 553                                 | -530       |
| 1RHIN  | <i>GCTGAAGCTTGTAGATTTGTATATATATGTTAGTTGACG</i> | -6                                    | - 34       |

Tabla III.3. Oligonucleótidos sintéticos utilizados como cebadores en la amplificación por PCR de la región promotora del gen *UBI4* de *C. albicans*. La posición de los extremos 5' y 3' está numerada respecto al sitio de inicio de la traducción. En cursiva se marcan las secuencias del extremo 5' no homólogas al DNA genómico que contienen las dianas de restricción indicadas (subrayadas). Nótese que los oligonucleótidos F y R hibridan con cadenas complementarias.

#### 1.5.b.- Transformación de *S. cerevisiae* con pINV4 y análisis fenotípico de los transformantes: producción de invertasa extracelular.

La cepa de *S. cerevisiae* que se utilizó para realizar este estudio fue la cepa *S. cerevisiae* SEY2101, que no contiene ninguno de los genes *SUC*, con lo que al ser transformada con el plásmido pINV4, toda la actividad invertasa que se detecte en dicha cepa procederá de la expresión del gen *SUC2* de pINV4. Esto permite el estudio de la regulación de expresión del promotor del gen *UBI4* de *C. albicans*, mediante la determinación de dicha actividad extracelular. Los transformantes de la cepa *S. cerevisiae* SEY2101 con el plásmido pINV4, se seleccionaron por su prototrofia para el uracilo y se comprobaron sus marcadores genéticos. El test de estabilidad demostró que el carácter *Ura*<sup>+</sup> se debía a un gen plasmídico, puesto que tras dos siembras consecutivas en medio rico (YPD), aproximadamente un 30% de las células perdían dicho carácter. Uno de estos transformantes se empleó para realizar el estudio.

**Estrés térmico.** Para estudiar el efecto anteriormente observado, mediante análisis por Northern blot, de los choques térmicos en la expresión del gen *UBI4* de *C. albicans*, se procedió a cultivar la cepa *S. cerevisiae* SEY2101 transformada con el plásmido pINV4, así como el transformante control (con pLC7) en los medios de cultivo YPD (con 4% de glucosa) e YPS, ambos con antimicina (2 ppm). La antimicina es un inhibidor de la respiración celular que se emplea para evitar que las células crezcan empleando una fuente de carbono distinta

del azúcar del medio, único nutriente fermentable, de tal forma que si las células crecen en medio con sacarosa, se debe a la invertasa expresada por el gen *SUC2*. No obstante, la baja producción de invertasa en el transformante pINV4, obligó a eliminar la antimicina del medio YPS, pues es incapaz de crecer fermentando la sacarosa. Se empleó un 4% de glucosa en el medio de YPD para garantizar una presencia suficiente de glucosa tras el crecimiento celular, que mantuviera el efecto de la misma tanto a nivel de transcripción, como a nivel de estabilidad del mRNA. La estabilidad del mRNA de la invertasa es menor en presencia de glucosa, que en condiciones de desrepresión (Carlson, 1987; Mormeneo & Sentandreu, 1982), por lo que la presencia de un 4% de glucosa posibilita que los resultados que se obtengan en este medio no estén influenciados por el consumo de la glucosa.

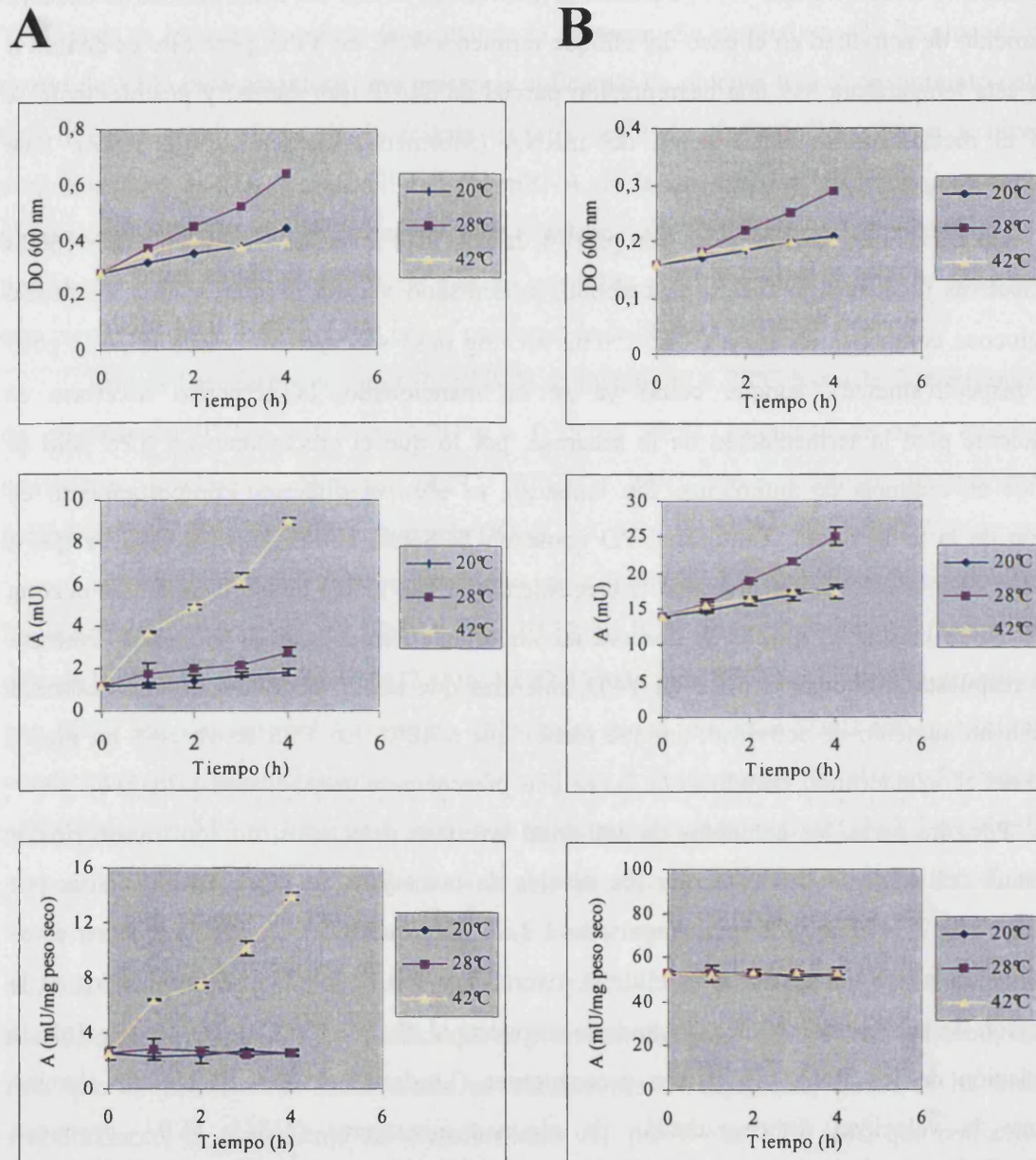
Ambos transformantes (pLC7, pINV4) se incubaron a 28°C hasta la fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} \approx 0.3$  en YPD y  $\approx 0.15$  en YPS). Alicuotas de estos cultivos se sometieron a choques térmicos (42°C, 20°C, y 28°C como control) determinándose periódicamente la actividad invertasa y la  $DO_{600}$ .

Los resultados obtenidos se muestran en la figura III.12. Como puede observarse, en las células transformadas con pINV4 (Fig. III.12.2), la actividad invertasa es mucho menor que en las transformadas con pLC7 (Fig. III.12.1), tanto en YPS, (en el que el promotor del gen *SUC2* está desreprimido), como en YPD (en el que el promotor *SUC2* está reprimido). En condiciones de represión (glucosa) la actividad fue 6 veces menor en el transformante con pINV4 ( $0.42 \pm 0.02$  mU/mg peso seco) que en el transformante con pLC7 ( $2.5 \pm 0.6$  mU/mg peso seco), mientras que en condiciones de desrepresión, la actividad de dicho transformante fue 100 veces menor que la del control, al desreprimirse la expresión de *SUC2* ( $0.56 \pm 0.04$  mU/mg peso seco en el transformante con pINV4,  $53 \pm 1$  mU/mg peso seco en el transformante con pLC7). Esto indica que el promotor del gen *UBI4* es bastante débil, incluso más que el promotor de la invertasa en condiciones de represión. Como se ha indicado anteriormente, el crecimiento del transformante con pINV4 en YPS tuvo que realizarse sin antimicina, ya que la invertasa producida es insuficiente para permitir el crecimiento fermentando la sacarosa; de hecho en medio YPS sólido este transformante no puede originar colonias en presencia de antimicina, independientemente de la temperatura de incubación. Sin embargo, en YPD este transformante crece bien puesto que el crecimiento es independiente de la actividad invertasa. También se puede comprobar cómo la actividad invertasa en las levaduras transformadas con pLC7, es dependiente de la fuente de carbono, siendo alrededor de 20 veces mayor en medio con sacarosa (YPS) que en medio con glucosa (YPD), e

independiente de la temperatura, como cabía esperar, ya que la expresión de los genes *SUC* está regulada exclusivamente por represión catabólica por glucosa (Carlson & Botstein, 1982; Grossmann & Zimmermann, 1979; Perlman & Halvorson, 1981). De todas formas se observa un aumento de actividad en el caso del choque térmico a 42°C en YPD, pero éste es debido a que a esta temperatura hay una desrepresión parcial de *SUC2* (por estrés) y posiblemente se altera el mecanismo de degradación del mRNA (Mormeneo & Sentandreu, 1982). Este fenómeno no se observa en YPS.

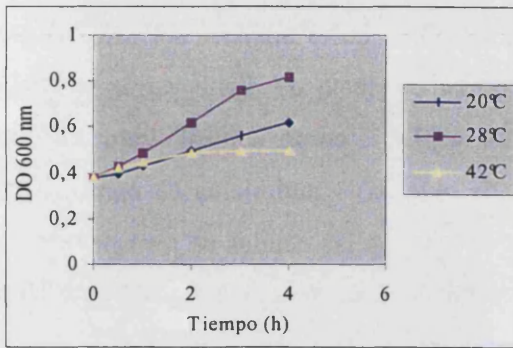
En las células transformadas con pINV4, la actividad invertasa no presenta diferencias significativas debidas a la fuente de carbono, presentando valores similares tanto en medio con glucosa como con sacarosa ( $0.42 \pm 0.02$  mU/mg peso seco y  $0.56 \pm 0.04$  mU/mg peso seco respectivamente), aunque como ya se ha mencionado, la actividad invertasa es insuficiente para la fermentación de la sacarosa, por lo que el crecimiento en YPS sólo se produce en ausencia de antimicina. Sin embargo, se observa diferente comportamiento en función de la temperatura. Tanto en YPD como en YPS (sin antimicina), se observa que a 28°C aumenta la actividad acorde con el crecimiento, lo que indica que la cantidad de enzima por célula es constante; a 42°C se observa un importante aumento de la actividad invertasa como respuesta al choque térmico en YPD, mientras que tras el choque a 20°C se observa también un aumento de actividad, aunque menor que a 42°C. En YPS se observa un menor efecto del choque térmico, debido a que las células presentan un metabolismo oxidativo.

Por otra parte, los aumentos de actividad invertasa detectados, no son transitorios, a diferencia del aumento observado en los niveles de mensajero de *UBI4* en el análisis por Northern blot tras choque térmico (apartado 1.3.c). Hay que tener en cuenta que en estos experimentos el mRNA transcrito es el de la invertasa, y uno de los factores implicados en la regulación de la expresión génica, incluida la respuesta al choque térmico, es el control de la degradación de los RNA mensajeros preexistentes (Lindquist, 1981). El choque térmico aumenta la velocidad de degradación de algunos mensajeros (*UBI3*, *SSB1*, proteínas ribosomales, etc.) (Gorenstein & Warner, 1976; Herruer *et al.*, 1988; Kim & Warner, 1983; Mager & Moradas-Ferreira, 1993; Maneu *et al.*, 2000b; Veinot-Drebot *et al.*, 1989). Por todo ello, este resultado podría deberse a la estabilidad del mRNA de la invertasa, y/o a la estabilidad de la propia proteína. Este resultado sugiere que la degradación del mRNA de *UBI4* está implicada en la respuesta transitoria al estrés. El hecho de que el aumento de actividad invertasa que se observa a 42°C en la cepa con pINV4, se aprecie tanto en YPD

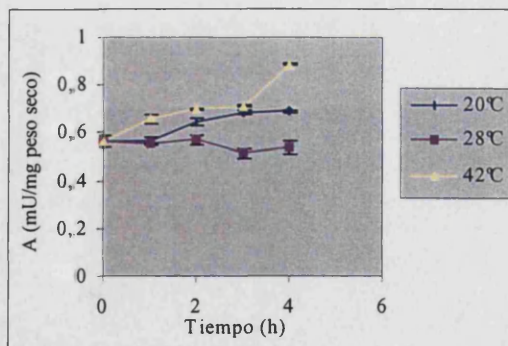
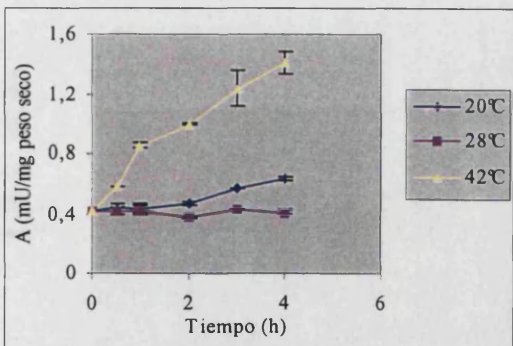
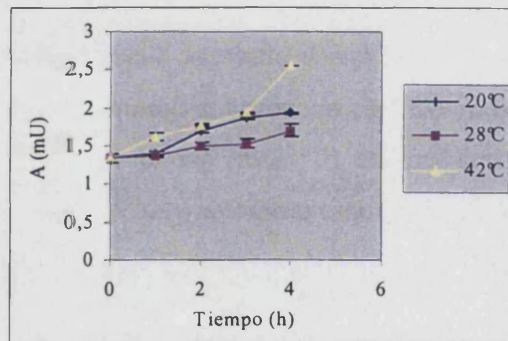
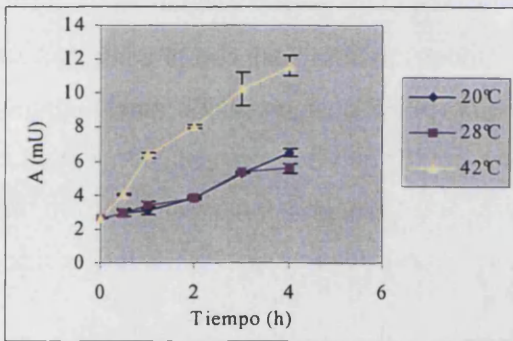
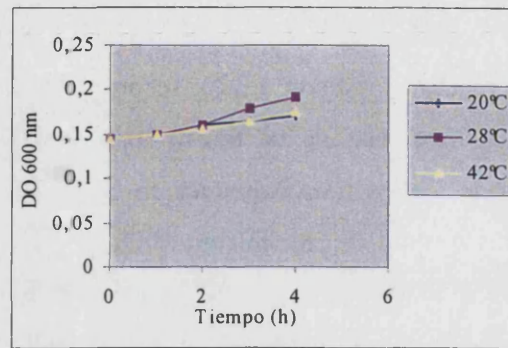


**Fig. III.12.1.** Efecto del estrés térmico sobre la producción de invertasa en *S. cerevisiae* SEY2101 transformada con pLC7. El transformante se creció en YPD (4% de glucosa)-antimicina (2 ppm) (panel A) e YPS-antimicina (2 ppm) (panel B), a 28°C hasta la fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} = 0.28$  en YPD y 0.16 en YPS). Los cultivos se dividieron en tres alícuotas y se les dió, a dos de ellas, un choque térmico a 20 y 42°C, respectivamente, en baño de agua con agitación, incubándose la alícuota restante a 28°C como control. Periódicamente, se tomaron muestras en las que se midió la DO del cultivo a 600 nm y la actividad invertasa de las células. Dicha actividad se expresa como mU totales en la muestra ensayada, o como mU/mg de peso seco de células; los valores mostrados son la media de al menos tres determinaciones ( $\pm$  desviación estándar).

A



B



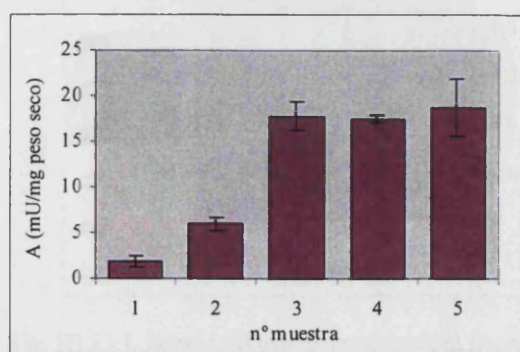
**Fig. III.12.2.** Efecto del estrés térmico sobre la producción de invertasa en *S. cerevisiae* SEY2101 transformada con pINV4. El transformante se creció en YPD (4% de glucosa)-antimicina (2 ppm) (panel A) e YPS (panel B), a 28°C hasta la fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} = 0.4$  en YPD y 0.15 en YPS). Los cultivos se dividieron en tres alícuotas y se les dió, a dos de ellas, un choque térmico a 20 y 42°C, respectivamente, en baño de agua con agitación, incubándose la alícuota restante a 28°C como control. Periódicamente se tomaron muestras en las que se midió la DO del cultivo a 600 nm y la actividad invertasa de las células. Dicha actividad se expresa como mU totales en la muestra ensayada, o como mU/mg de peso seco de células; los valores mostrados son la media de al menos tres determinaciones ( $\pm$  desviación estándar).

como en YPS, y en la cepa con pLC7 se aprecie sólo en YPD, sugiere que el aumento observado en la cepa con pINV4 se debe a regulación del promotor, y no a una posible regulación a nivel del mensajero de la invertasa.

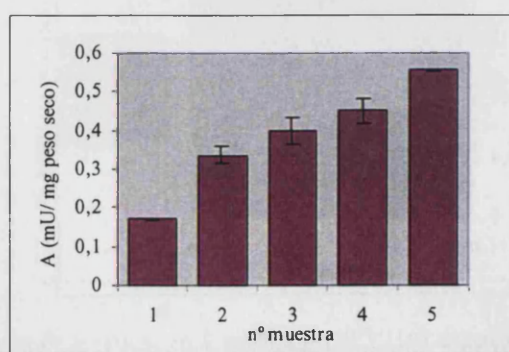
**Estrés nutricional.** Para estudiar el efecto del estrés nutricional en la expresión del gen *UBI4* de *C. albicans*, efecto que no pudo ser detectado en el análisis del mRNA por Northern blot (apartado 1.3.b), se procedió a determinar el efecto de dicho estrés sobre la actividad invertasa en los transformantes con pINV4 y pLC7, como control. Para ello, se cultivaron ambos transformantes en YPD (con 4% de glucosa) - antimicina (2 ppm), hasta fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} = 0.8$ ) y a continuación las células se resuspendieron en agua y se incubaron a 28°C durante 4 h. Seguidamente, se mantuvieron a 4°C durante 16 h y a continuación, se incubaron en agua a 28°C durante otras 3 h.

Los resultados de la actividad invertasa de cada muestra se representan en la figura III.13. Como se puede observar, la actividad en las células transformadas con la construcción del gen *SUC2* bajo el control del promotor del gen *UBI4* (pINV4), sigue siendo mucho menor (aproximadamente 10 veces) que en las transformadas con la que lleva el gen *SUC2* bajo el control de su propio promotor (pLC7). Las levaduras transformadas con pLC7, sufren un aumento de actividad invertasa (aproximadamente 10 veces) durante las 4 h que han sido

A



B



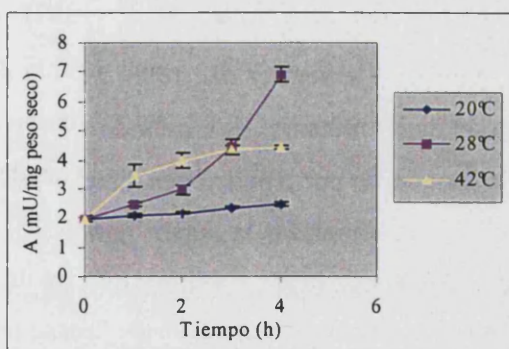
**Fig. III.13.** Actividad invertasa de la cepa *S. cerevisiae* SEY2101 transformada con pLC7 (panel A) y pINV4 (panel B) en condiciones de estrés nutricional. Ambos transformantes se cultivaron en YPD (4% glucosa)-antimicina (2 ppm) a 28°C hasta fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} = 0.8$ ). A continuación se recogieron las células, se resuspendieron en agua y se incubaron a 28°C durante 4 h, tomándose muestra a  $t=0$  (muestra n°1),  $t=2h$  (muestra n°2) y  $t=4h$  (muestra n°3). Seguidamente se mantuvieron a 4°C durante 16 h (muestra n°4), y se volvieron a incubar a 28°C durante 3 h (muestra n°5). La actividad invertasa (mU/mg de peso seco de células) se expresa como la media de los valores obtenidos en al menos tres determinaciones ( $\pm$  desviación estándar).



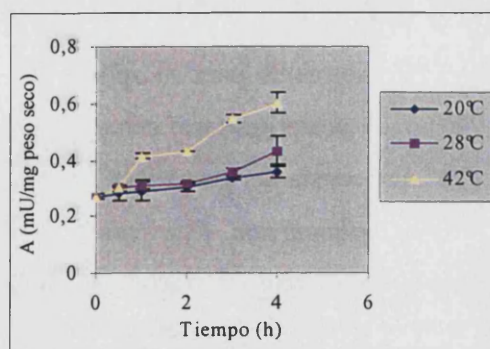
mantenidas en agua a 28°C, mientras que en las muestras posteriores la actividad permanece estable. Ese aumento de actividad se debe a la desrepresión del promotor *SUC* en ausencia de glucosa. En las células transformadas con pINV4, la actividad invertasa también sufre un aumento durante el ayuno metabólico (aproximadamente de 2.5 veces), aunque no tan grande como en el caso de las células con pLC7; este aumento no se debe a la ausencia de glucosa, puesto que anteriormente se ha demostrado que la fuente de carbono no afecta a la producción de invertasa en células con pINV4, incluso en ausencia de azúcar fermentable, la actividad no es superior a la detectada con glucosa (véase Fig. III.12.2). Por tanto, el ayuno metabólico induce la expresión a partir del promotor *UBI4*, de manera similar a lo descrito en *S. cerevisiae* (Finley *et al.*, 1987).

**Estrés térmico y nutricional.** Puesto que tanto estrés nutricional como térmico provocan aumento de la actividad invertasa en el transformante con pINV4, se decidió estudiar el efecto combinado de ambos tipos de estrés. Para ello, se cultivaron los transformantes de *S. cerevisiae* SEY2101 (con pINV4, y pLC7) en YPD (con 4% de glucosa) - antimicina (2 ppm) hasta fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} = 0.4$ ) y se sometieron a estrés nutricional mediante resuspensión en agua e incubación a diferentes temperaturas (20, 42 y 28°C) durante 4 h. Los resultados de actividad invertasa se muestran en la figura III.14.

A



B



**Fig. III.14.** Actividad invertasa de la cepa *S. cerevisiae* SEY2101 transformada con pLC7 (panel A) y pINV4 (panel B) en condiciones de estrés térmico y nutricional. Ambos transformantes se cultivaron en YPD (4% glucosa)-antimicina (2 ppm) a 28°C hasta fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} = 0.4$ ). A continuación se recogieron las células, se resuspendieron en agua, se dividieron en tres alícuotas y se sometieron dos de ellas a choque térmico a las temperaturas de 20 y 42°C en baño de agua con agitación; la alícuota restante se incubó a 28°C como control. Periódicamente se tomaron muestras en las que se determinó la actividad invertasa (mU/mg de peso seco de células) que se expresa como la media de los valores obtenidos en al menos tres determinaciones ( $\pm$  desviación estándar).

En las células transformadas con pLC7, la actividad a 28°C (estrés nutricional) aumenta por desrepresión del promotor del gen de la invertasa, como ya se había observado anteriormente; a 42°C se observa el mismo fenómeno, pero inicialmente es más intenso para estabilizarse rápidamente; mientras que a 20°C no hay desrepresión del promotor *SUC*. Por tanto, no se observa en este transformante efecto aditivo de ambos tipos de estrés. En la cepa transformada con pINV4 se produce un aumento de la actividad invertasa en respuesta al estrés nutricional, a 28°C, como previamente habíamos visto (véase Fig. III.13). A 42°C el aumento observado es mayor, pero no es tan intenso como el observado únicamente por estrés térmico, debido seguramente a la falta de nutrientes. Este efecto aditivo indica que la inducción del promotor *UBI4* ocurre por distintos mecanismos en respuesta a temperatura (42°C) o ayuno metabólico, por lo que deben existir dos vías de activación del promotor. A 20°C el aumento que se observa es también similar o ligeramente menor al observado por estrés térmico, probablemente por la falta de nutrientes, y también ligeramente menor que el detectado por estrés nutricional exclusivamente (28°C).

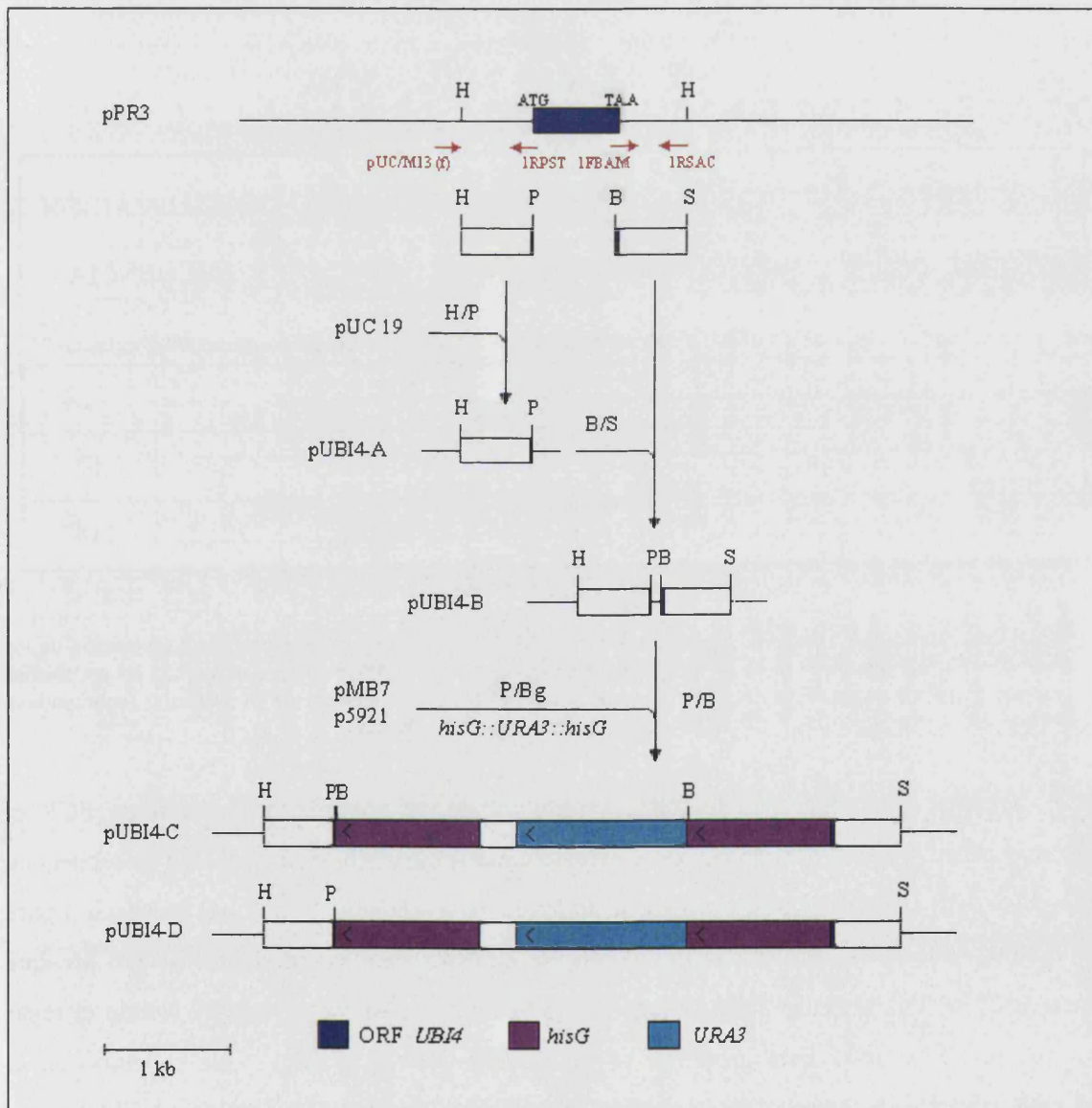
### **1.6.- Interrupción del gen *UBI4* en *C.albicans*.**

#### **1.6.A.- Interrupción secuencial mediante el cassette *hisG::URA3::hisG*.**

Con objeto de determinar la función del gen *UBI4* en *C. albicans* se procedió, en primer lugar, a la obtención de un mutante nulo para dicho gen, empleando una estrategia de interrupción génica desarrollada inicialmente para *S. cerevisiae* (Alani *et al.*, 1987) y modificada posteriormente para su aplicación en *C. albicans* (Cervera *et al.*, 1998; Fonzi & Irwin, 1993), para posteriormente estudiar el fenotipo de dicho mutante. Este método emplea un "cassette" que consta del gen *URA3* de *C. albicans* flanqueado por repeticiones directas del gen *hisG* de *S. typhimurium*. Este "cassette" se empleó para reemplazar la mayor parte de la región codificante del gen *UBI4* de *C. albicans*, tal y como se describe a continuación. En una primera etapa se construyó el "cassette" de interrupción, que contiene el "cassette" *hisG::URA3::hisG* flanqueado por los extremos 5' y 3' del gen *UBI4* de *C. albicans*, con el objeto de dirigir su inserción en el locus *UBI4* del genoma de *C. albicans* por recombinación entre secuencias homólogas. Con este "cassette" se transformó *C. albicans*, en un proceso de interrupción secuencial (véase apartado 25.1 de "Materiales y Métodos"), para obtener un mutante nulo con las dos copias del gen interrumpidas.

### 1.- Construcción de los "cassettes" de interrupción.

Para interrumpir el gen *UBI4* de *C. albicans* siguiendo este método, se ha de construir previamente el "cassette" de interrupción génica. Dicha construcción consiste, como se ha indicado anteriormente, en el "cassette" *hisG::URA3::hisG* flanqueado por los extremos 5' y 3' del gen *UBI4* de *C. albicans*. Debido a la ausencia de dianas de restricción adecuadas, fue necesario emplear técnicas de PCR para construir dicho "cassette". Un esquema del proceso seguido para la construcción de los "cassettes" de interrupción se muestra en la Fig. III.15.



**Fig. III.15.** Esquema de las construcciones plasmídicas empleadas en los experimentos de interrupción secuencial del gen *UBI4* (véase texto). Dianas de enzimas de restricción: H (*Hind*III), P (*Pst*I), B (*Bam*HI), S (*Sac*I), Bg (*Bgl*II).

En una primera etapa, la reacción de PCR utilizó como molde DNA del plásmido pPR3, que contiene el gen *UBI4* y sus secuencias adyacentes, y como cebadores el oligonucleótido "forward" universal de pUC/M13, que hibrida con secuencias del plásmido adyacentes al sitio múltiple de clonaje, y el oligonucleótido sintético 1RPST, deducido de la secuencia, al que se le introdujo una diana de restricción *Pst*I (Tabla III.4). El producto amplificado, de unas 570 pb, contenía 4 pb de la región 5' codificante del gen (extremo N-terminal de la proteína) y 565 pb de zona promotora. Este fragmento de DNA fue digerido con los enzimas de restricción *Pst*I y *Hind*III (diana también presente en el producto amplificado, proveniente del sitio múltiple de clonaje) y subclonado en el plásmido pUC19 digerido con los mismos enzimas, para originar el plásmido pUBI4-A.

| NOMBRE | SECUENCIA                                     | LOCALIZACIÓN EN LA SECUENCIA GENÓMICA |            |
|--------|---|---------------------------------------|------------|
|        |   | extremo 5'                            | extremo 3' |
| 1RPST  | <i>TCGGCTGCAGGCATTGCTTGTAGATTTGTATATATATG</i> | 4                                     | - 24       |
| 1FBAM  | <i>GGTCGGATCCGGTCTTGAGATTGAGAGGTGGTTTC</i>    | 663                                   | 687        |
| 1RSAC  | <i>GCTCGAGCTCGTCCTTGCTGCCGTTATTCTTGGTAC</i>   | 1212                                  | 1187       |

**Tabla III.4.** Oligonucleótidos sintéticos utilizados como cebadores en la amplificación por PCR de los extremos 5' y 3' del gen *UBI4* de *C. albicans*, para la construcción de los "cassettes" de interrupción. La posición de los extremos 5' y 3' está numerada respecto al sitio de inicio de la traducción. En cursiva se marcan las secuencias del extremo 5' no homólogas al DNA genómico que contienen las dianas de restricción indicadas (subrayadas). Nótese que los oligonucleótidos F y R hibridan con cadenas complementarias.

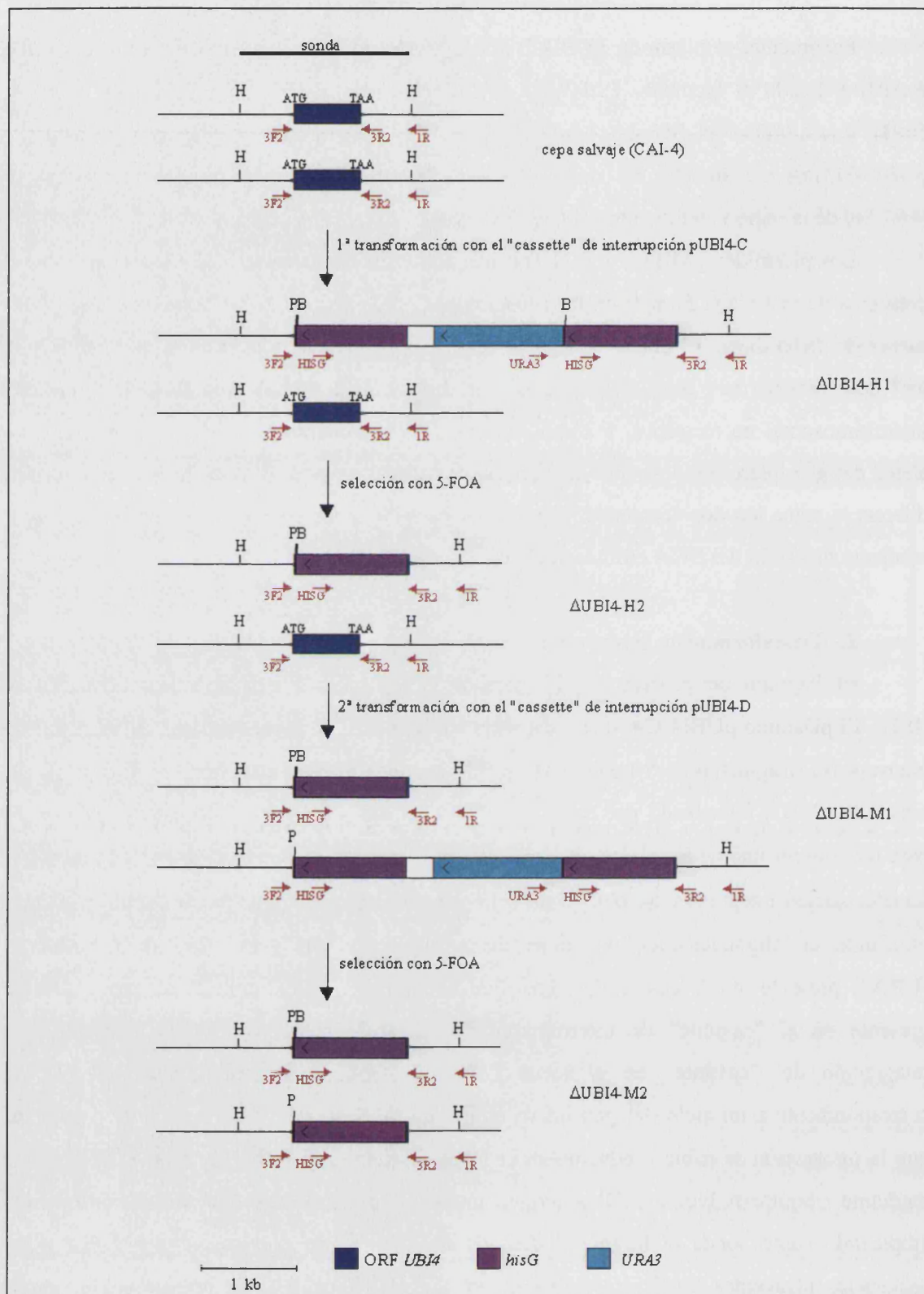
En una segunda etapa, se utilizó como molde de una nueva reacción de PCR el plásmido pPR3 y como cebadores, los oligonucleótidos sintéticos deducidos de la secuencia, 1FBAM y 1RSAC (Tabla III.4), a los que se les había introducido dianas de restricción para los enzimas *Bam*HI y *Sac*I, respectivamente. Se amplificó así un producto de 550 pb, que contenía 25 pb del extremo 3' de la región codificante (extremo C-terminal), siendo el resto zona 3' no codificante. Este producto se digirió con *Bam*HI y *Sac*I, y se subclonó en el plásmido pUBI4-A, obtenido en la primera etapa, para originar el plásmido pUBI4-B, que contiene los extremos 5' y 3' del gen *UBI4*, uno a continuación del otro, en la orientación adecuada, separados por las dianas *Pst*I y *Bam*HI.

Finalmente, el plásmido pUBI4-B fue digerido con los enzimas de restricción *Pst*I y *Bam*HI y ligado al fagmento *Pst*I/*Bgl*III de los plásmidos pMB7 ó p5921 (Fonzi & Irwin, 1993), que contiene el "cassette" *hisG::URA3::hisG*, originando los plásmidos pUBI4-C y pUBI4-D, respectivamente. En ambos "cassettes" de interrupción se han eliminado 658 pb (95.7 %) de la región codificante del gen *UBI4*.

Los plásmidos pMB7 y p5921 son idénticos, siendo la única diferencia entre ellos la presencia de una diana *Bam*HI en la secuencia *hisG* del plásmido pMB7, mientras que p5921 carece de dicha diana. El objeto de utilizar "cassettes" ligeramente diferentes para interrumpir los dos alelos del gen es averiguar si ha ocurrido una recombinación mitótica intercromosomal no recíproca, y como consecuencia el mutante obtenido no tendría los dos alelos del gen interrumpidos, sino que tendría dos copias de un mismo alelo interrumpido. La diferencia entre los dos "cassettes" empleados permite saber si ese suceso ha tenido lugar, mediante digestión del DNA cromosomal con *Bam*HI y posterior hibridación con la sonda.

## 2.- Transformación integrativa y análisis de los transformantes.

El diagrama del proceso seguido para obtener el mutante nulo se muestra en la figura III.16. El plásmido pUBI4-C (20 µg) digerido con *Hind*III/*Sac*I, para separar el "cassette" de interrupción (fragmento de 5.1 kb de DNA que contiene el "cassette" *hisG::URA3::hisG* del plásmido pMB7, flanqueado por regiones 5' y 3' del gen *UBI4* de *C. albicans*), se empleó para interrumpir uno de los alelos del gen *UBI4* de la cepa *C. albicans* CAI-4 (*Ura*<sup>-</sup>) mediante transformación integrativa. Se obtuvo un sólo transformante *Ura*<sup>+</sup> que fue analizado por PCR, utilizando un oligonucleótido que hibridaba en la región del gen *URA3* de *C. albicans* (*URA3*) presente en el "cassette", y otro que hibridaba en el extremo 3' del gen *UBI4*, no presente en el "cassette" de interrupción (1R) (Tabla III.5), para poder determinar la integración del "cassette" en el locus *UBI4*. Se obtuvo un amplificado de 1.9 kb, correspondiente a un alelo del gen interrumpido por el "cassette" completo, lo que indicaba que la integración se había producido en el lugar deseado (Fig. III.17 B, calle 1). El análisis mediante Southern blot del DNA cromosomal del transformante, digerido con *Hind*III, empleando como sonda el fragmento *Hind*III de 1.8 kb que contiene el gen *UBI4* y sus secuencias adyacentes, confirmó este resultado (Fig. III.18, calle 2). Se detectó una banda de 1.8 kb correspondiente al alelo salvaje del gen *UBI4*, y otra, de 5.1 kb, resultante de la integración del "cassette" en el locus *UBI4*. A este transformante heterocigótico se le denominó  $\Delta$ UBI4-H1. En la cepa control CAI-4 sólo se detectó el fragmento correspondiente



**Fig. III.16.** Esquema del proceso de interrupción secuencial de los dos alelos del gen *UBI4* (véase texto). Dianas de enzimas de restricción son: H (*Hind*III), P (*Pst*I), B (*Bam*HI). Se muestran las zonas de hibridación de los oligonucleótidos empleados en el análisis por PCR de los transformantes, y la zona de hibridación de la sonda empleada en el análisis por Southern blot de los mismos.

al alelo salvaje (1.8 kb) (Fig. III.18, calle 1). Cabe destacar que la cepa CAI-4 no presenta el polimorfismo de restricción por *Hind*III detectada en la cepa ATCC 26555 (Fig. III.4). La banda de 8 kb detectada en todas las calles, corresponde al fragmento de restricción que contiene el gen *UBI3* (Fig. III.31), que también es detectado ocasionalmente por esta sonda.

Una vez integrado el "cassette" *hisG::URA3::hisG* en el cromosoma, pueden ocurrir sucesos de recombinación intracromosomal entre las secuencias repetidas *hisG*, resultando en la pérdida de una de las copias del gen *hisG* y del marcador *URA3* (véase Fig. II.3 de "Materiales y Métodos"), con lo que las células recuperan la auxotrofia  $Ura^-$ , y se posibilita el empleo sucesivo de *URA3* como marcador para interrumpir la segunda copia del gen. Con el fin de seleccionar los segregantes  $Ura^-$  de la cepa  $\Delta UBI4-H1$ , ésta se plaqueó sobre medio SD, conteniendo uridina y ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) (Boeke *et al.*, 1984), ya que éste impide el crecimiento de las células  $Ura^+$  y permite seleccionar las cepas  $Ura^-$  (véase apartado 25.1 de "Materiales y Métodos"). Nueve segregantes  $Ura^-$  fueron analizados por PCR con los oligonucleótidos sintéticos 3F2 y 3R2 (Tabla III.1), que hibridan en las regiones 5' y 3' del gen *UBI4* utilizadas en la construcción del "cassette" de interrupción. Los resultados indicaron

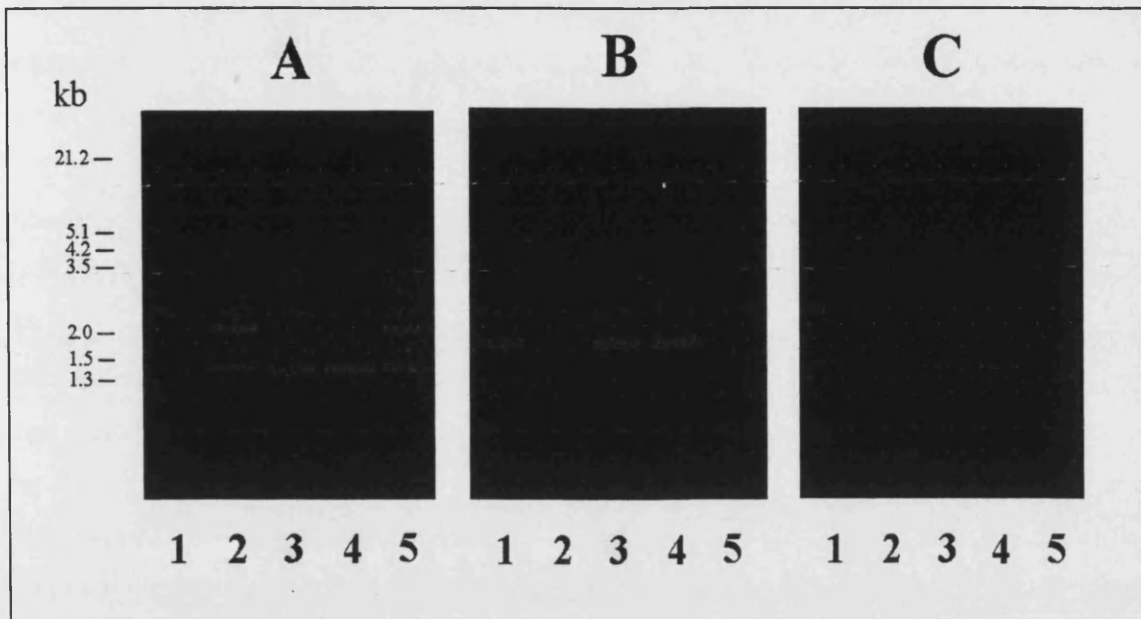
| NOMBRE | SECUENCIA                   | LOCALIZACIÓN EN LA SECUENCIA GENÓMICA |            |
|--------|-----------------------------|---------------------------------------|------------|
|        |                             | extremo 5'                            | extremo 3' |
| 1R     | AAGCTTCCACTGGGAGTTTAATTGTCC | 1235                                  | 1209       |
| HISG   | CGCGCGCCTGAATCACGCCCTG      | 788                                   | 767        |
| URA3   | CAGAATTAGTGTTACGAATCAATGGC  | 176                                   | 151        |
| 3F2    | GTCGTGACCTTACGTACAGCACAC    | - 220                                 | - 197      |
| 3R2    | GTTTAGGCGAAAATAAAGTTTGCC    | 917                                   | 893        |

**Tabla III.5.** Oligonucleótidos sintéticos utilizados como cebadores en el análisis por PCR de los transformantes obtenidos, por integración del "cassette", en cada una de las etapas de los experimentos de interrupción secuencial del gen *UBI4* de *C. albicans* (algunos de ellos se utilizaron también en la secuenciación de dicho gen). La posición de los extremos 5' y 3' está numerada respecto al sitio de inicio de la traducción, excepto en el caso de los oligos HISG y URA3 en que está numerada respecto al inicio de secuenciación de dichos genes dentro del "cassette" de interrupción. Nótese que los oligonucleótidos F y R hibridan con cadenas complementarias.

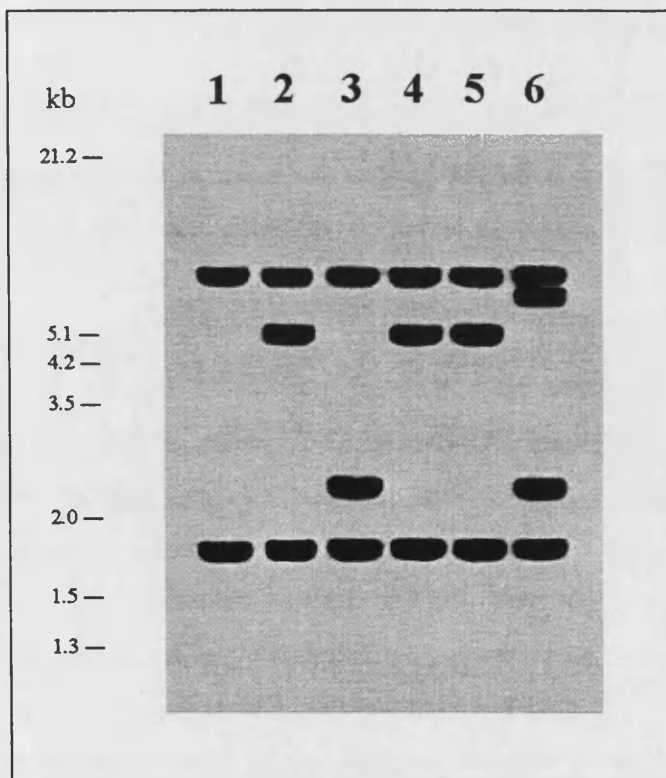
que en seis de ellos había tenido lugar la recombinación intracromosomal entre las secuencias *hisG*, puesto que se obtuvieron dos amplificadores, uno de 1.15 kb, correspondiente al alelo salvaje, y otro de 1.62 kb correspondiente al alelo de *UBI4* interrumpido por *hisG* (dato no mostrado). Los otros tres segregantes  $Ura^-$  habían experimentado un suceso de recombinación mitótica intercromosomal no recíproca, revertiendo al genotipo salvaje, ya que se obtuvo un sólo amplificador de 1.15 kb correspondiente al alelo salvaje (dato no mostrado). El resultado del análisis mediante Southern blot de uno de los segregantes  $Ura^-$  que habían experimentado recombinación intracromosomal, denominado  $\Delta UBI4-H2$ , se muestra en la figura III.18 (calle 3), en la que no se observa la banda de 5.1 kb y en su lugar aparece una de 2.3 kb, debido a la pérdida de *URA3* y una copia de *hisG*. El análisis de este transformante por PCR con los oligonucleótidos 3F2 (que hibrida en el extremo 5' del gen *UBI4* presente en el "cassette" de interrupción), y 1R (que hibrida en el extremo 3', no incluido en el "cassette" de interrupción), muestra la presencia de dos amplificadores, uno de 1.45 kb, correspondiente al alelo salvaje, y otro de 2 kb correspondiente al alelo interrumpido con *hisG* (Fig. III.17 A, calle 2). La ausencia de amplificador al combinar el oligonucleótido que hibrida en el gen *URA3* con otros, como son el 1R o el 3R2, (Fig. III.17 B y C, calle 2) demuestra la pérdida de *URA3* por recombinación intracromosomal. Para confirmar la presencia del gen *hisG* en uno de los alelos *UBI4* en esta cepa, se amplificó por PCR con un oligonucleótido sintético (HISG) que hibrida en la secuencia de este gen (Tabla III.5) y el oligonucleótido 1R, obteniéndose un fragmento del tamaño esperado (1.34 kb) (dato no mostrado), lo que confirmó totalmente que se había obtenido la cepa adecuada ( $Ura^-$ , con un alelo *UBI4* interrumpido con *hisG*) para proceder al siguiente paso de interrupción génica.

Para interrumpir el segundo alelo del gen se siguió una estrategia similar, empleando el "cassette" de interrupción de pUBI4-D, que carece de sitio *Bam*HI en *hisG*. DNA de pUBI4-D (20  $\mu$ g), digerido con *Hind*III/*Sac*I, para separar del vector el fragmento de 5.1 kb con el "cassette" de interrupción, se utilizó para transformar la cepa  $\Delta UBI4-H2$ . Se obtuvieron 30 transformantes  $Ura^+$  que se analizaron por PCR con oligonucleótidos deducidos de *hisG*, *UBI4* y *URA3*, y por Southern blot, demostrándose que en 26 de ellos el "cassette" se había integrado en el alelo ya interrumpido, mientras que en los otros 4 se había integrado en un locus distinto a *UBI4*, manteniéndose en todos ellos una copia salvaje de *UBI4*. El análisis por PCR con los oligonucleótidos *URA3* y 1R demostró que 26 transformantes contenían el "cassette" completo integrado en el locus *UBI4*, obteniéndose un amplificador de 1.9 kb (en la





**Fig. III.17.** Análisis mediante PCR de las cepas de *C. albicans* obtenidas en los experimentos de interrupción secuencial del gen *UBI4*. DNA cromosomal de las distintas cepas de *C. albicans* se amplificó por PCR empleando distintas combinaciones de oligonucleótidos. (A): 3F2 y 1R; (B): URA3 y 1R; (C): URA3 y 3R2. Véase texto y figura III.16 para más detalle. Cepas estudiadas:  $\Delta$ UBI4-H1 (calle 1),  $\Delta$ UBI4-H2 (calle 2),  $\Delta$ UBI4-1 (calle 3),  $\Delta$ UBI4-2 (calle 4) y  $\Delta$ UBI4-a (calle 5).



**Fig. III.18.** Análisis mediante Southern blot de las cepas de *C. albicans* obtenidas en los experimentos de interrupción secuencial del gen *UBI4*. Cada calle contiene DNA cromosomal (10  $\mu$ g), de las distintas cepas, digerido con *Hind*III. Como sonda se empleó el fragmento *Hind*III de 1.8 kb que contiene el gen y sus secuencias adyacentes. Cepas estudiadas: CAI-4 (calle 1),  $\Delta$ UBI4-H1 (calle 2),  $\Delta$ UBI4-H2 (calle 3),  $\Delta$ UBI4-1 (calle 4),  $\Delta$ UBI4-2 (calle 5) y  $\Delta$ UBI4-a (calle 6).

figura III.17 B, calles 3 y 4, se muestran los resultados obtenidos con 2 de los 26 transformantes, denominados  $\Delta$ UBI4-1 y  $\Delta$ UBI4-2); estos 26 transformantes contenían además una copia del alelo salvaje, y ninguna copia interrumpida con *hisG*, ya que se obtiene un sólo amplificado, de 1.45 kb, con los oligonucleótidos 3F2 y 1R (Fig. III.17 A, calles 3 y 4), lo que indica que el "cassette" se ha integrado en el alelo ya interrumpido. Este resultado se confirmó mediante análisis por Southern blot de los transformantes (Fig. III.18, calles 4 y 5), en los que aparece de nuevo la banda de 5.1 kb, correspondiente a un alelo de *UBI4* interrumpido por el "cassette" completo, desapareciendo la de 2.3 kb, correspondiente a un alelo de *UBI4* interrumpido por *hisG*, mientras que la banda de 1.8 kb, correspondiente a uno de los alelos salvajes del gen, se mantiene intacta. Los otros 4 transformantes contienen un alelo salvaje, puesto que se amplificaba un fragmento de DNA de 1.45 kb con los oligonucleótidos 3F2 y 1R, además de otro amplificado de 2 kb, lo que indicaba que también contienen un alelo interrumpido sólo con *hisG*, igual que la cepa  $\Delta$ UBI4-H2 antes de transformar (en la figura III.17 A, calle 5 se muestra el resultado obtenido con uno de estos transformantes, llamado  $\Delta$ UBI4-a). Por otro lado, estos 4 transformantes daban un amplificado de 1.58 kb con los oligonucleótidos URA3 y 3R2, que hibridan en secuencias internas del "cassette" (Fig. III.17 C, calle 5), indicando que tienen integrado el "cassette" completo en un locus distinto a *UBI4*, lo que se confirmó por la ausencia de amplificado con los oligonucleótidos URA3 y 1R (Fig. III.17 B, calle 5). El análisis mediante Southern blot confirmó estos resultados (Fig. III.18, calle 6), puesto que se mantiene la banda de 1.8 kb correspondiente a un alelo salvaje del gen y la de 2.3 kb que corresponde al otro alelo interrumpido sólo con *hisG*, y aparece una banda nueva de tamaño diferente que corresponde a un fragmento *Hind*III de DNA cromosomal no relacionado con *UBI4*, en el que se ha introducido el "cassette".

La imposibilidad de aislar el mutante nulo para el gen *UBI4* ( $\Delta$ *ubi4::hisG* /  $\Delta$ *ubi4::hisG*) a partir del mutante heterocigótico *UBI4*/ $\Delta$ *ubi4::hisG*, puede sugerir que al menos una copia del gen *UBI4* es necesaria para la viabilidad de *C.albicans*, por lo que además de estar implicada en la respuesta a estrés, la poliubiquitina sería necesaria para el crecimiento en condiciones normales, al menos para originar colonias en medio selectivo después de la transformación. No obstante, recientemente se ha descrito que las diferencias (heterología) entre alelos de un mismo gen produce una gran especificidad en los fenómenos de recombinación, de manera que una determinada construcción puede integrarse preferentemente (hasta con una preferencia de 50 veces) en uno de los alelos (Yesland &

Fonzi, 2000). Este fenómeno indica que los resultados obtenidos en la interrupción de *UBI4* pueden deberse a una gran preferencia del "cassette" por integrarse en uno de los alelos, sin que ello signifique que el gen *UBI4* sea esencial para la viabilidad.

De todos modos, al disponer del mutante heterocigótico para *UBI4*, se determinó si la presencia de un sólo alelo *UBI4* tenía algún efecto sobre el crecimiento celular y la respuesta a estrés térmico. Para ello, en primer lugar se estudió el efecto sobre el crecimiento en diferentes condiciones. En todas las condiciones probadas, el mutante heterocigótico *UBI4/Δubi4::hisG*, mostró un tiempo de generación muy parecido al encontrado para la cepa salvaje CAI-4 (2 h en medio de Lee a 28°C, 1.6 h en YPD a 28°C, y 1.3 h en YPD a 37°C). Estos resultados indican que la interrupción de uno de los alelos del gen *UBI4* no tiene ningún efecto sobre el crecimiento en las condiciones probadas. En segundo lugar, también se estudió la sensibilidad del mutante heterocigótico *UBI4/Δubi4::hisG* al calor crónico en medio de cultivo sólido (véase apartado 28.1 de "Materiales y Métodos"). No se observó una diferente respuesta de esta cepa respecto de la cepa *C. albicans* CAI-4 utilizada como control. Por lo tanto, la interrupción de uno de los alelos del gen *UBI4* de *C. albicans* no tiene ningún efecto sobre la sensibilidad al estrés térmico.

#### **1.6.B.- Obtención del mutante nulo condicional a partir del heterocigótico *UBI4/Δubi4::hisG*.**

El hecho de no haber obtenido el mutante nulo para el gen *UBI4* de *C. albicans* mediante la técnica de interrupción secuencial con el "cassette ura-blaster", y dado que esta técnica no es útil para interrumpir genes esenciales, puede sugerir que se trata de un gen esencial para *C. albicans*. Pero por otro lado, la técnica empleada presenta baja eficiencia de transformación y además puede haber una preferencia de integración del "cassette" en uno de los dos alelos, por lo que la ausencia de transformantes deseados (interrumpidos en los dos alelos), puede no deberse necesariamente a que el gen sea esencial, como se ha comentado anteriormente (Care *et al.*, 1999; Yesland & Fonzi, 2000). Aunque en nuestro caso se han obtenido una mayoría de transformantes en los que el "cassette" se ha introducido en el alelo ya interrumpido, y otros en los que se ha introducido incluso en secuencias no relacionadas con *UBI4*, el carácter esencial de *UBI4* no ha quedado demostrado.

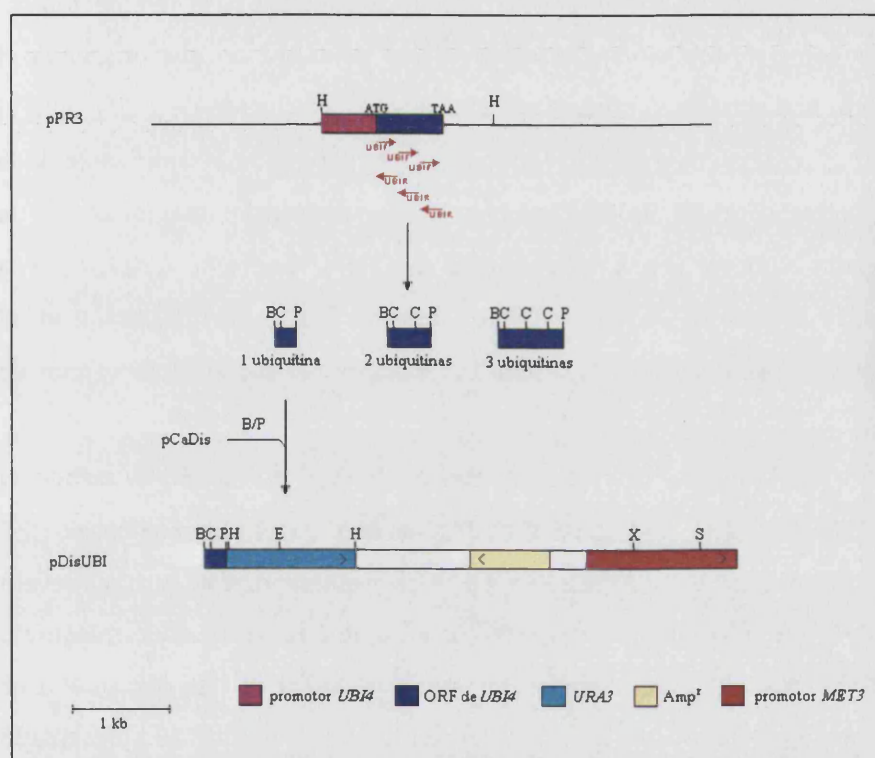
Para tratar de aclarar esta cuestión, se procedió a construir una cepa en la que la única copia del gen *UBI4* del mutante heterocigótico *UBI4/Δubi4::hisG*, estuviera bajo el control de

un promotor regulado. Esto permite estudiar no sólo el posible carácter esencial del gen, en cuyo caso la cepa sería viable sólo en condiciones en las que el promotor esté activado, sino que, en caso de no ser esencial, nos permitirá también observar las consecuencias fenotípicas de la ausencia de expresión en condiciones en que la misma esté bloqueada (Care *et al.*, 1999). El promotor regulable utilizado ha sido el del gen *MET3* de *C. albicans*, que codifica para el enzima ATP sulfuro-liasa (ATP: sulfato adeniltransferasa, EC 2.7.7.4) que cataliza la producción de adenosina 5'-fosfosulfato (APS) a partir de sulfato inorgánico y ATP, el primer paso en la asimilación de sulfato inorgánico (Marzluf, 1997; Thomas & Surdin-Kerjan, 1997). La expresión del gen *MET3* es reprimida por metionina exógena, S-adenosil metionina (SAM), y cisteína, aunque la naturaleza del verdadero represor no está completamente aclarada (Cherest *et al.*, 1985; Mountain *et al.*, 1991; Ono *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1989). Las condiciones de represión empleadas en este trabajo fueron una combinación de metionina (2.5 mM) y cisteína (0.5 mM), ya que la cisteína a mayor concentración puede inhibir el crecimiento del hongo por lo que se recomienda utilizarla a una concentración óptima de 0.5 mM. Sin embargo, en ningún caso se consigue una represión total del promotor, siendo los niveles basales de expresión aproximadamente el 1% de la expresión máxima (Care *et al.*, 1999).

#### **1.- Construcción del "cassette" de integración a partir del plásmido pCaDis.**

Para poder interrumpir la segunda copia del gen *UBI4* del mutante heterocigótico (*UBI4/Δubi4::hisG*), y generar simultáneamente una copia de *UBI4* bajo el control del promotor *MET3*, se ha de construir previamente el "cassette" de integración a partir del plásmido pCaDis (Care *et al.*, 1999) (Fig. III.19). La técnica consiste en subclonar un fragmento con la región 5' codificante del gen *UBI4* a continuación del promotor *MET3*. Para ello, en primer lugar, se amplificó por PCR a partir de pPR3, la secuencia de una ubiquitina del gen *UBI4* de *C. albicans* con los oligonucleótidos sintéticos UBIF y UBIR deducidos de la secuencia (Tabla III.6), que hibridan con el principio y el final de la secuencia de ubiquitina, y en los que se habían introducido las dianas de restricción *Bam*HI y *Pst*I respectivamente. Como resultado de la reacción de PCR se obtuvo el fragmento de DNA de 228 pb correspondiente a una subunidad de ubiquitina, más otros dos, de 456 y 684 pb, correspondientes a amplificados de dos y tres secuencias de ubiquitina respectivamente, puesto que los oligonucleótidos empleados hibridan al principio y al final de cada secuencia de ubiquitina. El producto amplificado de 228 pb, que contenía la secuencia de una sólo

ubiquitina, fue digerido con los enzimas de restricción *Bam*HI y *Pst*I, y subclonado en el plásmido pCaDis digerido con los mismos enzimas, originando un plásmido que se denominó pDisUBI, del que se guardaron dos clones (a y b).



**Fig. III.19.** Esquema de la construcción del "cassette" de integración pDisUBI partir del plásmido pCaDis. Se muestran las zonas de hibridación de los oligonucleótidos empleados en la ampliificación por PCR de la secuencia de una ubiquitina del gen *UBI4* de *C. albicans*. Dianas de enzimas de restricción: B (*Bam*HI) P (*Pst*I), C (*Cla*I), H (*Hind*III), E (*Eco*RI), X (*Xba*I), S (*Sal*I).

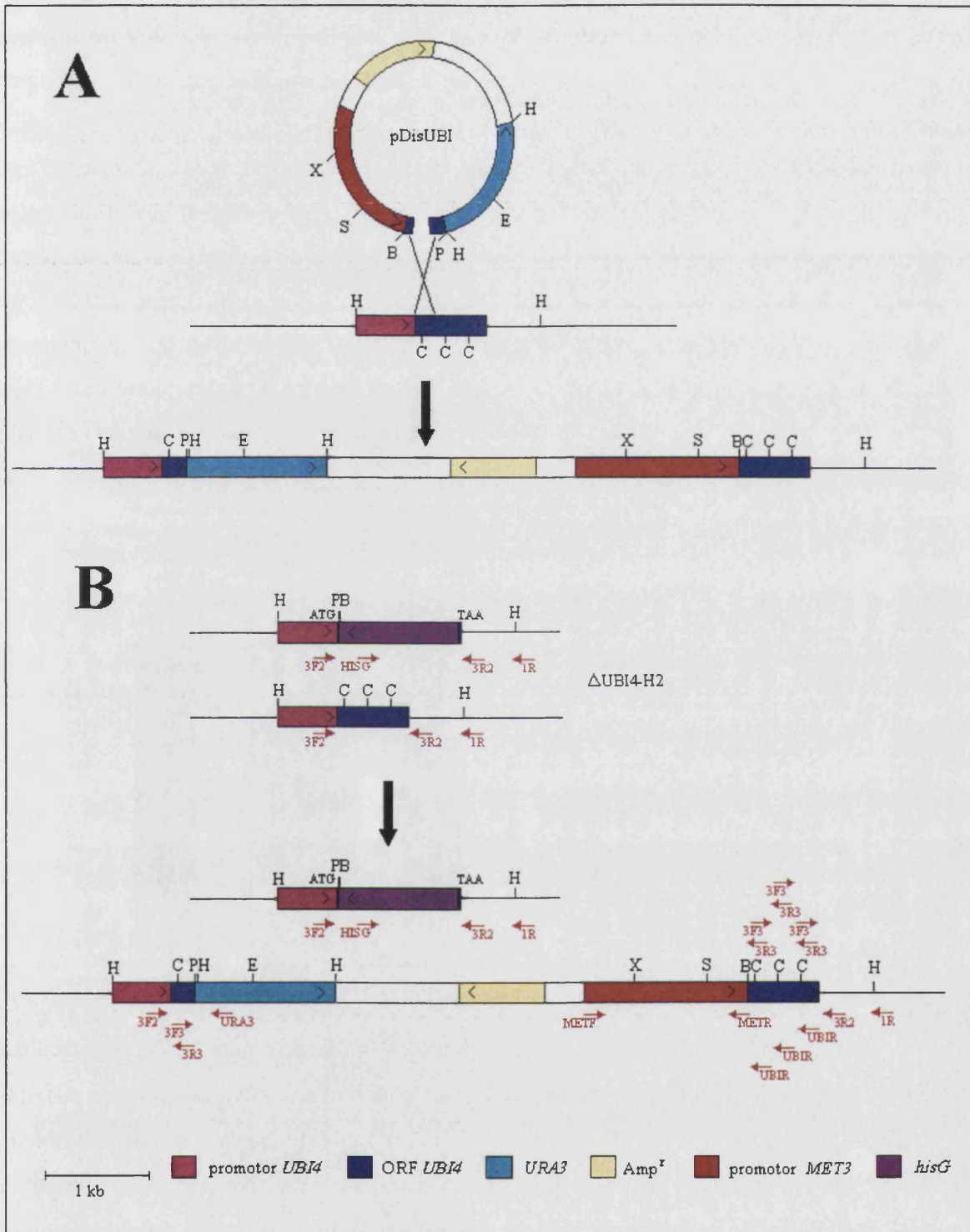
| NOMBRE | SECUENCIA                                     | LOCALIZACIÓN EN LA SECUENCIA GENÓMICA |            |
|--------|---|---------------------------------------|------------|
|        |   | extremo 5'                            | extremo 3' |
| UBIF   | <i>GGTCGGATCCATGCAAATTTTCGTTAAACTTTGACTGG</i> | 1                                     | 29         |
| UBIR   | <i>TCGGCTGCAGACCACCTCTCAATCTTAAACCAAATG</i>   | 228                                   | 202        |

**Tabla III.6.** Oligonucleótidos sintéticos utilizados como cebadores en la ampliificación por PCR de la secuencia codificante de la primera ubiquitina del gen *UBI4* de *C. albicans* para la construcción del plásmido pDisUBI. La posición de los extremos 5' y 3' está numerada respecto al sitio de inicio de la traducción. En cursiva se marcan las secuencias del extremo 5' no homólogas al DNA genómico que contienen las dianas de restricción indicadas (subrayadas). Nótese que los oligonucleótidos F y R hibridan con cadenas complementarias.

## **2.- Transformación integrativa y aislamiento de los transformantes.**

El plásmido pDisUBI-a linearizado mediante digestión con *ClaI* que corta en la secuencia de la ubiquitina, se empleó para transformar integrativamente la cepa  $Ura^-$  de *C. albicans* heterocigótica para *UBI4* (*UBI4/Δubi4::hisG*), por recombinación de las secuencias de ubiquitina (Fig. III.20 A). El resultado deseado de esta transformación es la integración del "cassette" en la primera copia de ubiquitina del alelo salvaje de *UBI4*, lo que originaría el mutante nulo condicional, con una copia completa de la región codificante de *UBI4* bajo el control del promotor *MET3*, y una copia de *UBI4* incompleta, sin la región 3' codificante de la segunda y tercera ubiquitina (Fig. III.20 B). También puede ocurrir la integración de la construcción en la segunda o tercera copia de ubiquitina del alelo salvaje de *UBI4*, o en la secuencia de ubiquitina de cualquiera de los dos alelos del gen *UBI3*. La integración en el alelo *UBI4* ya interrumpido (*Δubi4::hisG*) es imposible puesto que dicho alelo carece de secuencias de ubiquitina.

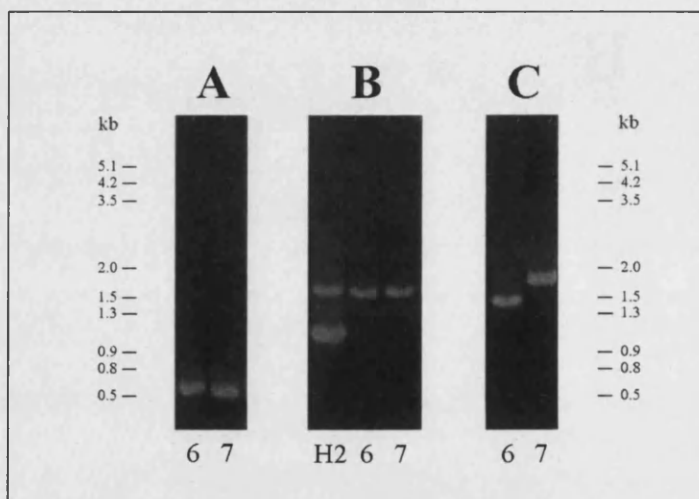
Se obtuvieron 6 transformantes  $Ura^+$ , que fueron analizados por PCR, utilizando el oligonucleótido URA3, que hibrida en la región *URA3* del "cassette", y el oligonucleótido 3F2 que hibrida en la región promotora de *UBI4* (Tabla III.1). El resultado de este análisis reveló que la construcción se había introducido en la primera copia de ubiquitina del alelo intacto de *UBI4* del mutante heterocigótico, en 3 de los transformantes analizados, puesto que se obtuvo un amplificado de 0.65 kb. En la figura III.21 A (calle 6) se muestra el amplificado presentado por uno de estos transformantes (denominado clon 6) que fue seleccionado para continuar el estudio. En otros 2 de los transformantes analizados, se obtuvo un amplificado de 0.88 kb, que indicó la integración de la construcción en la segunda copia de ubiquitina del alelo intacto de *UBI4*. En el transformante restante no se obtuvo ningún amplificado con esta combinación de oligonucleótidos, por lo que a continuación se analizó este transformante por PCR con los oligonucleótidos URA3 y 4F2 (que hibrida en la región promotora del gen *UBI3*) para estudiar la posible integración de la construcción en algún alelo de *UBI3*. Se obtuvo un amplificado de 0.56 kb (dato no mostrado), lo que confirmaba nuestra hipótesis. Este resultado indicaba que la construcción empleada sería útil para obtener el mutante nulo condicional de *C. albicans* para *UBI3* a partir del mutante heterocigótico  $\Delta UBI3$ -H2 (véase apartado 2.6.B). No se obtuvo ningún transformante en el que la construcción se hubiese introducido en la tercera copia de ubiquitina del alelo intacto de *UBI4* del mutante heterocigótico, aunque esta opción también era posible.



**Fig. III.20.** Esquema del proceso seguido para la obtención del mutante nulo condicional de *C. albicans* para el gen *UBI4* a partir del mutante heterocigótico  $\Delta$ UBI4-H2. En el panel A se muestra el proceso de integración de la construcción plasmídica pDisUBI, linearizada con *ClaI*, en el alelo salvaje de *UBI4*, y en el panel B se muestra el resultado esperado (véase texto para más detalle). Se indican las zonas de hibridación de los oligonucleótidos empleados en el análisis por PCR de los transformantes. Dianas de enzimas de restricción: B (*Bam*HI), P (*Pst*I), C (*Cla*I), H (*Hind*III), E (*Eco*RI), X (*Xba*I), S (*Sal*II).

Para continuar el estudio se eligió uno de los transformantes con la construcción pDisUBI-a integrada en la primera copia de ubiquitina del alelo intacto de *UBI4* del mutante heterocigótico. Esta cepa presenta el gen completo de la poliubiquitina, con las tres copias de ubiquitina bajo el control del promotor *MET3* y el promotor *UBI4* controla una copia incompleta de *UBI4*, sin la segunda y tercera copia de ubiquitina y sin la región 3' no codificante. A este transformante se le denominó  $\Delta$ UBI4-6. Para confirmar que el otro alelo del gen *UBI4* de esta cepa estaba interrumpido por el gen *hisG* de *S. typhimurium*, se analizó por PCR con los oligonucleótidos 3F2 y 3R2, obteniéndose un amplificado de 1.62 kb correspondiente al alelo interrumpido por *hisG* (Fig. III.21 B, calle 6). Al no obtenerse además un amplificado de 1.15 kb correspondiente al alelo salvaje, como ocurre en la cepa  $\Delta$ UBI4-H2 utilizada como control (Fig. III.21 B, calle H2), se confirmaba la ausencia de alelo salvaje de *UBI4* en este transformante.

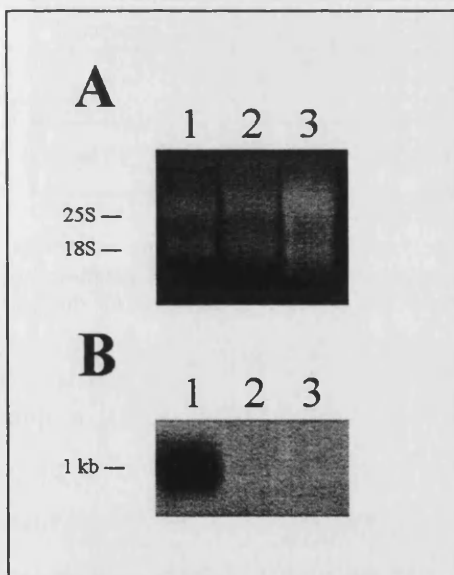
**Fig. III.21.** Análisis mediante PCR de los transformantes de *C. albicans* aislados en el proceso de obtención del mutante nulo condicional para *UBI4*. DNA cromosomal de los distintos transformantes de *C. albicans* se amplificó por PCR empleando distintas combinaciones de oligonucleótidos. (A): 3F2 y URA3; (B): 3F2 y 3R2; (C): METF y 3R3. Véase texto y figura III.20 para más detalle. Cepas estudiadas:  $\Delta$ UBI4-H2 (calle H2),  $\Delta$ UBI4-6 (calle 6) y  $\Delta$ UBI4-7 (calle 7).



Una vez obtenido el mutante nulo condicional de *C. albicans* para *UBI4*, se procedió a determinar el posible carácter esencial de dicho gen. Para ello, se cultivaron las cepas  $\Delta$ UBI4-6 y  $\Delta$ UBI4-H1 (*UBI4*/ $\Delta$ *ubi4*::*hisG-URA3-hisG*), como control, en medio selectivo SD líquido y sólido, a 28 y 37°C, con y sin aminoácidos para controlar el promotor *MET3*. Se obtuvo un crecimiento similar de ambas cepas en los dos medios de cultivo y a las dos temperaturas. Estos resultados indicaban que no se trataba de un gen esencial, a pesar de no haberse podido obtener el mutante nulo de *C. albicans* para el gen *UBI4* mediante la técnica de interrupción secuencial con el "cassette ura-blaster".



Para confirmar estos resultados, se procedió a analizar la expresión del gen *UBI4*, mediante análisis por Northern blot, en la cepa  $\Delta$ UBI4-6 cultivada en presencia y ausencia de los aminoácidos represores del promotor *MET3*. Para ello, dicha cepa se cultivó a 28°C en SD y SD+aa (metionina, 2.5 mM y cisteína 0.5 mM); como control, se empleó la cepa  $\Delta$ UBI4-H1 cultivada únicamente en SD, pues en esta cepa la expresión del único alelo *UBI4* está bajo el control de su propio promotor, y no depende de la presencia de aminoácidos. Para purificar el RNA total de los tres cultivos, las células se recogieron al final de la fase exponencial de crecimiento, excepto en el caso del medio SD+aa, en el que las células se recogieron al inicio de la fase exponencial ( $DO_{600} = 0.3$ ) para evitar el consumo excesivo de los aminoácidos y que éstos dejaran de ejercer el efecto inhibitorio sobre el promotor *MET3*. Se realizó un Northern blot del RNA total empleando como sonda el cDNA de la poliubiquitina. Como puede observarse en la figura III.22, sólo se detectó el transcrito del gen *UBI4* en la cepa



**Fig. III.22.** Análisis mediante Northern blot de la expresión de *UBI4* en la cepa  $\Delta$ UBI4-6. Cada calle contiene 6  $\mu$ g de RNA total obtenido tras cultivar la cepa  $\Delta$ UBI4-6 a 28°C, en medio SD (calle 2) y SD+aa inhibidores del promotor *MET3* (calle 3). La calle 1 contiene 6  $\mu$ g de RNA total de la cepa  $\Delta$ UBI4-H1 cultivada a 28°C, en medio SD. Como sonda se utilizó el fragmento de 0.9 kb de cDNA de la poliubiquitina de *C. albicans* (panel B). En el panel A se muestra el gel teñido con bromuro de etidio para visualizar los rRNAs (25S y 18S).

$\Delta$ UBI4-H1, no encontrándose niveles detectables de mRNA de *UBI4* en la cepa  $\Delta$ UBI4-6, en ningún caso, independientemente del medio de cultivo en que había crecido. La ausencia de mRNA transcrito de la poliubiquitina en medio mínimo en una cepa que crece perfectamente en este medio de cultivo, confirma que el gen *UBI4* de *C. albicans* no es esencial. Se había obtenido, por tanto, una cepa de *C. albicans* ( $\Delta$ UBI4-6), en la que no es funcional ninguno de los dos alelos *UBI4*; un alelo estaba interrumpido con *hisG*, y el otro alelo *UBI4*, bajo el control del promotor *MET3*, no se expresaba.

De estos resultados se desprende la idea de que el "cassette" de integración construido a partir del plásmido pCaDis no estaba correcto, o bien no se había producido correctamente la recombinación esperada en el mutante heterocigótico, siendo una de éstas la causa de la ausencia de expresión del gen *UBI4* en la cepa  $\Delta$ UBI4-6. Por PCR se había comprobado que el "cassette" se había introducido en el lugar deseado del mutante heterocigótico (véase Fig. III. 21 A, calle 6). Para determinar si el promotor *MET3* había entrado en la orientación adecuada, se analizó por PCR la cepa  $\Delta$ UBI4-6, combinando los oligonucleótidos METF y METR, deducidos de la secuencia del promotor *MET3* del plásmido pCaDis (Tabla III.7), con oligonucleótidos que hibridan dentro de la secuencia de ubiquitina, 3F3 y 3R3 (Tabla III.1).

| NOMBRE | SECUENCIA                          | LOCALIZACIÓN EN LA SECUENCIA GENÓMICA |            |
|--------|------------------------------------|---------------------------------------|------------|
|        |                                    | extremo 5'                            | extremo 3' |
| METF   | CCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGC | 3834                                  | 3867       |
| METR   | GCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCGGGG | 5369                                  | 5336       |

**Tabla III.7.** Oligonucleótidos sintéticos utilizados como cebadores en la comprobación por PCR de la correcta construcción del "cassette" de integración para la obtención del mutante nulo condicional. La posición de los extremos 5' y 3' está numerada respecto a la numeración de la secuencia del plásmido pCaDis. Nótese que los oligonucleótidos F y R hibridan con cadenas complementarias.

Sólo se obtuvo amplificado en la combinación de los oligonucleótidos METF y 3R3, lo que demuestra que la orientación del promotor *MET3* dentro de la construcción era correcta, pero el amplificado obtenido no era del tamaño esperado (1.7 kb), sino que era unas 350 pb más pequeño (Fig. III.21 C, calle 6). Se obtuvo un amplificado del mismo tamaño cuando se analizó por PCR el plásmido pDisUBI-a con los mismos oligonucleótidos (dato no mostrado), lo que indicaba que el defecto (ausencia de unas 350 pb) estaba presente en el "cassette" de integración (pDisUBI-a), y no era consecuencia del proceso de transformación e integración en el cromosoma. Esta anomalía podría explicar la falta de funcionalidad del promotor *MET3*.

Para averiguar qué secuencia en concreto era la que faltaba en la construcción, se analizaron los fragmentos de DNA obtenidos tras realizar digestiones del plásmido pDisUBI-a con diferentes combinaciones de enzimas de restricción. Se observó que, aunque se conservaban todas las dianas de restricción teóricas, se había perdido la secuencia de

aproximadamente 0.35 kb del promotor *MET3* comprendida entre las dianas *SalI* y *BamHI* (véase Fig. II.2). La ausencia de estas 350 pb en la región 3' del promotor *MET3* en pDisUBI-a fue confirmada por secuenciación. Para ello, se amplificó por PCR un fragmento de DNA de 1.34 kb, a partir de pDisUBI-a con los oligonucleótidos METF (que hibrida en la región 5' de la secuencia del promotor *MET3*), y 3R3 (que hibrida en la secuencia de ubiquitina) y se secuenció empleando como cebador el oligonucleótido 3R3. Los resultados indicaron que la región perdida comprendía exactamente los últimos 327 nucleótidos de la región 3' del promotor *MET3* (Fig. III.23), situados inmediatamente antes de la secuencia codificante del gen de la poliubiquitina. Esta delección explica la falta de funcionalidad del promotor *MET3* del "cassette" pDisUBI-a.

```

CAA TCT TTG TTG GTC TGG TGG AAT ACC TTC TTT GTC TTG
GAT CTT GGA TTT GAC GTT ATC GAT GGT GTC AGA AGA TTC
GAC TTC TAA GGT AAT GGT TTT ACC AGT CAA AGT TTT AAC
GAA AAT TTG CAT GGATCCGGGAGGGTATTTACTTTTAAATATAGTT
                BamHI
AACAGGAAGAAAGTGACAACACTTGGAGTTGAAGAATAGAAAGAAAAAAG
GAACAACATAAAAATCTAAAAAAGGTTTATAGATTTTATTTTATGCAATTTT
TTTTTTGGGGAGATTACGTATACTTGATGATCTATTATATACTTTATTATT
GGATCAATTATAGTGTCAGAGTTGCAAAAATTGTATACATTATATGTGACT
ACGCAATTAGCAAAGGTGAAAAAAAAAATTGCAAAAAAAAAAGCCAAAAAAG
AAAAATAAAAAGAAACTCATAATTCAGTGATCGCACGTGATCCACAGCAAT
AGTTCATTGTCGTGTCGACATTCTAACTAAAGTAAATCCAGAAACATTTAT
                SalI
AAGCAGATGCATACTTAAGAAGACATTATGGGTATTGTTTTAGAGGGGCGC
ATTAATGGATCTATGTCGTTCCCTTGTAGAAAAGTCCAGAAATACTTTAAA
TGTTGAAAAATTTGTTAGAAAAACACCACAATTTGCACCAAGAAAAACTCA
AGTAGACAATCTAATAACAACCAAGAAAAAATTCAATCGAACATGATGAT
GAACAAAGGATGTATATATATATACTCAA

```

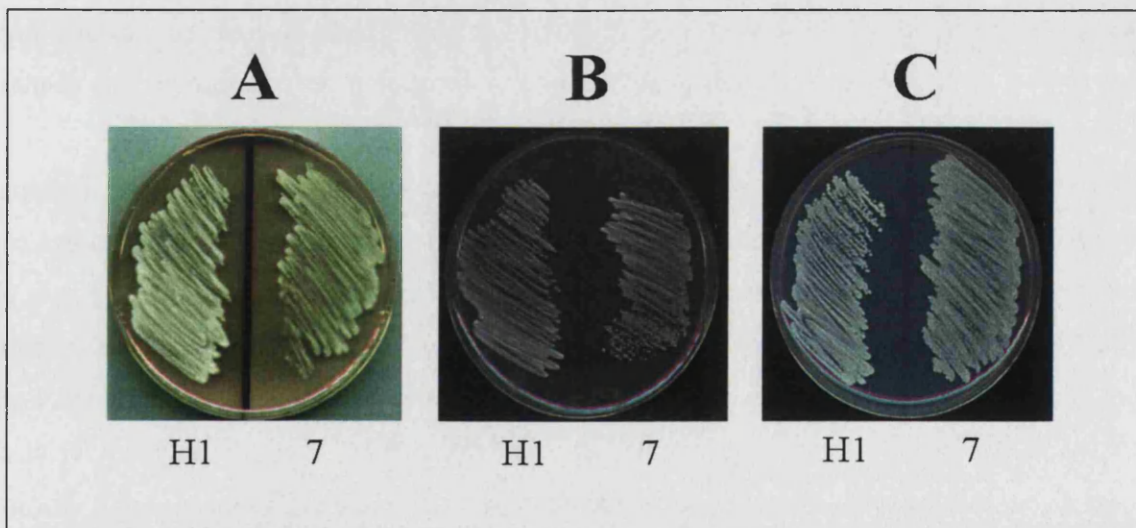
Fig III.23. Secuencia nucleotídica del extremo 3' del promotor *MET3* de los plásmidos pDisUBI-a y pDisUBI-b. El promotor *MET3* de ambos plásmidos se secuenció con el oligonucleótido 3R3 cuyo extremo 5' hibrida en la posición 180 respecto del codón de iniciación de la ubiquitina (indicado en color azul). Nótese que la región codificante corresponde a la cadena complementaria. En color rojo se indica la secuencia que presenta el plásmido pDisUBI-b y que está ausente en la construcción pDisUBI-a. También se indican los sitios de restricción *BamHI* y *SalI* de los plásmidos pDisUBI.

A continuación se procedió a analizar si la construcción pDisUBI-b estaba correcta y podía utilizarse para obtener el mutante nulo condicional de *C. albicans* para *UBI4*. Mediante PCR con los oligonucleótidos METF y 3R3 se amplificó un fragmento de DNA de 1.7 kb, lo que indicó que esta construcción era correcta. La secuenciación con el oligonucleótido 3R3 de dicho fragmento de DNA confirmó que el plásmido pDisUBI-b contiene los 327 nucleótidos de la región 3' del promotor *MET3* que se habían perdido en la construcción pDisUBI-a (Fig. III.23). Esto se reconfirmó posteriormente, mediante digestión del plásmido con los enzimas de restricción *SalI* y *BamHI*. Además, antes de emplear pDisUBI-b para obtener el mutante nulo condicional, se comprobó que estaba perfectamente construido, mediante: a) reacciones de PCR con el oligonucleótido METF y los oligonucleótidos UBIR y URA3, que originaron los fragmentos esperados de 1.75 y 1.94 kb, respectivamente (dato no mostrado), y b) mediante digestiones simples y dobles con diferentes enzimas de restricción, que originaron fragmentos de tamaño esperado en todos los casos (dato no mostrado).

A continuación, se procedió a obtener el mutante nulo condicional de *C. albicans* para el gen *UBI4* con la construcción pDisUBI-b. Para ello, la cepa *Ura*<sup>-</sup> de *C. albicans* heterocigótica (*UBI4/Δubi4::hisG*), fue transformada, con DNA del plásmido pDisUBI-b linearizado con *ClaI*. Se obtuvieron 40 transformantes *Ura*<sup>+</sup>, que fueron analizados por PCR con los oligonucleótidos URA3 y 3F2. Este análisis reveló que en un 25% de los transformantes la construcción se había introducido en la primera ubiquitina de *UBI4*, puesto que se obtuvo un amplificado de 0.65 kb (en la figura III.21 A, calle 7, se muestra el amplificado obtenido en uno de estos transformantes, elegido para continuar el estudio); en un 40% de transformantes, el "cassette" se había introducido en la segunda copia de ubiquitina, obteniéndose un amplificado de 0.88 kb, y en un 25% de casos, el "cassette" se había introducido en la tercera copia, obteniéndose un amplificado de 1.11 kb. En el 10% restante de transformantes no se obtuvo amplificado con estos oligonucleótidos, lo que indicaba la integración del "cassette" en una zona del genoma diferente del locus *UBI4*. Se eligió uno de los transformantes en los que la construcción se había integrado en la primera copia de ubiquitina de *UBI4*, puesto que esta cepa dispondría de una copia completa de la región codificante de *UBI4* bajo el control del promotor *MET3*. Para comprobar que el otro alelo del gen *UBI4* de esta cepa estaba interrumpido por el gen *hisG* de *S. typhimurium*, se analizó por PCR con los oligonucleótidos 3F2 y 3R2. Como resultado de este análisis se obtuvo un único amplificado, de 1.62 kb, correspondiente al alelo de *UBI4* interrumpido por *hisG*, no detectándose el amplificado de 1.15 kb correspondiente al alelo salvaje (Fig. III.21 B, calle 7),

que se detecta en la cepa  $\Delta UBI4$ -H2 utilizada como control (Fig. III.21 B, calle H2). Además, se comprobó que el promotor *MET3* se encontraba completo delante de la región codificante del gen *UBI4* mediante PCR con los oligonucleótidos METF y 3R3, obteniéndose un amplificado de 1.7 kb (Fig. III.21 C, calle 7). A este mutante nulo condicional de *C. albicans* para *UBI4* se le denominó  $\Delta UBI4$ -7.

Aunque ya se había demostrado que el gen *UBI4* no era esencial para la viabilidad de la célula, para confirmar los resultados se procedió a estudiar el crecimiento del mutante nulo condicional en presencia y ausencia de los aminoácidos represores del promotor *MET3*. Para ello, se cultivaron las cepas  $\Delta UBI4$ -7 (*Δubi4::hisG/Δubi4::MET3-URA3*) y  $\Delta UBI4$ -H1 (*UBI4/Δubi4::hisG-URA3-hisG*), como control, a 28°C, en medio selectivo SD con y sin aminoácidos para controlar el promotor *MET3*, tanto en medio líquido como sólido, así como en medio rico (YPD) sólido. Las dos cepas crecieron perfectamente en todos los medios de cultivo (Fig. III.24). Los tiempos de generación fueron muy similares para ambas, así como para el mutante nulo  $\Delta UBI4$ -6, siendo de 1.5 h en medio rico YPD, y de 2.4 h en medio mínimo SD, sin encontrarse diferencias entre la presencia ó ausencia de los aminoácidos represores de *MET3*. Estos resultados indican que: a) el gen *UBI4* de *C. albicans* no es esencial, y b) la interrupción de ambos alelos de *UBI4* no tiene ningún efecto sobre el crecimiento en condiciones normales, lo que sugiere que la principal función de *UBI4* en *C. albicans* debe ser proporcionar ubiquitina en respuesta a estrés.



**Fig. II.24.** Crecimiento del mutante nulo condicional de *C. albicans* para el gen *UBI4* en distintas condiciones. Las cepas  $\Delta UBI4$ -7 y  $\Delta UBI4$ -H1 (control) se cultivaron en distintos medios de cultivo sólido a 28°C. (A): YPD (24 h de incubación); (B): SD (4 días de incubación); (C): SD+aa inhibidores del promotor *MET3* (4 días de incubación).

### **3.- Análisis fenotípico del mutante nulo *ubi4*.**

Tras demostrar que el gen *UBI4* de *C. albicans* no es esencial y que la ausencia de poliubiquitina no afecta al crecimiento en condiciones normales, se procedió a estudiar las consecuencias fenotípicas en condiciones de estrés térmico, con objeto de obtener información sobre la función de *UBI4* en *C. albicans*.

#### **3.a.- Efecto del estrés térmico.**

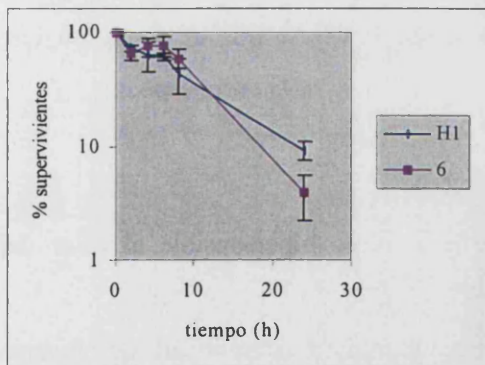
El producto génico de *UBI4* de *C. albicans* debe tener una función similar a la descrita en *S. cerevisiae*, puesto que complementa el fenotipo conferido por la mutación *ubi4* en esa especie (hipersensibilidad al estrés térmico) (véase apartado 1.4). Por tanto, la principal función de la poliubiquitina de *C. albicans* debe ser proporcionar y mantener los niveles de ubiquitina libre en condiciones de estrés (Finley *et al*, 1987; Mager & Moradas-Ferreira, 1993). Además los niveles de mRNA de *UBI4* en *C. albicans* aumentan transitoriamente tras choque térmico (véase apartado 1.3.c). Por todo ello, se procedió a estudiar el efecto de la interrupción del gen de la poliubiquitina de *C. albicans* sobre la viabilidad celular en condiciones de estrés térmico por calor crónico.

Para ello, se crecieron las cepas  $\Delta$ UBI4-6 y  $\Delta$ UBI4-H1 (*UBI4*/ $\Delta$ *ubi4*::*hisG-URA3-hisG*), como control, a 28°C, en medios de cultivo mínimo y rico hasta la fase exponencial o estacionaria de crecimiento. A continuación se sometieron a un choque térmico a 41°C (en el mismo medio de cultivo), temperatura a la que se mantuvieron hasta 24 h. Para determinar la viabilidad de las células tras el choque, periódicamente se tomaron alícuotas, que fueron diluidas y plaqueadas en medio sólido (200 UFC/placa). Cada muestra se plaqueó por triplicado, y las placas se incubaron a 28°C hasta la formación de colonias por las células viables.

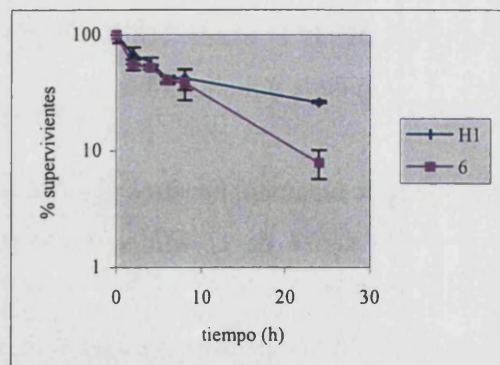
En ningún caso se observaron diferencias significativas de viabilidad entre la cepa control y el mutante nulo. Esta observación está en la línea de lo descrito por otros autores en la especie *K. lactis*. En esta especie las diferencias en la viabilidad celular en respuesta a estrés térmico crónico entre la cepa salvaje y el mutante nulo *ubi4* son muy pequeñas cuando se determinan en cultivos en fase exponencial con glucosa como fuente de carbono. Las diferencias se hacen mucho más visibles cuando el estrés térmico se aplica a células estacionarias cultivadas con glicerol como fuente de carbono (Bao & Fukuhara, 2000). Por lo tanto, se determinó de nuevo la viabilidad celular en respuesta a estrés térmico crónico (41°C) de células estacionarias, cultivadas tanto en medio rico como en medio mínimo, con glicerol como fuente de carbono.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. III.25. Como puede observarse, ambas cepas son sensibles al estrés térmico de tipo crónico. El porcentaje de supervivientes, en medio mínimo (SG), al cabo de 24 h de tratamiento fue de  $9.16 \pm 1.66$  y  $3.88 \pm 1.68$  para las cepas  $\Delta$ UBI4-H1 y  $\Delta$ UBI4-6, respectivamente. La diferencia entre estos dos valores es estadísticamente muy significativa ( $P < 0.01$ ). En YPG, el porcentaje de supervivientes al cabo de 24 h de tratamiento fue de  $26.21 \pm 0.63$  y  $7.91 \pm 2.21$  para las cepas  $\Delta$ UBI4-H1 y  $\Delta$ UBI4-6, respectivamente, siendo también la diferencia entre estos dos valores estadísticamente muy significativa ( $P < 0.01$ ). Los resultados obtenidos en YPG, son fiables a pesar de no ser un medio selectivo, puesto que la recombinación intracromosomal espontánea que pueden sufrir las células de la cepa  $\Delta$ UBI4-6, entre las secuencias repetidas de ubiquitina, para revertir al mutante heterocigótico ( $\Delta$ UBI4-H2), ocurre en proporción minoritaria, tal y como se ha podido comprobar al crecer estas cepas en medio YPG sólido, ya que la mayor parte de las colonias de la cepa  $\Delta$ UBI4-6 presentan una morfología diferente de la presentada por la cepa  $\Delta$ UBI4-H2 (véase apartado 1.6.B.3.b).

A



B



**Fig. III.25.** Sensibilidad del mutante nulo de *C. albicans* para el gen *UBI4* a las condiciones de estrés térmico. Cultivos en medio SG (panel A) e YPG (panel B) en fase estacionaria de crecimiento de las cepas  $\Delta$ UBI4-6 y  $\Delta$ UBI4-H1 (control) se sometieron a un choque térmico a 41°C, y periódicamente se tomaron alícuotas para determinar la viabilidad de las células a 28°C. Cada determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresan como la media del porcentaje (%) de supervivientes  $\pm$  la desviación estándar.

Los resultados obtenidos indican que, aunque ambas cepas son sensibles al estrés térmico por calor crónico, el mutante nulo responde peor que el heterocigótico a estas condiciones, lo que confirma que la poliubiquitina está implicada en respuesta a estrés. Estos resultados sólo se observan en células en fase estacionaria y con glicerol como fuente de carbono, por lo que la fase del cultivo y la fuente de carbono son importantes para que pueda

apreciarse el efecto de la ausencia de poliubiquitina sobre la viabilidad celular en condiciones de estrés térmico crónico. Esto sugiere que en *C. albicans* el sistema de la ubiquitina sólo participa en la respuesta a estrés térmico crónico dependiendo de condiciones adicionales tales como la fase de crecimiento y tipo de metabolismo.

Estos resultados coinciden con lo descrito en otras especies fúngicas. En el mutante *ubi4* de *S. cerevisiae* (cepa SUB60), la deficiencia en poliubiquitina provoca hipersensibilidad al calor crónico por su incapacidad para mantener los niveles necesarios de ubiquitina libre (Finley *et al.*, 1987). No obstante, la sensibilidad al estrés térmico por calor crónico presentada por el mutante nulo *ubi4* de *C. albicans*, es menor que la del mutante *ubi4* de *S. cerevisiae* (Finley *et al.*, 1987), mientras que el mutante *ubi4* de *K. lactis* presenta una sensibilidad intermedia, lo que sugiere que algunos aspectos del gen *UBI4* relacionados con la respuesta estrés puede diferir entre especies (Bao & Fukuhara, 2000).

Cuando se determinó el efecto del estrés térmico agudo (45-50°C) durante diferentes tiempos, no pudo observarse ninguna diferencia significativa sobre la viabilidad celular entre la cepa control y el mutante nulo, lo que sugiere que la poliubiquitina puede no ser importante para la recuperación de la viabilidad celular tras estrés térmico agudo (no mostrado). Esta observación no coincide con lo descrito para el mutante nulo *ubi4* de *S. cerevisiae*, que es parcialmente resistente al estrés térmico agudo (Finley *et al.*, 1987), lo que de nuevo sugiere que la implicación de la poliubiquitina en respuesta a estrés térmico varía entre especies.

A modo de resumen, nuestros resultados muestran que:

a) el gen *UBI4* de *C. albicans* complementa el fenotipo hipersensible al calor del mutante nulo *ubi4* de *S. cerevisiae*,

b) el mutante nulo *ubi4* de *C. albicans* manifiesta una mayor sensibilidad, que la cepa control, al estrés térmico sólo bajo determinadas condiciones (células estacionarias y glicerol como fuente de carbono).

Estas observaciones, junto con la comparación de genes y secuencias de ubiquitina en *C. albicans* y *S. cerevisiae* (véase apartado 2.2.c), sugieren que el sistema de la ubiquitina en *S. cerevisiae* está mucho más evolucionado estructural (hay 4 genes, *UBI1-4*, el gen *UBI4* contiene 5 subunidades de ubiquitina, y la divergencia entre las copias de ubiquitina es mayor que la observada en *C. albicans*) y funcionalmente (el sistema de la ubiquitina está implicado en múltiples procesos celulares); en *C. albicans* el sistema está menos evolucionado, estructural (probablemente sólo hay 2 genes, *UBI3* y *UBI4*, el gen *UBI4* sólo consta de 3



subunidades de ubiquitina, y las copias de ubiquitina son mucho más parecidas entre sí que las de *S. cerevisiae*), y quizá también funcionalmente, en el sentido de que procesos mediados por ubiquitina en *S. cerevisiae*, como la respuesta a estrés térmico, podrían ser aún rudimentarios en *C. albicans*. Esto podría explicar que el gen *UBI4* restaure el fenotipo salvaje en mutantes nulos de *S. cerevisiae*, mientras que el mutante nulo *ubi4* de *C. albicans* no parece especialmente sensible a dicho estrés.

### 3.b.- Morfología celular y colonial.

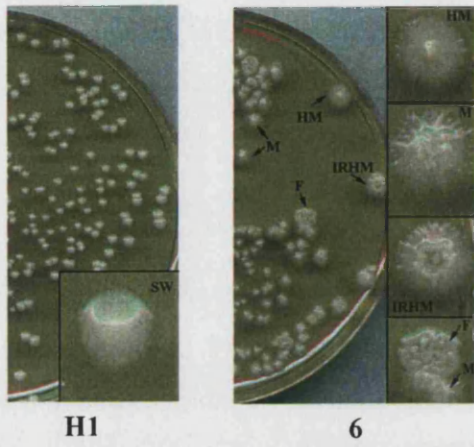
Durante el estudio de la viabilidad del mutante nulo *ubi4* en condiciones de estrés térmico por calor crónico, se observó que las colonias procedentes de la cepa  $\Delta$ UBI4-6 presentaban, en un porcentaje significativo, un fenotipo diferente del normalmente presentado por *C. albicans*. Los diferentes tipos de morfología colonial observados correspondían a morfologías descritas en *C. albicans* durante el proceso de "switching", estudiado por Soll y colaboradores, y por lo tanto, se denominaron con la nomenclatura propuesta por dichos autores (Radford *et al.*, 1994; Slutsky *et al.*, 1985, 1987; Soll *et al.*, 1987).

Por un lado, tras choque a 41°C en medio de cultivo YPG, la cepa  $\Delta$ UBI4-H1, utilizada como control, presentó una morfología colonial del tipo "smooth-white" (SW) o "original smooth". El mutante nulo  $\Delta$ UBI4-6, cuando el choque se dió a las placas sembradas con células (200 UFC) en fase estacionaria, originó colonias de tipo "heavy myceliated" (HM) ó colonias medusa, y, en menor porcentaje, colonias tipo "myceliated" (M), "fuzzy" (F) e "intermediate-ring-heavy myceliated" (IRHM) (Fig. III.26 A); y cuando el choque se dió al cultivo de la cepa  $\Delta$ UBI4-6 en fase estacionaria antes de hacer las diluciones y sembrar las placas, se originaron colonias del tipo SW, colonias SW con un sector central "wrinkled" denominadas "intermediate-smooth-white-wrinkled" (ISWW), colonias "intermediate-fuzzy-star" (IFST), colonias "original smooth" con un sector M (SW/M) y colonias "original smooth" con un sector wrinkled (SW/W) (Fig. III.26 B).

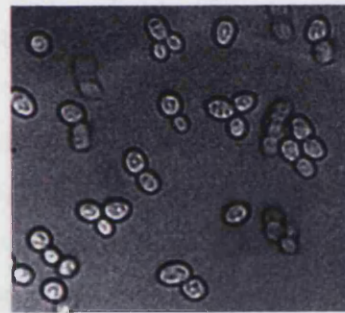
En medio de cultivo SG, tras someter a los cultivos en fase estacionaria a un choque a 41°C, diluirlos y plaquear, la morfología de las colonias de la cepa control fue también del tipo "smooth-white" (SW), mientras que el mutante nulo presentó, además de este tipo de colonia, una morfología SW con un halo miceliado bastante espeso alrededor (SW-hm) (Fig. III.26 C).

Estas morfologías coloniales se observaron ya en las placas control, sembradas antes del choque térmico, por lo que este fenómeno no era consecuencia directa del mismo, aunque

**A**

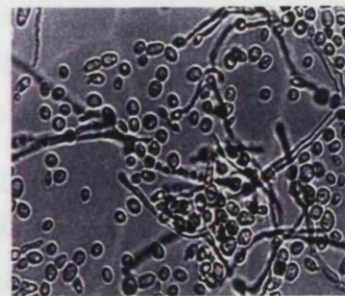
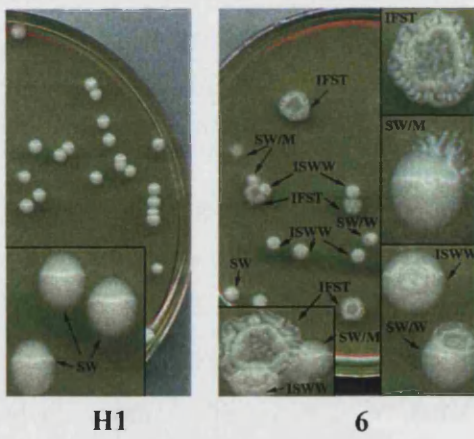


**D**



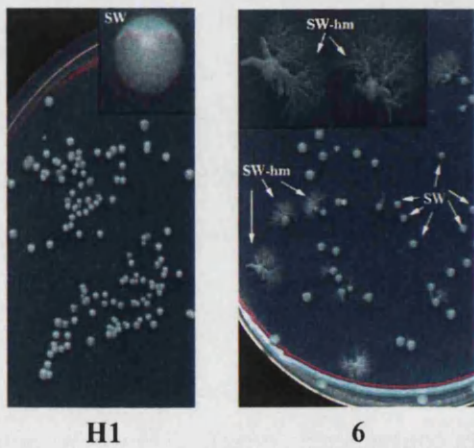
H1 (SW)

**B**



6 (HW)

**C**



el porcentaje de colonias con morfología diferente en el mutante aumentaba ligeramente con el choque térmico.

Al examinar al microscopio de contraste de fases la morfología de las células que formaban parte de las diferentes colonias, se comprobó que las colonias de tipo SW estaban formadas completamente por células en fase levaduriforme, mientras que el resto de los tipos de colonias contenían en su composición células en fase micelial, en mayor o menor proporción según el tipo de colonia (Fig. III.26 D). El diferente grado de crecimiento filamentoso (proporción de blastosporas, hifas verdaderas y pseudohifas), es responsable de las diferentes morfologías coloniales producidas por la cepa  $\Delta$ UBI4-6. Como se ha comentado anteriormente, esta variación colonial del mutante nulo *ubi4* de *C. albicans* es similar al sistema de switching fenotípico descrito por Soll y colaboradores (Radford *et al.*, 1994; Slutsky *et al.*, 1985, 1987; Soll *et al.*, 1987).

Esta capacidad de variación fenotípica colonial que presenta la cepa  $\Delta$ UBI4-6 puede ser considerada como un sistema de "switching" o "variación fenotípica". Dicho sistema en *C. albicans* debe diferenciarse de la transición levadura-micelio, porque ocurre de manera espontánea, a bajas frecuencias, y se identifica por variaciones reversibles en la morfología de las colonias, es heredable y en muchos casos implica más de dos morfologías diferentes (Soll *et al.*, 1993). Dentro de los sistemas de "switching" descritos en *C. albicans*, el presentado por la cepa  $\Delta$ UBI4-6 podría incluirse dentro del tipo: "smooth-heavy myceliated transition" (Soll *et al.*, 1993).

Puesto que la variación fenotípica colonial presentada por la cepa  $\Delta$ UBI4-6 parecía ser debida a la interrupción del gen de la poliubiquitina, independientemente de que el choque térmico pudiera aumentar la frecuencia de dicha variación, se procedió a estudiar los diferentes fenotipos caracterizables por la morfología de las colonias que aparecen al cultivar esta cepa en diferentes condiciones (medio de cultivo y temperatura) utilizándose la cepa

---

**Fig. III.26.** (Página anterior). Morfología colonial y celular del mutante nulo de *C. albicans* para el gen *UBI4* tras estrés térmico por calor crónico. Se muestra la morfología colonial obtenida en la cepa  $\Delta$ UBI4-6 y  $\Delta$ UBI4-H1 (control) tras distintos tratamientos. (A): células crecidas en YPG líquido a 28°C hasta fase estacionaria, se inocularon en placas de YPG (200 UFC/placa), se trataron a 41°C durante 24 h y seguidamente se incubaron a 28°C hasta la formación de colonias; (B): células crecidas en YPG líquido a 28°C hasta fase estacionaria, se incubaron a 41°C durante 24 h y seguidamente se inocularon en placas de YPG (200 UFC/placa) que fueron incubadas a 28°C hasta la aparición de colonias; (C): células crecidas en medio SG líquido a 28°C hasta fase estacionaria se inocularon directamente en placas de SG (200 UFC/placa) y se incubaron a 28°C hasta la formación de colonias. Las diferentes morfologías coloniales observadas se indican de acuerdo con la nomenclatura utilizada en el texto. En el panel D se muestra la morfología celular, obtenida mediante microscopía óptica de contraste de fases, de muestras tomadas de colonias SW de la cepa  $\Delta$ UBI4-H1 y de colonias HM de la cepa  $\Delta$ UBI4-6.

$\Delta$ UBI4-H1 como control. Para ello, células procedentes de un cultivo en medio mínimo SD sólido a 28°C, fueron diluidas en agua destilada estéril, sembradas en placas (200 UFC/placa) de distintos medios de cultivo y se incubaron a diferentes temperaturas. En la tabla III.8 se resumen las diferentes morfologías detectadas y el porcentaje en el que aparecían en cada caso.

| MEDIO DE CULTIVO | T <sup>a</sup> (°C) | CEPA  |  |
|------------------|---------------------|---|--|
|                  |                     | $\Delta$ UBI4-H1                                    | $\Delta$ UBI4-6  |
| YPD              | 28                  | SW → 100%   | SW → 63%<br>HW → 27%<br>SW/HW → 10%                          |
|                  | 37                  | SW → 100%   | HW → 95%<br>SW/HW → 5%                                       |
| YPG              | 28                  | SW → 90%<br>P → 10%                                 | SW → 10%<br>HM → 90%   |
|                  | 37                  | SW → 95%<br>P → 5%                                  | W, HW, ST, FR, SR, P → 94%<br>ISWW, IFST → 6%                |
| SD               | 28                  | SW → 100%   | SW → 2%<br>W, W-m, ST, P, HW-m → 93%<br>IRW, ISWW, IRHW → 5% |
|                  | 37                  | SW → 4%<br>W → 2%<br>ISWW, ISTW → 94%               | SW → 2%<br>HW, W, P → 97%<br>ISWW, IRW → 1%                  |
| SG               | 28                  | SW → 100%   | SW → 11%<br>SW-hm, SW-m → 89%                                |
|                  | 37                  | SW → 100%   | SW → 9%<br>SW-hm, SW-m → 91%                                 |
| Lee              | 28                  | SW → 20%<br>R, SW-m → 80%                           | FE → 100%  |
|                  | 37                  | SW → 5%<br>HW-hm, W-hm → 55%<br>IRST, IRST-hm → 40% | FE → 100%  |

**Tabla III.8.** Proporción de las diferentes morfologías coloniales obtenidas tras crecimiento de las cepas  $\Delta$ UBI4-H1 y  $\Delta$ UBI4-6 en diferentes condiciones (medio de cultivo y temperatura de incubación). Las células se inocularon en los diferentes medios (200 UFC/placa) (véase texto para más detalle) y se incubaron hasta la formación de colonias. En color negro se indica el porcentaje de colonias smooth-white (SW); en color rojo el de cualquier otra morfología diferente: wrinkled (W), petite (P), ring (R), stippled-ring (SR), flat-ring (FR), hyper-wrinkled (HW), fried-egg (FE), heavy-myceliated (HM), star (ST), fuzzy (F), y en color azul las morfologías intermedias; "m" indica la presencia de un pequeño halo micelial alrededor de la colonia y "hm" un halo micelial muy espeso alrededor de la colonia.

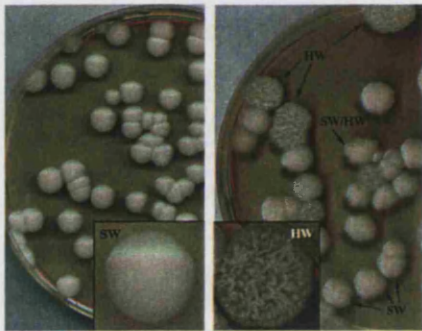
Las colonias de tipo smooth-white (SW; Fig. III.27), presentan el borde regular y una textura homogénea, siendo de color blanquecino-cremoso, y al microscopio de contraste de fases presentan una composición enteramente de blastosporas. En las morfologías coloniales obtenidas diferentes a la SW, aparecen en su composición micelios en mayor ó menor proporción, según el tipo de colonia (Fig. III.27). Las colonias de tipo "wrinkled" (W), son cóncavas, y están delimitadas por un grueso borde irregular del que emanan nerviaciones que convergen de forma irregular hacia el centro de la colonia; las de tipo "hyper-wrinkled" (HW), son como las "wrinkled" pero con más nerviaciones; las de tipo "star" (ST), son parecidas a las "wrinkled" pero con forma de estrella; las de tipo "petite" (P), son morfológicamente semejantes a las smooth-white, aunque tienen un diámetro sensiblemente inferior; las colonias de tipo "ring" (R), tienen un borde grueso que puede llegar a representar más de un tercio del radio de la colonia, con una parte central ligeramente convexa, y de textura suavemente granulosa; las denominadas "stippled-ring" (SR), presentan un borde grueso semejante al de las colonias "ring", pero a diferencia de éstas la parte central de la colonia está más deprimida y tiene una textura mucho más rugosa; las colonias de tipo "flat-ring" (FR), son muy semejantes a las "stippled-ring" aunque mucho más aplanadas; las de tipo "fuzzy" (F), exhiben un perímetro irregular que queda delimitado por un borde grueso, la parte central de la colonia es cóncava, de textura lisa y de ella emanan micelios aéreos con profusión; las de tipo "fried-egg" (FE), con forma de huevo frito, presentan una colonia parecida a las "smooth-white" en el centro con un espeso micelio alrededor, y las "heavy-myceliated" (HM), presentan un denso micelio homogéneamente distribuido. En algunos casos las morfologías coloniales obtenidas presentan un aspecto intermedio entre dos de las morfologías básicas descritas anteriormente. Además algunas colonias (en diferente porcentaje según las condiciones de cultivo) presentan diferentes partes: un sector muestra una determinada morfología y otro sector de la misma colonia presenta la morfología smooth-white (Fig. III.27). Este fenómeno se debe a cambios fenotípicos ocurridos de manera temprana en el desarrollo colonial, que son estables y continúan expresándose fenotípicamente (Soll, 1992), siendo ésta una de las características del fenómeno de "switching" o "variación fenotípica" (Soll, 1992; Soll *et al.*, 1993).

Como puede observarse en la tabla III.8, la cepa  $\Delta$ UBI4-H1 (control), presenta únicamente o mayoritariamente colonias del tipo SW, compuestas por células levaduriformes (Fig. III.27 B), en todas las condiciones ensayadas, excepto en SD a 37°C y Lee a 28 y 37°C donde predominan otras morfologías coloniales. En cambio, la cepa  $\Delta$ UBI4-6, siempre

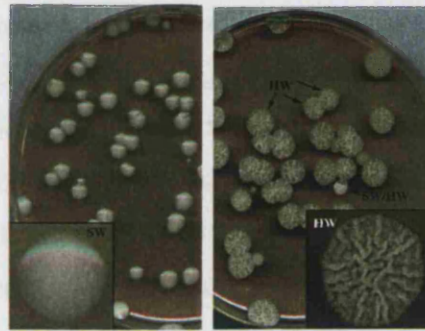
# A

## YPD

28°C

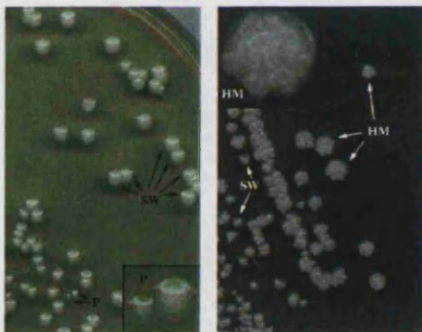


37°C

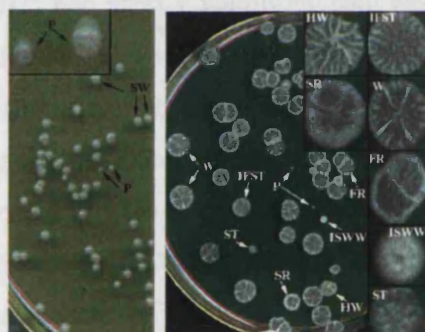


## YPG

28°C

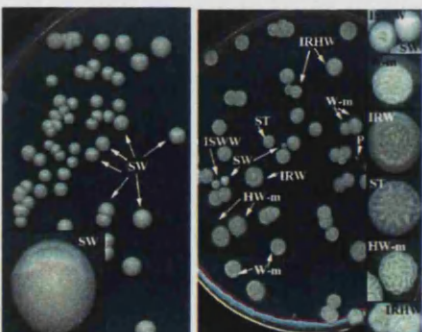


37°C

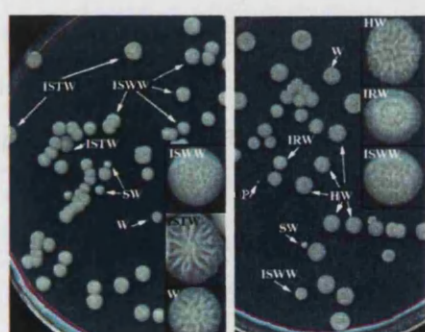


## SD

28°C

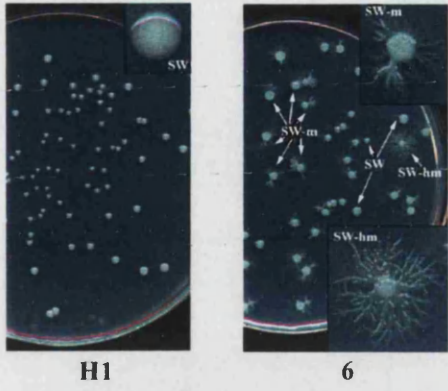


37°C

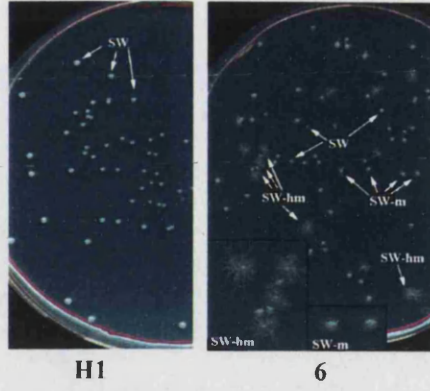


SG

28°C

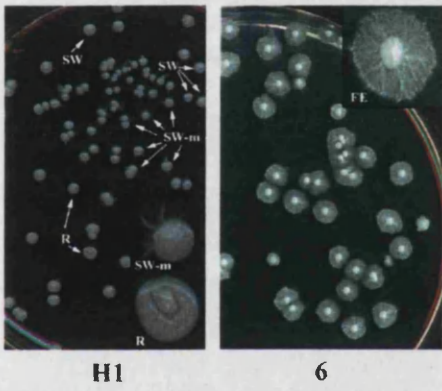


37°C

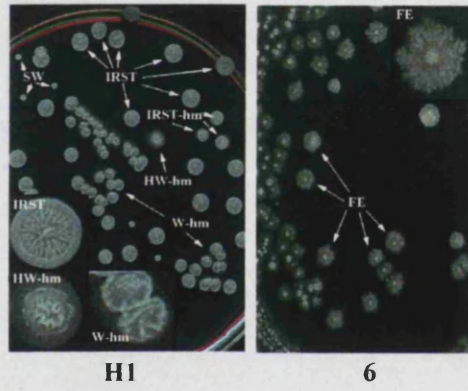


Lee

28°C

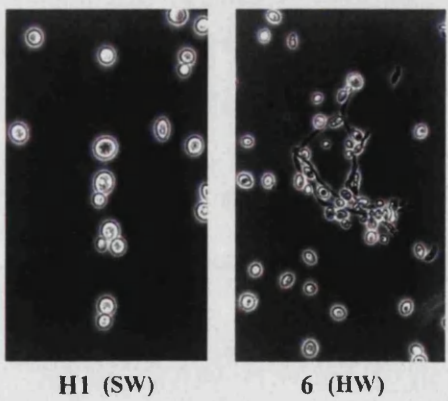


37°C

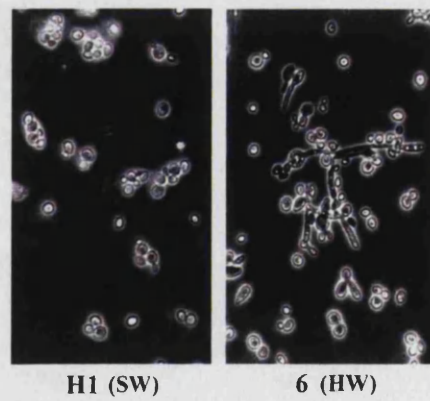


B

28°C



37°C



presenta un porcentaje mayor de colonias con morfologías diferentes de la SW que la cepa control, en todos los medios de cultivo probados y a ambas temperaturas. Las diferentes morfologías coloniales están compuestas por una mezcla de diferentes morfologías celulares tal y como se ha comentado anteriormente. En la figura III.27 B se muestra la morfología de una colonia tipo HW como representativa. Por lo tanto, el mutante nulo *ubi4* de *C. albicans* presenta una alta frecuencia de aparición de colonias diferentes del tipo smooth normal (SW), que suelen incluir dos ó más tipos diferentes en el mismo medio de cultivo y temperatura. Esta frecuencia de variación fenotípica colonial es muy superior a la observada en la cepa control, particularmente en YPD, YPG, SG, a ambas temperaturas, y SD a 28°C. En aquellas condiciones en las que el control muestra también una elevada variación fenotípica (SD a 37°C y Lee a 28 y 37°C), los fenotipos observados son distintos a los mostrados por el mutante nulo en las mismas condiciones. Si comparamos los resultados obtenidos en cada medio de cultivo a ambas temperaturas, cabe resaltar que en medio rico (YPD) es donde se observa un mayor efecto de la temperatura sobre la variación colonial en el mutante nulo, mientras que en la cepa control no hay diferencias en YPD a ambas temperaturas.

Dado que la frecuencia de variación colonial presentada por la cepa  $\Delta$ UBI4-6, se incrementa con la temperatura (mayor a 37°C que a 28°C, particularmente en medio rico, YPD), y también lo hacía bajo choque térmico por calor crónico, como se ha descrito anteriormente, se procedió a estudiar la capacidad de formación de tubos germinativos siguiendo el método clásico de nuestro laboratorio (Casanova *et al.*, 1989), que implica un choque térmico a 37°C en medio de Lee precalentado, a partir de células en reposo metabólico, 24 h a 4°C. Para ello, se cultivaron las cepas  $\Delta$ UBI4-6 y  $\Delta$ UBI4-H1, como control, en medio de Lee a 28°C. La cepa  $\Delta$ UBI4-H1, creció como cabía esperar, como levaduras gemando (Fig. III.28 B), mientras que el mutante nulo había miceliado perfectamente (Fig. III.28 B). Estos resultados indican que el gen de la poliubiquitina mantiene bloqueada "la miceliación" en condiciones normales, siendo esencial para la represión de la miceliación, puesto que las células del mutante nulo, sin poliubiquitina,

---

**Fig. III.27.** (Doble página anterior). Variantes fenotípicas coloniales y morfología celular del mutante nulo de *C. albicans* para el gen *UBI4* en diferentes condiciones de medio de cultivo y temperatura. Las cepas  $\Delta$ UBI4-H1 (control) y  $\Delta$ UBI4-6 se sembraron en placas de diferentes medios de cultivo (200 UFC/placa), a partir de una suspensión de células en agua destilada estéril (véase texto para más detalle), y se incubaron seguidamente a diferentes temperaturas (28 y 37°C) durante 2-7 días según las condiciones. Panel A: morfología colonial. Las diferentes morfologías observadas se indican mediante las abreviaturas utilizadas en el texto. Panel B: morfología celular, obtenida mediante microscopía óptica de contraste de fases, de muestras tomadas de colonias SW de la cepa  $\Delta$ UBI4-H1 y de colonias HW de la cepa  $\Delta$ UBI4-6.



micelian perfectamente en condiciones en las que la cepa heterocigótica no lo hace. Este mismo efecto se observó en medio de Lee sólido a las temperaturas de 28°C y 37°C, obteniéndose en el mutante nulo un 100% de colonias de tipo FE, como se refleja en la tabla III.8. Por lo tanto, hay una correlación entre la formación del tubo germinativo y el "switching" colonial; esta correlación se observa perfectamente en el medio de Lee a 28°C. En los demás casos, no se ha determinado la capacidad de miceliación del mutante nulo en medios líquidos, pero la alta frecuencia de "switching" observada indica que el mutante nulo es capaz de producir micelios, en mayor o menor proporción, en condiciones en las que el control crece exclusivamente como levadura (particularmente a 28°C).

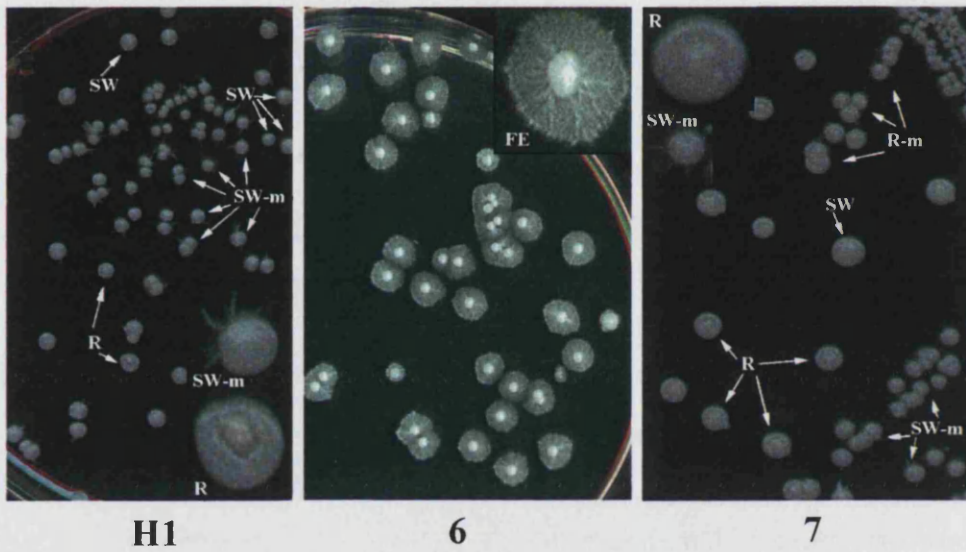
A continuación, para confirmar que la expresión de *UBI4* está implicada en fenómenos de miceliación, se incluyó en el estudio, el mutante nulo condicional para la poliubiquitina,  $\Delta$ UBI4-7, en el que se puede controlar la expresión de *UBI4*. En medio de Lee líquido (28°C) y sólido (28 y 37°C) y en condiciones en las que el gen *UBI4* se expresa bajo el control del promotor *MET3*, la cepa  $\Delta$ UBI4-7 se comporta de manera similar a la cepa control (pues en ambas se expresa el gen *UBI4*) mostrando el mutante nulo ( $\Delta$ UBI4-6) un fenotipo colonial y celular distinto, debido a que micelia en estas condiciones (Tabla III.9 y Fig. III.28). Al adicionar aminoácidos al medio de Lee para bloquear la expresión de *UBI4* regulada por *MET3*, el resultado no es tan claro puesto que en la cepa control se induce la formación de micelio (en medio líquido a 28°C) con el consiguiente aumento de variación colonial. Aún así, en medio sólido a 28°C, el mutante nulo condicional ( $\Delta$ UBI4-7) se comporta de manera similar al mutante nulo ( $\Delta$ UBI4-6) (Tabla III.9 y Fig. III.28). Cabe comentar que el fenotipo observado en el mutante nulo condicional en condiciones de represión se parece bastante al observado en el mutante nulo, aunque no es idéntico, lo que podría deberse a la expresión basal del promotor *MET3* (1%), aún en condiciones de represión (Care *et al.*, 1999).

Estos resultados demuestran que la alta frecuencia de variación fenotípica colonial y la capacidad de miceliación era una consecuencia directa de la interrupción del gen *UBI4*. Se ha observado claramente con los resultados obtenidos, que existe una relación entre la ausencia de poliubiquitina y la miceliación, puesto que (i) las colonias con morfología diferente de la SW, lo son porque las células que la forman micelian (en mayor o menor proporción) y (ii) en medio de Lee a 28°C el mutante nulo micelia mientras que la cepa control crece como levadura. Sin embargo, la relación entre la ausencia de poliubiquitina y el fenómeno de "switching" no se ha estudiado directamente en este trabajo, puesto que para ello, se debería analizar la morfología colonial en múltiples resiembras para determinar la frecuencia de

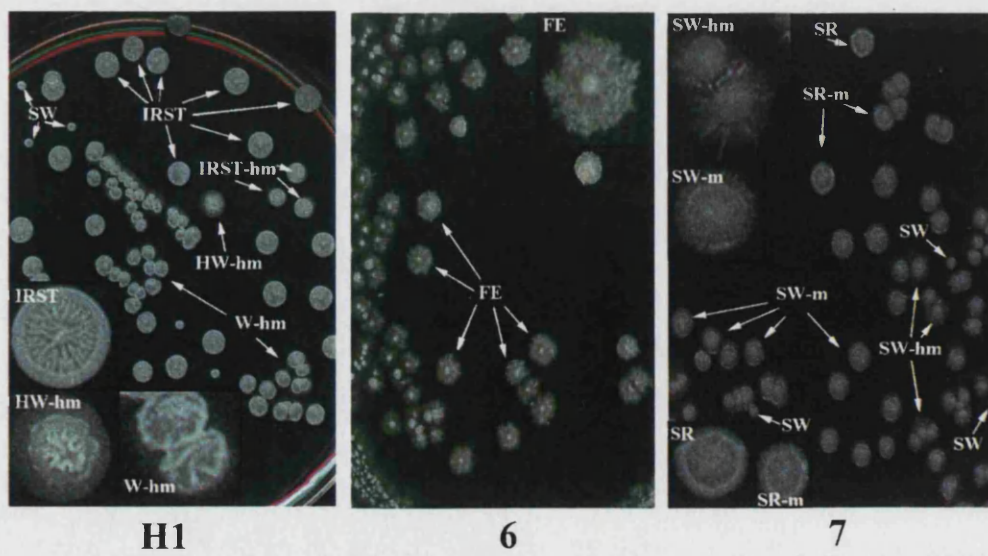
**A**

**Lee**

**28°C**

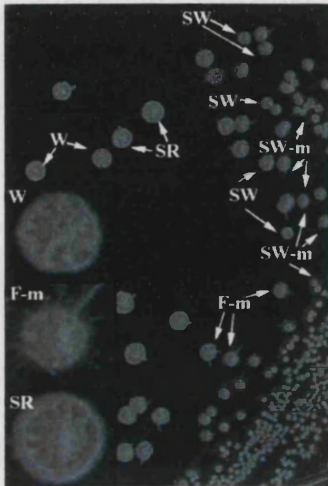


**37°C**

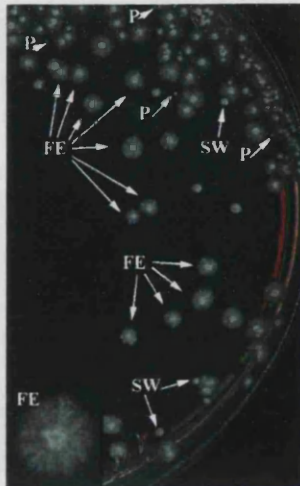


Lee+aa

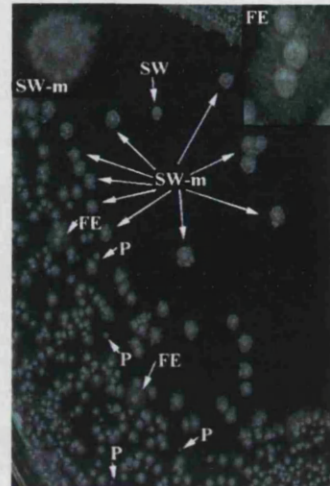
28°C



H1

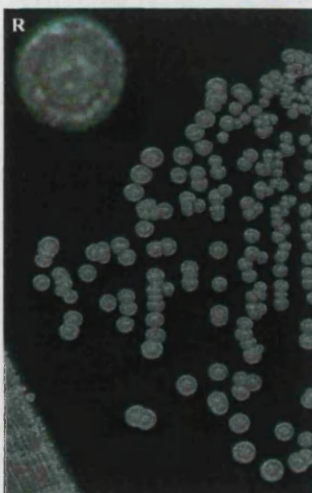


6

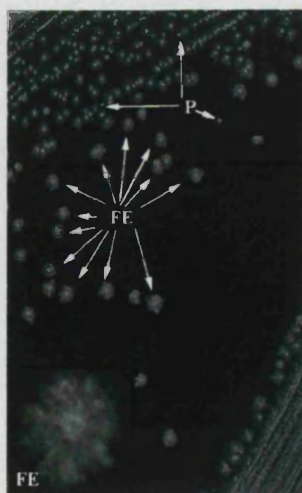


7

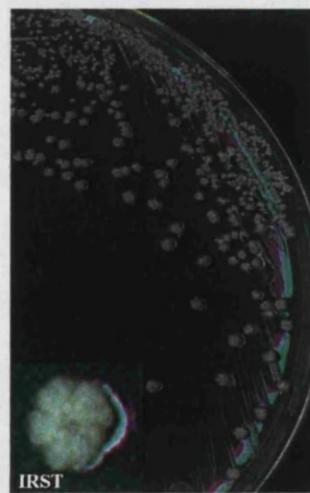
37°C



H1

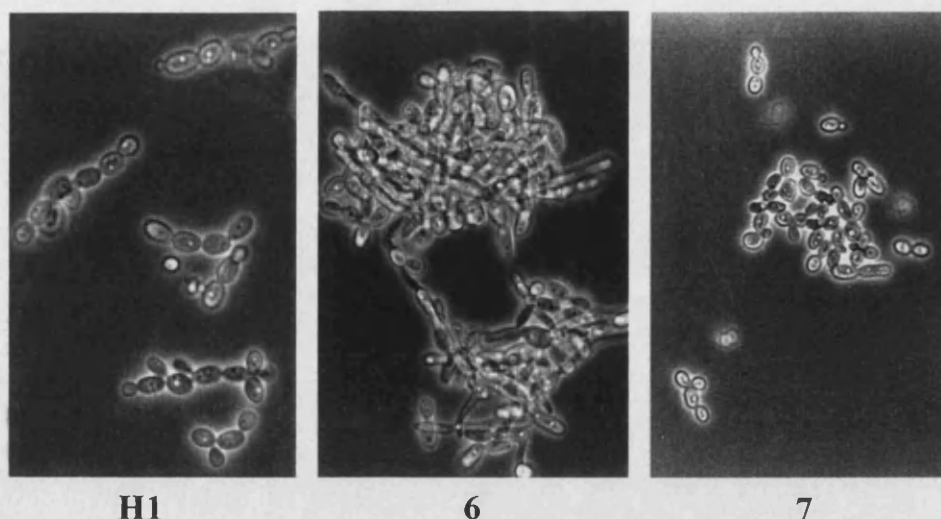


6



7

## B



**Fig. III.28.** Variantes fenotípicas coloniales y morfología celular del mutante nulo y mutante nulo condicional de *C. albicans* para el gen *UBI4*. Las cepas  $\Delta$ UBI4-6,  $\Delta$ UBI4-7 y  $\Delta$ UBI4-H1 (control) se sembraron (200 UFC/placa) en placas con medio de Lee en presencia y ausencia de los aminoácidos represores del promotor *MET3*, a partir de una suspensión celular en agua destilada estéril (véase texto para más detalle), y se incubaron a 28 y 37°C hasta la formación de colonias. Panel A: morfología colonial presentada por estas cepas en estas condiciones. Las diferentes morfologías se indican mediante las abreviaturas utilizadas en el texto. Panel B: morfología celular, obtenida mediante microscopía óptica de contraste de fases, de células de las diferentes cepas crecidas en medio de Lee líquido a 28°C.

variación fenotípica a partir de cada morfología colonial, puesto que cabe la posibilidad de que la morfología colonial sea estable, lo que descartaría el fenómeno de "switching". De todos modos, hay ciertas evidencias para decir que la cepa  $\Delta$ UBI4-6 presenta un alto porcentaje de "switching": a) en diferentes condiciones de cultivo (diferentes medios de cultivo y diferentes temperaturas), como son YPD (28 y 37°C), YPG (28 y 37°C), SD (28°C), y SG (28 y 37°C), el 100% de las células de la cepa  $\Delta$ UBI4-H1 presentan una morfología SW, mientras que las de la cepa  $\Delta$ UBI4-6, presentan diferentes morfologías coloniales al mismo tiempo; y b) la cepa  $\Delta$ UBI4-6 presenta colonias sectoreadas en ciertas condiciones.

Los resultados obtenidos indican que la poliubiquitina tiene importantes funciones en la biología de *C. albicans*. Además de participar en la respuesta a estrés térmico, la ubiquitina está implicada en el control de los mecanismos que regulan el "switching" fenotípico y la

morfología celular. De este modo, la expresión del gen *UBI4* mantendría bloqueada la capacidad de formar tubo germinativo en condiciones en las que la célula crece como levadura, y a la vez, mantendría unos niveles bajos de "switching". Un defecto de ubiquitina en las mismas condiciones, induciría la miceliación y el cambio fenotípico.

| MEDIO DE CULTIVO | TIPO    | Tª(°C) | CEPA  |                        |  |
|------------------|---------|--------|---|------------------------|--|
|                  |         |        | ΔUBI4-H1  | ΔUBI4-6                | ΔUBI4-7                                      |
| Lee              | Sólido  | 28     | SW → 20 %<br>SW-m, R → 80%                          | FE → 100%              | SW → 10%<br>R, SW-m, R-m<br>→ 90%            |
|                  |         | 37     | SW → 5%<br>HW-hm, W-hm → 55%<br>IRST, IRST-hm → 40% | FE → 100%              | SW → 4%<br>SW-m, SW-hm,<br>SR, SR-m<br>→ 96% |
|                  | Líquido | 28     | levaduras<br>gemando                                | micelio<br>corto       | levaduras<br>agrupadas                       |
| Lee + aa         | Sólido  | 28     | SW → 40%<br>F, SR, W, SW-m →<br>60%                 | SW → 5%<br>FE, P → 95% | SW → 3%<br>FE, P, SW-m<br>→ 97%              |
|                  |         | 37     | R → 100%  | FE, P → 100%           | IRST → 100%                                  |
|                  | Líquido | 28     | micelio<br>largo                                    | micelio<br>largo       | micelio<br>largo                             |

**Tabla III.9.** Proporción de las diferentes morfologías coloniales obtenidas tras crecimiento de las cepas ΔUBI4-H1, ΔUBI4-6 y ΔUBI4-7 en medio de Lee sólido, en presencia y ausencia de los aminoácidos represores del promotor *MET3*. En medio sólido las células se inocularon (200 UFC/placa) (véase texto para más detalle) y se incubaron hasta la formación de colonias. En color negro se indica el porcentaje de colonias smooth-white (SW); en color rojo el de cualquier otra morfología diferente: wrinkled (W), petite (P), ring (R), stippled-ring (SR), hyper-wrinkled (HW), fried-egg (FE), fuzzy (F), star (ST), y en color azul las morfologías intermedias; "m" indica la presencia de un pequeño halo micelial alrededor de la colonia, "hm" indica que el halo micelial es espeso, y "aa" adición al medio de cultivo de los aminoácidos represores del promotor *MET3*. Se indica además la morfología celular obtenida mediante microscopía óptica de contraste en los medios de cultivo líquidos a 28°C.

El posible mecanismo por el que la ubiquitina controlaría este proceso es desconocido, pero dado que la ubiquitina y la ubiquitinación actúan marcando proteínas para su rápida degradación, es muy posible que este sea el mecanismo implicado: la ubiquitina sería necesaria para mantener niveles bajos o nulos de proteínas implicadas en la miceliación o

"switching", procesos muy complejos en los que intervienen múltiples factores (Fig. III.29). Alternativamente, la ubiquitinación de algunas proteínas podría regular su función (activándolas o desactivándolas reversiblemente, según estén ubiquitinadas o no), y de esta manera controlar los procesos anteriormente citados (Fig. III.29). De hecho hay receptores de membrana que se regulan (activan e inactivan reversiblemente) por ubiquitinación (Ciechanover, 1994; Hicke & Riezman, 1996; Kölling & Hollenberg, 1994; Paolini & Kinet, 1993; Roth & Davis, 1996).

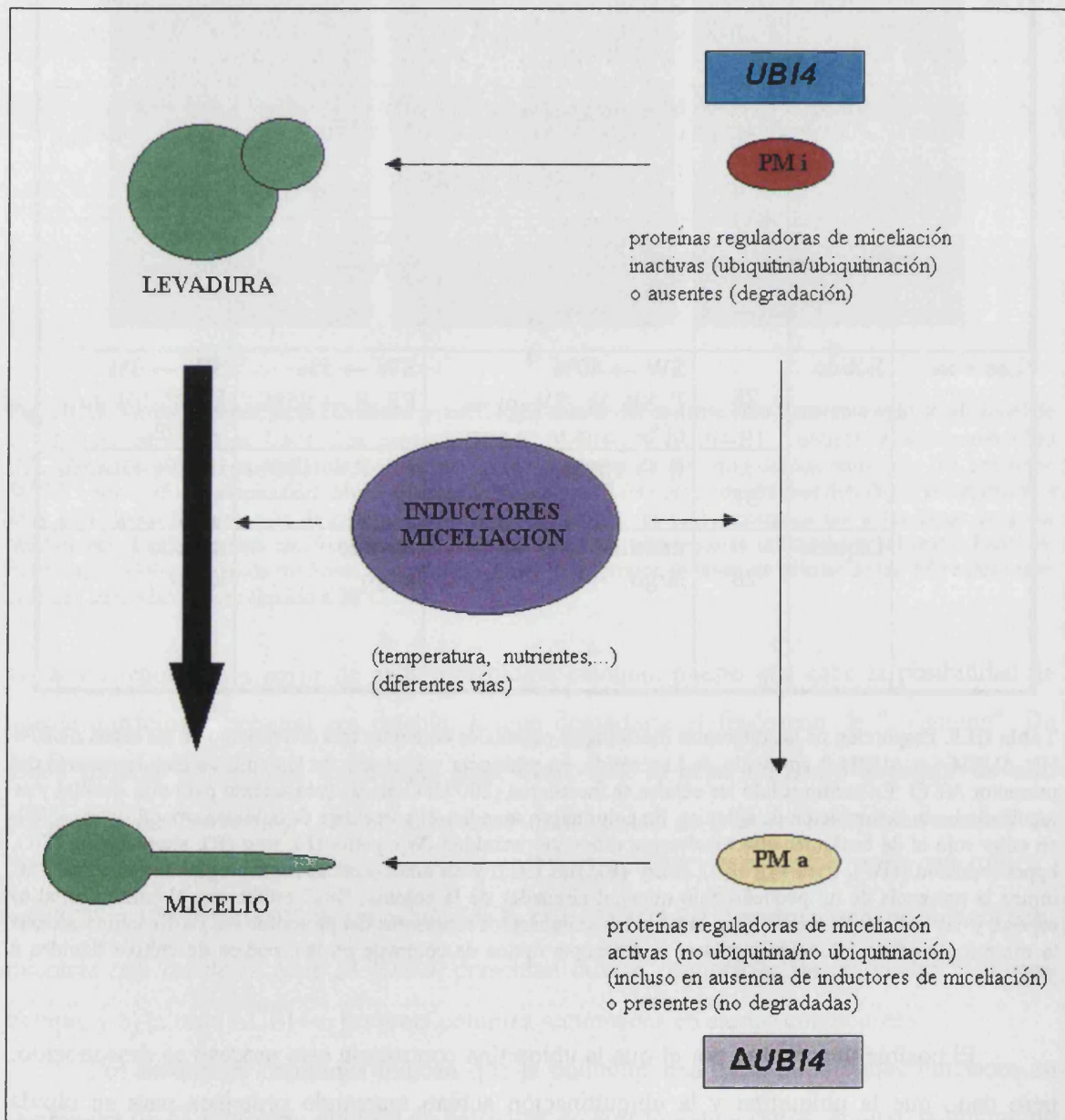


Fig. III.29. Esquema hipotético de la posible función de la ubiquitina (*UBI4*) en la transición morfológica levadura-micelio.

## **2.- AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN *UBI3* DE *C.albicans***

### **2.1.- Rastreo de una librería genómica empleando un cDNA de poliubiquitina como sonda.**

Tras el rastreo de una librería genómica construida a partir de DNA cromosomal de la cepa WO-1 de *C. albicans* en el vector plasmídico pEMBLYe23 (Baldari & Cesareni, 1985), empleando como sonda el cDNA de 0.9 kb de la poliubiquitina de *C. albicans*, con objeto de aislar los genes que codificasen proteínas relacionadas con la ubiquitina en *C. albicans*, se obtuvieron trece clones positivos (véase apartado 1.1).

### **2.2.- Análisis del DNA cromosomal de los clones aislados.**

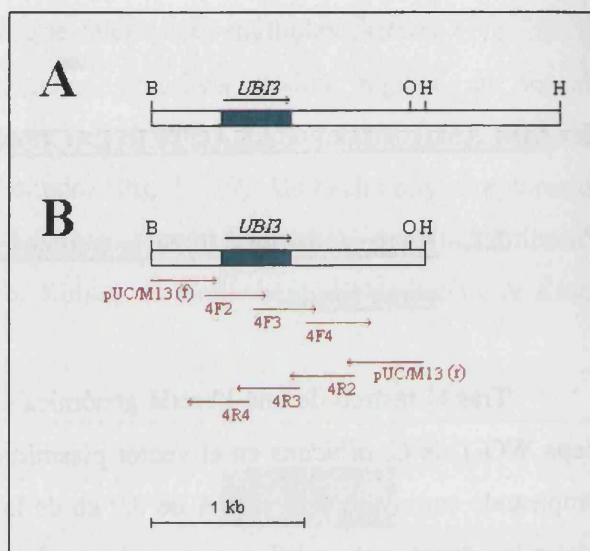
Doce de los clones aislados en el rastreo eran idénticos (pPR1) y contenían el gen *UBI4* de *C. albicans*, descrito anteriormente. En este apartado se describen los resultados obtenidos en el análisis del otro clon aislado (pPR2), que también está relacionado con la ubiquitina y que es diferente de pPR1.

#### **2.2.a.- Mapa de restricción de pPR2.**

Como se explica en el apartado 1.2, los dos clones diferentes aislados (pPR1 y pPR2) en el rastreo de la librería genómica corresponden a dos genes distintos. Con objeto de determinar la localización del gen dentro del inserto genómico de 2.8 kb del plásmido pPR2, se procedió, en primer lugar, a determinar el mapa de restricción del plásmido (Fig. III.30 A).

El análisis mediante Southern blot para determinar los fragmentos de restricción que hibridaban con la sonda de cDNA, permitió localizar el gen en un fragmento de restricción *HindIII*/*BamHI* de 1.85 kb (Fig. III.2 D, calle 2).

**Fig. III.30.** Panel A: Mapa de restricción del fragmento de DNA genómico de *C. albicans* clonado en el plásmido pPR2. La región codificante (ORF) del gen *UBI3* aparece en color verde. La flecha indica el mRNA transcrito. Dianas de enzimas de restricción: H (*Hind*III), O (*Xho*I), B (*Bam*HI). Panel B: Estrategia de secuenciación del gen *UBI3*. Las flechas indican el inicio, la dirección y la longitud de los tramos secuenciados. Los oligonucleótidos empleados se describen en la tabla III.10.



### 2.2.b.- Secuenciación del gen *UBI3* y análisis de la secuencia.

El fragmento *Hind*III/*Bam*HI de 1.85 kb del plásmido pPR2 que contenía el gen de interés se subclonó en el mismo vector plasmídico, eliminando el fragmento *Hind*III/*Hind*III de 0.95 kb, para obtener un nuevo plásmido, que se denominó pPR4. El DNA plasmídico de pPR4 se empleó para secuenciar el gen de interés, según se describe a continuación.

La doble cadena del fragmento *Xho*I/*Bam*HI de 1.5 kb, se secuenció completamente empleando, en primer lugar, los oligonucleótidos universales de pUC/M13 "forward" y "reverse", y posteriormente, nuevos oligonucleótidos sintéticos deducidos de la región de DNA secuenciada (tabla III.10). La estrategia de secuenciación se indica en la figura III.30 B.

El análisis del fragmento de 1.490 pb secuenciado, muestra un marco abierto de lectura de 453 nucleótidos que codifica una proteína de 151 aminoácidos. Dicha proteína está formada por una unidad de ubiquitina (76 aminoácidos), seguida en su extremo carboxi-terminal de un péptido de 75 aminoácidos, no relacionado con la ubiquitina. La secuencia de aminoácidos de la subunidad de ubiquitina es idéntica a la de la ubiquitina del gen *UBI4* de *C. albicans* y a la de la ubiquitina de los genes *UBI1-4* de *S. cerevisiae*, lo que confirma que se trata de una proteína muy conservada entre especies (Finley & Chau, 1991; Finley & Varshavsky, 1985; Özkaynak *et al.*, 1987). La secuencia nucleotídica que codifica el péptido unido al extremo carboxi-terminal de la ubiquitina muestra una significativa homología con la correspondiente secuencia del gen *UBI3* de *S. cerevisiae*, que codifica la proteína S34 de la subunidad pequeña del ribosoma (Finley *et al.*, 1989; Finley & Chau, 1991; Özkaynak *et al.*,



| NOMBRE | SECUENCIA                  | LOCALIZACIÓN EN LA SECUENCIA GENÓMICA |            |
|--------|----------------------------|---------------------------------------|------------|
|        |                            | extremo 5'                            | extremo 3' |
| 4F2    | GATGAGATACAAATACTGGTGCGCC  | - 129                                 | - 105      |
| 4R4    | CAAGGTAATGGTTTTACCAGTTAAGG | 45                                    | 20         |
| 4F3    | GGTCTTGAGATTGAGAGGTGGTGG   | 207                                   | 230        |
| 4R3    | GCATCCCTTAGTTAGCCTTTAAGG   | 463                                   | 440        |
| 4F4    | CCACACATCCCCCCTTGCCCACCC   | 608                                   | 631        |
| 4R2    | TATGGCTTGGGATCGAAGTACGC    | 801                                   | 779        |

**Tabla III.10.** Oligonucleótidos sintéticos utilizados como cebadores en la secuenciación del gen *UBI3* de *C. albicans*. La posición de los extremos 5' y 3' está numerada respecto al sitio de inicio de la traducción. Nótese que los oligonucleótidos F y R hibridan con cadenas complementarias.

1987), por lo que a este gen de *C. albicans* se le denominó *UBI3*. La región codificante, al igual que en *S. cerevisiae*, no está interrumpida por ningún intrón, a diferencia de lo que ocurre en los genes *UBI1* y *UBI2* de *S. cerevisiae*. La secuencia del gen *UBI3* de *C. albicans* (Fig. III.31) se encuentra depositada en la base de datos del GenBank/EMBL con el número de acceso Y15608.

Al comparar las secuencias nucleotídicas de la ubiquitina de los genes *UBI3* de *C. albicans* y *S. cerevisiae*, se encontró una homología de un 90%, pero ésta disminuyó hasta un 77% al comparar las secuencias nucleotídicas del péptido ribosomal situado en el extremo carboxi-terminal de la ubiquitina, siendo la identidad de la secuencia de aminoácidos de este péptido de un 77%. Además este péptido contiene 75 aminoácidos en *C. albicans*, en lugar de los 76 encontrados en *S. cerevisiae* (Fig. III.32). Esto indica un menor grado de conservación de este péptido, aunque las secuencias de aminoácidos de las proteínas unidas al extremo carboxi-terminal de la ubiquitina en los genes híbridos de esta proteína (*UBI1-3* de *S. cerevisiae*) están también muy conservadas (Finley *et al.*, 1989; Finley & Chau, 1991; Özkaynak *et al.*, 1987).

Al igual que en el caso de *UBI4*, el uso de codones de *UBI3* en *C. albicans* (Tabla III.11), sigue el patrón descrito para los genes muy expresados (Lloyd & Sharp, 1992), lo que

indica preferencia por aquellos codones que son traducidos eficientemente (Bennetzen & Hall, 1982; Ikemura, 1982; Sharp *et al.*, 1986).

```

- 472                CCGGGGATCCGCTGATAGTTTT
                        BamHI
- 450    TATCTAAGCGAGAGTAAGTCTTGGCAAACCTACACAAAATAAGAGTTGGG
- 400    TCAGGGTTGCTATGTGTATAATTTTTAGCGTAGAATTTTATCTTAGTTTT
- 350    GGTA AAAATTGACTCGAAAATAAAAGTACCCCTAGAGATATGAAAGGAGG
- 300    GTCAA AVGTAGCAAAGAGATATGGTCAGTAACATGGCACAGTATTATATG
- 250    TCTCTGACCAGGCTTTGACATGTACCCACTGTCCAAGGTAAGTCGGAGGA
- 200    TTAGGGCTTAACCCTAATTTTTTGCACGTGACCCGCACAAAACAATTTTT
- 150    CAAGCTCTTTTTTTTTTTTTCTGATGAGATACAAATACTGGTGCGCCACCA
- 100    ATATAGTTTTCAAAACTTTTTTTCACTTCTTTTTTTTTTACACTAATCCCA
- 50     CATTTTTGGTAAGAAAGAAGCATAGCTATTTGCCGACAAGCCAATTCAAG

    1    ATG CAA ATT TTC GTC AAA ACC TTA ACT GGT AAA ACC
    1    M  Q  I  F  V  K  T  L  T  G  K  T

    37   ATT ACC TTG GAA GTT GAA TCT TCT GAC ACT ATT GAC
    13   I  T  L  E  V  E  S  S  D  T  I  D

    73   AAT GTC AAA TCC AAA ATT CAA GAC AAA GAA GGT ATT
    25   N  V  K  S  K  I  Q  D  K  E  G  I

    109  CCA CCA GAC CAA CAA AGA TTG ATT TTT GCT GGT AAA
    37   P  P  D  Q  Q  R  L  I  F  A  G  K

    145  CAA TTG GAA GAC GGT AGA ACT TTG TCT GAC TAC AAC
    49   Q  L  E  D  G  R  T  L  S  D  Y  N

    181  ATC CAA AAG GAA TCC ACC TTG CAC TTG GTC TTG AGA
    61   I  Q  K  E  S  T  L  H  L  V  L  R

                                P
    217  TTG AGA GGT GGT GGT AAG AAG AGA AAG AAG AAG GTC
    73   L  R  G  G  G  K  K  R  K  K  K  V

    253  TAC ACC ACC CCA AAG AAG ATC AAG CAC AAG CAC AGA
    85   Y  T  T  P  K  K  I  K  H  K  H  R
    
```

289 AAA CAC AAG TTG GCT GTT TTG ACT TAC TAC AAA GTT  
97 K H K L A V L T Y Y K V

325 GAC AAC GAA GGT AAC GTC GAA AGA TTG AGA AGA GAA  
109 D N E G N V E R L R R E

361 TGT CCA GCT CCA ACT TGT GGT GCC GGT ATT TTC ATG  
121 C P A P T C G A G I F M

397 GCC AAC ATG AAA GAC AGA CAA TAC TGT GGT AAA TGT  
133 A N M K D R Q Y C G K C

433 CAC TTG ACC TTA AAG GCT AAC TAA GGGATGCAATAGTAATAT  
145 H L T L K A N \* \* \*

475 AGTTGTATAGTATTTCTAATGTATTTTTTTATAAACCTTTTCCCAAAAAC

525 GAGTGTAGAATTTTGGTAGTTGTGCACGACATATTTTTTTTGTCCAACA

575 AAACGTAAACAAGTTTTAGAAATCTTTTTTGACCACACATCCCCCTTG

625 CCCACCCAGGATGAGTTTTTCTATTTATGAACTAGATGAGAATATAAAGA

675 AACTACTAACGGTAGACAACCTACCTCAATGGGTGTTCGGTCAACGATTTT

725 ATTGAAGAAATCAGTAAAGATCATTTTCTTAAAGGTGCTGAAGTCAACAA

775 CAAAGCGTACTTCGATCCCAAGCCATAACATCAGAACTTTTGAAAGTACT

←

825 TTGAGAGAATTGAAACAATTACAGGCAGAGGCCAATGAACAACGAGTAAA

875 GAATGAGAGACAAGTGGACTCGTATGAGTTGAAACATTCGGAGAACGTTT

925 TGGAGTTGAACCAACAAATTGCACGAGGCGACCAAGAAATTTGATATATT

975 GGACACCCAGATCCTGGACGTTTCTACGAAGGATTAACCCATTAGGGGAA

1025 TACGTTGAATAAAAATTACCAATTCTCGAGATCGAT  
XhoI

Fig III.31. Secuencia nucleotídica del gen *UBI3* de *C. albicans* y regiones adyacentes, introducida en la base de datos del GenBank/EMBL con el número de acceso Y15608. La secuencia está numerada respecto al lugar de inicio de la traducción. En la zona promotora se muestran cuatro posibles cajas TATA (en rojo y subrayadas) y una zona rica en CT seguida de secuencias CAAG (en verde y subrayado). Los codones de terminación de la traducción se indican con asteriscos. Las posibles señales de terminación de la transcripción y poliadenilación se muestran subrayadas. La secuencia de aminoácidos de la proteína codificada se indica con el código de una sola letra, numerándose desde el codón de inicio de la traducción. El extremo carboxi-terminal de la secuencia de la ubiquitina (glicina) está indicado con una flecha vertical. La posición de los sitios de restricción *Bam*HI y *Xho*I, que flanquean la región secuenciada, también se indican. Los extremos 5' y 3' del fragmento de 0.6 kb empleado como sonda específica de *UBI3* están señalados con flechas horizontales (207, 801).

*Aislamiento y caracterización de los genes UBI3 y UBI4 de C. albicans*

| AMINOÁCIDO | CODÓN | Nº   | USO (%) | AMINOÁCIDO | CODÓN   | Nº  | USO (%) |      |
|------------|-------|------|---------|------------|---------|-----|---------|------|
| Arg (R)    | AGA   | 10   | 100     | Gly (G)    | GGA     | 11  | 100     |      |
|            | AGG   | 0    |         |            | GGC     | 0   |         |      |
|            | CGA   | 0    |         |            | GGG     | 0   |         |      |
|            | CGG   | 0    |         |            | GGT     | 11  |         |      |
|            | CGT   | 0    |         |            |         |     |         |      |
|            | CGC   | 0    |         |            |         |     |         |      |
| Ser (S)    | TCA   | 5    | 40      | Val (V)    | GTA     | 8   | 62,5    |      |
|            | TCC   | 0    |         |            | GTC     | 5   |         |      |
|            | TCG   | 0    |         |            | GTG     | 0   |         |      |
|            | TCT   | 3    | 60      | Gln (Q)    | GTT     | 3   | 37,5    |      |
|            | AGT   | 0    |         |            | CAA     | 7   |         |      |
|            | AGC   | 0    |         |            | CAG     | 7   |         |      |
| CTG        | 0     |      |         |            |         |     |         |      |
| Asn (N)    | AAT   | 6    | 16,6    | His (H)    | CAC     | 5   | 100     |      |
|            | AAC   | 5    |         |            | CAT     | 5   |         |      |
| Lys (K)    | AAA   | 22   | 45,4    | Leu (L)    | CTA     | 14  | 14,2    |      |
|            | AAG   | 10   |         |            | CTC     | 0   |         |      |
|            |       | 12   |         |            | CTT     | 0   |         |      |
|            |       |      | TTA     |            | 2       |     |         |      |
|            |       |      | TTG     |            | 12      |     |         |      |
| Met (M)    | ATG   | 3    | 100     | Pro (P)    | CCA     | 5   | 100     |      |
| Ile (I)    | ATA   | 9    | 22,2    |            | CCC     | 5   |         |      |
|            | ATC   | 0    |         |            | CCG     | 0   |         |      |
|            | ATT   | 2    |         |            | CCT     | 0   |         |      |
|            | 7     | 77,7 |         |            |         |     |         |      |
| Thr (T)    | ACA   | 12   | 58,3    | Tyr (Y)    | TAC     | 5   | 100     |      |
|            | ACC   | 0    |         |            | TAT     | 5   |         |      |
|            | ACG   | 7    |         | 41,6       | Cys (C) | TGC | 4       | 100  |
|            | ACT   | 0    |         |            |         | TGT | 4       |      |
| Ala (A)    | GCA   | 6    | 33,3    | Trp        | TGG     | 0   |         |      |
|            | GCC   | 0    |         |            |         |     |         |      |
|            | GCG   | 2    |         | 66,6       | Phe (F) | TTC | 3       | 66,6 |
|            | GCT   | 0    |         |            |         | TTT | 2       |      |
|            | 4     |      |         | 1          | 33,3    |     |         |      |
| Asp (D)    | GAC   | 8    | 100     |            |         |     |         |      |
|            | GAT   | 8    |         |            |         |     |         |      |
| Glu (E)    | GAA   | 8    | 100     |            |         |     |         |      |
|            | GAG   | 8    |         |            |         |     |         |      |
|            |       | 0    |         |            |         |     |         |      |

El análisis de la zona promotora de *UBI3* permitió la identificación de cuatro posibles cajas TATA (Guarante, 1984; Struhl, 1987) situadas en las posiciones -384, -259, -122 y -101 con respecto al sitio de inicio de la traducción (Fig. III.31), que podrían actuar como señales de iniciación de la transcripción. Además se identificó en la posición -85 una zona rica en CT, seguida a cierta distancia por dos repeticiones de la secuencia CAAG en las posiciones -14 y -4, elementos que forman una secuencia nucleotídica bipartita encontrada en la región promotora de muchos genes de levadura (Dobson *et al.*, 1982; Klebl & Tanner, 1989).

En la región 3' no traducida, aparecen en las posiciones 466, 474, 482, 487, 498, 530, 541 y 558, las secuencias TAG...TAGT...TTT, presentes en muchos genes de levadura, y que actúan como posibles señales de terminación de la transcripción y poliadenilación del mRNA (Maneu *et al.*, 1996, 1997; Zaret & Sherman, 1982) (Fig. III.31).

|                      |    |  |
|----------------------|----|--|
| <i>C. albicans</i>   | 1  | GKKRKKKVYTTTPKKIKHKH <b>R</b> KHKLAVL <b>T</b> YYKVD                   |
| <i>S. cerevisiae</i> | 1  | GKKRKKKVYTTTPKKIKHKH <b>K</b> VKLAVLSYYKVD                             |
| <i>C. albicans</i>   | 34 | NEGN <b>V</b> ERLRRECP <b>A</b> PTCGAGIFMAN <b>M</b> KDRQYCGK          |
| <i>S. cerevisiae</i> | 34 | AEG <b>K</b> VTKLRRECS <b>N</b> PTCGAG <b>V</b> FLAN <b>H</b> KDRLYCGK |
| <i>C. albicans</i>   | 68 | CH <b>L</b> TLKAN  |
| <i>S. cerevisiae</i> | 68 | CH <b>S</b> VYKVNA   |

**Fig. III.32.** Comparación de las secuencias de aminoácidos de la proteína ribosomal codificada por el gen *UBI3* de *C. albicans* y *S. cerevisiae*. Los aminoácidos diferentes en las dos proteínas se indican en rojo y el aminoácido de más que se encuentra en la proteína de *S. cerevisiae* respecto a la de *C. albicans* se muestra en azul.

**Tabla III.11.** (Página anterior). Uso de codones del gen *UBI3* de *C. albicans*. Se muestra el número de veces que aparece cada codón y el uso relativo en %.

### **2.2.c.- Distribución de los cambios nucleotídicos entre las diferentes secuencias de ubiquitina de *UBI3* y *UBI4*.**

En el apartado 1.2.b se han comparado las secuencias nucleotídicas de las diferentes subunidades de ubiquitina del gen *UBI4* de *C. albicans*. Este análisis se completa ahora con la comparación de la secuencia nucleotídica de la ubiquitina del gen *UBI3* para determinar el número y la distribución de diferencias nucleotídicas (mutaciones espontáneas) entre dichas secuencias. El análisis de la distribución de diferencias nucleotídicas espontáneas entre distintos genes de una misma familia, puede aportar información sobre las relaciones evolutivas entre dichos genes, así como sobre los posibles mecanismos que dieron lugar a su aparición (Hohmann & Gozalbo, 1989). Este análisis puede realizarse mediante el cálculo de la divergencia entre diferentes genes, y entre distintas partes de un mismo gen (véase apartado 23.2 de "Materiales y Métodos"). Al comparar la secuencia nucleotídica de la ubiquitina de *UBI3* con la de la primera subunidad de ubiquitina de *UBI4* se observaron 24 diferencias nucleotídicas (homología del 89.4%), 28 cuando se comparó con la de la segunda (homología del 87.7%), y 21 cuando se comparó con la de la tercera copia (homología del 90.7%). Estas diferencias se encuentran, al igual que al comparar las secuencias de ubiquitina de *UBI4* entre sí, desigualmente distribuidas, de manera que la región 5' de la secuencia de ubiquitina de *UBI3* comparte con la primera copia de *UBI4* la mayoría de las diferencias nucleotídicas (6 de 8) que ésta tiene respecto a la segunda y tercera copia, y el extremo 3' de *UBI3* comparte con la tercera copia de *UBI4* sus diferencias (6 de 6) con la primera y la segunda copia (Fig. III.33). Además la secuencia de ubiquitina de *UBI3* presenta 14 cambios nucleotídicos presentes sólo en su secuencia. El análisis de la distribución de las diferencias nucleotídicas sugiere posibles eventos genéticos para explicar, de un modo muy preliminar, cómo las secuencias de ubiquitina de los genes *UBI3* y *UBI4* han podido originarse.

Después de una duplicación inicial para dar lugar a una secuencia de dos copias de ubiquitina (que serían la primera y la tercera de *UBI4*), el gen precursor de *UBI3* se originaría a partir del gen de la poliubiquitina por recombinación entre las dos repeticiones de ubiquitina dando lugar a la delección de una de ellas, resultando una secuencia de ubiquitina con el extremo 5' de la primera unidad y el extremo 3' de la segunda (la tercera en *UBI4*). Alternativamente, se podría originar el mismo resultado por un proceso de "slipped strand mispairing" a nivel de las secuencias repetidas durante la replicación, con la consiguiente eliminación de las secuencias intermedias. Existen evidencias que indican que las secuencias

|          |   |
|----------|---|
| UBI4 (1) | ATG CAA ATT TTC GTT AAA ACT TTG ACT GGT AAA ACC |
| UBI4 (2) | ATG CAA ATC TTT GTT AAA ACT TTA ACT GGT AAG ACT |
| UBI4 (3) | ATG CAA ATC TTT GTT AAA ACT TTA ACT GGT AAG ACT |
| UBI3     | ATG CAA ATT TTC GTC AAA ACC TTA ACT GGT AAA ACC |
| UBI4 (1) | ATT ACC TTA GAA GTC GAA TCT TCT GAC ACC ATC GAT |
| UBI4 (2) | ATC ACT TTG GAA GTC GAA TCT TCT GAC ACC ATC GAT |
| UBI4 (3) | ATC ACT TTG GAA GTC GAA TCT TCT GAC ACC ATC GAT |
| UBI3     | ATT ACC TTG GAA GTT GAA TCT TCT GAC ACT ATT GAC |
| UBI4 (1) | AAC GTC AAA TCC AAG ATC CAA GAC AAA GAA GGT ATT |
| UBI4 (2) | AAC GTC AAA TCC AAG ATC CAA GAC AAA GAA GGT ATT |
| UBI4 (3) | AAC GTC AAA TCC AAG ATC CAA GAC AAA GAA GGT ATT |
| UBI3     | AAT GTC AAA TCC AAA ATT CAA GAC AAA GAA GGT ATT |
| UBI4 (1) | CCA CCA GAC CAA CAA AGA TTG ATT TTC GCC GGT AAA |
| UBI4 (2) | CCA CCA GAT CAA CAA AGA TTG ATT TTC GCC GGT AAA |
| UBI4 (3) | CCA CCA GAC CAA CAA AGA TTG ATT TTC GCT GGT AAA |
| UBI3     | CCA CCA GAC CAA CAA AGA TTG ATT TTT GCT GGT AAA |
| UBI4 (1) | CAA TTA GAA GAT GGC AGA ACC TTG TCT GAC TAC AAC |
| UBI4 (2) | CAA TTA GAA GAT GGC AGA ACT TTG TCT GAC TAC AAC |
| UBI4 (3) | CAA TTA GAA GAT GGT AGA ACC TTG TCT GAC TAC AAC |
| UBI3     | CAA TTG GAA GAC GGT AGA ACT TTG TCT GAC TAC AAC |
| UBI4 (1) | ATC CAA AAA GAA TCT ACT TTA CAT TTG GTT TTA AGA |
| UBI4 (2) | ATC CAA AAA GAA TCT ACT TTA CAT TTG GTT TTA AGA |
| UBI4 (3) | ATC CAA AAA GAA TCT ACC TTG CAC TTG GTC TTG AGA |
| UBI3     | ATC CAA AAG GAA TCC ACC TTG CAC TTG GTC TTG AGA |
| UBI4 (1) | TTG AGA GGT GGT                                 |
| UBI4 (2) | TTG AGA GGT GGT                                 |
| UBI4 (3) | TTG AGA GGT GGT TTC                             |
| UBI3     | TTG AGA GGT GGT                                 |

**Fig. III.33.** Comparación de las secuencias de ubiquitina de los genes *UBI4* y *UBI3* de *C. albicans*. Las diferencias nucleotídicas encontradas en sólo una de las tres secuencias de *UBI4* están indicadas en color rojo; las encontradas en la secuencia de ubiquitina de *UBI3* comunes a las presentes en cualquier secuencia de ubiquitina de *UBI4* se indican también en color rojo y las encontradas sólo en la secuencia de ubiquitina de *UBI3* se indican en color azul.

## A

| Secuencias comparadas <sup>a</sup>               | nº diferencias | %    | Divergencia (%) |
|--|----------------|------|-----------------|
| <i>UBI4</i> (1) / <i>UBI4</i> (2)                | 10             | 17.5 | 20              |
| <i>UBI4</i> (1) / <i>UBI4</i> (3)                | 15             | 26.3 | 32.5            |
| <i>UBI4</i> (2) / <i>UBI4</i> (3)                | 9              | 15.8 | 17.7            |
| <i>UBI3</i> / <i>UBI4</i> (1)                    | 24             | 42.1 | 62              |
| <i>UBI3</i> / <i>UBI4</i> (2)                    | 28             | 49   | 80              |
| <i>UBI3</i> / <i>UBI4</i> (3)                    | 21             | 36.8 | 50.7            |
| <i>UBI3</i> / <i>UBI4</i> (1,3) <sup>b</sup>     | 15             | 26.3 | 32.5            |
| <i>UBI4</i> (2) / <i>UBI4</i> (1,3) <sup>b</sup> | 2              | 3.5  | 3.6             |

## B

| Secuencias comparadas <sup>a</sup> | nº diferencias | %    | Divergencia (%) |
|------------------------------------|----------------|------|-----------------|
| <i>UBI4</i> (1) / <i>UBI4</i> (2)  |                |      |                 |
| mitad 5'                           | 8              | 28   | 35              |
| mitad 3'                           | 2              | 7    | 7.4             |
| <i>UBI4</i> (1) / <i>UBI4</i> (3)  |                |      |                 |
| mitad 5'                           | 8              | 28   | 35              |
| mitad 3'                           | 7              | 24.5 | 29.8            |
| <i>UBI4</i> (2) / <i>UBI4</i> (3)  |                |      |                 |
| mitad 5'                           | 0              | 0    | 0               |
| mitad 3'                           | 9              | 31.6 | 41              |
| <i>UBI3</i> / <i>UBI4</i> (1)      |                |      |                 |
| mitad 5'                           | 11             | 38.6 | 54.2            |
| mitad 3'                           | 13             | 45.6 | 70.3            |
| <i>UBI3</i> / <i>UBI4</i> (2)      |                |      |                 |
| mitad 5'                           | 15             | 52.6 | 90.8            |
| mitad 3'                           | 13             | 45.6 | 70.3            |
| <i>UBI3</i> / <i>UBI4</i> (3)      |                |      |                 |
| mitad 5'                           | 15             | 52.6 | 90.8            |
| mitad 3'                           | 6              | 21   | 24.7            |

Tabla III.12. Diferencias nucleotídicas entre las secuencias de ubiquitina, en lugares que no afectan a la traducción (lugares silenciosos), y divergencia entre ellas. En la tabla A se ha realizado la comparación considerando toda la región codificante. En la tabla B se ha realizado la comparación considerando regiones determinadas de la secuencia codificante.

<sup>a</sup> El número entre paréntesis indica la copia de ubiquitina considerada del gen de la poliubiquitina.

<sup>b</sup> Se consideran únicamente las diferencias nucleotídicas encontradas en la primera secuencia comparada y que no están presentes en ninguna de las dos secuencias del segundo miembro de la comparación.



repetidas originan este tipo de mutaciones (delecciones) espontáneas (Ahne *et al.*, 1988; Albertini *et al.*, 1982; Gozalbo & Hohmann, 1989; Schaaper *et al.*, 1986). Este suceso habría ocurrido pronto después de la duplicación inicial, ya que la divergencia calculada entre la primera y la tercera copia de *UBI4* (32.5%) es la misma que la calculada para la secuencia de ubiquitina de *UBI3*, comparada con la primera y tercera copia del *UBI4* si consideramos sólo diferencias no compartidas con ninguna de ellas (Tabla III.12), lo que podría reflejar mejor la divergencia real. Obviamente, antes de la generación de la secuencia de *UBI3*, el locus *UBI* con dos copias de ubiquitina (precursor de *UBI4*) se habría extendido por el genoma probablemente mediante cambios no recíprocos en el cromosoma; un locus daría lugar al gen de la poliubiquitina (*UBI4*) y el otro al gen *UBI3*. Datos adicionales, tales como la localización cromosomal y las secuencias flanqueantes de *UBI4* y *UBI3*, son necesarios para proponer un modelo para este evento genético. En un segundo paso, la tercera copia de ubiquitina de la poliubiquitina (la segunda en la secuencia de *UBI4*) habría aparecido por "overreplicación" originada por "slipped strand mispairing" de las dos repeticiones iniciales durante la replicación, que originaría un lazo monocatenario con la secuencia que contiene el extremo 3' de la primera copia y el 5' de la segunda, que serviría como molde para la replicación. Esto explicaría que la segunda ubiquitina de *UBI4* (la última en aparecer), muestre los extremos 5' y 3' similares a los de la tercera y primera copia respectivamente. Este modelo podría también explicar que entre las secuencias de ubiquitina de *UBI4*, la primera y la tercera copia sean las más diferentes entre sí (Tabla III.12), y que la secuencia de ubiquitina de *UBI3* muestre la más baja homología y la más alta divergencia con la segunda copia de *UBI4* (Tabla III.12), ya que sus extremos 5' y 3' se originaron a partir de distintas secuencias de ubiquitina. El evento genético que dió lugar a la generación de la última ubiquitina habría ocurrido recientemente, ya que su secuencia sólo muestra dos diferencias nucleotídicas no compartidas con la primera y tercera subunidad de ubiquitina de *UBI4*.

El cálculo de la divergencia de la segunda copia, teniendo en cuenta todas las diferencias nucleotídicas, da lugar a un valor sobreestimado, ya que refleja la divergencia entre la primera y la tercera copia, que se mezclaron para generar la segunda copia (Tabla III.12). La divergencia mostrada por las regiones 5' y 3' de las regiones codificantes de las secuencias *UBI* también concuerda con esta hipótesis (Tabla III.12).

Hay una serie de datos que sugieren que el sistema de la ubiquitina ha aparecido más recientemente en *C albicans* que en *S. cerevisiae*:

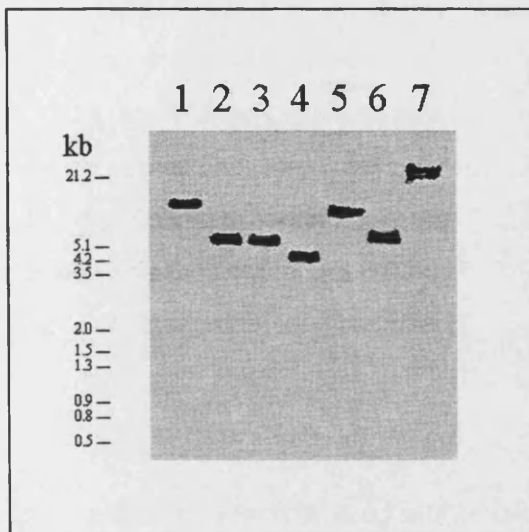
- (1) la organización del gen *UBI4* de *C. albicans* en tres subunidades de ubiquitina en lugar de las cinco encontradas en *S. cerevisiae*;
- (2) la mayor homología entre las distintas secuencias de ubiquitina de los genes *UBI4* y *UBI3* en *C. albicans* (88-96%) que en *S. cerevisiae* (80-90%);
- (3) la menor divergencia calculada para cada par de secuencias de ubiquitina en *C. albicans* (de 18 a 79%) que en *S. cerevisiae* (de 54% a más de 300%), y
- (4) los genes *UBI1* y *UBI2* que en *S. cerevisiae* codifican proteínas idénticas, posiblemente no están presentes en el genoma de *C. albicans* (véase apartado 2.2.d).

Este menor grado de evolución estructural puede estar correlacionado también con un menor grado de complejidad funcional, tal como se ha comentado anteriormente (apartado 1.6.B.3.a).

#### **2.2.d.- Southern blot.**

Para confirmar el mapa de restricción correspondiente al fragmento genómico clonado que contenía el gen *UBI3*, se analizó el DNA cromosomal de *C. albicans* ATCC 26555 mediante Southern blot, empleando una sonda específica del gen *UBI3* de *C. albicans*. Dicha sonda se obtuvo mediante amplificación por PCR, a partir del plásmido pPR4, con los oligonucleótidos 4F3 y 4R2, que hibridan en el extremo 5' de la secuencia codificadora del péptido específico de *UBI3* y a unas 350 pb del extremo 3' de esa secuencia, respectivamente (véase tabla III.10 y Fig. III.31). El amplificado obtenido, de aproximadamente 600 pb, se subclonó en el vector plasmídico pGEM-T dando lugar a un nuevo plásmido que se denominó pPR5. Esta sonda es específica de *UBI3*, puesto que carece de la secuencia de ubiquitina y contiene sólo la secuencia que codifica la proteína ribosomal de *UBI3* y unas 350 bp del extremo 3' no codificante. En todas las digestiones ensayadas se obtuvo una única señal de hibridación, lo que indica que en el genoma de *C. albicans* sólo existe una copia del gen *UBI3* (Fig. III.34), a la vez el tamaño de los fragmentos detectados confirmaba el mapa de restricción deducido para pPR2.

Las señales de hibridación obtenidas con la sonda específica de *UBI3* también se habían detectado utilizando como sonda el cDNA de la poliubiquitina en condiciones de hibridación no estrictas (véase Fig. III.4 A). Todas las señales detectadas en estas condiciones corresponden bien a *UBI4* o bien a *UBI3*, no apareciendo ninguna banda adicional



**Fig. III.34.** Análisis mediante Southern blot de DNA cromosomal de *C. albicans* ATCC 26555. Cada calle contiene 10 µg de DNA cromosomal digerido con *Hind*III, *Bam*HI, *Eco*RV, *Eco*RI, *Xba*I, *Sal*I, y *Pst*I (calles 1-7 respectivamente). Como sonda específica se utilizó el fragmento de 0.6 kb de DNA que contiene la región 3' de *UBI3* (véase texto).

correspondiente a otros genes. Estos resultados sugieren la ausencia de otros genes, distintos de *UBI4* y *UBI3*, de ubiquitina en el genoma de *C. albicans*. Esto está apoyado, además, por el hecho de que se aislaron únicamente estos dos genes (*UBI3* y *UBI4*) en el rastreo de la librería genómica. Sin embargo, esta familia está formada por cuatro genes en el genoma de *S. cerevisiae* y por tres en el de *K. lactis*. Los genes *UBI1* y *UBI2*, no detectados en el genoma de *C. albicans*, codifican una proteína, unida en su extremo carboxi-terminal a la ubiquitina, que es idéntica y forma parte de la subunidad grande del ribosoma. Esta proteína es necesaria, junto con la codificada por *UBI3*, para un ensamblaje eficiente de las subunidades ribosomales. Las secuencias que codifican estas proteínas ribosomales se han encontrado en muchas especies eucariotas, siempre unidas a secuencias de ubiquitina (Finley *et al.*, 1989; Finley & Chau, 1991). Sin embargo esta proteína ribosomal en *C. albicans* está codificada por una secuencia genómica independiente o no asociada a ubiquitina (contig 6-2408, *C. albicans* Sequencing Project, Stanford Genome Center, California), lo que indica que en *C. albicans* la biogénesis de esta proteína no está relacionada con la ubiquitina. Esta observación apoya la hipótesis anteriormente expuesta, de que el sistema de la ubiquitina en *C. albicans* está menos evolucionado que en otras especies.

### **2.3.- Análisis mediante Northern blot de la expresión de *UBI3* en *C.albicans*.**

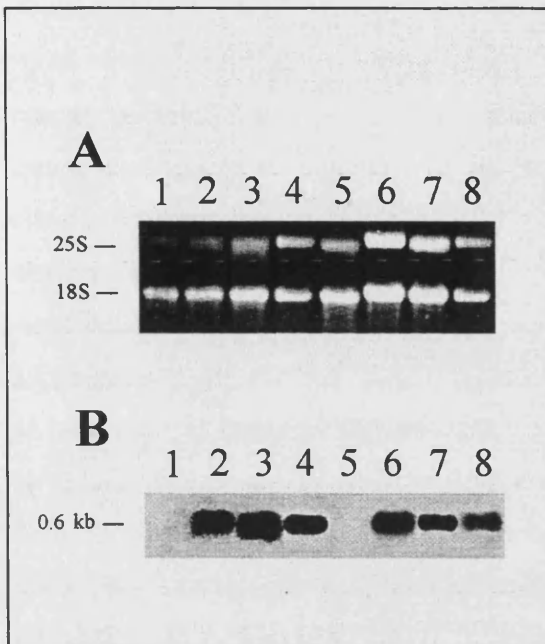
La expresión en diferentes condiciones ambientales del gen *UBI3* en la cepa ATCC 26555 de *C. albicans*, se determinó mediante análisis por Northern blot, utilizando la sonda específica de la región 3' del gen *UBI3* anteriormente descrita (véase apartado 2.2.d). El mRNA transcrito detectado fue de un tamaño aproximado de 0.6 kb, lo que concuerda con el tamaño del gen *UBI3* clonado (453 bp de región codificante, más los extremos 5' y 3' no traducidos).

#### **2.3.a.- Transición morfológica levadura-micelio.**

En primer lugar, al igual que se hizo con el gen *UBI4*, se estudió la expresión del gen *UBI3* en las dos morfologías del hongo: levadura y micelio. El mRNA transcrito fue detectado en niveles cuantitativamente similares en ambas morfologías, obtenidas tras incubar células en reposo metabólico durante 4 h a 28°C (levadura) y 37°C (micelio) respectivamente, en medio de Lee (Fig. III.35).

Como se ha descrito anteriormente, el gen *UBI3* de *C. albicans* codifica una proteína ribosomal unida a ubiquitina por el extremo carboxi-terminal de ésta. También se ha comentado que la ubiquitina es un componente esencial del sistema de respuesta a estrés en levaduras (Finley *et al.*, 1987; Mager & Moradas-Ferreira, 1993), y que la formación de los ribosomas es sensible al estrés térmico (Mager & Moradas-Ferreira, 1993; Veinot-Drebot *et al.*, 1989). Dado que el método empleado para inducir el tubo germinativo, implica un cambio brusco de temperatura desde levaduras en reposo metabólico (mantenidas al menos 24 h a 4°C), bien a 28°C para obtener levaduras, o a 37°C para inducir el tubo germinativo (Casanova *et al.*, 1989), se decidió determinar la expresión de *UBI3* durante este proceso.

Para ello, se purificó el RNA total a distintos tiempos (0, 15 y 90 min) durante el proceso de transición morfológica a partir de células en reposo metabólico, incubadas en medio de Lee a 28°C (levadura) y a 37°C (micelio). Dicho RNA se analizó mediante Northern blot empleando la sonda específica de *UBI3*. Como puede observarse en la figura III.35, se detectaron transcritos cuantitativamente similares en todos los casos, excepto en las calles 1 y 5, correspondientes al mRNA de las células en reposo metabólico. Estos resultados indican que el mRNA de *UBI3* está ausente, o bien por debajo del límite de detección, en células en reposo metabólico, y que sus niveles aumentan rápidamente tras la incubación a ambas



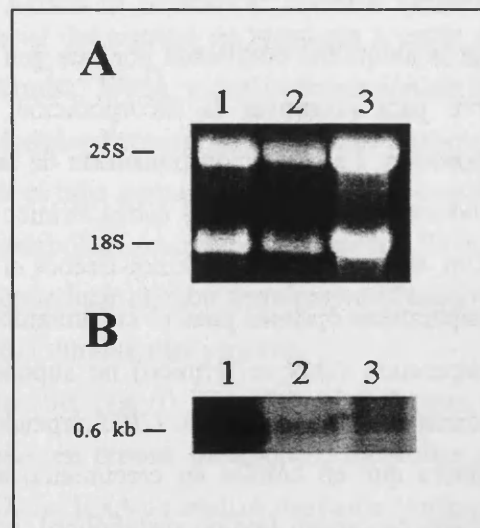
**Fig. III.35.** Análisis de la expresión de *UBI3* mediante Northern blot durante la transición morfológica levadura-micelio en la cepa *C. albicans* ATCC 26555. Cada calle contiene 6 µg de RNA total obtenido tras incubación de células en reposo metabólico, en medio de Lee, a 28°C para obtener levadura (calles 1-4), y a 37°C para obtener micelio (calles 5-8). El RNA total se purificó a partir de las células después de 15 min (calles 2 y 6), 90 min (calles 3 y 7) y 3 h (calles 4 y 8) de incubación, así como a partir de células en reposo metabólico antes de la incubación (calles 1 y 5). Como sonda específica se utilizó el fragmento de 0.6 kb de DNA que contiene la región 3' de *UBI3* (véase texto) (panel B). En el panel A se muestra el gel teñido con bromuro de etidio para visualizar los rRNAs (25S y 18S).

temperaturas (28 y 37°C). Por tanto, este gen no se expresa en condiciones de estrés nutricional (ayuno metabólico), como cabía esperar puesto que codifica una proteína ribosomal, no requerida en estas condiciones, ya que no hay crecimiento celular (síntesis proteica). Además, la ausencia de mRNA de *UBI3* en condiciones de ayuno metabólico indica que la ubiquitina codificada por este gen no está implicada en la respuesta a estrés, sino que sirve para promover la incorporación de la proteína ribosomal a la estructura de los ribosomas. La inhibición transitoria de la transcripción de genes de proteínas ribosomales se produce como respuesta al estrés térmico por temperaturas a las que la célula no puede crecer (Kim & Warner, 1983; Veinot-Drebot *et al.*, 1989), pero las temperaturas de 28 y 37°C son temperaturas óptimas para el crecimiento de *C. albicans*, por lo que este aumento brusco de temperatura (choque térmico) no supone estrés térmico para este hongo. Estos resultados indican que la expresión de *UBI3* depende de las necesidades celulares de síntesis proteica, de manera que en células en crecimiento activo, el gen se expresa, mientras que cuando las células no crecen (ayuno metabólico), no hay expresión de *UBI3*; es decir, la expresión de *UBI3* está acorde con los requerimientos ribosomales necesarios para mantener el crecimiento celular (independientemente de que la morfología sea levaduriforme o micelial), puesto que codifica para una proteína ribosomal.

### 2.3.b.- Efecto del estrés nutricional.

Para confirmar los resultados anteriores (ausencia de mRNA en células en reposo metabólico), se procedió a estudiar, la expresión del gen durante el proceso de ayuno metabólico.

Para ello, se obtuvo RNA tanto de células levaduriformes en fase tardía de crecimiento exponencial a 28°C en medio de Lee, como de células mantenidas durante 3 h a 37°C en agua estéril, y de células mantenidas posteriormente durante 24 h a 4°C también en agua estéril. El análisis mediante Northern blot con la sonda específica de *UBI3* mostró la presencia de niveles de transcrito únicamente en la muestra de RNA de levaduras en fase exponencial (Fig. III.36, calle 1), lo que concuerda con resultados obtenidos anteriormente. El gen *UBI3* de *C. albicans* se expresa en la fase exponencial tardía de crecimiento, como ocurre en *S. cerevisiae* (Finley *et al.*, 1987; Finley & Chau, 1991; Fraser *et al.*, 1991; Özkaynak *et al.*, 1987). La ausencia de transcrito en el resto de muestras de RNA obtenidas en condiciones de estrés nutricional (Fig. III.36, calles 2 y 3), podría explicarse teniendo en cuenta que en dichas condiciones no hay síntesis proteica, y por tanto, no hay requerimientos de proteínas ribosomales, como ya se ha indicado anteriormente.



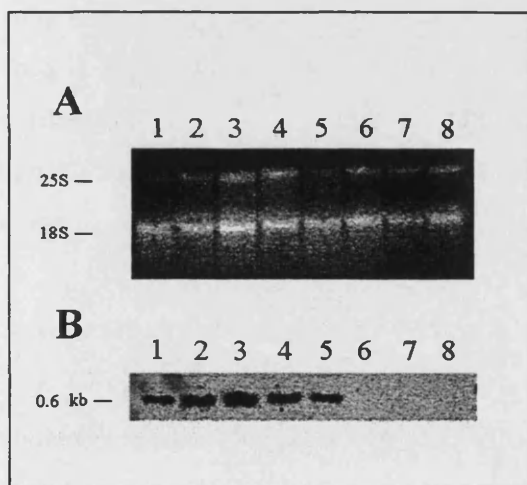
**Fig. III.36.** Efecto del ayuno metabólico sobre los niveles de mRNA de *UBI3*: análisis mediante Northern blot. Cada calle contiene 6 µg de RNA total de la cepa *C. albicans* ATCC 26555. Dicho RNA se obtuvo a partir de células levaduriformes en fase tardía de crecimiento exponencial ( $DO_{600} = 0.75$ ) a 28°C en medio de Lee (calle 1), mantenidas posteriormente durante 3 h a 37°C en agua estéril (calle 2), y posteriormente durante 24 h a 4°C también en agua estéril (calle 3). Como sonda específica se utilizó el fragmento de 0.6 kb de DNA que contiene la región 3' de *UBI3* (véase texto) (panel B). En el panel A se muestra el gel teñido con bromuro de etidio para visualizar los rRNAs (25S y 18S).

### 2.3.c.- Efecto del estrés térmico.

Como se ha comentado anteriormente, la formación de los ribosomas es sensible al estrés por temperatura y la expresión de genes que codifican proteínas ribosomales se inhibe

transitoriamente en estas condiciones (Gorenstein & Warner, 1976; Kim & Warner, 1983; Mager & Moradas-Ferreira, 1993; Veinot-Drebot *et al.*, 1989). Por tanto, se procedió a estudiar a continuación el efecto de distintos choques térmicos sobre la expresión de *UBI3*.

Para ello, se obtuvo RNA a partir de células levaduriformes en fase exponencial temprana de crecimiento en medio rico (YPD), tras ser sometidas durante 0, 5, 15 y 30 min a un choque térmico de 28°C a 42°C, y de 28°C a 23°C, respectivamente. El análisis mediante Northern blot de las distintas muestras de RNA hibridadas con la sonda específica de *UBI3*, mostró en primer lugar niveles esperados del transcrito en la muestra de células en crecimiento exponencial, como ya se había observado anteriormente (Fig. III.35, calles 1 y 5). Por otro lado, los niveles del transcrito no se afectaron después del choque térmico a 23°C (Fig. III.37, calles 2-4), mientras que disminuyeron rápidamente hasta niveles indetectables tras el choque a 42°C (Fig. III.37, calles 6-8). Esta disminución en los niveles de mRNA de *UBI3* por el choque térmico es mucho más rápida de lo que cabría esperar únicamente por un bloqueo de la transcripción de este gen, lo que sugiere la participación de un mecanismo de degradación del mensajero preexistente (Herruer *et al.*, 1988; Mager & Moradas-Ferreira, 1993; Veinot-Drebot *et al.*, 1989). Una caída similar en los niveles de mRNA, ya se había observado en proteínas ribosomales de *S. cerevisiae*, cuya síntesis se reduce mucho tras choque térmico de 23 a 36°C (Gorenstein & Warner, 1976; Kim & Warner, 1983). Esta caída tampoco puede explicarse únicamente por el bloqueo de la transcripción (Mager & Moradas Ferreira, 1993; McAllister & Finkelstein, 1980) sino que es necesaria la existencia de un mecanismo de degradación del mRNA preexistente (Herruer *et al.*, 1988; Mager & Moradas Ferreira, 1993). Un patrón de expresión similar ha sido descrito por nuestro grupo para los



**Fig. III.37.** Efecto del estrés térmico sobre la expresión de *UBI3*: análisis mediante Northern blot. Cada calle contiene 6 µg de RNA total de la cepa *C. albicans* ATCC 26555. Dicho RNA se obtuvo a partir de células levaduriformes cultivadas a 28°C en YPD hasta fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} = 0.35$ ) y sometidas posteriormente a un choque térmico de 28°C a 23°C (calles 1-4), y de 28°C a 42°C (calles 5-8), durante 5 min (calles 2 y 6), 15 min (calles 3 y 7) y 30 min (calles 4 y 8), así como de células antes del choque (control) (calles 1 y 5). Como sonda específica se utilizó el fragmento de 0.6 kb de DNA que contiene la región 3' de *UBI3* (véase texto) (panel B). En el panel A se muestra el gel teñido con bromuro de etidio para visualizar los rRNAs (25S y 18S).

genes *EFB1* y *SSB1* de *C. albicans*, que codifican para el factor de elongación 1- $\beta$  y para una chaperonina necesaria para la estabilización de los péptidos nacientes durante el proceso de síntesis proteica, respectivamente (Maneu *et al.*, 1996, 1997, 2000b; Pfund *et al.*, 1998). Esto sugiere que la expresión de miembros de la maquinaria traduccional (*UBI3*, *EFB1*, *SSB1*) está coordinadamente regulada en *C. albicans*, al igual que ocurre en *S. cerevisiae* (López *et al.*, 1999; Mager & Planta, 1991).

La ausencia de expresión del gen *UBI3* en células estresadas, tanto por calor como por ayuno metabólico, indica, además, que la ubiquitina codificada por *UBI3* no está implicada en la respuesta a estrés, sino que sirve para promover la incorporación de la proteína ribosomal S34 durante la biogénesis de los ribosomas. Por lo tanto, la expresión de *UBI3*, como se ha comentado anteriormente, parece estar asociada al crecimiento celular, en función de los requerimientos de ribosomas para la síntesis proteica.

#### **2.4.- Caracterización funcional del gen *UBI3* de *C.albicans*: complementación del mutante *ubi3* de *S.cerevisiae*.**

Debido a la similitud existente entre las especies fúngicas *C. albicans* y *S. cerevisiae*, la mayoría de los genes de la primera pueden ser expresados y son funcionales en la segunda, lo que se ha utilizado en ocasiones para comprobar la función de determinados genes por complementación en mutantes de *S. cerevisiae* (Kurtz *et al.*, 1990b; Maneu *et al.*, 2000b; Scherer & Magee, 1990), tal como se ha indicado en el apartado 1.4 para el gen *UBI4*.

Para comprobar la función del producto codificado por el gen *UBI3* de *C. albicans*, se determinó su capacidad para complementar el fenotipo de la cepa SUB121 de *S. cerevisiae*, cepa haploide en la que la única copia del gen *UBI3* ha sido interrumpida insertando el gen *HIS3* en su secuencia (Finley *et al.*, 1989). La deficiencia en la proteína codificada por el gen *UBI3* (proteína ribosomal S34, presente en la subunidad pequeña de los ribosomas y necesaria para un correcto ensamblaje de sus subunidades) (Finley & Chau, 1991), provoca en esta cepa un importante aumento del tiempo de generación, resultando un fenotipo de crecimiento muy lento (Finley *et al.*, 1989).

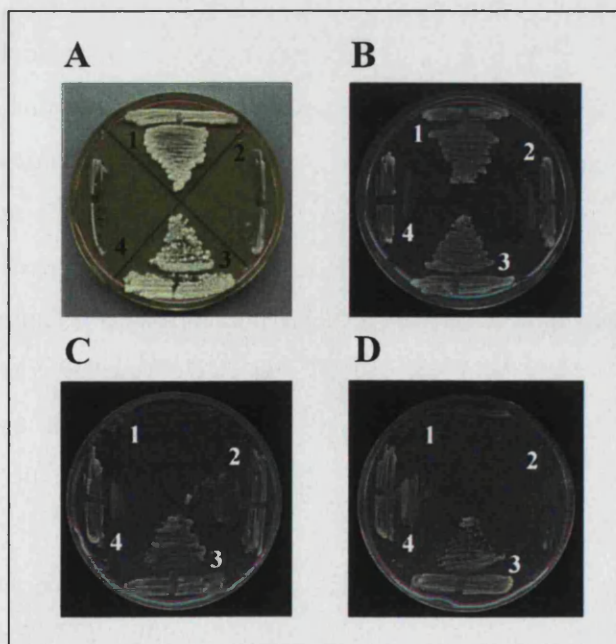
La cepa *S. cerevisiae* SUB121 (Ura<sup>-</sup>), fue transformada, con los plásmidos pEMBLye23 (control) y pPR2, (pEMBLye23 con un inserto de 2.8 kb que contiene el gen *UBI3* de *C. albicans* y sus regiones adyacentes). Los transformantes (Ura<sup>+</sup>) se seleccionaron en medio mínimo con leucina, lisina y triptófano, sin uracilo. Tras comprobar los marcadores



genéticos ( $\text{Leu}^-$ ,  $\text{Lis}^-$ ,  $\text{Trp}^-$ ) de varios de los transformantes, se determinó que la prototrofia para el uracilo (carácter  $\text{Ura}^+$ ) estaba asociada a la presencia del plásmido, dada su inestabilidad en condiciones no selectivas: después de crecer los transformantes en medio rico (YPD) en dos cultivos sucesivos, se recuperó aproximadamente un 40% de clones  $\text{Ura}^-$ . Se seleccionó un transformante con cada plásmido (pEMBLYe23 y pPR2) y se determinó su tiempo de generación en distintos medios de cultivo (Tabla III.13). El transformante de la

| CEPA                   | MEDIO DE CULTIVO |                |                    |
|------------------------|------------------|----------------|--------------------|
|                        | YPD              | SD+leu+lys+trp | SD+leu+lys+trp+ura |
| WT (SUB62)             | 2,8              | *              | *                  |
| <i>ubi3</i> (SUB121)   | 10,4             | *              | 12,5               |
| <i>ubi3</i> /pPR2      | 2,7              | 5,6            | 6                  |
| <i>ubi3</i> /pEMBLYe23 | 10,4             | 16,8           | 13,2               |

**Fig III.13.** Tiempo de generación (h) de la cepa *S. cerevisiae* SUB121 (*ubi3*), de los transformantes SUB121 con pPR2 y pEMBLYe23, así como de la cepa salvaje SUB62, en los medios de cultivo indicados. (\*): Tiempo de generación no determinado debido a la incapacidad de crecimiento de estas cepas ( $\text{His}^-$  y/o  $\text{Ura}^-$ ) en estos medios de cultivo.



**Fig III.38.** El gen *UBI3* de *C. albicans* complementa el fenotipo de lento crecimiento del mutante *ubi3* de *S. cerevisiae* mediante transformación con pPR2. Crecimiento de la cepa salvaje SUB62 de *S. cerevisiae* (1), mutante *ubi3* (SUB121) (2), y transformantes SUB121 con pPR2 (3), y pEMBLYe23 (4), en diferentes medios de cultivo sólido tras incubación a 28°C. (A): YPD; (B): medio mínimo con lisina, leucina, histidina, triptófano y uracilo; (C): medio mínimo con lisina, leucina, triptófano y uracilo; (D): medio mínimo con lisina, leucina y triptófano.

cepa mutante *ubi3* de *S. cerevisiae* con el plásmido pPR2 mostró un tiempo de generación similar al de la cepa salvaje (SUB62) (2.8 h en medio rico, YPD), mientras que el mutante *ubi3*, así como el transformante con pEMBLYe23, mostraron un tiempo de generación de 10.4 h. En medio mínimo, el tiempo de generación presentado por el mutante *ubi3* y el transformante con pEMBLYe23 fue de 12.5 h y 13.2 h respectivamente, mientras que el del transformante con pPR2 fue de 6 h. Estas diferencias en los tiempos de generación de estas cepas, quedan reflejadas en el crecimiento de las mismas en placas con los diferentes medios de cultivo (Fig. III.38).

Los resultados obtenidos demuestran que la expresión heteróloga del gen *UBI3* de *C. albicans* en el mutante *ubi3* de *S. cerevisiae* complementa el fenotipo (crecimiento lento) conferido por dicha mutación, restaurando el fenotipo salvaje. Esto confirma que el plásmido pPR2 contiene el gen *UBI3* de *C. albicans*, que es expresado correctamente en *S. cerevisiae*, y que su producto génico tiene una función similar a la descrita en *S. cerevisiae* (Finley *et al.*, 1989), y por lo tanto está implicado en la biogénesis del ribosoma.

### **2.5.- Estudio del promotor del gen UBI3: control de la producción de invertasa en S.cerevisiae.**

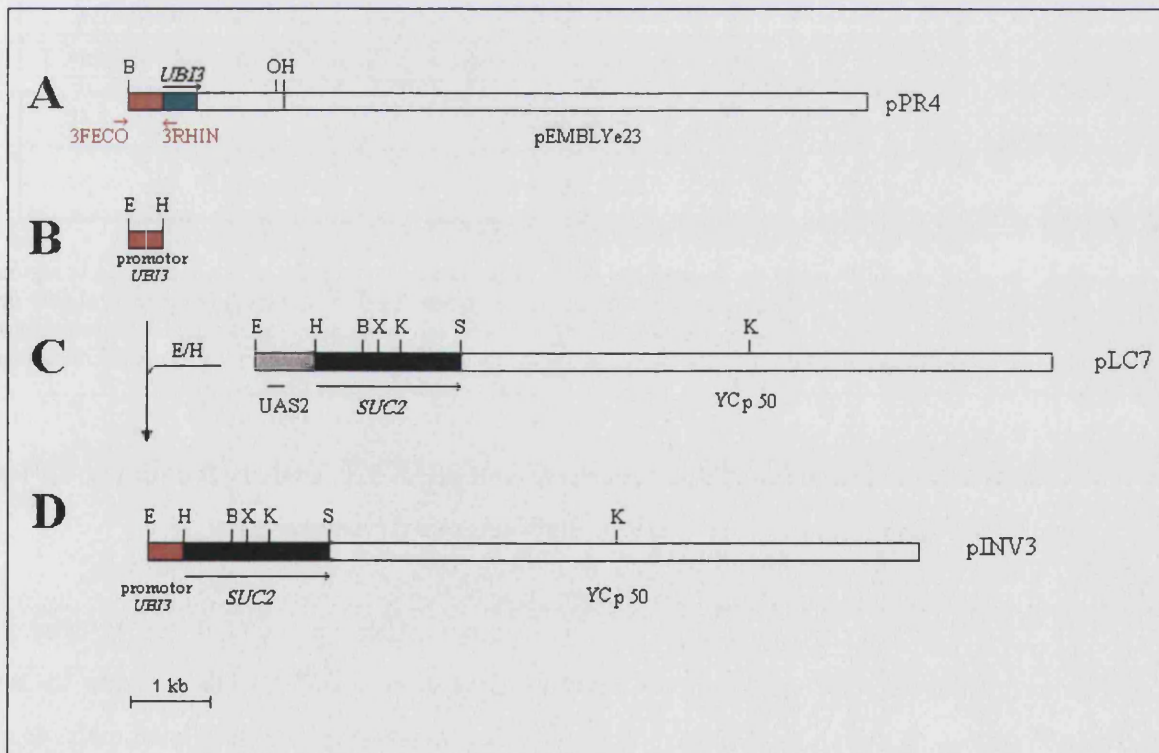
A partir de los resultados obtenidos mediante análisis por Northern blot, igual que se hizo con el gen *UBI4* de *C. albicans*, se quiso comprobar que las secuencias del promotor de este gen son responsables de la ausencia de expresión del gen *UBI3* en células estresadas, tanto por temperatura como por ayuno metabólico. Para ello, se colocó bajo el control del promotor del gen *UBI3* de *C. albicans*, la región codificante del gen *SUC2* de *S. cerevisiae*, uno de los genes que codifican para el enzima invertasa (EC 3.2.1.26,  $\beta$ -D-fructofuranósido-fructohidrolasa) (Gozalbo & del Castillo, 1994), en un plásmido centromérico. Con este plásmido se transformó la cepa *S. cerevisiae* SEY2101, que no contiene ninguno de los genes *SUC*, por lo que la determinación de la actividad invertasa en dicho transformante permite estudiar la regulación de expresión del promotor del gen *UBI3* de *C. albicans*. Este estudio se realizó empleando un plásmido centromérico (bajo número de copias por célula), ya que un exceso de regiones reguladoras (promotores) puede titular factores transcripcionales específicos y modificar la regulación de la expresión génica (Gozalbo, 1992).

Como ya se ha indicado en el apartado 1.5 la invertasa cataliza en levaduras la hidrólisis extracelular de algunas fuentes de carbono, como la sacarosa o la rafinosa. Todos

los genes *SUC* codifican para una invertasa externa, que se secreta a la pared celular, y otra interna, citoplasmática, de función no determinada (Carlson & Botstein, 1982; Perlman *et al.*, 1982). La invertasa externa está implicada en la hidrólisis de la sacarosa y la rafinosa, estando regulada su expresión exclusivamente por represión catabólica por glucosa (Carlston & Botstein, 1982; Grossmann & Zimmermann, 1979; Perlman & Halvorson, 1981; Rodríguez *et al.*, 1981).

### 2.5.a.- Construcción del plásmido pINV3.

Para realizar este estudio, se utilizó el plásmido centromérico pLC7, un derivado de YCp50, que contiene el gen *SUC2* de *S. cerevisiae* (del Castillo *et al.*, 1992). En este plásmido, se substituyó el fragmento *EcoRI/HindIII* que contiene el promotor del gen *SUC2* por un fragmento que contiene las secuencias del promotor del gen *UBI3* de *C. albicans* (Fig. III.39).



**Fig III.39.** Construcción del plásmido pINV3. A partir de pPR4 (A), se amplificó por PCR, con los oligonucleótidos 3FECO y 3RHIN, un fragmento de 0.45 kb que contiene las secuencias reguladoras 5' no-codificantes de este gen (B) y se subclonó en pLC7 digerido con *EcoRI* y *HindIII* para sustituir el promotor del gen *SUC2* de *S. cerevisiae* (C) por el del gen *UBI3* de *C. albicans* y originar pINV3 (D). Dianas de enzimas de restricción: H (*HindIII*), O (*XhoI*), X (*XbaI*), B (*BamHI*), K (*KpnI*), E (*EcoRI*), S (*SalI*). Véase texto para más detalle.

En primer lugar, a partir de pPR4, que contiene el gen *UBI3* con sus secuencias adyacentes (Fig. III.39 A), se amplificó por PCR un fragmento de DNA que contiene las secuencias reguladoras 5' no-codificantes del gen *UBI3*. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos sintéticos 3FECO, que contiene la diana de restricción *EcoRI*, y 3RHIN, que contiene la diana de restricción *HindIII* (Tabla III.14). El producto amplificado, un fragmento de 0.45 kb que contiene el promotor del gen *UBI3* de *C. albicans*, se digirió con los enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI* (Fig. III.39 B), y se ligó al plásmido pLC7, digerido con los mismos enzimas, para eliminar el fragmento que contiene el promotor del gen *SUC2* (Fig. III.39 C), y sustituirlo así por el promotor de *UBI3*. De este modo se obtuvo la construcción adecuada (pINV3) para el estudio de la expresión del gen *SUC2* en *S. cerevisiae* bajo el control del promotor del gen *UBI3* de *C. albicans* (Fig. III.39 D).

| NOMBRE | SECUENCIA  | LOCALIZACIÓN EN LA SECUENCIA GENÓMICA |            |
|--------|--|---------------------------------------|------------|
|        |  | extremo 5'                            | extremo 3' |
| 3FECO  | <i>GCACGAA</i> <u>TTCTT</u> ATCTAAGCGAGAGTAAGTCTTGGC | - 451                                 | - 426      |
| 3RHIN  | <i>CGTGAAGCTT</i> GCTTGTCGGCAAATAGCTATGCTTC          | - 10                                  | - 34       |

**Tabla III.14.** Oligonucleótidos sintéticos utilizados como cebadores en la amplificación por PCR de la región promotora del gen *UBI3* de *C. albicans*. La posición de los extremos 5' y 3' está numerada respecto al sitio de inicio de la traducción. En cursiva se marcan las secuencias del extremo 5' no homólogas al DNA genómico que contienen las dianas de restricción indicadas (subrayadas). Nótese que los oligonucleótidos F y R hibridan con cadenas complementarias.

### 2.5.b.- Transformación de *S. cerevisiae* con pINV3 y análisis fenotípico de los transformantes: producción de invertasa extracelular.

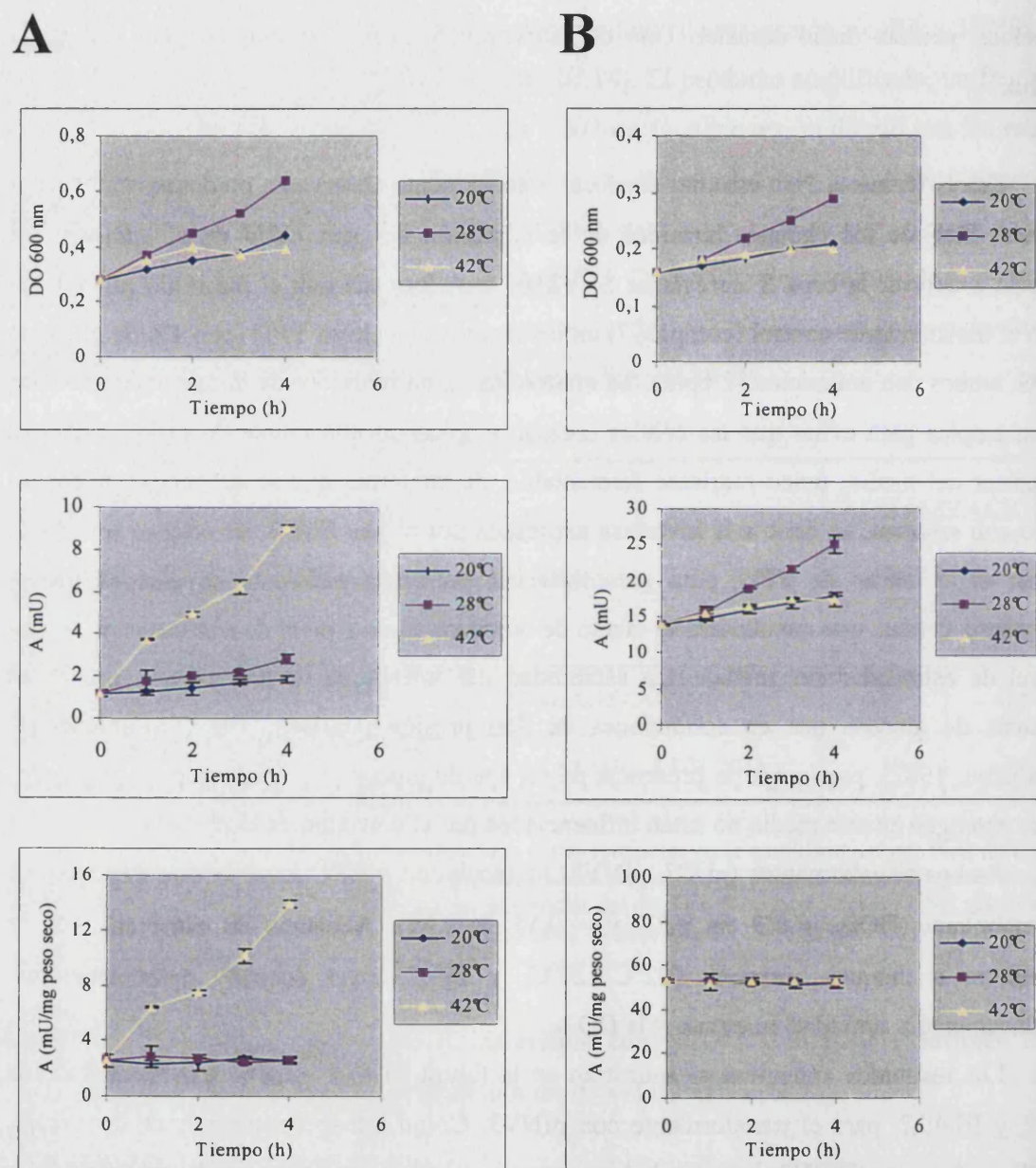
La cepa de *S. cerevisiae* que se utilizó para realizar este estudio fue la cepa *S. cerevisiae* SEY2101, que no contiene ninguno de los genes *SUC*, con lo que al ser transformada con el plásmido pINV3, toda la actividad invertasa que se detecte en dicha cepa procederá de la expresión del gen *SUC2* de pINV3. Esto permite el estudio de la regulación de expresión del promotor del gen *UBI3* de *C. albicans*, mediante la determinación de dicha actividad extracelular. Los transformantes de la cepa *S. cerevisiae* SEY2101 con el plásmido

pINV3, se seleccionaron por su prototrofia para el uracilo y se comprobaron sus marcadores genéticos. El test de estabilidad demostró que el carácter Ura<sup>+</sup> se debía a un gen plasmídico, puesto que tras dos siembras consecutivas en medio rico (YPD), aproximadamente un 30% de las células perdían dicho carácter. Uno de estos transformantes se empleó para realizar el estudio.

**Estrés térmico.** Para estudiar el efecto anteriormente observado, mediante análisis por Northern blot, de los choques térmicos en la expresión del gen *UBI3* de *C. albicans*, se procedió a cultivar la cepa *S. cerevisiae* SEY2101 transformada con el plásmido pINV3, así como el transformante control (con pLC7) en los medios de cultivo YPD (con 4% de glucosa) e YPS, ambos con antimicina (2 ppm). La antimicina es un inhibidor de la respiración celular que se emplea para evitar que las células crezcan empleando una fuente de carbono distinta del azúcar del medio, único nutriente fermentable, de tal forma que si las células crecen en medio con sacarosa, se debe a la invertasa expresada por el gen *SUC2*. Se empleó un 4% de glucosa en el medio de YPD, para garantizar una presencia suficiente de glucosa tras el crecimiento celular, que mantuviera el efecto de la misma tanto a nivel de transcripción, como a nivel de estabilidad del mRNA. La estabilidad del mRNA de la invertasa es menor en presencia de glucosa que en condiciones de desrepresión (Carlson, 1987; Mormeneo & Sentandreu, 1982), por lo que la presencia de un 4% de glucosa posibilita que los resultados que se obtengan en este medio no estén influenciados por el consumo de la glucosa.

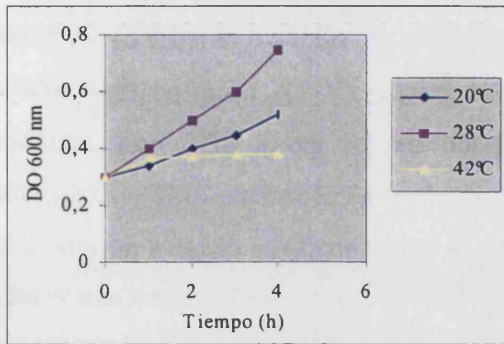
Ambos transformantes (pLC7, pINV3) se incubaron a 28°C hasta la fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} \approx 0.3$  en YPD y  $\approx 0.15$  en YPS). Alícuotas de estos cultivos se sometieron a choques térmicos (42°C, 20°C, y 28°C como control) determinándose periódicamente la actividad invertasa y la  $DO_{600}$ .

Los resultados obtenidos se muestran en la figura III.40.1, para el transformante con pLC7, y III.40.2, para el transformante con pINV3. Como puede observarse, en las células transformadas con pINV3, la actividad invertasa es mucho mayor que en las transformadas con pLC7, tanto en YPD, (en el que el promotor *SUC2* está reprimido), como en YPS (en el que el promotor *SUC2* está desreprimido). En condiciones de represión (glucosa) la actividad fue 36 veces mayor en el transformante con pINV3 ( $90 \pm 12$  mU/mg peso seco) que en el transformante con pLC7 ( $2.5 \pm 0.6$  mU/mg peso seco), mientras que en condiciones de desrepresión, la actividad de dicho transformante fue 2.5 veces mayor que la del control, al desreprimirse la expresión de *SUC2* ( $120 \pm 4$  mU/mg peso seco en el transformante con

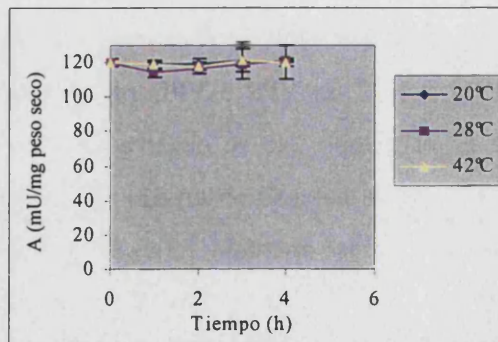
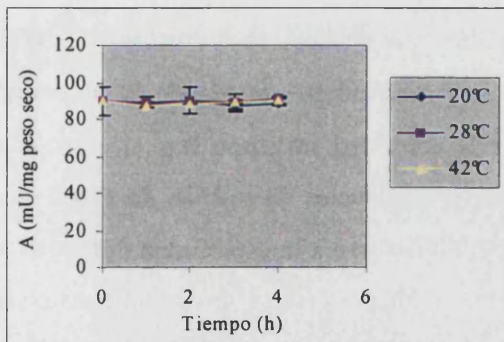
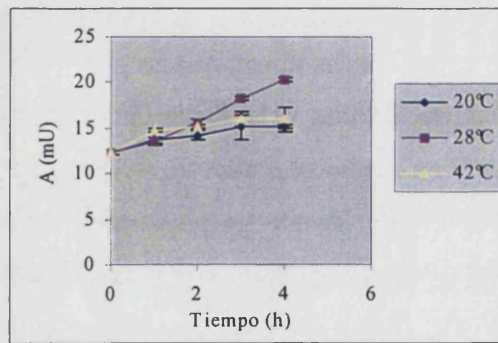
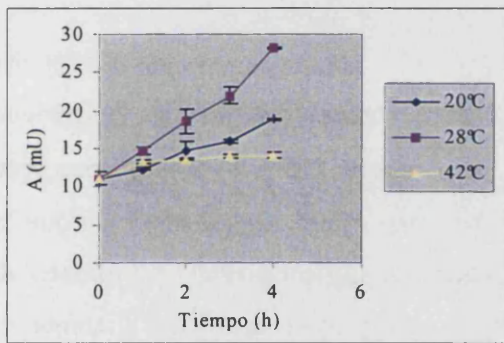
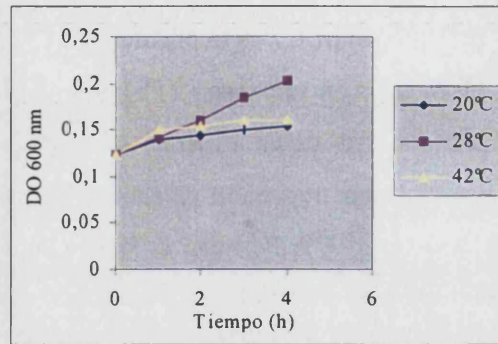


**Fig. III.40.1.** Efecto del estrés térmico sobre la producción de invertasa en *S. cerevisiae* SEY2101 transformada con pLC7. El transformante se creció en YPD (4% de glucosa)-antimicina (2 ppm) (panel A) e YPS-antimicina (2 ppm) (panel B), a 28°C hasta la fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} = 0.28$  en YPD y 0.16 en YPS). Los cultivos se dividieron en tres alícuotas y se les dio, a dos de ellas, un choque térmico a 20 y 42°C, respectivamente, en baño de agua con agitación, incubándose la alícuota restante a 28°C como control. Periódicamente se tomaron muestras en las que se midió la DO del cultivo a 600 nm y la actividad invertasa de las células. Dicha actividad se expresa como mU totales en la muestra ensayada, o como mU/mg de peso seco de células; los valores mostrados son la media de al menos tres determinaciones ( $\pm$  desviación estándar). Nótese que esta figura es idéntica a la III.12.1.

A



B



**Fig. III.40.2.** Efecto del estrés térmico sobre la producción de invertasa en *S. cerevisiae* SEY2101 transformada con pINV3. El transformante se creció en YPD (4% de glucosa)-antimicina (2 ppm) (panel A) e YPS-antimicina (2 ppm) (panel B), a 28°C hasta la fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} = 0.3$  en YPD y 0.125 en YPS). Los cultivos se dividieron en tres alícuotas y se les dió, a dos de ellas, un choque térmico a 20 y 42°C, respectivamente, en baño de agua con agitación, incubándose la alícuota restante a 28°C como control. Periódicamente se tomaron muestras en las que se midió la DO del cultivo a 600 nm y la actividad invertasa de las células. Dicha actividad se expresa como mU totales en la muestra ensayada, o como mU/mg de peso seco de células; los valores mostrados son la media de al menos tres determinaciones ( $\pm$  desviación estándar).

pINV3, y  $53 \pm 1$  mU/mg peso seco en el transformante con pLC7). Esto indica que el gen *UBI3* tiene un promotor muy potente, incluso más que el promotor de la propia invertasa en condiciones de desrepresión. Por ello, el crecimiento del transformante con pINV3 en YPS pudo realizarse en presencia de antimicina, puesto que esta cepa crece perfectamente en estas condiciones. Como vimos en el apartado 1.5.b, la actividad invertasa en las levaduras transformadas con pLC7 es dependiente de la fuente de carbono, siendo alrededor de 20 veces mayor en medio con sacarosa (YPS) que en medio con glucosa (YPD), e independiente de la temperatura, como cabía esperar, ya que la expresión de los genes *SUC* está regulada exclusivamente por represión catabólica por glucosa (Carlson & Botstein, 1982; Grossmann & Zimmermann, 1979; Perlman & Halvorson, 1981). De todas formas se observa un aumento de actividad en el caso del choque térmico a 42°C en YPD, pero éste es debido a que a esta temperatura hay una desrepresión parcial de *SUC2* (por estrés) y posiblemente se altera el mecanismo de degradación del mRNA (Mormeneo & Sentandreu, 1982).

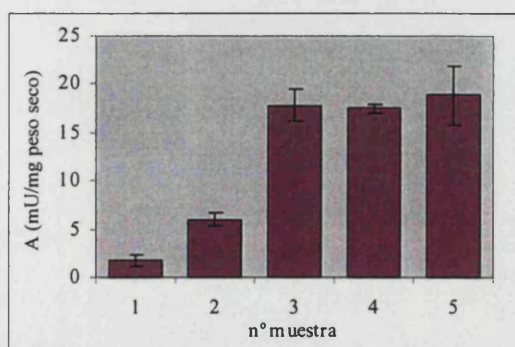
En las células transformadas con pINV3, la actividad invertasa no presenta diferencias significativas debidas a la fuente de carbono, presentando valores similares en medio con glucosa y en medio con sacarosa ( $90 \pm 12$  mU/mg peso seco y  $120 \pm 4$  mU/mg peso seco respectivamente), siendo un poco mayor (un 25%) en este último, seguramente porque la estabilidad del mRNA es menor en presencia de glucosa (Carlson, 1987; Mormeneo & Sentandreu, 1982). Tampoco se observa en esta cepa un comportamiento muy diferente en función de la temperatura. Tanto en YPD como en YPS, se observa que a 28°C aumenta la actividad proporcionalmente al crecimiento celular; a 20°C en YPD ocurre lo mismo, y a 20°C en YPS y a 42°C en YPS e YPD prácticamente no hay crecimiento, quedando la actividad estable en el tiempo. No se observa disminución de la actividad invertasa tras el choque a 42°C, a pesar de haberse observado una disminución de los niveles de mRNA de *UBI3* por Northern blot (véase apartado 2.3.c). Este resultado podría deberse a la estabilidad del mRNA de la invertasa y/o a la estabilidad de la propia proteína, y tampoco se observa aumento de la actividad invertasa tras el choque térmico a 42°C, lo que indica que se produce un bloqueo de la transcripción provocado por el estrés por temperatura. Todo esto sugiere que la rápida disminución de los niveles de transcrito de *UBI3* tras un choque a 42°C observada en el análisis mediante Northern blot, se debe a la acción combinada del bloqueo de la transcripción y probablemente a la rápida degradación del mRNA preexistente, fenómeno que no ocurriría en el caso del mRNA de invertasa.



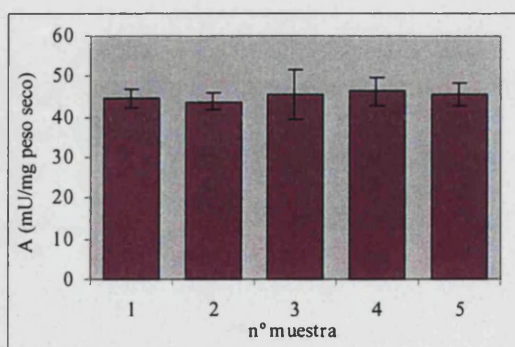
**Estrés nutricional.** Para confirmar la ausencia de mRNA del gen *UBI3* de *C. albicans* en condiciones de estrés nutricional, efecto detectado en el análisis del mRNA por Northern blot (apartado 2.3.b), se procedió a determinar el efecto de dicho estrés sobre la actividad invertasa en los transformantes con pINV3 y pLC7, como control. Para ello, se cultivaron ambos transformantes en YPD (con 4% de glucosa) -antimicina (2 ppm), hasta fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} = 0.8$ ) y a continuación las células se resuspendieron en agua y se incubaron a 28°C durante 4 h. Seguidamente, se mantuvieron a 4°C durante 16 h y a continuación se incubaron en agua a 28°C durante otras 3 h.

Los resultados de la actividad invertasa de cada muestra se representan en la figura III.41. Como se puede observar, la actividad en las células en crecimiento exponencial transformadas con la construcción del gen *SUC2* bajo el control del promotor del gen *UBI3* (pINV3), sigue siendo mucho mayor (aproximadamente 30 veces) que en las transformadas con la que lleva el gen *SUC2* bajo el control de su propio promotor (pLC7). Las levaduras transformadas con pLC7, sufren un aumento de actividad invertasa (aproximadamente 10 veces) durante las 4 h que han sido mantenidas en agua a 28°C, mientras que en las muestras posteriores la actividad permanece estable. Ese aumento de actividad se debe a la desrepresión del promotor *SUC* en ausencia de glucosa. En las células transformadas con pINV3, la actividad invertasa permanece estable durante el ayuno metabólico. Estos resultados concuerdan con los obtenidos al someter este transformante a condiciones de estrés

A



B

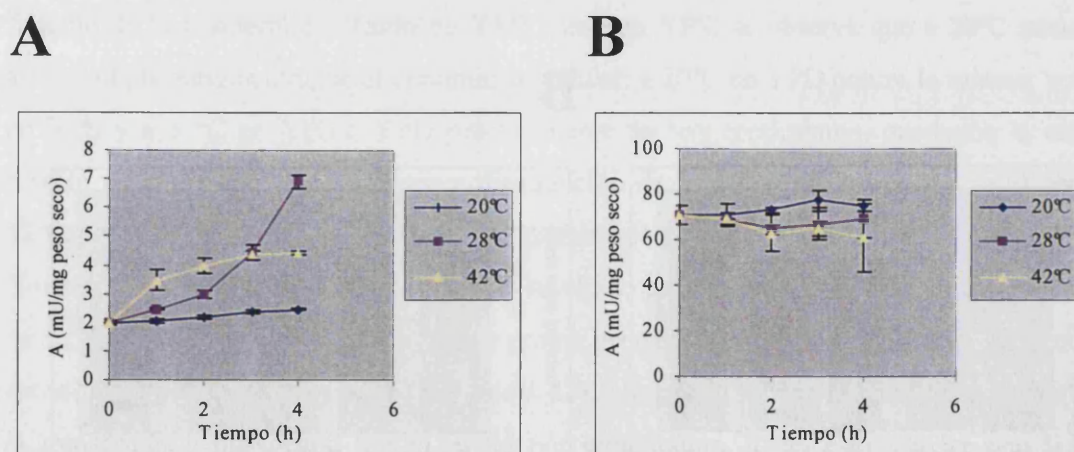


**Fig. III.41.** Actividad invertasa de la cepa *S. cerevisiae* SEY2101 transformada con pLC7 (panel A) y pINV3 (panel B) en condiciones de estrés nutricional. Ambos transformantes se cultivaron en YPD (4% glucosa)-antimicina (2 ppm) a 28°C hasta fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} = 0.8$ ). A continuación se recogieron las células, se resuspendieron en agua y se incubaron a 28°C durante 4 h, tomándose muestra a  $t=0$  (muestra n°1),  $t=2h$  (muestra n°2) y  $t=4h$  (muestra n°3). Seguidamente se mantuvieron a 4°C durante 16 h (muestra n°4), y se volvieron a incubarse a 28°C durante 3 h (muestra n°5). La actividad invertasa (mU/mg de peso seco de células) se expresa como la media de los valores obtenidos en al menos tres determinaciones ( $\pm$  desviación estándar).

térmico a 42°C (véase Fig. III.40.2) y apoyan la idea de que el ayuno metabólico produce un bloqueo de la transcripción de *UBI3*. Aunque los niveles de transcrito de *UBI3* desaparecían por completo en condiciones de estrés nutricional en el análisis por Northern blot (apartado 2.3), no se observa disminución de la actividad invertasa en estas condiciones debido a la estabilidad del mRNA de la invertasa y/o de la proteína. Por tanto, la desaparición observada de los niveles de mRNA del gen *UBI3* en condiciones de estrés nutricional en el estudio por Northern blot (apartado 2.3) se debe al bloqueo de la transcripción y probablemente a la degradación del mRNA preexistente.

**Estrés térmico y nutricional.** A continuación, se estudió el efecto combinado de ambos tipos de estrés (térmico y nutricional) en la actividad invertasa. Para ello, se cultivaron los transformantes de *S. cerevisiae* SEY2101 (con pINV3, y pLC7) en YPD (con 4% de glucosa) - antimicina (2 ppm) hasta fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} = 0.4$ ) y se sometieron a estrés nutricional mediante resuspensión en agua e incubación a diferentes temperaturas (20, 42 y 28°C) durante 4 h. Los resultados de actividad invertasa se muestran en la Fig. III.42.

En las células transformadas con pLC7, la actividad a 28°C (estrés nutricional) aumenta por desrepresión del promotor del gen de la invertasa, como ya se había observado



**Fig. III.42.** Actividad invertasa de la cepa *S. cerevisiae* SEY2101 transformada con pLC7 (panel A) y pINV3 (panel B) en condiciones de estrés térmico y nutricional. Ambos transformantes se cultivaron en YPD (4% glucosa)-antimicina (2 ppm) a 28°C hasta fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} = 0.4$ ). A continuación se recogieron las células, se resuspendieron en agua, se dividieron en tres alícuotas y se sometieron dos de ellas a choque térmico a las temperaturas de 20 y 42°C en baño de agua con agitación; la alícuota restante se incubó a 28°C como control. Periódicamente se tomaron muestras en las que se determinó la actividad invertasa (mU/mg de peso seco de células) que se expresa como la media de los valores obtenidos en al menos tres determinaciones ( $\pm$  desviación estándar).

anteriormente; a 42°C se observa el mismo fenómeno, pero inicialmente es más intenso para estabilizarse rápidamente; mientras que a 20°C no hay desrepresión del promotor *SUC*. En la cepa transformada con pINV3 la actividad invertasa queda prácticamente constante en el tiempo, independientemente de la temperatura. Por tanto, se observa el mismo resultado que el descrito anteriormente para cada uno de los tipos de estrés por separado.

Estos resultados, junto con los obtenidos a partir de los análisis por Northern blot, indican que en *C. albicans* la regulación de *UBI3* es similar a la de otros genes que codifican componentes de la maquinaria traduccional (Maneu *et al.*, 2000b), cuya expresión en *S. cerevisiae* está coordinadamente regulada en función de la velocidad de crecimiento (López *et al.*, 1999; Mager & Planta, 1991). En condiciones de estrés (térmico o nutricional) la expresión de *UBI3* se bloquea a nivel transcripcional, como se deduce del análisis de los transformantes pINV3, y además, debe existir un mecanismo de degradación del mRNA preexistente, como se deduce del análisis mediante Northern blot.

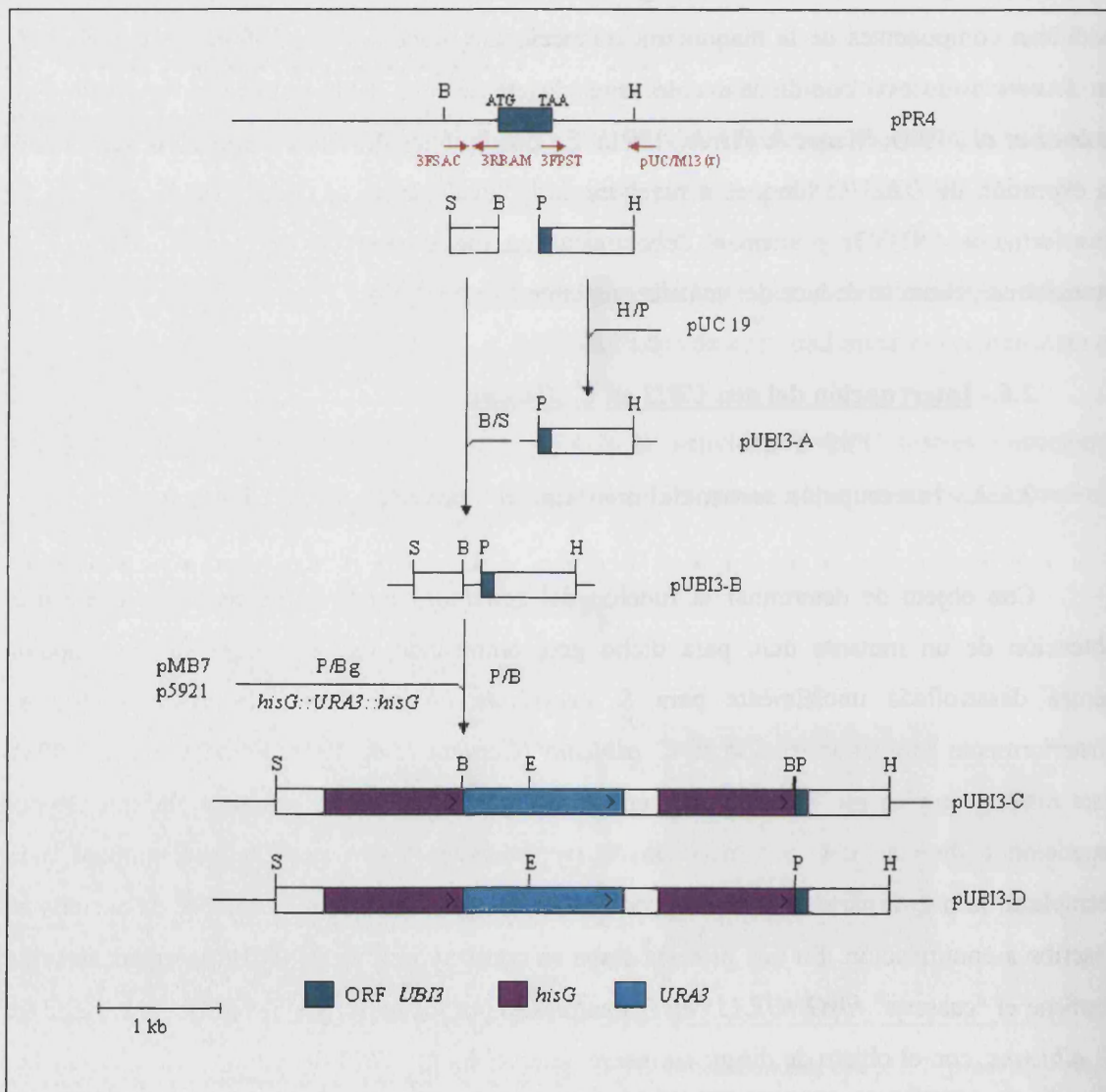
## **2.6.- Interrupción del gen *UBI3* en *C.albicans*.**

### **2.6.A.- Interrupción secuencial mediante el "cassette" *hisG::URA3::hisG*.**

Con objeto de determinar la función del gen *UBI3* en *C. albicans* se procedió a la obtención de un mutante nulo para dicho gen, empleando una estrategia de interrupción génica desarrollada inicialmente para *S. cerevisiae* (Alani *et al.*, 1987) y modificada posteriormente para su aplicación en *C. albicans* (Cervera *et al.*, 1998; Fonzi & Irwin, 1993). Este método emplea un "cassette" que consta del gen *URA3* de *C. albicans* flanqueado por repeticiones directas del gen *hisG* de *S. typhimurium*. Este "cassette" se empleó para reemplazar la mayor parte de la región codificante del gen *UBI3* de *C. albicans*, tal y como se describe a continuación. En una primera etapa se construyó el "cassette" de interrupción, que contiene el "cassette" *hisG::URA3::hisG* flanqueado por los extremos 5' y 3' del gen *UBI3* de *C. albicans*, con el objeto de dirigir su inserción en el locus *UBI3* del genoma de *C. albicans* por recombinación entre secuencias homólogas. Con este "cassette" se transformó *C. albicans*, en un proceso de interrupción secuencial (véase apartado 25.1 de "Materiales y Métodos"), para obtener un mutante nulo con las dos copias del gen interrumpidas.

### 1.- Construcción de los "cassettes" de interrupción.

Para interrumpir el gen *UBI3* de *C. albicans* siguiendo este método, se ha de construir previamente el "cassette" de interrupción génica. Dicha construcción consiste, como se ha indicado anteriormente, en el "cassette" *hisG::URA3::hisG* flanqueado por los extremos 5' y 3' del gen *UBI3* de *C. albicans*. Debido a la ausencia de dianas de restricción adecuadas, fue necesario emplear técnicas de PCR para construir dicho "cassette". Un esquema del proceso seguido para la construcción de los "cassettes" de interrupción se muestra en la Fig. III.43.



**Fig. III.43.** Esquema de las construcciones plasmídicas empleadas en los experimentos de interrupción secuencial del gen *UBI3* (véase texto). Dianas de enzimas de restricción: H (*Hind*III), P (*Pst*I), B (*Bam*HI), S (*Sac*I), Bg (*Bgl*II), E (*Eco*RI).

En una primera etapa, la reacción de PCR utilizó como molde DNA del plásmido pPR4, que contiene el gen *UBI3* y sus secuencias adyacentes, y como cebadores el oligonucleótido "reverse" universal de pUC/M13, que hibrida con secuencias del plásmido adyacentes al sitio múltiple de clonaje, y el oligonucleótido sintético 3FPST, deducido de la secuencia, al que se le introdujo una diana de restricción *Pst*I (Tabla III.15). El producto amplificado, de unas 800 pb, contenía 92 pb de la región 3' codificante del gen (extremo C-terminal de la proteína), siendo el resto zona 3' no codificante. Este fragmento de DNA fue digerido con los enzimas de restricción *Pst*I y *Hind*III (diana también presente en el producto amplificado, proveniente del sitio múltiple de clonaje) y subclonado en el plásmido pUC19 digerido con los mismos enzimas, para originar el plásmido pUBI3-A.

| NOMBRE | SECUENCIA                                   | LOCALIZACIÓN EN LA SECUENCIA GENÓMICA |            |
|--------|---|---------------------------------------|------------|
|        |   | extremo 5'                            | extremo 3' |
| 3FSAC  | <i>GGTCGAGCTCGAGTTGGGTCAGGGTTGCTATGTG</i>   | - 408                                 | - 385      |
| 3RBAM  | <i>GGTCGGATCCCTTGAATTGGCTTGTCGGCAAATAGC</i> | - 1                                   | - 26       |
| 3FPST  | <i>GACCCTGCAGGTCCAGCTCCAACCTTGTGGTGCCGG</i> | 362                                   | 386        |

**Tabla III.15.** Oligonucleótidos sintéticos utilizados como cebadores en la amplificación por PCR de los extremos 5' y 3' del gen *UBI3* de *C. albicans*, para la construcción de los "cassettes" de interrupción. La posición de los extremos 5' y 3' está numerada respecto al sitio de inicio de la traducción. En cursiva se marcan las secuencias del extremo 5' no homólogas al DNA genómico que contienen las dianas de restricción indicadas (subrayadas). Nótese que los oligonucleótidos F y R hibridan con cadenas complementarias.

En una segunda etapa, se utilizó como molde de una nueva reacción de PCR el plásmido pPR4 y como cebadores, los oligonucleótidos sintéticos deducidos de la secuencia, 3FSAC y 3RBAM (Tabla III.15), a los que se les había introducido dianas de restricción para los enzimas *Sac*I y *Bam*HI, respectivamente. Se amplificó así un producto de 400 pb, que no contenía ninguna base del extremo 5' de la región codificante del gen (extremo N-terminal), correspondiendo todo el amplificado a región promotora. Este producto se digirió con los enzimas de restricción *Sac*I y *Bam*HI, y se subclonó en el plásmido pUBI3-A, obtenido en la primera etapa, para originar el plásmido pUBI3-B, que contiene los extremos 5' y 3' del gen

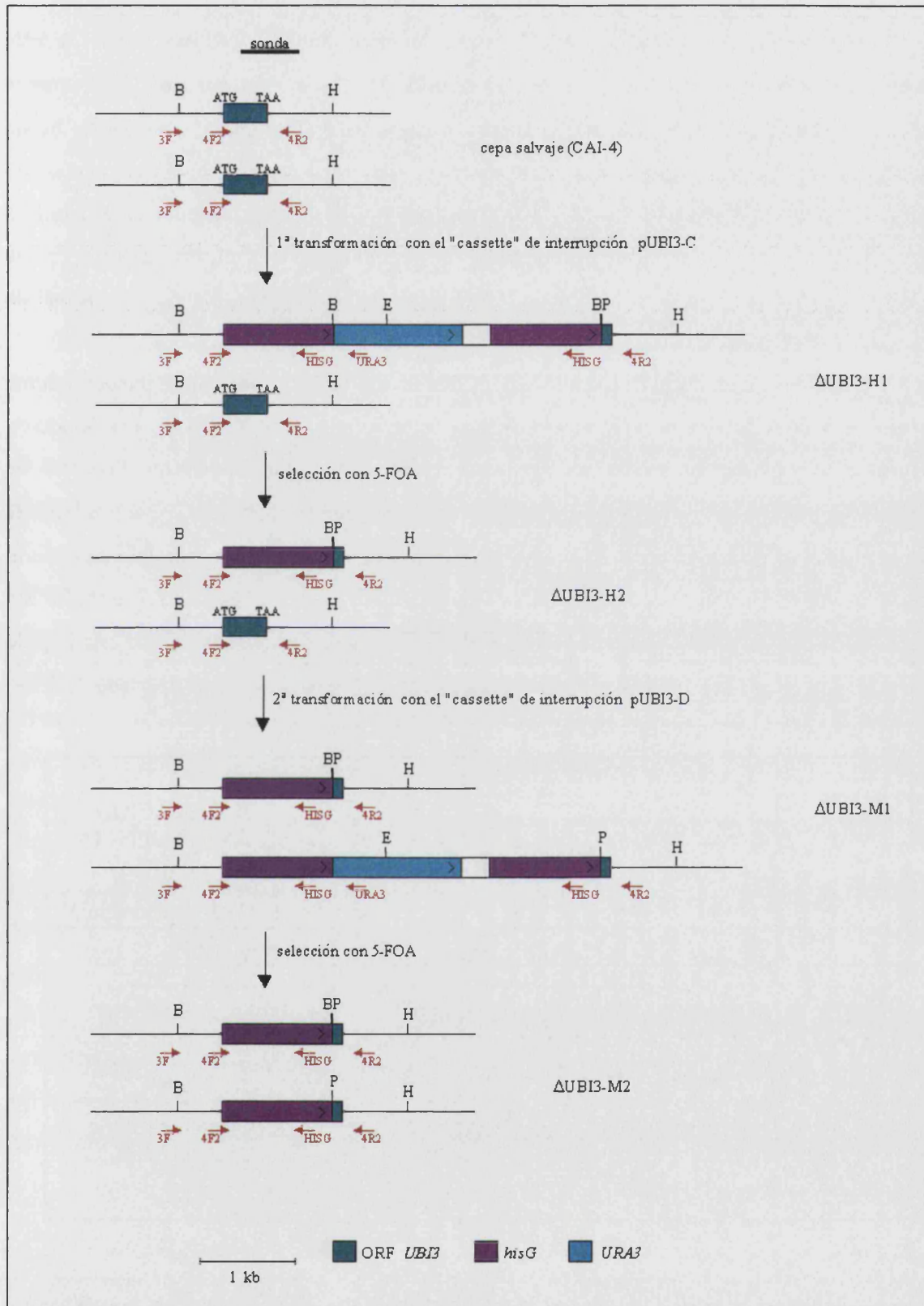
*UBI3*, uno a continuación del otro, en la orientación adecuada, separados por las dianas *Bam*HI y *Pst*I.

Finalmente, el plásmido p*UBI3*-B fue digerido con los enzimas de restricción *Pst*I y *Bam*HI y ligado al fragmento *Pst*I/*Bgl*II de los plásmidos pMB7 ó p5921 (Fonzi & Irwin, 1993), que contiene el "cassette" *hisG::URA3::hisG*, originando los plásmidos p*UBI3*-C y p*UBI3*-D, respectivamente. En ambos "cassettes" de interrupción se han eliminado 361 pb (79.7 %) de la región codificante del gen *UBI3*.

Los plásmidos pMB7 y p5921 son idénticos, siendo la única diferencia entre ellos la presencia de una diana *Bam*HI en la secuencia *hisG* del plásmido pMB7, mientras que p5921 carece de dicha diana. El objeto de utilizar "cassettes" ligeramente diferentes para interrumpir los dos alelos del gen es averiguar si ha ocurrido una recombinación mitótica intercromosomal no recíproca, y como consecuencia el mutante obtenido no tendría los dos alelos del gen interrumpidos, sino que tendría dos copias de un mismo alelo interrumpido. La diferencia entre los dos "cassettes" empleados permite saber si ese suceso ha tenido lugar, mediante digestión del DNA cromosomal con *Bam*HI y posterior hibridación con la sonda.

## **2.- Transformación integrativa y análisis de los transformantes.**

El diagrama del proceso seguido para obtener el mutante nulo se muestra en la figura III.44. El plásmido p*UBI3*-C (20 µg) digerido con *Hind*III/*Sac*I, para separar el "cassette" de interrupción (fragmento de 5.17 kb de DNA que contiene el "cassette" *hisG::URA3::hisG* del plásmido pMB7, flanqueado por regiones 5' y 3' del gen *UBI3* de *C. albicans*), se empleó para interrumpir uno de los alelos del gen *UBI3* de la cepa *C. albicans* CAI-4 (*Ura*<sup>-</sup>) mediante transformación integrativa. Se obtuvo un sólo transformante *Ura*<sup>+</sup> que fue analizado por PCR, utilizando un oligonucleótido que hibridaba en la región del gen *URA3* de *C. albicans* (*URA3*) presente en el "cassette", y otro que hibridaba en el extremo 5' del gen *UBI3*, no presente en el "cassette" de interrupción (3F) (Tabla III.16), para poder determinar la integración del "cassette" en el locus *UBI3*. Se obtuvo un amplificado de 1.78 kb, correspondiente a un alelo del gen interrumpido por el "cassette" completo, lo que indicaba que la integración se había producido en el lugar deseado (Fig. III.45 B, calle 1). El análisis mediante Southern blot del DNA cromosomal del transformante, digerido con *Eco*RI, empleando la sonda específica del gen *UBI3* de *C. albicans* (apartado 2.2.d), confirmó este resultado (Fig. III.46, calle 2). Se detectó una banda de 4.2 kb correspondiente al alelo salvaje del gen *UBI3*, y otra, de 5.5 kb, que corresponde a un fragmento del alelo interrumpido con el



**Fig. III.44.** Esquema del proceso de interrupción secuencial de los dos alelos del gen *UBI3* (véase texto). Dianas de enzimas de restricción: H (*HindIII*), P (*PstI*), B (*BamHI*), E (*EcoRI*). Se muestran las zonas de hibridación de los oligonucleótidos empleados en el análisis por PCR de los transformantes, y la zona de hibridación de la sonda empleada en el análisis por Southern blot de los mismos.

"cassette" completo (puesto que *EcoRI* corta también dentro del "cassette"). A este transformante heterocigótico se le denominó  $\Delta$ UBI3-H1. En la cepa control CAI-4 sólo se detectó el fragmento correspondiente al alelo salvaje (4.2 kb) (Fig. III.46, calle 1). La banda de 6 kb detectada en todas las calles, corresponde al fragmento de restricción que contiene el gen *UBI4* (Fig. III.4), que también ha sido detectado por esta sonda, seguramente debido a que contiene 22 bases del extremo C-terminal de la ubiquitina, con un 50% de G ó C, que pueden hibridar con las tres secuencias homólogas del gen *UBI4*, dando una señal de hibridación (véase Fig. III.4 B).

Una vez integrado el "cassette" *hisG::URA3::hisG* en el cromosoma, pueden ocurrir sucesos de recombinación intracromosomal entre las secuencias repetidas *hisG*, resultando en la pérdida de una de las copias del gen *hisG* y del marcador *URA3* (véase Fig. II.3 de "Materiales y Métodos"), con lo que las células recuperan la auxotrofia  $Ura^-$ , y se posibilita el empleo sucesivo de *URA3* como marcador para interrumpir la segunda copia del gen. Con el fin de seleccionar los segregantes  $Ura^-$  de la cepa  $\Delta$ UBI3-H1, ésta se plaqueó sobre medio SD conteniendo uridina y ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) (Boeke *et al.*, 1984), ya que éste impide el crecimiento de las células  $Ura^+$  y permite seleccionar las cepas  $Ura^-$  (véase apartado 25.1 de

| NOMBRE | SECUENCIA                  | LOCALIZACIÓN EN LA SECUENCIA GENÓMICA |            |
|--------|----------------------------|---------------------------------------|------------|
|        |                            | extremo 5'                            | extremo 3' |
| 3F     | TTATCTAAGCGAGAGTAAGTCTTGGC | - 451                                 | - 426      |
| HISG   | CGCGCGCCTGAATCACGCCCTG     | 788                                   | 767        |
| URA3   | CAGAATTAGTGTTACGAATCAATGGC | 176                                   | 151        |
| 4F2    | GATGAGATACAAATACTGGTGCGCC  | - 129                                 | - 105      |
| 4R2    | TATGGCTTGGGATCGAAGTACGC    | 801                                   | 779        |

**Tabla III.16.** Oligonucleótidos sintéticos utilizados como cebadores en el análisis por PCR de los transformantes, obtenidos por integración del "cassette", en cada una de las etapas de los experimentos de interrupción secuencial del gen *UBI3* de *C. albicans* (algunos de ellos se utilizaron también en la secuenciación de dicho gen). La posición de los extremos 5' y 3' está numerada respecto al sitio de inicio de la traducción, excepto en el caso de los oligos HISG y URA3 en que está numerada respecto al inicio de secuenciación de dichos genes dentro del "cassette" de interrupción. Nótese que los oligonucleótidos F y R hibridan con cadenas complementarias.



"Materiales y Métodos"). Nueve segregantes  $Ura^-$  fueron analizados por PCR con los oligonucleótidos sintéticos 4F2 y 4R2 (Tabla III.10), que hibridan en las regiones 5' y 3' del gen *UBI3* utilizadas en la construcción del "cassette" de interrupción. Los resultados indicaron que en dos de ellos había tenido lugar la recombinación intracromosomal entre las secuencias *hisG*, puesto que se obtuvieron dos amplificados, uno de 0.95 kb, correspondiente al alelo salvaje, y otro de 1.7 kb, correspondiente al alelo de *UBI3* interrumpido por *hisG* (dato no mostrado). Los otros siete segregantes  $Ura^-$  habían experimentado un suceso de recombinación mitótica intercromosomal no recíproca, revertiendo al genotipo salvaje, ya que se obtuvo un sólo amplificado de 0.95 kb correspondiente al alelo salvaje (dato no mostrado). El resultado del análisis mediante Southern blot de uno de los segregantes  $Ura^-$  que habían experimentado recombinación intracromosomal, denominado  $\Delta UBI3$ -H2, se muestra en la figura III.46 (calle 3), en la que no se observa la banda de 5.5 kb y en su lugar aparece una de 5 kb, debido a la pérdida de *URA3* y una copia de *hisG*. Esta pequeña diferencia entre los tamaños se debe a que al recombinar las secuencias *hisG*, se pierde la diana *EcoRI* del "cassette". El análisis de este transformante por PCR con los oligonucleótidos 4R2 (que hibrida en el extremo 3' del gen *UBI3* presente en el "cassette" de interrupción), y 3F (que hibrida en el extremo 5' no incluido en el "cassette" de interrupción), muestra la presencia de dos amplificados, uno de 1.25 kb, correspondiente al alelo salvaje, y otro de 2 kb correspondiente al alelo interrumpido con *hisG* (Fig. III.45 A, calle 2). La ausencia de amplificado al combinar el oligonucleótido que hibrida en el gen *URA3* con otros, como son el 3F o el 4F2, (Fig. III.45 B y C, calle 2) demuestra la pérdida de *URA3* por recombinación intracromosomal. Para confirmar la presencia del gen *hisG* en uno de los alelos *UBI3* en esta cepa, se amplificó por PCR con un oligonucleótido sintético (HISG) que hibrida en la secuencia de este gen (Tabla III.16) y el oligonucleótido 3F, obteniéndose un fragmento del tamaño esperado (1.2 kb) (dato no mostrado), lo que confirmó totalmente que se había obtenido la cepa adecuada ( $Ura^-$ , con un alelo *UBI3* interrumpido con *hisG*) para proceder al siguiente paso de interrupción génica.

Para interrumpir el segundo alelo del gen se siguió una estrategia similar, empleando el "cassette" de interrupción de pUBI3-D, que carece de sitio *BamHI* en *hisG*. DNA de pUBI3-D (20  $\mu$ g), digerido con *HindIII/SacI*, para separar del vector el fragmento de 5.17 kb con el "cassette" de interrupción, se utilizó para transformar la cepa  $\Delta UBI4$ -H2. Se obtuvieron 25 transformantes  $Ura^+$  que se analizaron por PCR con oligonucleótidos deducidos de *hisG*, *UBI3* y *URA3*, y por Southern blot, demostrándose que en 23 de ellos el "cassette" se había

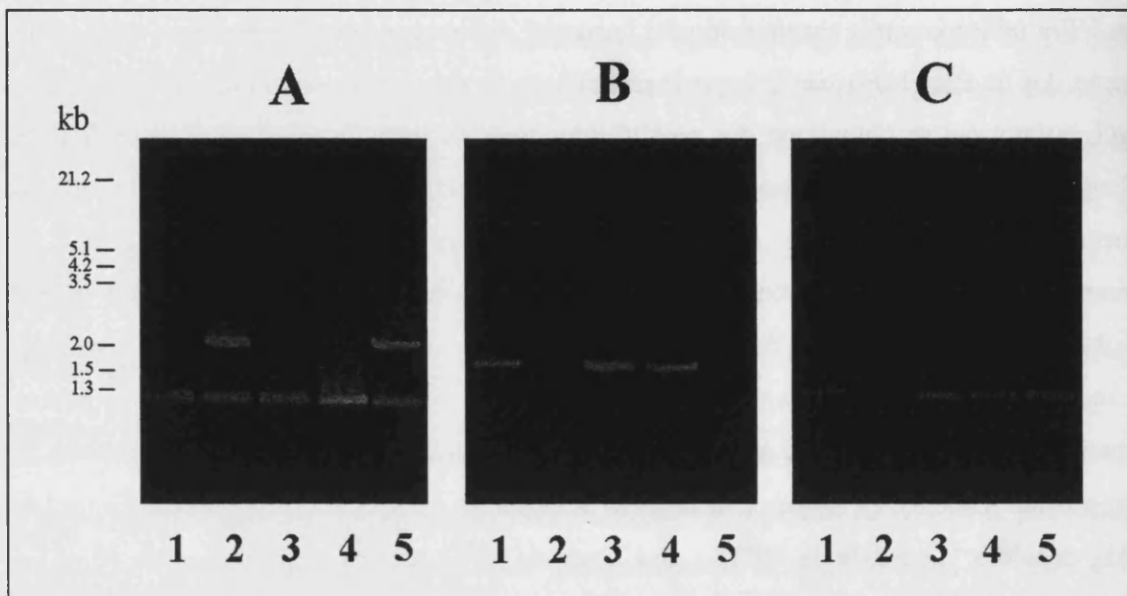


Fig. III.45. Análisis mediante PCR de las cepas de *C. albicans* obtenidas en los experimentos de interrupción secuencial del gen *UBI3*. DNA cromosomal de las distintas cepas de *C. albicans* se amplificó por PCR empleando distintas combinaciones de oligonucleótidos. (A): 4R2 y 3F; (B): URA3 y 3F; (C): URA3 y 4F2. Véase texto y figura III.44 para más detalle. Cepas estudiadas:  $\Delta$ UBI3-H1 (calle 1),  $\Delta$ UBI3-H2 (calle 2),  $\Delta$ UBI3-1 (calle 3),  $\Delta$ UBI3-2 (calle 4) y  $\Delta$ UBI3-a (calle 5).

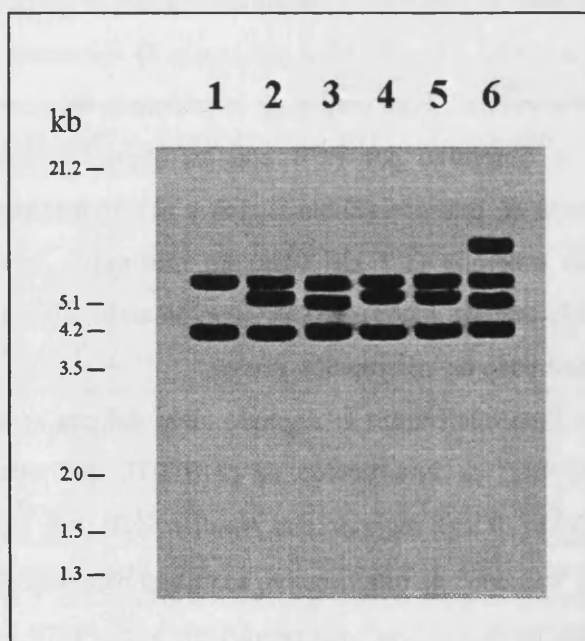


Fig. III.46. Análisis mediante Southern blot de las cepas de *C. albicans* obtenidas en los experimentos de interrupción secuencial del gen *UBI3*. Cada calle contiene DNA cromosomal (10  $\mu$ g), de las distintas cepas, digerido con *EcoRI*. Como sonda se empleó la sonda específica del gen *UBI3* de *C. albicans*. Cepas estudiadas: CAI-4 (calle 1),  $\Delta$ UBI3-H1 (calle 2),  $\Delta$ UBI3-H2 (calle 3),  $\Delta$ UBI3-1 (calle 4),  $\Delta$ UBI3-2 (calle 5) y  $\Delta$ UBI3-a (calle 6).

integrado en el alelo ya interrumpido, mientras que en los otros 2 se había integrado en un locus distinto a *UBI3*, manteniéndose en todos ellos una copia salvaje de *UBI3*. El análisis por PCR con los oligonucleótidos URA3 y 3F demostró que 23 transformantes contenían el "cassette" completo integrado en el locus *UBI3*, obteniéndose un amplificado de 1.78 kb (en la figura III.45 B, calles 3 y 4, se muestran los resultados obtenidos con 2 de los 23 transformantes, denominados  $\Delta$ UBI3-1 y  $\Delta$ UBI3-2); estos 23 transformantes contenían además una copia del alelo salvaje, y ninguna copia interrumpida con *hisG*, ya que se obtiene un sólo amplificado, de 1.25 kb, con los oligonucleótidos 4R2 y 3F (Fig. III.45 A, calles 3 y 4), lo que indica que el "cassette" se ha integrado en el alelo ya interrumpido. Este resultado se confirmó mediante análisis por Southern blot de los transformantes (Fig. III.46, calles 4 y 5), en los que aparece de nuevo la banda de 5.5 kb, correspondiente a un alelo de *UBI3* interrumpido por el "cassette" completo, desapareciendo la de 5 kb, correspondiente a un alelo de *UBI3* interrumpido por *hisG*, mientras que la banda de 4.2 kb, correspondiente a uno de los alelos salvajes del gen, se mantiene intacta. Los otros 2 transformantes contienen un alelo salvaje, puesto que se amplificaba un fragmento de DNA de 1.25 kb con los oligonucleótidos 4R2 y 3F, además de otro amplificado de 2 kb, lo que indicaba que también contienen un alelo interrumpido sólo con *hisG*, igual que la cepa  $\Delta$ UBI3-H2 antes de transformar (en la figura III.45 A, calle 5 se muestra el resultado obtenido con uno de estos transformantes, llamado  $\Delta$ UBI3-a). Por otro lado, estos 2 transformantes daban un amplificado de 1.46 kb con los oligonucleótidos URA3 y 4F2, que hibridan en secuencias internas del "cassette" (Fig. III.45 C, calle 5), indicando que tienen integrado el "cassette" completo en un locus distinto a *UBI3*, lo que se confirmó por la ausencia de amplificado con los oligonucleótidos URA3 y 3F (Fig. III.45 B, calle 5). El análisis mediante Southern blot confirmó estos resultados (Fig. III.46, calle 6), puesto que se mantiene la banda de 4.2 kb correspondiente a un alelo salvaje del gen y la de 5 kb que corresponde al otro alelo interrumpido sólo con *hisG*, y aparece una banda nueva de tamaño diferente que corresponde a un fragmento *Eco*RI de DNA cromosomal no relacionado con *UBI3*, en el que se ha introducido el "cassette".

La imposibilidad de aislar el mutante nulo para el gen *UBI3* ( $\Delta$ *ubi3::hisG* / $\Delta$ *ubi3::hisG*) a partir del mutante heterocigótico *UBI3*/ $\Delta$ *ubi3::hisG*, puede sugerir que al menos una copia del gen *UBI3* es necesaria para la viabilidad de *C.albicans*, por lo que el producto génico de *UBI3*, implicado en la biogénesis del ribosoma, sería esencial para el crecimiento en condiciones normales. No obstante, se ha descrito que las diferencias (heterología) entre alelos de un mismo gen produce una gran especificidad en los fenómenos

de recombinación, de manera que una determinada construcción puede integrarse preferentemente (hasta con una preferencia de 50 veces) en uno de los alelos (Yesland & Fonzi, 2000). Este fenómeno indica que los resultados obtenidos en la interrupción de *UBI3* pueden deberse a una gran preferencia del "cassette" por integrarse en uno de los alelos, sin que ello signifique que el gen *UBI3* sea esencial para la viabilidad. Cabe indicar que un resultado similar se obtuvo en la interrupción de *UBI4*, y posteriormente se demostró que no era esencial.

De todos modos, al disponer del mutante heterocigótico para *UBI3* y dado que la proteína codificada por el gen *UBI3* está implicada en la biogénesis del ribosoma, se procedió a estudiar si la presencia de un sólo alelo *UBI3* tenía algún efecto sobre el crecimiento en diferentes condiciones. En todas las condiciones probadas, el mutante heterocigótico *UBI3/Δubi3::hisG*, mostró un tiempo de generación muy parecido al encontrado para la cepa salvaje CAI-4 (2 h en medio de Lee a 28°C, 1.6 h en YPD a 28°C y 1.3 h en YPD a 37°C). Estos resultados indican que la interrupción de uno de los alelos del gen *UBI3* no tiene ningún efecto sobre el crecimiento en las condiciones probadas, y que un sólo alelo *UBI3* es suficiente para permitir un crecimiento óptimo.

#### **2.6.B.- Obtención del mutante nulo condicional a partir del heterocigótico *UBI3/Δubi3::hisG*.**

El hecho de no haber obtenido el mutante nulo para el gen *UBI3* de *C. albicans* mediante la técnica de interrupción secuencial con el "cassette ura-blaster", y dado que esta técnica no es útil para interrumpir genes esenciales, puede sugerir que se trata de un gen esencial para *C. albicans*. Pero por otro lado, la técnica empleada presenta baja eficiencia de transformación y además puede haber una preferencia de integración del "cassette" en uno de los dos alelos, por lo que la ausencia de transformantes deseados (interrumpidos en los dos alelos), puede no deberse necesariamente a que el gen sea esencial, como se ha comentado anteriormente (Care *et al.*, 1999; Yesland & Fonzi, 2000). Aunque en nuestro caso se han obtenido una mayoría de transformantes en los que el "cassette" se ha introducido en el alelo ya interrumpido, y otros en los que se ha introducido incluso en secuencias no relacionadas con *UBI3*, el carácter esencial de *UBI3* no ha quedado demostrado.

Para tratar de aclarar esta cuestión, se procedió a construir una cepa en la que la única copia del gen *UBI3* del mutante heterocigótico *UBI3/Δubi3::hisG*, estuviera bajo el control de

un promotor regulado. Esto permite estudiar no sólo el posible carácter esencial del gen, en cuyo caso la cepa sería viable sólo en condiciones en las que el promotor esté activado, sino que, en caso de no ser esencial, nos permitirá también observar las consecuencias fenotípicas de la ausencia de expresión en condiciones en que la misma esté bloqueada (Care *et al.*, 1999). El promotor regulable utilizado ha sido el del gen *MET3* de *C. albicans*, cuyas características se han descrito en el apartado 1.6.B. La expresión del gen *MET3* es reprimida por metionina exógena, S-adenosil metionina (SAM), y cisteína (Cherest *et al.*, 1985; Mountain *et al.*, 1991; Ono *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1989). Las condiciones de represión empleadas en este trabajo fueron una combinación de metionina (2.5 mM) y cisteína (0.5 mM), ya que la cisteína a mayor concentración puede inhibir el crecimiento del hongo por lo que se recomienda utilizarla a una concentración óptima de 0.5 mM. Sin embargo, en ningún caso se consigue una represión total del promotor, siendo los niveles basales de expresión aproximadamente el 1% de la expresión máxima (Care *et al.*, 1999).

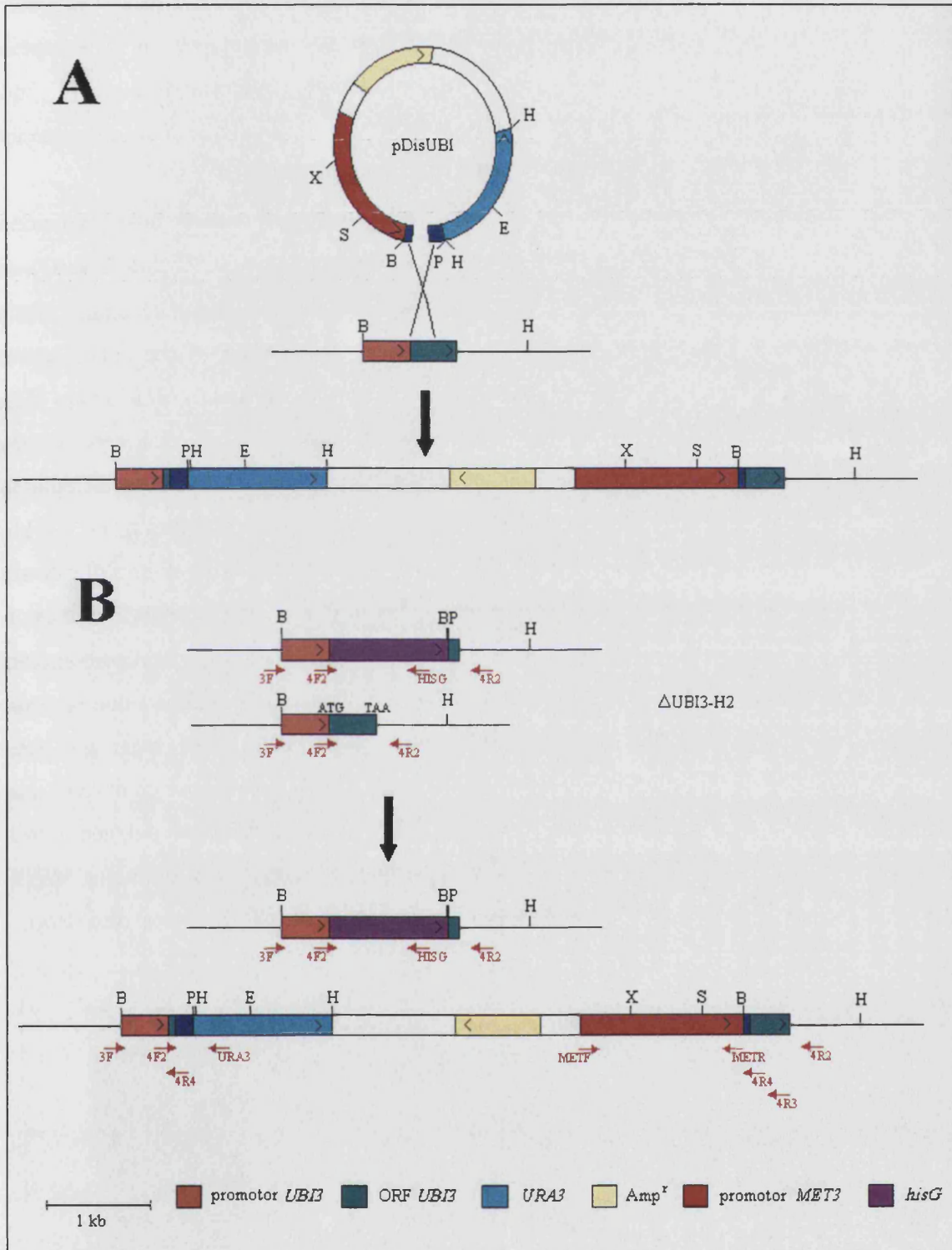
#### **1.- Construcción del "cassette" de integración a partir del plásmido pCaDis.**

Para poder interrumpir la segunda copia del gen *UBI3* del mutante heterocigótico (*UBI3/Δubi3::hisG*), y generar simultáneamente una copia de *UBI3* bajo el control del promotor *MET3*, se ha de construir previamente el "cassette" de integración a partir del plásmido pCaDis (Care *et al.*, 1999) (Fig. III.19). La técnica consiste en subclonar un fragmento con la región 5' codificante del gen *UBI3* a continuación del promotor *MET3*. La región 5' de los genes *UBI3* y *UBI4* codifica para la misma proteína, la ubiquitina, aunque tengan algunas diferencias nucleotídicas, y además la secuencia de ubiquitina codificada por *UBI4* contiene una diana de restricción interna para *ClaI* (necesaria para linearizar el plásmido posteriormente, véase apartado 25.2 de "Materiales y Métodos"), mientras que la de *UBI3* no la presenta. Por tanto, se pensó en utilizar, para obtener el mutante nulo condicional para *UBI3*, el mismo "cassette" de integración que el construido para obtener el mutante nulo condicional para *UBI4* (véase apartado 1.6.B.1). De hecho al intentar obtener el mutante nulo condicional para el gen *UBI4*, se obtuvieron algunos transformantes en los que la construcción se introdujo en el gen *UBI3* (véase apartado 1.6.B.2), lo que confirma que la misma construcción (pDisUBI) era útil para obtener el mutante nulo condicional de *C. albicans* para el gen *UBI3*.

## 2.- Transformación integrativa y aislamiento de los transformantes.

Antes de saber que el plásmido pDisUBI-a carecía de 327 nucleótidos en el promotor *MET3* (véase apartado 1.6.B.2), y que su utilización lo que realmente permitía, por lo tanto, era la obtención del mutante nulo para el gen en cuestión, se utilizó dicho plásmido, linearizado con *ClaI*, para transformar integrativamente la cepa de *C. albicans* heterocigótica para *UBI3* (*UBI3/Δubi3::hisG*), por recombinación de las secuencias de ubiquitina (Fig. III.47 A). El resultado deseado de esta transformación es la integración del "cassette" en la secuencia de ubiquitina del alelo salvaje de *UBI3*, obteniéndose el mutante nulo condicional, con una copia completa de la región codificante de *UBI3* bajo el control del promotor *MET3*, y una copia de *UBI3* incompleta, sin la región 3' codificante de la proteína ribosomal (Fig. III.47 B). También puede ocurrir la integración de la construcción en cualquier secuencia de ubiquitina de los dos alelos del gen *UBI4*. La integración en el alelo *UBI3* ya interrumpido (*Δubi3::hisG*) es imposible, puesto que dicho alelo carece de secuencia de ubiquitina.

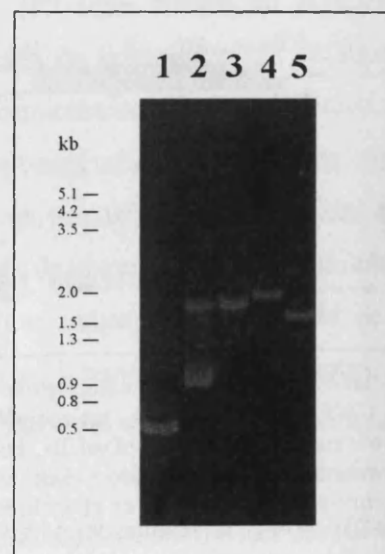
Se obtuvieron 28 transformantes Ura<sup>+</sup>, que fueron analizados por PCR, utilizando el oligonucleótido URA3, que hibrida en la región *URA3* del "cassette", y el oligonucleótido 4F2 que hibrida en la región promotora del gen *UBI3* (Tabla III.10). El resultado de este análisis reveló que la construcción no se había introducido en el alelo intacto de *UBI3* del mutante heterocigótico en ninguno de los transformantes, ya que no se obtuvo amplificado con estos oligonucleótidos en ninguno de ellos (dato no mostrado). Al ser analizados por PCR con los oligonucleótidos 4F2 y 4R2, se obtuvo en todos ellos un amplificado de 0.95 kb, correspondiente al alelo salvaje de *UBI3*, y otro de 1.7 kb, correspondiente a un alelo de *UBI3* interrumpido por *hisG* (dato no mostrado). Posteriormente, estos 28 transformantes se analizaron por PCR con los oligonucleótidos URA3 y 3F2 (que hibrida en la región promotora del gen *UBI4*) para estudiar la posible integración de la construcción en alguna secuencia de ubiquitina del gen *UBI4*. En 12 de los transformantes analizados se obtuvo un amplificado de 0.65 kb, lo que indicaba la integración de la construcción en la primera copia de ubiquitina de *UBI4*; en 4 transformantes, se obtuvo un amplificado de 0.88 kb, que indicaba la integración de la construcción en la segunda copia de ubiquitina de *UBI4*; en otros 4 transformantes, se obtuvo un amplificado de 1.11 kb, que indicaba la integración de la construcción en la tercera copia de ubiquitina de *UBI4*. En los 8 transformantes restantes, no se obtuvo amplificado con esta combinación de oligonucleótidos, lo que hacía suponer que la integración había ocurrido en algún locus distinto a *UBI4* y *UBI3*. La ausencia de transformantes con la construcción pDisUBI-a integrada en el alelo intacto del gen *UBI3* del



**Fig. III.47.** Esquema del proceso seguido para la obtención del mutante nulo condicional de *C. albicans* para el gen *UBI3* a partir del mutante heterocigótico  $\Delta$ UBI3-H2. En el panel A se muestra el proceso de integración de la construcción plasmídica pDisUBI, linearizada con *Cla*I, en el alelo salvaje de *UBI3*, y en el panel B se muestra el resultado esperado (véase texto para más detalle). Se indican las zonas de hibridación de los oligonucleótidos empleados en el análisis por PCR de los transformantes. Dianas de enzimas de restricción: B (*Bam*HI), P (*Pst*I), H (*Hind*III), E (*Eco*RI), X (*Xba*I), S (*Sal*I).

mutante heterocigótico, que corresponderían al mutante nulo de *C. albicans* para el gen *UBI3* (véase apartado 1.6.B.2), es una prueba confirmativa de que se trata de un gen esencial, siendo imposible el aislamiento de transformantes sin este gen. Además cabe recordar que este "cassette" de interrupción sí que puede integrarse en *UBI3* puesto que dicha construcción se obtuvo durante la obtención del mutante nulo condicional para *UBI4*.

Cuando se utilizó la construcción pDisUBI-b para obtener el mutante nulo condicional de *C. albicans* para el gen *UBI3* a partir del mutante heterocigótico (*UBI3/Δubi3::hisG*), se obtuvieron 35 transformantes. Al analizarlos mediante PCR con los oligonucleótidos 4F2 y URA3, se obtuvo un amplificado de 0.56 kb en un sólo transformante, lo que indicó que la construcción se había introducido en la secuencia de ubiquitina del alelo *UBI3* salvaje (Fig. III.48, calle 1). Para comprobar que el otro alelo del gen *UBI3* de esta cepa estaba interrumpido por el gen *hisG* de *S. typhimurium*, se analizó por PCR con los oligonucleótidos 4F2 y 4R2. Como resultado de este análisis se obtuvo un único amplificado, de 1.7 kb, correspondiente al alelo de *UBI3* interrumpido por *hisG*, no detectándose el amplificado de 0.95 kb correspondiente al alelo salvaje (Fig. III.48, calle 3), que aparece al analizar con estos oligonucleótidos la cepa  $\Delta$ UBI3-H2 utilizada como control (Fig. III.48, calle 2). La obtención de pocos transformantes con la construcción integrada en el locus *UBI3* se debe a que hay una baja probabilidad de que esta recombinación ocurra, pues puede tener lugar en siete secuencias de ubiquitina en el mutante heterocigótico para *UBI3*. Además, se comprobó que el promotor *MET3* se encontraba intacto delante de la región codificante del gen *UBI3* mediante PCR con los oligonucleótidos METF (que hibrida en la región del promotor *MET3* del "cassette"), y 4R3 (que hibrida en la región 3' codificante de *UBI3*), y por otro lado,



**Fig. III.48.** Análisis mediante PCR del mutante nulo condicional de *C. albicans* para *UBI3*. DNA cromosomal de la cepa  $\Delta$ UBI3-33 de *C. albicans* se amplificó por PCR empleando distintas combinaciones de oligonucleótidos: 4F2 y URA3 (calle 1), 4F2 y 4R2 (calle 3), METF y 4R3 (calle 4), METF y 4R4 (calle 5). La calle 2 corresponde a DNA cromosomal de la cepa  $\Delta$ UBI3-H2 amplificada con los oligonucleótidos 4F2 y 4R2, empleada como control. Véase texto y figura III.47 para más detalle.



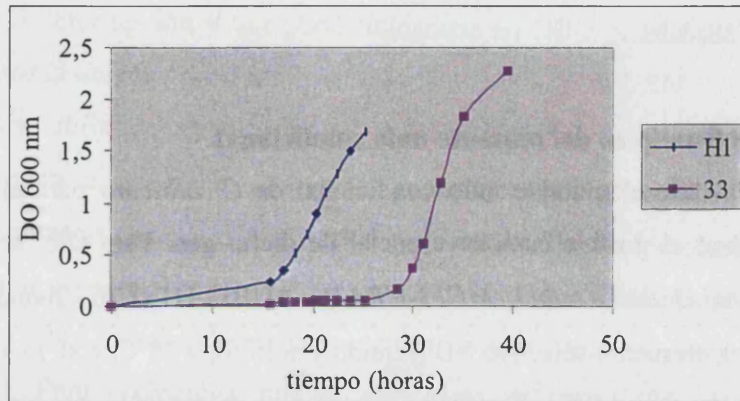
METF y 4R4 (que hibrida en la secuencia de ubiquitina), obteniéndose los amplificadores esperados, de 1.98 y 1.56 kb, respectivamente (Fig. III.48, calles 4 y 5 respectivamente). Se había obtenido, por tanto, el mutante nulo condicional de *C. albicans* para el gen *UBI3*, que fue denominado  $\Delta$ UBI3-33.

### 3.- Análisis fenotípico del mutante nulo condicional.

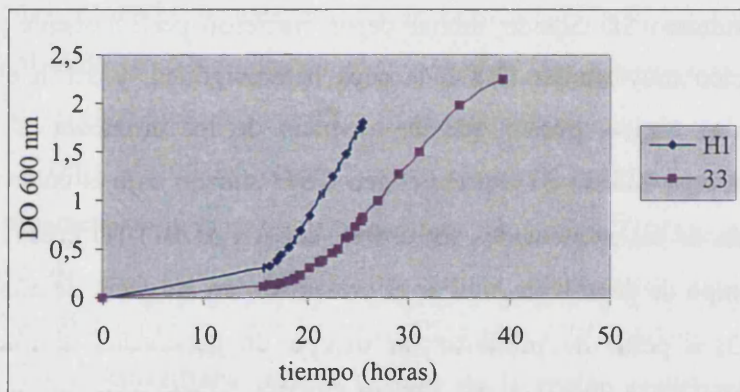
Una vez obtenido el mutante nulo condicional de *C. albicans* para el gen *UBI3*, se procedió a determinar el posible carácter esencial de dicho gen. Para ello, se cultivaron las cepas  $\Delta$ UBI3-33 (*Δubi3::hisG/Δubi3::MET3-URA3*) y  $\Delta$ UBI3-H1 (*UBI3/Δubi3::hisG-URA3-hisG*), como control, en medio selectivo SD (líquido y sólido), a 28°C, con y sin aminoácidos para controlar el promotor *MET3*. También se estudió el crecimiento en medio rico (YPD) sólido y líquido, a 28°C.

En medio mínimo SD líquido, ambas cepas crecieron perfectamente presentando un tiempo de generación muy similar (2.8 h la cepa heterocigótica, y 3.1 h el mutante nulo condicional). Esto es lógico, puesto que en ausencia de los aminoácidos represores del promotor *MET3*, la cepa  $\Delta$ UBI3-33 expresa el gen *UBI3* situado bajo el control del promotor *MET3*. En presencia de los aminoácidos represores, la cepa  $\Delta$ UBI3-H1 creció perfectamente, presentando un tiempo de generación similar al presentado en ausencia de ellos; sin embargo la cepa  $\Delta$ UBI3-33, a pesar de presentar un tiempo de generación similar, presentó un incremento en el período de latencia (Fig. III.49 C). Este comportamiento puede explicarse porque los aminoácidos utilizados para reprimir el promotor *MET3* no consiguen una represión total, permaneciendo una actividad residual de este promotor (al menos el 1%) (Care *et al.*, 1999), y por tanto, un nivel basal de expresión del gen que controla. Por este motivo, las células, al tener una expresión residual del gen *UBI3*, son incapaces de formar la cantidad mínima de ribosomas requeridos para el crecimiento celular, por un déficit en la proteína ribosomal codificada por *UBI3*. Los niveles de esta proteína van aumentando debido a la expresión basal desde el promotor *MET3*, hasta conseguir ensamblar un número mínimo de ribosomas suficientes para el crecimiento celular. Como consecuencia de este crecimiento los niveles de aminoácidos reguladores de *MET3* presentes en el medio van disminuyendo lentamente, lo que provoca un aumento de la expresión basal de *UBI3*. Como consecuencia de estos dos factores, las células tras un período de latencia largo y un período de crecimiento lento, consiguen alcanzar una velocidad de crecimiento exponencial similar a la de la cepa control.

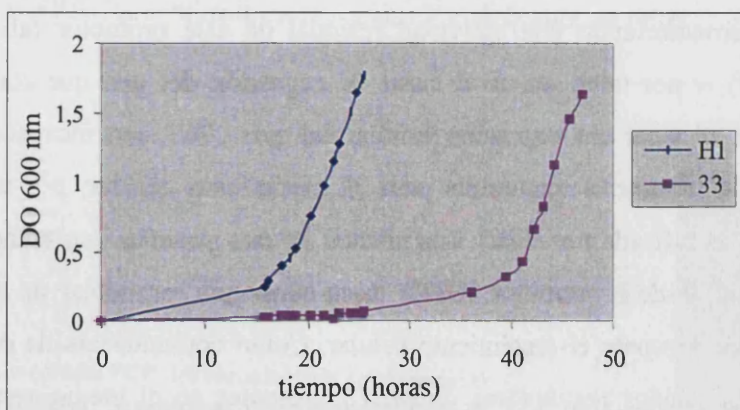
**A**



**B**

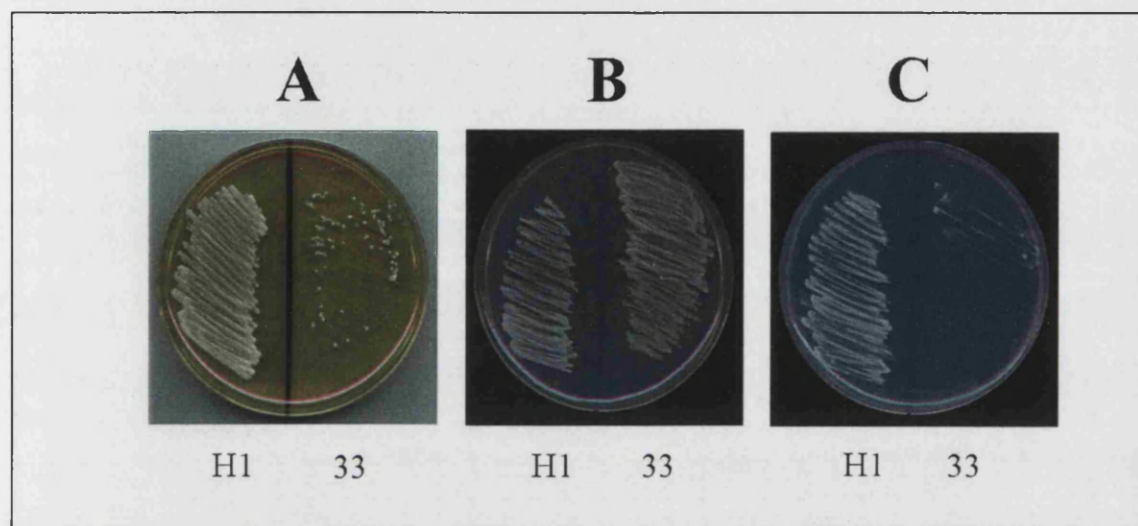


**C**



**Fig. III.49.** Curvas de crecimiento del mutante nulo condicional de *C. albicans* para el gen *UBI3* en diferentes condiciones de cultivo. El crecimiento, a 28°C, de las cepas de *C. albicans*  $\Delta$ *UBI3*-33 y  $\Delta$ *UBI3*-H1 (control), en distintos medios de cultivo: YPD (A), SD (B) y SD+aa inhibidores del promotor *MET3* (C), se siguió mediante la determinación de la  $DO_{600}$ .

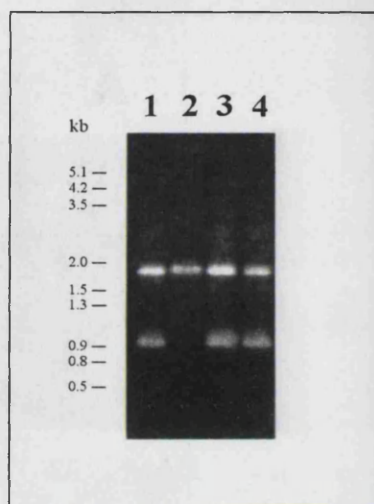
Este comportamiento también se ve reflejado al crecer las cepas en medio sólido. En medio SD sin los aminoácidos represores las dos cepas crecen perfectamente (Fig. III.50 B); pero en presencia de dichos aminoácidos, la cepa  $\Delta UBI3$ -33 sufre un retraso en el crecimiento (Fig. III.50 C), que se iguala al presentado por la cepa  $\Delta UBI3$ -H1 al prolongar el tiempo de incubación cuando crecen en placas independientes (no mostrado).



**Fig. III.50.** Crecimiento del mutante nulo condicional de *C. albicans* para el gen *UBI3* en distintos medios de cultivo sólido. Las cepas de *C. albicans*  $\Delta UBI3$ -33 y  $\Delta UBI3$ -H1 (control) se cultivaron a 28°C durante 2 días en distintos medios de cultivo sólido. (A): YPD; (B): SD; (C): SD+aa inhibidores del promotor *MET3*.

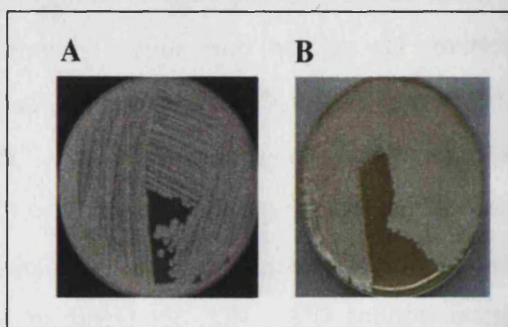
En medio rico (YPD) líquido, la cepa control  $\Delta UBI3$ -H1 creció perfectamente presentando un tiempo de generación de 2.1 h, sin embargo, el mutante nulo condicional, presentó el mismo comportamiento que en medio SD con los aminoácidos represores. El retraso en el crecimiento se debía también a un incremento en el período de latencia, ya que una vez alcanzada la fase exponencial de crecimiento el tiempo de generación presentado fue similar al de la cepa heterocigótica (Fig. III.49 A). La explicación sería similar al caso anterior: expresión basal de *UBI3* en medio rico y consumo de los aminoácidos represores del promotor *MET3*. En este caso se sumaba, además, el hecho de que al no tratarse de medio selectivo, las células que sufrían recombinación intracromosomal espontánea entre las regiones homólogas de ubiquitina con la consiguiente pérdida de la construcción con el marcador *URA3* (reversión a la cepa heterocigótica *UBI3*/*Δubi3::hisG*), podían crecer normalmente. Se comprobó que en la población celular crecida en este medio de cultivo existían revertientes  $Ura^-$  con un alelo salvaje *UBI3* mediante: a) PCR con los oligonucleótidos 4F2 y 4R2, obteniéndose dos amplificados, uno de 0.95 kb, correspondiente

al alelo salvaje, y otro de 1.7 kb, correspondiente al alelo de *UBI3* interrumpido por *hisG* (Fig. III.51, calle 3), y b) observación del crecimiento de esas células en placas de YPD, en las que se observó un crecimiento en masa muy abundante (Fig. III.52 A), parecido al que se obtiene en la cepa  $\Delta$ UBI3-H1, y muy diferente al observado en la cepa  $\Delta$ UBI3-33, cuando se sembró en este medio de cultivo (YPD) a partir de medio selectivo (SD) (Fig. III.50 A). En este



**Fig. III.51.** Análisis mediante PCR del mutante nulo condicional de *C. albicans* para el gen *UBI3* tras crecimiento en diferentes condiciones. DNA cromosomal de la cepa  $\Delta$ UBI3-33, tras ser crecida a 28°C en distintas condiciones (calle 2: SD líquido; calle 3: YPD, líquido, hasta fase estacionaria; calle 4: YPD, sólido, colonias grandes) y de la cepa  $\Delta$ UBI3-H2 (control), tras ser crecida a 28°C en SD (calle 1), se amplificó por PCR con los oligonucleótidos 4F2 y 4R2. Véase texto y figura III.47 para más detalle.

último caso, el crecimiento presentado por la cepa  $\Delta$ UBI3-33 en medio YPD sólido es lento, debido a las mismas causas que en medio SD con los aminoácidos represores del promotor *MET3*. No obstante, aparecen, además, colonias aisladas grandes que corresponden a células que han sufrido espontáneamente recombinación intracromosomal entre regiones homólogas revertiendo a la cepa heterocigótica (*UBI3*/ $\Delta$ *ubi3*::*hisG*). Esto se comprobó por: a) PCR, con los oligonucleótidos 4F2 y 4R2, obteniéndose dos amplificados, uno de 0.95 kb correspondiente al alelo salvaje y otro de 1.7 kb correspondiente al alelo de *UBI3* interrumpido por *hisG* (Fig. III.51, calle 4); b) la siembra de una de estas colonias en otra placa del mismo medio de cultivo, origina crecimiento en masa (Fig. III.52 B), que no corresponde a la cepa  $\Delta$ UBI3-33 en este medio de cultivo (Fig. 50 A), y c) comprobación del carácter *Ura*<sup>-</sup> de estas células.



**Fig. III.52.** Crecimiento del mutante nulo condicional de *C. albicans* para *UBI3* en medio YPD sólido tras ser cultivado previamente en diferentes condiciones. La cepa  $\Delta$ UBI3-33 se cultivó en YPD líquido a 28°C, hasta fase estacionaria, y en YPD sólido a 28°C, hasta originar colonias aisladas grandes. A partir de ambos cultivos (YPD líquido, A, y colonias grandes de YPD sólido, B) se inocularon en placas de YPD que fueron incubadas durante 3 días a 28°C.

Todos estos resultados demuestran que el gen *UBI3* de *C. albicans* es un gen esencial para el crecimiento. En condiciones en las que el promotor *MET3* está reprimido, se observa una ausencia total de crecimiento, hasta que, debido a la expresión basal de *UBI3* y el consumo progresivo de los aminoácidos, las células alcanzan una velocidad de crecimiento similar a la de la cepa control. Cabe concluir, por lo tanto, que cuando la célula carece del producto génico de *UBI3* es incapaz de crecer.

En *S. cerevisiae*, el gen *UBI3* no es esencial, pero el mutante defectivo en este gen (*S. cerevisiae* SUB121) presenta, un tiempo de generación muy grande, resultando un fenotipo de lento crecimiento (Finley *et al.*, 1989). Al comparar el crecimiento del mutante nulo condicional para el gen *UBI3* de *C. albicans* en medio rico YPD, con el de la cepa *S. cerevisiae* SUB121 en este medio de cultivo, se observó que el crecimiento de ésta última era lento pero homogéneo por toda la superficie sembrada, mientras que la cepa  $\Delta$ UBI3-33 presentaba un crecimiento residual, no homogéneo, con algunas colonias grandes correspondientes a células recombinantes que habían revertido a la cepa heterocigótica (*UBI3*/ $\Delta$ *ubi3::hisG*).

*C. albicans* no es la única levadura en la que se ha encontrado que el gen *UBI3* es esencial, siéndolo también en *K. lactis* (Bao & Fukuhara, 2000). Esto sugiere que, probablemente, el mecanismo de biogénesis de los ribosomas es ligeramente distinto en *C. albicans* y *S. cerevisiae*, siendo en la primera especie esencial el producto de *UBI3*. Como ejemplo indicador de estas posibles diferencias puede mencionarse el hecho de que la proteína ribosomal codificada por *UBI1-2* en *S. cerevisiae* en forma de proteína de fusión con ubiquitina, en *C. albicans* parece sintetizarse de manera independiente de la ubiquitina, como se ha comentado en apartados anteriores.



#### **IV. CONCLUSIONES**





1.- Se han aislado y caracterizado los genes *UBI3* y *UBI4* de *C. albicans*, de los que sólo hay una copia por genoma haploide, y probablemente son los únicos genes de ubiquitina en esta especie.

2.- El gen *UBI4* de *C. albicans* codifica la poliubiquitina, proteína formada por tres subunidades idénticas de ubiquitina, de 76 aminoácidos cada una, unidas directamente cabeza-cola, sin espacios intermedios, teniendo la última subunidad un aminoácido de más en el extremo carboxi-terminal. La secuencia de aminoácidos de la ubiquitina de *C. albicans* es idéntica a la de *S. cerevisiae*.

3.- El gen *UBI4* se transcribe en un mRNA de 1 kb, presente tanto en células levaduriformes como miceliales; los niveles de dicho mensajero aumentan transitoriamente tras choque térmico, lo que sugiere la implicación de la poliubiquitina en la respuesta a estrés en *C. albicans*. El estudio de la capacidad del promotor *UBI4* de *C. albicans* para dirigir la producción de invertasa en *S. cerevisiae* confirma que se trata de un promotor que se activa en respuesta a estrés térmico y/o nutricional.

4.- El gen *UBI4* de *C. albicans* se expresa en *S. cerevisiae*, y complementa el fenotipo de hipersensibilidad al calor crónico del mutante *ubi4* de esta especie, lo que confirma la función de la poliubiquitina en la respuesta a estrés térmico.

5.- La interrupción del gen *UBI4* provoca en el mutante nulo de *C. albicans* diferentes manifestaciones fenotípicas: (i) hipersensibilidad al estrés térmico por calor crónico, observable sólo en ciertas condiciones (cultivos estacionarios con glicerol como fuente de carbono); (ii) crecimiento en forma de micelio en condiciones en las que la cepa salvaje crece como levadura; (iii) elevada frecuencia de variabilidad fenotípica colonial. Por lo tanto, la poliubiquitina en *C. albicans* está implicada en la inhibición o silenciamiento de los mecanismos de emisión del tubo germinativo en ausencia de inductores de la miceliación, así como de los mecanismos inductores del "switching" o cambio fenotípico colonial.

6.- El gen *UBI3* de *C. albicans* codifica una proteína formada por una subunidad de ubiquitina, de 76 aminoácidos idéntica a la de la poliubiquitina, seguida en su extremo carboxi-terminal de un péptido de 75 aminoácidos, no relacionado con la ubiquitina e implicado en la biogénesis del ribosoma. Esta proteína ribosomal presenta un 77% de identidad con la codificada por el gen *UBI3* de *S. cerevisiae*.

7.- El gen *UBI3* de *C. albicans* se transcribe en un mRNA de 0.6 kb, tanto en células levaduriformes como miceliales en crecimiento. Los niveles de dicho mensajero disminuyen drásticamente en condiciones de estrés térmico y/o nutricional, lo que sugiere un bloqueo de la transcripción y la participación transitoria de un mecanismo de degradación específica del mRNA, descrito para otros genes de levadura que codifican componentes de la maquinaria traduccional. El estudio de la capacidad del promotor *UBI3* de *C. albicans* para dirigir la producción de invertasa en *S. cerevisiae* indica que se trata de un promotor potente cuyos niveles de expresión son proporcionales a la velocidad de crecimiento celular.

8.- La expresión del gen *UBI3* de *C. albicans* en *S. cerevisiae* complementa el fenotipo de lento crecimiento en mutantes *ubi3*, demostrando que la función del producto génico en la biogénesis del ribosoma es idéntica en ambas especies.

9.- El análisis del mutante nulo condicional de *C. albicans* para el gen *UBI3* indica que este gen es esencial para el crecimiento celular.





## **V. REFERENCIAS**



**Agabian, N., Odds, F.C., Poulain, D., Soll, D.R. & White, T.C.** 1994. "Pathogenesis of invasive candidiasis". *J. Med. Vet. Mycol.* 32: 229-237.

**Ahne, A., Müller-Derlich, J., Merlos-Lange, A.M., Kambay, F., Wolf, K. & Lang, B.F.** 1988. "Two distinct mechanisms for deletion in mitochondrial DNA of *Schizosaccharomyces pombe* mutator strains, slipped mispairing mediated by direct repeats and erroneous intron splicing". *J. Mol. Biol.* 202: 725-734.

**Ainsworth, G.C.** 1961. "Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi", 6<sup>a</sup> ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

**Alani, E., Cao, L. & Kleckner, N.** 1987. "A method for gene disruption that allows repeated use of *URA3* selection in the construction of multiply disrupted yeast strains". *Genetics* 116: 541-545.

**Albertini, A.M., Hofer, M., Calos, M.P. & Miller, J.H.** 1982. "On the formation of spontaneous deletions: the importance of short sequence homologies in the generation of large deletions". *Cell* 29: 319-328.

**Andersen, J.K.** 2000. "What causes the build-up of ubiquitin-containing inclusions in Parkinson disease?". *Mech. Ageing. Dev.* 118: 15-22.

**Annaix, Y., Bouchara, J.R., Tronchin, G., Senet, J.M. & Robert, R.** 1990. "Structures involved in binding human fibrinogen to *Candida albicans* germ tubes". *FEMS Microbiol. Immunol.* 64: 147-154.

**Aviel, S., Winberg, G., Massucci, M. & Ciechanover, A.** 2000. "Degradation of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue". *J. Biol. Chem.* 275: 23491-23499.

**Bachmair, A., Becker, F., Masterson, R.V. & Schell, J.** 1990. "Perturbation of the ubiquitin system causes leaf curling, vascular tissue alterations and necrotic lesions in a higher plant". *EMBO J.* 9: 4543-4549.

**Bakerspiegel, A. & Burke, S.** 1974. "A possible function of the chlamydospores of *Candida albicans*". *Micol. Appl.* 54: 147-152.

**Balan, I., Alareo, A. & Raymond, M.** 1997. "The *Candida albicans* CDR3 gene codes for an opaque-phase ABC transporter". *J. Bacteriol.* 179: 7210-7218.

**Baldari, C. & Cesareni, G.** 1985. "Plasmids pEMBL Y: a new single stranded shuttle vectors for the recovery and analysis of yeast DNA sequences". *Gene* 35: 27-32.

**Band, V., De Caprio, J.A., Delmolino, L., Kulesa, V. & Sager, R.** 1991. "Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells". *J. Virol.* 65: 6671-6676.

- Bao, W-G. & Fukuhara, H.** 2000. "The ubiquitin-encoding genes of *Kluyveromyces lactis*". Yeast 16: 343-351.
- Barnes, C.A., Singer, R.A. & Johnston, G.C.** 1987. "Production of heat shock protein is independent of cell cycle blockage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". J. Bacteriol. 169: 5622-5625.
- Baumer, M., Braus, G.H. & Irniger, S.** 2000. "Two different modes of cyclin clb2 proteolysis during mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*". FEBS Lett. 468: 142-148.
- Bennetzen, J.L. & Hall, B.D.** 1982. "Codon selection in yeast". J. Biol. Chem. 257: 3026-3031.
- Bikandi, J., San Millán, R., Moragues, M.D., et al.** 1998. "Rapid identification of *Candida dubliniensis* by indirect immunofluorescence based on differential localization of antigens on *C. dubliniensis* blastospores and *Candida albicans* germ tubes". J. Clin Microbiol. 36: 2428-2433.
- Birnboim, H.C. & Doly, J.** 1979. "A rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid DNA". Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523.
- Bodey, G.P.** 1993. "Candidiasis. Pathogenesis, diagnosis and treatment". Raven Press, New York.
- Boeke, J.D., LaCroute, F. & Fink, G.R.** 1984. "A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance". Mol. Gen. Genet. 197: 345-346.
- Bouchara, J.P., Tronchin, G., Annaix, V., Robert, R. & Senet, J.M.** 1990. "Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes". Infect. Immun. 58: 48-54.
- Brassart, D., Woltz, A., Golliard, M. & Neeser, J.R.** 1991. "In vitro inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Gal $\beta$ -bearing complex carbohydrates". Infect. Immun. 59: 1605-1613.
- Braun, P.C.** 1994. "Surface hydrophobicity enhances corticosterone incorporation in *Candida albicans*". Infect. Immun. 62: 4087-4090.
- Brown, A.J.P. & Gow, N.A.R.** 1999. "Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis". Trends Microbiol. 7: 333-338.
- Brown, D.H.Jr., Slobodkin, I.V. & Kumamoto, C.A.** 1996. "Stable transformation and regulated expression of an inducible reporter construct in *Candida albicans* using restriction enzyme-mediated integration". Mol. Gen. Genet. 251: 75-80.
- Buchman, T.G., Rossier, M., Merz W.G. & Charade, P.** 1990. "Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification". Part I. "Rapid identification of *Candida albicans* by in vitro amplification of a fungus-specific gene". Surgery 108: 338-347.



- Buffo, J., Herman, M.A. & Soll, D.R.** 1984. "A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*". *Mycopathologia* 85: 21-30.
- Bullen, J.J.** 1981. "The significance of iron in infection". *Rev. Infect. Dis.* 3: 1127-1138.
- Cameron, B.J. & Douglas L.J.** 1996. "Blood group glycolipids as epithelial cell receptors for *Candida albicans*". *Infect. Immun.* 64: 891-896.
- Calderone, R.** 1993. "Recognition between *Candida albicans* and host cells". *Trends. Microbiol.* 1: 55-58.
- Calderone, R.A. & Braun, P.C.** 1991. "Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*". *Microbiol. Rev.* 55: 1-20.
- Cannon, R.D., Jenkinson, H.F. & Shepherd, M.G.** 1992. "Cloning and expression of *Candida albicans* ADE2 and proteinase genes on a replicative plasmid in *C. albicans* and in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Gen. Genet.* 235: 453-457.
- Cannon, R.D., Timberlake, W.E., Gow, N.A.R., Bailey, D., Brown, A., Gooday, G.W., Hube, B., Monod, M., Nombela, C., Navarro, F., Pérez, R., Sánchez, M. & Plá, J.** 1994. "Molecular, biological and biochemical aspects of fungal dimorphism". *J. Med. Vet. Mycol.* 32: 53-64.
- Care, R.S., Trevethick, J., Binley, K.M. & Sudbery, P.E.** 1999. "The *MET3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics". *Mol. Microbiol.* 34: 792-798.
- Carile, M.J. & Watkinson.** 1994. "The Fungi". Academic Press, San Diego, CA.
- Carlson, M.** 1987. "Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces cerevisiae* species". *J. Bacteriol.* 169: 4873-4877.
- Carlson, M. & Botstein, D.** 1982. "Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase". *Cell* 28: 145-154.
- Casanova M., Cervera, A.M., Gozalbo, D. & Martínez, J.P.** 1997. "Hemin induces germ-tube formation in *Candida albicans*". *Infec. Immun.* 65: 4360-4364.
- Casanova M., Gil M.L., Cardeñoso L., Martínez J.P. & Sentandreu R.** 1989. "Identification of wall-specific antigens synthesized during germ tube formation by *Candida albicans*". *Infect. Immun.* 57: 262-271.
- Casanova, M., López-Ribot, J.L., Monteagudo, C., Llombart-Bosch, A., Sentandreu, R. & Martínez, J.P.** 1992. "Identification of a 58-kilodalton cell surface fibrinogen-binding mannoprotein from *Candida albicans*". *Infect. Immun.* 60: 4221-4229.
- Cenciarelli, C., Hou, D., Hsu, K.C., Rellahan, B.L., Wiest, B.L., Smith, H.T., Fried, V.A. & Weissman, A.M.** 1992. "Activation-induced ubiquitination of the T cell antigen receptor". *Science* 257: 795-797.

Cervera, A.M., Gozalbo, D., McCreath, K.J., Gow, N.A.R., Martínez, J.P. & Casanova, M. 1998. "Molecular cloning and characterization of a *Candida albicans* gene coding for cytochrome *c* haem lyase and a cell wall-related protein". *Mol. Microbiol.* 30: 67-81.

Chaffin, W.L., Collins, B., Marx, J.N., Cole, G.T. & Morrow, K.J., Jr. 1993. "Characterization of mutant strains of *Candida albicans* deficient in expression of a surface determinant". *Infect. Immun.* 61: 3449-3458.

Chaffin, W.L., López-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D. & Martínez, J.P. 1998. "Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 130-180.

Chantrel, Y., Gaisne, M., Lions, C. & Verdière, J. 1998. "The transcriptional regulator Hap1p (Cyp1p) is essential for anaerobic or heme-deficient growth of *Saccharomyces cerevisiae*: genetic and molecular characterization of an extragenic suppressor that encodes a WD repeat protein". *Genetics* 148: 559-569.

Chelbi-Alix, M.K. & de The, H. 1999. "Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins". *Oncogene* 18: 935-941.

Chen, J.Y. & Fonzi, W.A. 1992. "A temperature-regulated, retrotransposon-like element from *Candida albicans*". *J. Bacteriol.* 174: 5624-5632.

Cherest, H., Thao, N.N. & Surdin-Kerjan, Y. 1985. "Transcriptional regulation of the *MET3* gene of *Saccharomyces cerevisiae*". *Gene* 34: 269-281.

Chu, W.S., Magee, B.B. & Magee, P.T. 1993. "Construction of an *Sfi*I macrorestriction map of the *Candida albicans* genome". *J. Bacteriol.* 175: 6637-6651.

Ciechanover A. 1994. "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway". *Cell* 79: 13-21.

Ciechanover A. 1998. "The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life". *EMBO J.* 17: 7151-7160.

Ciechanover, A., DiGiuseppe, J.A., Bercovich, B., Orain, A. & Richter, J.D. 1991. "Degradation of nuclear oncoproteins by the ubiquitin system in vitro". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 139-143.

Ciechanover, A., Orian, A. & Schwartz, A.L. 2000a. "Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction". *BioEssays* 22: 442-451.

Ciechanover, A., Orian, A. & Schwartz, A.L. 2000b. "The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical importance". *J. Cell Biochem.* 34: 40-51.

Cohen, J., Groyne, F. & Merchez, M. 1986. "Nucleotide sequence and transcription analysis in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* of the *C. albicans* gene coding for a secreted glucoamylase". Abstracts of the 13th. International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology. *Yeast* 2, S67.

- Colina, A., Aumont, F., Deslaureirs, N., Belhemeru, P. & de Repentigny, L. 1996. "Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase". *Infect. Immun.* 64: 4514-4519.
- Cormack, B.P. 1998. "Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi". *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 406-410.
- Cormack, B.P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N.A.R., Falkow, S. & Brown, A.J.P. 1997. "Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*". *Microbiology* 143: 303-311.
- Coux, O., Tanaka, K. & Goldberg, A.L. 1996. "Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes". *Annu. Rev. Biochem.* 65: 801-847.
- Crane, D.I., Kalish, J.E. & Gould, S.J. 1994. "The *Pichia pastoris* *PAS4* gene encodes a ubiquitin-conjugating enzyme required for peroxisome assembly". *J. Biol. Chem.* 269: 21835-21844.
- Csank, C., Makris, C., Meloche, S., Schropfel, K., Rollinghoff, M., Dignard, D., *et al.* 1997. "Derepressed hyphal growth and reduced virulence in a Vhl family-related protein phosphatase mutant of the human pathogen *Candida albicans*". *Mol. Biol. Cell* 8: 2539-2551.
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A. & Tsien, R.Y. 1995. "Understanding, improving and using green fluorescent proteins". *Trends Biochem. Sci.* 20: 448-455.
- Cutler, J.E. 1991. "Putative virulence factors of *Candida albicans*". *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 187-218.
- Cutler, J.E., Glee, P.M. & Horn, H.L. 1988. "*Candida albicans* and *Candida stellatoidea*-specific DNA fragment". *J. Clin. Microbiol.* 26: 1720-1724.
- Damagnez, V., Rolfe, M. & Cottarel, G. 1995. "*Schizosaccharomyces pombe* and *Candida albicans* cDNA homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* *UBC4* gene". *Gene* 155: 137-138.
- De Backer, M.D., Magee, P.T. & Plá, J. 2000. "Recent developments in Molecular Genetics of *Candida albicans*". *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 463-498.
- De Bernardis, F., Agatensi, L., Ross, I.K., Emerson, G.W., Lorenzini, R., Sullivan, P.A. & Cassone, A. 1990. "Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis". *J. Infect. Dis.* 161: 1276-1283.
- Del Castillo, L., Nieto Soria, A. & Sentandreu, R. 1992. "Differential expression of the invertase-encoding *SUC* genes in *Saccharomyces cerevisiae*". *Gene* 120: 59-65.
- Del Rosario, M., Stephans, J.C., Zakel, J., Escobedo, J. & Giese, K. 1996. "Positive selection system to screen for inhibitors of human immunodeficiency virus-1 transcription". *Nat. Biotechnol.* 14: 1592-1596.

Denis, C.L., Ferguson, J. & Young, E.T. 1981. "A positive regulatory gene is required for accumulation of the functional messenger RNA for the repressible alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*". J. Mol. Biol. 148: 355-368.

De Repentigny, L., Kaufman, L., Cole, G.T., Kruse, D., Latgé, J.-P. & Matthews, R.C. 1994. "Immunodiagnosis of invasive fungal infections". J. Med. Vet. Mycol. 32: 239-252.

Deveraux, Q.L. & Reed, J.C. 1999. "IAP family proteins-suppressors of apoptosis". Genes Dev. 13: 239-252.

Diehl, J.A., Zindy, F. & Sherr, C.J. 1997. "Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on Thr-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway". Genes Dev. 11: 957-972.

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. 1982. "Conservation of high efficiency promoter sequences in *Saccharomyces cerevisiae*". Nucleic Acids Res. 10: 2625-2637.

Doherty, F.J., Osborn, N.U., Wassell, J.A., Heggie, P.E., László, L., *et al.* 1989. "Ubiquitin-protein conjugates accumulate in the lysosomal system of fibroblasts treated with cysteine proteinase inhibitors". Biochem. J. 263: 47-55.

Donnelly, S.M., Sullivan, D.J., Shanley, D.B. & Coleman, D.C. 1999. "Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of *ACT1* intron and exon sequences". Microbiology 145: 1871-1882.

Douglas, L.J. 1988. "*Candida* proteinases and candidosis". Crit. Rev. Biotechnol. 8: 121-129.

Dupont, B., Denning, D.W., Marriott, D., Sugar, A., Viviani, M.A. & Sirisanthana, T. 1994. "Mycoses in AIDS patients". J. Med. Vet. Mycol. 32: 65-77.

Edwards, J.E., Gaither, T.A., O'Shea, J.J., Rotrosen, D., Lawley, T.J., Wright, S.A. & Frank, M.M. 1986. "Expression of specific binding sites on *Candida* with functional and antigenic characteristics of human complement receptors". J. Immunol. 137: 3577-3583.

Egner, R. & Kuchler, K. 1996. "The yeast multidrug transporter Pdr5 of the plasma membrane is ubiquitinated prior to endocytosis and degradation in the vacuole". FEBS Lett. 378: 177-181.

Elble, R. 1992. "A simple and efficient procedure for transformation of yeast". BioFeedback 13: 18-20.

Ellis, R.J. 1990. "Molecular chaperones: the plant connection". Science 250: 954-959.

- Emr, S., Scheckman, R., Flersel, M.C. & Thorner, J. 1983. "An MF  $\alpha$ -1-*SUC2* ( $\alpha$ -factor invertase) gene fashion for study of protein localization and gene expression in yeast". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7080-7084.
- Ener, B. & Douglas, L.J. 1992. "Correlation between cell-surface hydrophobicity of *Candida albicans* and adhesion to buccal epithelial cells". FEMS Microbiol. Lett. 78: 37-42.
- Ernst, J.F. 2000. "Transcription factors in *Candida albicans*-enviromental control of morphogenesis". Microbiology 146: 1763-1774.
- Eroles, P., Sentandreu, M., Elorza, M.V. & Sentandreu, R. 1995. "Cloning of a DNA fragment encoding part of a 70 kDa heat shock protein of *Candida albicans*". FEMS Microbiol. Lett. 128: 95-100.
- Everett, R.D., Freemont, P., Saitoh, H., Dasso, M., Orr, A., Kathoria, M. & Parkinson, J. 1998a. "The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110-and proteasome-dependent loss of several PML isoforms". J. Virol. 72: 6581-6591.
- Everett, R.D., Orr, A. & Preston, C.M. 1998b. "A viral activator of gene expression functions via the ubiquitin-proteasome pathway". EMBO J. 17: 7161-7169.
- Fidel, P.L. Jr. & Sobel, J.D. 1996. "Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis". Clin. Microbiol. Rev. 9: 335-348.
- Finley, D., Bartel, B. & Varshavsky, A. 1989. "The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis". Nature 338: 394-401.
- Finley, D. & Chau, V. 1991. "Ubiquitination". Annu. Rev. Cell Biol. 7: 25-69.
- Finley, D., Özkaynak, E. & Varshavsky, A. 1987. "The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation and other stresses". Cell 48: 1035-1046.
- Finley, D., Sadis, S., Monia, B.P., Boucher, P., Ecker, D.J., Crooke, S.T. & Chau, V. 1994. "Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant". Mol. Cell. Biol. 14: 5501-5509.
- Finley, D. & Varshavsky, A. 1985. "The ubiquitin system: functions and mechanisms". Trends Biochem. Sci. 10: 343-346.
- Fonzi, W.A. & Irwin, M.Y. 1993. "Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*". Genetics 134: 717-728.
- Fraser, J., Luu, H.A., Neculcea, J., Thomas, D.Y. & Storms, R.K. 1991. "Ubiquitin gene expression: response to environmental changes". Curr. Genet. 20: 17-23.

- Frey, C.L., Barone, J.M., Dreyer, G., Koltin, Y., Petteway, S.R. & Drutz, D.J. 1990. "Synthetic protease inhibitors inhibit *Candida albicans* extracellular acid protease activity and adherence to endothelial cells". Abstr. F-102., p. 425. En: Abstracts of the 90th. General Meeting of the American Society for Microbiology 1990. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Fujiwara, T., Tanaka, K., Orino, E., Yoshimura, T. & Kumatori, A. 1990. "Proteasomes are essential for yeast proliferation: cDNA cloning and gene disruption of two major subunits". J. Biol. Chem. 265: 16604-16613.
- Fukazawa, Y. & Kagaya, K. 1997. "Molecular basis of adhesion of *Candida albicans*". J. Med. Vet. Mycol. 35: 87-99.
- Gale, C.A., Benbel, C.M., McClellan, M., Hauser, M., Becker, J.M., Berman, J. & Hostetter, M.K. 1998. "Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence of *Candida albicans* to a single gene, *INT1*". Science 279: 1355-1358.
- García-Bustos, J.F., Gómez-Lorenzo, M.G., Capa, L., Mendoza, A. y Lavandera, J.L. 1998. "Diana molecular de los nuevos antifúngicos derivados de Sordarina". II Reunión del Grupo de Microbiología Molecular de la S.E.M. Valencia. España. p. 112.
- Gascón, S. & Lampen, J.O. 1968. "Purification of the internal invertase of yeast". J. Biol. Chem. 243: 1567-1572.
- Gentry, L.O. & Price, M.F. 1985. "Urinary and genital *Candida* infections". En: Bodey, G.P. & Fainstein. Candidiasis, V. eds, p. 169. Raven Press, New York.
- Gereben, B., Goncalves, C., Harney, J.W., Larsen, P.R. & Bianco, A.C. 2000. "Selective proteolysis of human type 2 deiodinase: a novel ubiquitin-proteasomal mediated mechanism for regulation of hormone activation". Mol. Endocrinol. 14: 1697-1708.
- Ghannoum, M. & Abu-Elteen, K. 1986. "Correlative relationship between proteinase production, adherence, and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*". J. Med. Vet. Mycol. 24: 407-413.
- Gilmore, B.J., Retsinas, E.M., Lorenz, J.S. & Hostetter, M.K. 1988. "An iC3b receptor on *Candida albicans*". J. Infect. Dis. 157: 38-46.
- Gil-Navarro, I., Gil, M.L., Casanova, M., Martínez, J.P. & Gozalbo, D. 1997. "The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen". J. Bacteriol. 179: 4992-4999.
- Gilon, T., Chomsky, O. & Kulka, R.G. 1998. "Degradation signals for ubiquitin system proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*". EMBO J. 17: 2759-2766.
- Glee, P.M., Masouka, J., Ozier, W.T. & Hazer, K.C. 1996. "Presence of multiple laminin- and-fibronectin-binding protein in cell wall extract of *Candida albicans*: influence of dialysis". J. Med. Vet. Mycol. 34: 57-61.

- Glickman, M.H., Rubin D.M., Fried V.A. & Finley D. 1998. "The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome". *Mol. Cell. Biol.* 18: 3149-3162.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fu, H., Larsen, C.N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W., Fried, V. & Finley, D. 1999. "Functional analysis of the proteasome regulatory particle". *Mol. Biol. Rep.* 26: 21-28.
- Gorenstein, C. & Warner, J.R. 1976. "Coordinate regulation of the synthesis of eukaryotic ribosomal proteins". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 1547-1551.
- Gorman, J.A., Chan, W. & Gorman, J.W. 1991. "Repeated use of *GAL1* for gene disruption in *Candida albicans*". *Genetics* 129: 19-24.
- Gow, N.A.R. 1994. "Yeast-hyphal dimorfism". En: Gow, N.A.R. & Gadd, G.M. (eds.), *The growing fungus*. Chapman and Hall, London.
- Gow, N.A.R., Hube, B., Bayley, D.A., Schofield, D.A., Munro, C., Swoboda, R.K., Bertram, G., Westwater, C., Broadbent, Y., Smith, R.J., Gooday, G.W. & Brown, A.J.P. 1995. "Genes associated with dimorphism and virulence of *Candida albicans*". *Can. J. Bot.* 73: S335-S342.
- Gow, N.A.R., Perera T.H.S., 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*". *Scan. Microscop.* 8: 705-710.
- Gozalbo, D. 1992. "Multiple copies of *SUC4* regulatory regions may cause partial depression of invertase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*". *Curr. Genet.* 21: 437-442.
- Gozalbo, D. & del Castillo, L. 1994. "Differential expression of *SUC* genes: a question of bases". *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 1-7.
- Gozalbo, D., Elorza, M.V., Sanjuán, R., Marcilla, A., Valentín, E. & Sentandreu, R. 1993. "Critical steps in fungal cell wall synthesis: strategies for their inhibition". *Pharmac. Ther.* 60: 337-345.
- Gozalbo, D., Gil-Navarro, I., Azorín, I., Renau-Piqueras, J., Martínez, J.P. & Gil, M.L. 1998. "The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein". *Infect. Immun.* 66: 2052-2059.
- Gozalbo, D. & Hohmann, S. 1989. "Comparison of the nucleotide sequences of a yeast gene family. II. Analysis of spontaneous deletions and insertions". *Mutation Res.* 215: 89-94.
- Gröll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. & Huber, R. 1997. "Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution". *Nature* 386: 463-471.
- Gropper, R., Brandt, R.A., Elias S., Bearer, C.F., Mayer, A., Schwartz, A.L. & Ciechanover, A. 1991. "The ubiquitin-activating enzyme, E1, is required for stress-induced lysosomal degradation of cellular proteins". *J. Biol. Chem.* 266: 3602-3610.

- Grossmann, M.K. & Zimmermann, F.K. 1979. "The structural genes of internal invertases in *Saccharomyces cerevisiae*". Mol. Gen. Genet. 175: 223-229.
- Guarante, L. 1984. "Yeast promoters: positive and negative elements". Cell 36: 799-800.
- Hahn, S. & Guarente, L. 1988. "Yeast HAP2 and HAP3: transcriptional activators in a heteromeric complex". Science 240: 317-321.
- Hanahan, D. 1983. "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids". J. Mol. Biol. 166: 557-580.
- Hateboer, G., Kerkhoven, R. M., Shvarts, A., Bernards, R. & Beijersbergen, R.L. 1996. "Degradation of E2F by the ubiquitin-proteasome pathway: regulation by retinoblastoma family proteins and adenovirus transforming proteins". Genes Dev. 10: 2960-2970.
- Hazen, B.W. & Hazen, K.C. 1988. "Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and before germ tube formation of *Candida albicans*". Infect. Immun. 56: 2521-2525.
- Hazen, B.W., Liebert, R.E. & Hazen, K.C. 1988. "Relationship of cell surface hydrophobicity to morphology of monomorphic and dimorphic fungi". Mycologia 80: 348-355.
- Hazen, K.C. 1989. "Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells". Infect. Immun. 57: 1894-1900.
- Hazen, K.C. 1990. "Cell surface hydrophobicity of medically important fungi, specially *Candida* species". En: Doyle, R.J. & Rosenberg, M. (eds.), Microbial cell surface hydrophobicity, pp. 249-295. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Hazen, K.C., Brawner, D.L., Riesselman, M.H., Cutler, J.E. & Jutila, M.A. 1991. "Differential adherence of hydrophobic and hydrophilic *Candida albicans* yeast cells to mouse tissues". Infect. Immun. 59: 907-912.
- Hazen, K.C. & Glee, P.M. 1994. "Hydrophobic cell wall glycosylation by the pathogenic fungus *Candida albicans*". Can. J. Microbiol. 40: 266-272.
- Hazen, K.C. & Hazen, B.W. 1987. "A polystyrene microsphere assay for detecting surface hydrophobicity variations within *Candida albicans* populations". J. Microbiol. Methods 6: 289-299.
- Hazen, K.C. & Hazen, B.W. 1992. "Hydrophobic surface protein masking by the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*". Infect. Immun. 60: 1499-1508.
- Hazen, K.C. & Hazen, B.W. 1993. "Surface hydrophobic and hydrophilic protein alterations in *Candida albicans*". FEMS Microbiol. Lett. 107: 83-88.
- Hazen, K.C. & LeMelle, W.G. 1990. "Improved assay for surface hydrophobic avidity of *Candida albicans* cells". Appl. Environ. Microbiol. 56: 1974-1976.



- Heidenreich, F. & Dierich, M.P. 1985. "*Candida albicans* and *Candida stellatoidea*, in contrast to other *Candida* species, bind iC3b and C3d but not C3b". *Infect. Immun.* 50: 598-600.
- Herreros, E., García-Sáez, M.I., Nombela, C. & Sánchez, M. 1992. "A reorganized *Candida albicans* DNA sequence promoting homologous non-integrative genetic transformation". *Mol. Microbiol.* 6: 3567-3574.
- Herruer, M.H., Mager, W.H., Raué, H.A., Vreken, P., Wilms, E. & Planta, J. 1988. "Mild temperature shock affects transcription of yeast ribosomal protein genes as well as the stability of their mRNAs". *Nucleic Acids Res.* 16: 7917-7929.
- Hershko, A. & Ciechanover, A. 1992. "The ubiquitin system for protein degradation". *Annu. Rev. Biochem.* 61: 761-807.
- Hershko, A. & Ciechanover, A. 1998. "The ubiquitin system". *Annu. Rev. Biochem.* 67: 425-479.
- Hershko, A., Ciechanover, A. & Varshavsky, A. 2000. "The ubiquitin system". *Nat. Med.* 6: 1073-1081.
- Hicke, L. & Riezman, H. 1996. "Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis". *Cell* 84: 277-287.
- Hicke, L., Zanolari, B. & Riezman, H. 1998. "Cytoplasmic tail phosphorylation of the  $\alpha$ -factor receptor is required for its ubiquitination and internalization". *J. Cell Biol.* 141: 349-358.
- Hochstrasser, M. 1996a. "Ubiquitin-dependent protein degradation". *Annu. Rev. Genet.* 30: 405-439.
- Hochstrasser, M. 1996b. "Protein degradation or regulation: Ub the judge". *Cell* 84: 813-815.
- Hochstrasser, M., Johnson, P.R., Arendt, C.S., Amerik, A.Yu., Swaminathan, S., Swanson, R., Li, S.J., Laney, J., Pals-Rylaarsdam, R., Nowak, J. & Connerly, P.L. 1999. "The *Saccharomyces cerevisiae* ubiquitin-proteasome system". *Philos. Trans. R. Soc. Lon. B. Biol. Sci.* 354: 1513-1522.
- Hohmann, S. & Gozalbo, D. 1989. "Comparison of the nucleotide sequences of a yeast gene family. I. Distribution and spectrum of spontaneous base substitutions". *Mutation Res.* 215: 79-87.
- Hopwood, V. & Warnock, D.W. 1986. "New developments in the diagnosis of opportunistic fungal infection". *Eur. J. Clin. Microbiol.* 5: 379-388.
- Hostetter, M.K. 1994. "Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida albicans* with epithelial and endothelial surfaces". *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 29-42.

Hostetter, M.K. 1999. "Integrin-like proteins in *Candida* spp. and other microorganisms". *Fungal Genetics and Biology* 28: 135-145.

Hoyer, L.L., Scherer, S., Shatzman, A.R. & Livi, G.P. 1995. "*Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif". *Mol. Microbiol.* 15: 39-54.

Hube, B., Sanglard, D., Odds, F.C., Hess, D., Monod, M., Schafer, W., Brown, A.J.P. & Gow, N.A.R. 1997. "Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence". *Infect. Immun.* 65: 3529-3538.

Hynes, R.O. 1992. "Integrins: versatility, modulation and signalling in cell adhesion". *Cell* 69: 11-25.

Ibrahim, A.S., Mirbod, F., Filler, S.G., Banno, Y., Cole, G.T., Kitajima, Y., Edwards, J.E., Jr., Nozawa, Y. & Ghannoum, M.A. 1995. "Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*". *Infect. Immun.* 63: 1993-1998.

Ikemura, T. 1982. "Correlation between the abundance of yeast transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in protein genes. Differences in synonymous codon choice patterns of yeast and *Escherichia coli* with reference to the abundance of isoaccepting transfer RNAs". *J. Mol. Biol.* 158: 573-597.

Isaksson, A., Musti, A.M. & Bohmann, D. 1996. "Ubiquitin in signal transduction and cell transformation". *Biochim. Biophys. Acta.* 1288: F21-29.

Iwaguchi, S.I., Homma, M., Chibana, H. & Tanaka, K. 1992. "Isolation and characterization of a repeated sequence (RSP1) of *Candida albicans*". *J. Gen. Microbiol.* 138: 1893-1900.

Jakab, E., Paulsson, M., Ascencio, F. & Ljungh, A. 1993. "Expression of vitronectin and fibronectin binding by *Candida albicans* yeast cells". *APMIS* 101: 187-193.

Jenowski, R., Naehring, J. & Wolf, K. 1995. "A rapid and reliable method for PCR-based amplification of chromosomal and mitochondrial DNA from intact yeast cells". *Curr. Genet.* 27: 318-319.

Jiménez-Lucho, V., Ginsburg, V. & Krivan H.C. 1990. "*Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, and other fungi bind specifically to the glycosphingolipid lactosylceramide (Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer), a possible adhesion receptor for yeast". *Infect. Immun.* 58: 2085-2090.

Johnson, P.R., Swanson, R., Rakhilina, L. & Hochstrasser, M. 1998. "Degradation signal masking by heterodimerization of MAT $\alpha$ 2 and MAT $\alpha$ 1 blocks their mutual destruction by the ubiquitin proteasome pathway". *Cell* 94: 217-227.

Jones, E.W. 1991. "Three proteolytic systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Biol. Chem.* 266: 7963-7966.

- Kaminishi, H., Miyaguchi, H., Tamaki, T., Suenaga, N., Hisamatsu, M., Mihashi, I., Matsumoyo, H., Maeda, N. & Hagihara, Y.** 1995. "Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase". *Infect. Immun.* 63: 984-988.
- Kanbe, T., Han, Y., Redgrave, B., Riesselman, H. & Cutler, J.E.** 1993. "Evidence that mannans of *Candida albicans* are responsible for adherence of yeast forms to spleen and lymph node tissue". *Infect. Immun.* 61: 2578-2584.
- Kanbe, T., Li, R.K., Wadsworth, E., Calderone, R.A. & Cutler, J.E.** 1991. "Evidence for the expression of the C3d receptor of *Candida albicans* in vitro and in vivo by immunofluorescence and immunoelectron microscopy". *Infect. Immun.* 59: 1832-1838.
- Kelly, R., Miller, S.M. & Kurtz, M.B.** 1988. "One-step gene disruption by cotransformation to isolate double auxotrophs in *Candida albicans*". *Mol. Gen. Genet.* 214: 24-31.
- Kelly, R., Miller, S.M., Kurtz, M.B. & Kirsch, D.R.** 1987. "Directed mutagenesis in *Candida albicans*: one-step gene disruption to isolate *ura3* mutants". *Mol. Cell. Biol.* 7: 199-208.
- Kerridge, D.** 1988a. "Polyene macrolide antibiotics". En: Vanden Bossche, H., Mackenzie, D.W.R. & Cauwenbergh, G. (eds.), *Aspergillus and aspergillosis*, pp. 147-160. Plenum Press, New York.
- Kerridge, D.** 1988b. "Antifungal drugs". *Drugs of Today* 24: 705-715.
- Kim, C.H. & Warner, J.R.** 1983. "Messenger RNA for ribosomal proteins in yeast". *J. Mol. Biol.* 165: 79-89.
- Kimura, M. & Ohta, T.** 1972. "On the stochastic model for estimation of mutational distance between homologous proteins". *J. Mol. Evol.* 2: 87-90.
- Kimura, L.H. & Pearsall, N.N.** 1980. "Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human bucal epithelial cells". *Infect. Immun.* 28: 464-468.
- King, R.W., Deshaies, R.J., Peters, J.M. & Kirschner, M.W.** 1996. "How proteolysis drives the cell cycle". *Science* 274: 1652-1659.
- Kirsch, D.R., Rosemarie, K. & Kurtz, M.B.** 1990. *The Genetics of Candida*. eds. CRC Press.
- Kirsch, D.R. & Whitney, R.R.** 1991. "Pathogenicity of *Candida albicans* auxotrophic mutants in experimental infections". *Infect. Immun.* 59: 3297-3300.
- Kishino, T., Lalande, M. & Wagstaff, J.** 1997. "UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome". *Nature Genet.* 15: 70-73.
- Klebl, F. & Tanner, W.** 1989. "Molecular cloning of a cell wall exo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* 171: 6259-6264.

**Klotz, S.A.** 1987. "The adherence of *Candida* yeast to human and bovine vascular endothelium and subendothelial extracellular matrix". *FEMS Microbiol. Lett.* 48: 201-205.

**Klotz, S.A.** 1990. "Adherence of *Candida albicans* to components of the subendothelial extracellular matrix". *FEMS Microbiol. Lett.* 68: 249-254.

**Klotz, S.A.** 1994. "Plasma and extracellular matrix proteins mediate in the fate of *Candida albicans* in the human host". *Medical Hypotheses* 42: 328-334.

**Klotz, S.A., Drutz, D.J., Harrison, J.L. & Huppert, M.** 1983. "Adherence and penetration *Candida stellatoidea*". *Infect. Immun.* 55: 3207-3208.

**Klotz, S.A. & Penn, R.L.** 1987. "Multiple mechanisms may contribute to the adherence of *Candida* yeasts to living cells". *Curr. Microbiol.* 16: 119-122.

**Klotz, S.A. & Smith, R.L.** 1995. "Gelatin fragments block adherence of *Candida albicans* to extracellular matrix proteins". *Microbiology* 141: 2681-2684.

**Koepp, D.M., Harper, J.W. & Elledge, S.J.** 1999. "How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle". *Cell* 97: 431-434.

**Köhler, J.R. & Fink, G.R.** 1996. "*Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13223-13228.

**Köhler, G.A., White, T.C. & Agabian, N.** 1997. "Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid". *J. Bacteriol.* 179: 2331-2338.

**Koller, A., Snyder, W.B., Faber, K.N., Wenzel, T.J., Rangell, L., Keller, G.A. & Subramani, S.** 1999. "Pex22p of *Pichia pastoris*, essential for peroxisomal matrix protein import, anchors the ubiquitin-conjugating enzyme, Pex4p, on the peroxisomal membrane". *J. Cell Biol.* 146: 99-112.

**Kölling, R. & Hollenberg, C. P.** 1994. "The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants". *EMBO J.* 13: 3261-3271.

**Kornitzer, D., Raboy, B., Kulka, R.G. & Fink, G.R.** 1994. "Regulated degradation of the transcription factor *Gen4*". *EMBO J.* 13: 6021-6030.

**Krestchmar, M., Bernhard, H., Bertsch, T., Sanglard, D., Merker, R., Schröder, M., Hof, H. & Nichterlein, T.** 1999. "Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis". *Infect. Immun.* 67: 6637-6642.

**Kurtz, M.B., Kelly, R. & Kirsch, D.R.** 1990a. "Overview of *Candida* physiology, pathogenicity, and new anticandidal agents". En: Kirsch, D.R., Kelly R. & Kurtz M.B. (eds.), *The genetics of Candida*, pp. 1-19. CRC Press.

- Kurtz, M.B., Kelly, R. & Kirsch, D.R.** 1990b. "Molecular genetics of *Candida albicans*". En: Kirsch, D.R., Kelly, R. & Kurtz, M.B. (eds.), *The genetics of Candida*, pp. 21-73. CRC Press.
- Kurtz, M.B., Kirsch, D.R. & Kelly, R.** 1988. "The molecular genetics of *Candida albicans*". *Microbiol. Sci.* 5: 58-63.
- Kwong-Chung, K.J., Lheman, D., Good, C. & Magee, P.T.** 1985. "Genetic evidence for role extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*". *Sabouraudia* 23: 81-83.
- Lai, K., Bolognese, C.P., Swift, S. & McGraw, P.** 1995. "Regulation of inositol transport in *Saccharomyces cerevisiae* involves inositol-induced changes in permease stability and endocytic degradation in the vacuole". *J. Biol. Chem.* 270: 2525-2534.
- Langle-Rouault, F. & Jacobs, E.** 1995. "A method for performing precise alterations in the yeast genome using a recyclable selectable marker". *Nucleic Acids Res.* 23: 3079-3081.
- Lasker, B.A., Page, L.S., Lott, T.J. & Kobayashi, G.S.** 1992. "Isolation, characterization, and sequencing of *Candida albicans* repetitive element 2". *Gene* 116: 51-57.
- Lasker, B.A., Page, L.S., Lott, T.J., Kobayashi, G.S. & Medoff, G.** 1991. "Characterization of *CARE-1: Candida albicans* repetitive element-1". *Gene* 102: 45-50.
- László, L., Doherty, F.J., Osborn, N.U. & Mayer, R.J.** 1990. "Ubiquitinated protein conjugates are specifically enriched in the lysosomal system of fibroblasts". *FEBS Lett.* 261: 365-368.
- Leberer, E., Harcus, D., Broadbent, Y.D., Clark, K.L., Dignard, D., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Gow, N.A.R., Brown, A.J.P. & Thomas, D.Y.** 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.L., Buckley, H.R. & Campbell, C.** 1975. "An amino acid liquid synthetic medium for development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*". *Sabouraudia* 13: 148-153.
- Leng, P., Sudbery, P.E. & Brown, A.J.P.** 2000. "Rad6p represses yeast-hypha morphogenesis in the human fungal pathogen *Candida albicans*". *Mol. Microbiol.* 35: 1264-1275.
- Lenk, S.E., Dunn, W.A., Jr., Trausch, J.S., Ciechanover, A. & Schwartz, A.L.** 1992. "Ubiquitin-activating enzyme, E1, is associated with maturation of autophagic vacuoles". *J. Cell Biol.* 118: 301-308.
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A. & Masucci, M.** 1997. "Inhibition of ubiquitin-proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)-1". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12616-12621.
- Li, R.K. & Cutler, J.E.** 1993. "Chemical definition of an epitope/adhesin molecule on *Candida albicans*". *J. Biol. Chem.* 268: 18293-18299.

**Limper, A.H. & Standing, J.E.** 1994. "Vitronectin interacts with *Candida albicans* and augments organism attachment to the NR8383 macrophage cell line". *Immunol. Lett.* 42: 139-144.

**Lindquist, S.** 1981. "Regulation of protein synthesis during heat shock". *Nature (London)* 293: 311-314.

**Lloyd, A.T. & Sharp, P.M.** 1992. "Evolution of codon usage patterns: the extent and nature of divergence between *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*". *Nucleic Acids Res.* 20: 5289-5295.

**Lo, H.J., Köhler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. & Fink, G.R.** 1997. "Nonfilamentous *Candida albicans* mutants are avirulent". *Cell* 90: 939-949.

**Loo, S. & Rine, J.** 1994. "Silencers and domains of generalized repression". *Science* 264: 1768-1771.

**López, N., Halladay, J., Walter, W. & Craig, E.A.** 1999. "*SSB1*, encoding a ribosome-associated chaperone, is coordinately regulated with ribosomal proteins". *J. Bacteriol.* 181: 136-143.

**López-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 hsp 70 family". *Infect. Immun.* 64: 3333-3340.

**López-Ribot, J.L., Casanova, M., Martínez, J.P. & Sentandreu, R.** 1991. "Characterization of cell wall proteins of yeast and hydrophobic mycelial cells of *Candida albicans*". *Infect. Immun.* 59: 2324-2332.

**López-Ribot, J.L., Casanova, M., Montegudo, C., Sepúlveda, P. & Martínez, J.P.** 1994. "Evidence for the presence of a high-affinity laminin receptor-like molecule on the surface of *Candida albicans* yeast cells". *Infect. Immun.* 62: 742-746.

**López-Ribot, J.L. & Chaffin, W.L.** 1994. "Binding of the extracellular matrix component entactin to *Candida albicans*". *Infect. Immun.* 62: 4564-4571.

**López-Ribot, J.L., Martínez, J.P. & Chaffin, W.L.** 1995. "Comparative study of the C3d receptor and 58-kilodalton fibrinogen-binding mannoproteins of *Candida albicans*". *Infect. Immun.* 63: 2126-2132.

**López-Salon, M., Morelli, L., Castano, E.M., Soto, E.F. & Pasquini, J.M.** 2000. "Defective ubiquitination of cerebral proteins in Alzheimer's disease". *J. Neurosci. Res.* 62: 302-310.

**Lott, T.J., Boiron, P. & Reiss, E.** 1987. "An electrophoretic karyotype for *Candida albicans* reveals large chromosomes in multiples". *Mol. Gen. Genet.* 209: 170-174.

**Lowe, J. & Mayer, R.J.** 1990. "Ubiquitin, cell stress and diseases of the nervous system". *Neuropath. Appl. Neurobiol.* 16: 281-291.

- Lucero, P., Peñalver, E., Vela, L. & Lagunas, R.** 2000. "Monoubiquitination is sufficient to signal internalization of the maltose transporter in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* 182: 241-243.
- Macura, A.B.** 1987. "Hydrophobicity of *Candida albicans* related to their adherence to mucosal epithelial cells". *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. Ser. A* 266: 491-496.
- Madura, K., Prakash, S. & Prakash, L.** 1990. "Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD6 that encodes a ubiquitin conjugating enzyme, increases in response to DNA damage and in meiosis but remains constant during the mitotic cell cycle". *Nucleic Acids Res.* 18: 771-778.
- Magee, B.B., Koltin, Y., Gorman, J. & Magee, P.T.** 1988. "Assignment of cloned *Candida albicans* genes to bands on the electrophoretic karyotype". *Mol. Cell. Biol.* 8: 4721-4726.
- Magee, B.B. & Magee, P.T.** 1987. "Electrophoretic karyotypes and chromosome numbers in *Candida* species". *J. Gen. Microbiol.* 133: 425-430.
- Magee, B.B. & Magee, P.T.** 1997. "WO-2, a stable aneuploid derivative of *Candida albicans* strain WO-1, can switch from white to opaque and form hyphae". *Microbiology* 143: 289-295.
- Mager, W.H. & Moradas-Ferreira, P.** 1993. "Stress response of yeast". *Biochem. J.* 290: 1-13.
- Mager, W.H. & Planta, R.J.** 1991. "Coordinate expression of ribosomal protein genes in yeast as a function of cellular growth rate". *Mol. Cell. Biochem.* 104: 181-187.
- Maneu, V., Cervera, A.M., Martínez, J.P. & Gozalbo, D.** 1996. "Molecular cloning and characterization of a *Candida albicans* gene (*EFB1*) coding for the elongation factor EF1- $\beta$ ". *FEMS Microbiol. Lett.* 145: 157-162.
- Maneu, V., Cervera, A., Martínez J.P. & Gozalbo, D.** 1997. "Molecular cloning and characterization of a *Candida albicans* gene (*SSB1*) coding for a protein related to the Hsp70 family". *Yeast* 13: 677-681.
- Maneu, V., Martínez, J.P. & Gozalbo, D.** 2000a. "Identification of *Candida albicans* clinical isolates by PCR amplification of an *EFB1* gene fragment containing an intron-interrupted open reading frame". *Med. Mycol.* 38: 123-126.
- Maneu, V., Roig, P. & Gozalbo, D.** 2000b. "Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* mutations in genes involved in translation and protein folding (*EFB1* and *SSB1*) with *Candida albicans* cloned genes". *Research in Microbiology* 151: 739-746.
- Manns, J.M., Mosser, D.M. & Buckley, H.R.** 1994. "Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*". *Infect. Immun.* 62: 5154-5156.

- Martínez, J.P., Gil, M.L., Casanova, M., López-Ribot, J.L., García, J. & Sentandreu, R.** 1990. "Wall mannoproteins in cells from colonial phenotypic variants of *Candida albicans*". *J. Gen. Microbiol.* 136: 2421-2432.
- Martínez, J.P., Gil, M.L., López-Ribot, J.L. & Chaffin, W.L.** 1998. "Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*". *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 121-141.
- Marzluf, G.A.** 1997. "Molecular genetics of sulphur metabolism in filamentous fungi and yeast". *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 73-96.
- Mayer, R.J., Tipler, C., Arnold, J., Laszlo, L., Al-Khedhairi, A., Lowe, J. & Landon, M.** 1996. "Endosomes-lysosomes, ubiquitin and neurodegeneration". *Adv. Exp. Med. Biol.* 389: 261-269.
- McAllister, L. & Finkelstein, D.B.** 1980. "Alterations in translatable ribonucleic acid after heat shock of *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* 143: 603-612.
- McDonald, F.** 1984. "Secretion of inducible proteinase by pathogenic *Candida* species". *Sabouraudia* 22: 79-82.
- McDonald, F. & Odds, F.C.** 1983. "Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant". *J. Gen. Microbiol.* 129: 431-438.
- Mendoza, A., Serramia, M.J., Capa, L. & García-Bustos, J.F.** 1999. "Translation elongation factor 2 is encoded by a single essential gene in *Candida albicans*". *Gene* 229: 183-191.
- Meunier, F.** 1989. "Candidiasis". *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.* 8: 438-447.
- Meunier, F., Aoun, M. & Bitar, N.** 1992. "Candidemia in immunocompromised patients". *Clin. Infect. Dis.* 14: S120-S125.
- Merz, W.J., Connelly, C. & Hieter, P.** 1988. "Variation of electrophoretic karyotype among clinical isolates of *Candida albicans*". *J. Clin. Microbiol.* 26: 842-845.
- Messing, J.** 1983. "New M13 vectors for cloning". En: Wu, R., Grossman, L. & Moldave K. (eds.), *Methods in enzymology*, vol. 101, pp. 20-78. Academic Press, New York.
- Meyer, S.A., Ahearn, D.G. & Yarrow, D.** 1984. Genus 4. *Candida* Berkhout. En: Kreger-van Rij, N.J.W. *The yeasts, a taxonomic study*, 3ª ed, pp. 1 -12. ed. Elsevier, Amsterdam.
- Miller, J.** 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Mimnaugh, E.G., Yunmbam, M.K., Li, Q., Bonvini, P., Hwang, S., Trepel, J., Reed, E. & Neckers, L.** 2000. "Prevention of cisplatin-DNA adduct repair and potentiation of cisplatin-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells by proteasome inhibitors". *Biochem. Pharmacol.* 60: 1343-1354.



- Mitch, W.E. & Goldberg, A.L. 1996. "Mechanisms of muscle wasting: the role of the ubiquitin proteasome pathway". *N. Engl. J. Med.* 335: 1897-1905.
- Mitchell, T.G., Sandin, R.L., Bowman, B.H., Meyer, W. & Merz, W.G. 1994. "Molecular mycology: DNA probes and applications of PCR technology". *J. Med. Vet. Mycol.* 32: 351-366.
- Moazed, D. & Johnson, D. 1996. "A deubiquitinating enzyme interacts with SIR4 and regulates silencing in *S. cerevisiae*". *Cell* 86: 667-877.
- Monia, B.P., Ecker, D.J. & Crooke, S.T. 1990. "New perspectives on the structure and function of ubiquitin". *Bio/technology* 8: 209-215.
- Mori, S., Heldin, C.H. & Claesson-Welsh, L. 1992. "Ligand-induced poly-ubiquitination of the platelet-derived growth factor  $\beta$ -receptor". *J. Biol. Chem.* 267: 6429-6434.
- Mormeneo, S. & Sentandreu, R. 1982. "Regulation of invertase synthesis by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* 152: 14-18.
- Moskvina, E., Imre, E.M. & Ruis, H. 1999. "Stress factors acting at the level of the plasma membrane induce transcription via the stress response element (STRE) of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Microbiol.* 32: 1263-1272.
- Mountain, H.A., Bystrom, A., Larsen, J.T. & Korch, C. 1991. "Four major transcriptional responses in the methionine threonine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast* 7: 781-803.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S.i., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K. & Ichihara, A. 1992. "Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination". *Nature* 360: 597-599.
- Musial, C.E., Cockerill, F.R. & Roberts, G.D. 1988. "Fungal infections of the immunocompromised host: clinical and laboratory aspects". *Clin. Microbiol. Rev.* 1: 346-364.
- Musti, A.M., Treier, M. & Bohmann, D. 1997. "Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases". *Science* 275: 400-402.
- Myer, A. & Schwartz, L.M. 1996. "Allelic variation of the polyubiquitin gene in the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*, and its regulation by heat shock and programmed cell death". *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 26: 1037-1046.
- Naujokat, C., Sezer, O., Zinke, H., Leclere, A., Hauptmann, S. & Possinger, K. 2000. "Proteasome inhibitors induced caspase-dependent apoptosis and accumulation of p21WAF1/Cip1 in human immature leukemic cells". *Eur. J. Haematol.* 65: 221-236.
- Nishizawa, M., Okazaki, K., Furuno, N., Watanabe, N. & Sagata, N. 1992. "The "second-codon rule" and autophosphorylation govern the stability and activity of Mos during the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes". *EMBO J.* 11: 2433-2446.

- Odds, F.C.** 1979. "*Candida* and candidiasis". University Park Press, Baltimore.
- Odds, F.C.** 1988. "*Candida* and candidosis", a review and bibliography, 2<sup>nd</sup> ed. Baillière Tindall, London.
- Odds, F.C.** 1992. "Antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by relative growth measurement at single concentrations of antifungal agents". *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 1727-1737.
- Odds, F.C.** 1993. "Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 31: 463-471.
- Odds, F.C.** 1994. "*Candida albicans*, the life and times of a pathogenic yeast". *J. Med. Vet. Mycol.* 32: 1-8.
- Olson, E.J., Standing, J.E., Griego-Harper, N., Hoffman, O.A. & Limper, A.H.** 1996. "Fungal  $\beta$ -glucan interacts with vitronectin and stimulates tumor necrosis factor alpha release from macrophages". *Infect. Immun.* 64: 3548-3554.
- Ono, B.I., Kijma, K., Ishii, N., Kawato, T., Matsuda, A., Paszewski, A. & Shinoda, S.** 1996. "Regulation of sulphate assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast* 12: 1153-1162.
- Otto, B.R., Verweij-van Vught, A.M.J.J. & MacLaren, D.M.** 1992. "Transferrins and heme compounds as iron sources for pathogenetic bacteria". *Crit. Rev. Microbiol.* 18: 217-273.
- Özkaynak, E., Finley, D., Solomon M.J. & Varshavsky, A.** 1987. "The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions". *EMBO J.* 6: 1429-1439.
- Page, S. & Odds, F.C.** 1988. "Binding of plasma membrane proteins to *Candida* species *in vitro*". *J. Gen. Microbiol.* 134: 2693-2702.
- Paolini, R. & Kinet, J.P.** 1993. "Cell surface control of the multiubiquitination and deubiquitination of high-affinity immunoglobulin E receptors". *EMBO J.* 12: 779-786.
- Pasquini, L.A., Marta, C.B., Adamo, A.M., Pasquini, J.M. & Soto, E.F.** 2000. "Relationship between the ubiquitin-dependent pathway and apoptosis in different cells of the central nervous system: effect of thyroid hormones". *Neurochem. Res.* 25: 627-635.
- Pearson, W.R. & Lipman, D.J.** 1988. "Improved tools for biological sequence comparison". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444-2448.
- Perepnikhatka, V., Fischer, F.J., Niimi, M., Baker, R.A., Cannon, R.D., et al.** 1999. "Specific chromosome alterations in fluconazole-resistant mutants of *Candida albicans*". *J. Bacteriol.* 181: 4041-4049.
- Pérez-Martín, J., Uría, J.A. & Johnson A.D.** 1999. "Phenotypic switching in *Candida albicans* is controlled by a *SIR2* gene". 18: 2580-2592.

- Perlman, D. & Halvorson, H.O.** 1981. "Distinct repressible mRNAs for cytoplasmic and secreted yeast invertase are encoded by a single gene". *Cell* 25: 525-536.
- Perlman, D., Halvorson, H.O. & Cannon, L.E.** 1982. "Presecretory and cytoplasmic invertase polypeptides encoded by distinct mRNAs derived from the same gene differ by a signal sequence". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 781-785.
- Pfaler, M.A.** 1989. "Infection control: opportunistic fungal infections - the increasing importance of *Candida* sp.". *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 9: 408-416.
- Pfaler, M.A.** 1994. "Epidemiology and control of fungal infections". *Clin. Infect. Dis.* 19: S8-S13.
- Pfund, C., Lopez-Hoyo, N., Ziegelhoffer, T., Schilke, B.A., Lopez-Buesa, P., Walter, W.A., Wiedmann, M. & Craig, E.A.** 1998. "The molecular chaperone Ssb from *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the ribosome-nascent chain complex". *EMBO J.* 17: 3981-3989.
- Pickart, C.M. & Vella, A.T.** 1988. "Levels of active ubiquitin carrier proteins decline during erythroid maturation". *J. Biol. Chem.* 263: 12028-12035.
- Plá, J., Gil, C., Monteoliva, L., Navarro-García, F., Sánchez, M. & Nombela, C.** 1996. "Understanding *Candida albicans* at the molecular level". *Yeast* 12: 1677-1702.
- Plá, J., Pérez-Díaz, R.M., Navarro-García, F., Sánchez, M. & Nombela, C.** 1995. "Cloning of the *Candida albicans* HIS1 gene by direct complementation of a *C. albicans* histidine auxotroph using an improved double-ARS shuttle vector". *Gene* 165: 115-120.
- Planta, R.J.** 1997. "Regulation of ribosome synthesis in yeast". *Yeast* 13: 1505-1518.
- Polak, A.** 1990. "Mode of action studies". En: Ryley, J.F. (ed.), *Chemotherapy of Fungal Diseases*, pp. 153-182. Springer-Verlag, Berlín.
- Pontón, J.** 1996. "Diagnóstico de laboratorio de las candidiasis invasivas". Conferencia en el Simposium Internacional "Biología molecular, celular y patogénesis de *Candida albicans*". Valencia. España.
- Pontón, J., Marot-Leblond, A., Ezcurra, P.A., Barturen, B., Robert, R. & Senet, J.M.** 1993. "Characterization of *Candida albicans* cell wall antigens with monoclonal antibodies". *Infect. Immun.* 61: 4842-4847.
- Poulain, D., Hopwood, V. & Vernes, A.** 1985. "Antigenic variability of *Candida albicans*". *Crit. Rev. Microbiol.* 12: 223-270.
- Raboy, B., Sharon, G., Parag, H.A., Shochat, Y. & Kulka, R.G.** 1991. "Effect of stress on protein degradation: role of the ubiquitin system". *Acta Biol. Hung.* 42: 3-20.

**Radford, D.R., Challacombe, S.J. & Walter, J.D.** 1994. "A scanning electronmicroscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of *Candida albicans*". J. Med. Microbiol. 40: 416-423.

**Ramsey, H., Morrow, B. & Soll, D.R.** 1994. "An increase in switching frequency correlates with an increase in recombination of the ribosomal chromosomes of *Candida albicans* strain 3153A". Microbiology 7: 1525-1531.

**Ray, T.L. & Paine, C.D.** 1988. "Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase". Infect. Immun. 56: 1942-1949.

**Rechsteiner, M.** 1987. "Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis". Annu. Rev. Cell Biol. 3: 1-30.

**Redman, K.L. & Rechsteiner, M.** 1989. "Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a". Nature 338: 438-440.

**Regúlez, P., Arilla, M.C., Bikandi, J., Quindós, G., Cisterna, R. & Pontón, J.** 1992. "Identification of antigens reacting with anti-*Candida albicans* germ tube antibodies". Eur. J. Epidemiol. 8: 356-361.

**Reinstein, E., Scheffner, M., Oren, M., Ciechanover, A. & Schwartz, A.** 2000. "Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue". Oncogene 19: 5944-5950.

**Riggsby, W.S.** 1990. "Physical characterization of the *Candida albicans* genome". En: Kirsch, D.R., Kelly, R. & Kurtz, M.B. (eds.), The genetics of *Candida*, pp. 125-146. CRC Press.

**Robzyk, K., Recht, J. & Osley, M.A.** 2000. "Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast". Science 287: 501-504.

**Rodríguez, L., Lampen, J.O. & MacKay, V.L.** 1981. "*SUC1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: a structural gene for the large (glycoprotein) and small (carbohydrate-free) forms of invertase". Mol. Cell. Biol. 1: 469-474.

**Ross, I.K., De Bernardis, F., Emerson, G.W., Cassone, A. & Sullivan, P.A.** 1990. "The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of secretion and virulence of a proteinase deficient mutant". J. Gen. Microbiol. 136: 687-694.

**Roth, A. F. & Davis, N. G.** 1996. "Ubiquitination of the yeast a-factor receptor". J. Cell Biol. 134: 661-674.

**Rothstein, R.** 1985. "Cloning in yeast". En: Glover, D.M. (ed.), DNA cloning, vol. II, pp. 45-66. IRL Press, Oxford.

Rubin, D.M., van Nocker, S., Glickman, M., Coux, O., Wefes, I., Sadis, S., Fu, H., Goldberg, A., Vierstra, I. & Finley, D. 1997. "ATPase and ubiquitin-binding proteins of the yeast proteasome". *Mol. Biol. Rep.* 24: 17-26.

Rüchel, R. 1986. "Cleavage of immunoglobulins by pathogenetic yeast of the genus *Candida*". *Microbiol. Sci.* 3: 316-319.

Rüchel, R., De Bernardis, F., Ray, T.L., Sullivan, P.A. & Cole, G.T. 1992. "*Candida* acid proteinases". *J. Med. Vet. Mycol.* 30: 123-132.

Ruis, H. & Schüller, C. 1995. "Stress signaling in yeast". *BioEssays* 17: 959-965.

Ruoslahti, E. & Pierschbacher, M.D. 1987. "New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins". *Science* 238: 491-497.

Rustchenko-Bulgac, E.P. & Howard, D.H. 1993. "Multiple chromosomal and phenotypic changes in spontaneous mutants of *Candida albicans*". *J. Gen. Microbiol.* 139: 1195-1207.

Rustchenko, E.P., Howard, D.H. & Sherman, F. 1997. "Variation in assimilating functions occurs in spontaneous *Candida albicans* mutants having chromosomal alterations". *Microbiology* 143: 1765-1778.

Ryder, N.S., Frank, I. & Dupont, M.C. 1986. "Ergosterol biosynthesis inhibition by the thiocarbamate antifungal agents, tolnaftate and tolclolate". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 29: 858-860.

Ryder, N.S., Stuetz, A. & Nussbaumer, P. 1992. "Squalene epoxidase inhibitors. Structural determinants for activity and selectivity of allylamines and related compounds". En: Nes, W.D., Parish, E.J. & Trzaskos, J.M. (eds.), *Regulation of Isopentenoid Metabolism*, pp. 192-204. American Chemical Society, Washington, DC.

Sadhu, C., McEachern, M., Rustchenko-Bulgac, E.P., Schmid, J., Soll, D.R. & Hicks, J.B. 1991. "Telomeric repeated sequences in *Candida* yeasts and their use in strain identification. *J. Bacteriol.* 173: 842-850.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. "Molecular cloning". A laboratory manual, 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. 1977. "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.

Sanglard, D., Hube, B., Monod, M., Odds, F.C. & Gow, N.A.R. 1997. "A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP4*, *SAP5*, and *SAP6* of *Candida albicans* causes attenuated virulence". *Infect. Immun.* 65: 3539-3546.

Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. & Bille, J. 1996. "Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors". *Antimicrobiol. Agents Chemother.* 40: 2300-2305.

Santos, M.A.S. & Tuite, M.F. 1995. "The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*". Nucleic Acids Res. 23: 1481-1486.

Santos, M.A.S., Ueda, T., Watanabe, K. & Tuite, M.F. 1997. "The non-standard genetic code of *Candida* spp.: an evolving genetic code or a novel mechanism for adaptation?". Mol. Microbiol. 26: 423-431.

Schaaper, R.M., Danforth, B.N. & Glickman, B.W. 1986. "Mechanism of spontaneous mutagenesis: an analysis of the spectrum of spontaneous mutations in the *Escherichia coli lacI* gene". J. Mol. Biol. 189: 273-284.

Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D. & Howley, P.M. 1993. "The HPV-16 E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53". Cell 75: 495-505.

Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. & Howley, P.M. 1990. "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53". Cell 63: 1129-1136.

Scheld, W.M., Strunk, R.W., Balian, G. & Calderone, R.A. 1985. "Microbial adhesion to fibronectin in vitro correlates with production of endocarditis in rabbits". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 180: 474-482.

Scherer, S. & Magee, P.T. 1990. "Genetics of *Candida albicans*". Microbiol. Rev. 54: 226-241.

Scherer, S. & Stevens, D.A. 1988. "A *Candida albicans* dispersed, repeated gene family and its epidemiologic applications". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1452-1456.

Schwartz, A.L. & Ciechanover, A. 1999. "The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases". Annu. Rev. Med. 50: 57-74.

Schwartz, L.M., Kosz, L. & Kay, B.K. 1990. "Gene activation is required for developmentally programmed cell death". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6594-6598.

Seglen, P.O. & Bohley, P. 1992. "Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms". Experientia (Basel) 48: 158-172.

Senet, J.M. 1996. "Relationship between the fungus and the host defense mechanisms". Conferencia en el Simposium Internacional "Biología molecular, celular y patogénesis de *Candida albicans*". Valencia. España.

Senet, J.M. 1997. "Risk factors and physiopathology of candidiasis". Rev. Iberoam. Micol. 14: 6-13.

Sepúlveda, P., Cervera, A.M., López-Ribot, J.L., Chaffin, W.L., Martínez, J.P., & Gozalbo, D. 1996a. "Cloning and characterization of a cDNA coding for *C. albicans* polyubiquitin". J. Med. Vet. Mycol. 34: 315-322.

- Sepúlveda, P., López-Ribot, J.L., Gozalbo, D., Cervera, A., Martínez, J.P. & Chaffin, W.L. 1996b. "Ubiquitin-like epitopes associated with *C. albicans* cell surface receptors". *Infect. Immun.* 64: 4406-4408.
- Sharp, P.M., Tuohy, P.M.F. & Mosursky, K.R. 1986. "Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes". *Nucleic Acids Res.* 14: 5125-5143.
- Shepherd, M.G., Poulter, R.T.M. & Sullivan P.A. 1985. "*Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity". *Annu. Rev. Microbiol.* 39: 579-614.
- Sherwood, J., Gow, N.A.R., Gooday, G.W., Gregory, D.W. & Marshall D. 1992. "Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration". *J. Med. Vet. Mycol.* 30: 461-469.
- Shih, S.C., Sloper-Mould, K.E. & Hicke, L. 2000. "Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors". *EMBO J.* 19: 187-198.
- Shirane, M., Harumiya, Y., Ishida, N., Hirai, A., Miyamoto, C., Hatakeyama, S., Nakayama, K. & Kitagawa, M. 1999. "Down-regulation of p27(Kip1) by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic processing". *J. Biol. Chem.* 274: 13886-13893.
- Silva, T.M., Glee, P.M. & Hazen, K.C. 1995. "Influence of cell surface hydrophobicity on attachment of *Candida albicans* to extracellular matrix proteins". *J. Med. Vet. Mycol.* 33: 117-122.
- Simon, J.R., Treger, J.M. & McEntee, K. 1999. "Multiple independent regulatory pathways control *UBI4* expression after heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Microbiol.* 31: 823-832.
- Simoneti, N., Strippoli, V. & Cassone, A. 1974. "Yeast-mycelial conversion induced by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*". *Nature* 250: 344-346.
- Skerl, K.G., Calderone, R.A., Segal, E., Sreevalsan, T. & Scheld, W.M. 1984. "In vitro binding of *Candida albicans* yeast cells to human fibronectin". *Can. J. Microbiol.* 30: 221-227.
- Slutsky, B., Buffo, J. & Soll, D.R. 1985. "High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*". *Science* 230: 666-669.
- 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.
- Snell, R.G., Hermans, I.F., Wilkins, R.J. & Corner, B.E. 1987. "Chromosomal variations in *Candida albicans*". *Nucleic Acids Res.* 15: 3625.

- Sobel, J.D., Muller, G. & Buckley, H.R.** 1984. "Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candidal vaginitis". *Infect. Immun.* 44: 576-580.
- Soll, D.R.** 1985. "*Candida albicans*". En: Szanislo, P.I. (ed.), *Fungal dimorphism with emphasis on fungi pathogenic for humans*, pp. 167-190. Plenum Press, New York, London.
- Soll, D.R.** 1990. "Dimorphism and high-frequency switching in *Candida albicans*". En: Kirsch, D.R., Kelly, R. & Kurtz, M.B. (eds.), *The genetics of Candida*, pp. 147-176. CRC Press.
- Soll, D.R.** 1992. "High-frequency switching in *Candida albicans*". *Clin. Microbiol. Rev.* 5: 183-203.
- Soll, D.R.** 1997. "Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*". *Microbiology* 143: 279-288.
- Soll, D.R., Langtimm, L.J., McDowell, J., Hicks, J. & Galask, D.** 1987. "High-frequency switching in *Candida albicans*". *J. Clin. Microbiol.* 25: 1611-1622.
- Soll, D.R., Morrow, B. & Srikantha, T.** 1993. "High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*". *Trends Genet.* 9: 61-65.
- Southern, E.** 1975. "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". *J. Mol. Biol.* 98: 503-510.
- Spence, J., Sadis, S., Haas, A.L. & Finley, D.** 1995. "A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination". *Mol. Cell. Biol.* 15: 1265-1273.
- Spencer, V.A. & Davie, J.R.** 1999. "Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression". *Gene* 240: 1-12.
- Staub, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Köhler, G., Michel, S., et al.** 1999. "Host-induced, stage-specific virulence gene activation in *Candida albicans* during infection". *Mol. Microbiol.* 32: 533-546.
- Staub, O., Gautschi, I., Ishikawa, Y., Breitschopf, K., Ciechanover, A., Schild, L. & Rotin, D.** 1997. "Regulation of stability and function of the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) by ubiquitination". *EMBO J.* 16: 6325-6336.
- Stoldt, V.R., Sonneborn, A., Leuker, C.E. & Ernst, J.F.** 1997. "Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi". *EMBO J.* 16: 1982-1991.
- Storey, A., Thomas, M., Kalita, A., Harwood, C., Gardiol, D., Mantovani, F., Breuer, J., Leigh, I.M., Matlashewski, G. & Banks, L.** 1998. "Role of p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer". *Nature* 392: 229-234.



- Strack, B., Calistri, A., Accola, M.A., Palu, G. & Gottlinger, H.G.** 2000. "A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13063-13068.
- Struhl, K.** 1987. "Promoters, activator proteins and the mechanism of transcriptional initiation in yeast". *Cell* 49: 295-297.
- Suenegawa, T., Hirano, A., Llena, J.F., Ksiezak-Reding, H. & Yen, S.H.** 1990. "Immunoreactivity in kuru plaques in Creutzfeldt-Jakob disease". *Ann. Neurobiol.* 28: 174-177.
- Suzuki, T., Kobayashi, I., Kanbe, T. & Tanaka, K.** 1989. "High frequency variation of colony morphology and chromosome reorganization in the pathogenic yeast *Candida albicans*". *J. Gen. Microbiol.* 135: 425-434.
- Swaminathan, S., Amarik, A.Y. & Hochstrasser, M.** 1999. "The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast". *Mol. Biol. Cell* 10: 2583-2594.
- Swoboda, R.K., Bertram, G., Budge, S., Gooday, G.W., Gow, N.A., et al.** 1995. "Structure and regulation of the HSP90 gene from the pathogenic fungus *Candida albicans*". *Infect. Immun.* 63: 4506-4514.
- Tanaka, K., Matsumoto, K. & Toh-e A.** 1988. "Dual regulation of the expression of the polyubiquitin gene by cyclic AMP and heat shock in yeast". *EMBO J.* 7: 495-502.
- Tavares, D., Ferreira, M., Vilanova, M., Videira, A. & Arala-Chaves, M.P.** 1995. "Immunoprotection against systemic candidiasis in mice". *Internat. Immunol.* 7: 785-796.
- Tavares, D., Salvador, A., Ferreira, P. & Arala-Chaves, M.** 1993. "Immunological activities of a *Candida albicans* protein which plays an important role in the survival of the microorganism in the host". *Infect. Immun.* 61: 1881-1888.
- Thomas, D., Cherest, H. & Surdin-Kerjan, Y.** 1989. "Elements involved in S-adenosylmethionine-mediated regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* gene". *Mol. Cell. Biol.* 9: 3292-3298.
- Thomas, D. & Surdin-Kerjan, Y.** 1997. "Metabolism of Sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 61: 503-532.
- Thompson, J.R., Register, E., Curotto, J., Kurtz, M. & Kelly, R.** 1998. "An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation". *Yeast* 14: 565-571.
- Tosh, F.D. & Douglas, L.J.** 1992. "Characterization of a fucoside-binding adhesin of *Candida albicans*". *Infect. Immun.* 60: 4734-4739.
- Treger, J., Hiechman, K.A. & McEntee K.** 1988. "Expression of the yeast *UBI4* gene increases in response to DNA-damaging agents and in meiosis". *Mol. Cell. Biol.* 8: 1132-1136.

Treier, M., Staszewski, L.M. & Bohmann, D. 1994. "Ubiquitin-dependent c-Jun degradation *in vivo* is mediated by the  $\delta$  domain". *Cell* 78: 787-798.

Tsuboi, R., Komatsuzaki, H. & Ogawa, H. 1996. "Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties". *Infect. Immun.* 64: 2936-2940.

Tsuboi, R., Ogawa, H., Bramono, K., Richardson, M.D., Shankland, G.S., Crozier, W.J., Sei, Y., Ninomiya, J., Nakabayashi, A., Takaiuchi, I., Payne, C.D. & Ray, T.L. 1994. "Pathogenesis of superficial mycoses". *J. Med. Vet. Mycol.* 32: 91-104.

Vanden Bossche, H., Warnock, D.W., Dupont, B., Kerridge, D., Sen Gupta, S., Improvisi, L., Marichal, P., Odds, F.C., Provost, F. & Ronin, O. 1994. "Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance". *J. Med. Vet. Mycol.* 32: 189-202.

Vanden Bossche, H., Willemsens, G. & Marichal, P. 1987. "Anti-*Candida* drugs. The biochemical basis for their activity". *CRC Critical Reviews in Microbiology* 15: 57-72.

van der Klei, I.J., Hilbrands, R.E., Kiel, J.A., Rasmussen, S.W., Cregg, J.M. & Veenhuis, M. 1998. "The ubiquitin-conjugating enzyme Pex4p of *Hansenula polymorpha* is required for efficient functioning of the PTS1 import machinery". *EMBO J.* 17: 3608-3618.

van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D. & Vierstra, R.D. 1996. "The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover". *Mol. Cell. Biol.* 16: 6020-6028.

Varshavsky, A. 1992. "The N-end rule". *Cell* 69: 725-735.

Varshavsky, A. 1996. "The N-end rule: Functions, mysteries, uses". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12142-12149.

Varshavsky, A., Turner, G., Du, F. & Xie, Y. 2000. "The ubiquitin system and the N-end rule pathway". *Biol. Chem.* 381: 779-789.

Veinot-Drebot, L.M., Singer, R.A. & Johnston, G.C. 1989. "Heat shock causes transient inhibition of yeast rRNA gene transcription". *J. Biol. Chem.* 264: 19473-19474.

Vespa, M.N., López-Ribot, J.L. & Chaffin, W.L. 1995. "Adherence of germ tubes of *Candida albicans* to tissues from immunocompromised mice". *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 11: 57-64.

Vijay-Kumar, S., Bugg, C.E., Wilkinson, K.D., Vierstra, R.D. & Hatfield, P.M. 1987. "Comparison of the three-dimensional structures of human, yeast, and oat ubiquitin". *J. Biol. Chem.* 262: 6396-6399.

Voges, D., Zwickl, P. & Baumeister, W. 1999. "The proteasome: A molecular machine designed for controlled proteolysis". *Annu. Rev. Biochem.* 68: 1015-1068.

- Volland, C., Urban-Grimal, D., Geraud, G. & Haguenaer-Tsapis. 1994. "Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions". *J. Biol. Chem.* 269: 9833-9841.
- Walsh, T.J., De Pauw, B., Anaissie, E. & Martino, P. 1994. "Recent advances in the epidemiology, prevention and treatment of invasive fungal infections in neutropenic patients". *J. Med. Vet. Mycol.* 32: 33-51.
- Ward, C.L., Omura, S. & Kopito, R.R. 1995. "Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway". *Cell* 83: 121-127.
- Warren, N.G. & Hazen, K.C. 1995. "Candida, Cryptococcus, and other yeast of medical importance". En: Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C. & Tenover, R.H. (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 6<sup>th</sup> edn, pp. 723-737. Washington: American Society for Microbiology Press.
- Watt, R. & Piper, P.W. 1997. "*UBI4*, the polyubiquitin gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is a heat shock gene that is also subject to catabolite derepression control". *Mol. Gen. Genet.* 253: 439-447.
- Weinberg, E.D. 1978. "Iron and infection". *Microbiol. Rev.* 42: 45-66.
- White, T.C. 1997. "The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14 $\alpha$  demethylase in *Candida albicans*". *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1488-1494.
- Wickes, B.L. & Petter, R. 1996. "Genomic variation in *C. albicans*". *Curr. Top. Med. Mycol.* 7: 71-86.
- Wiebel, F.F. & Kunau, W.H. 1992. "The Pas2 protein essential for peroxisome biogenesis is related to ubiquitin conjugating enzymes". *Nature* 359: 73-76.
- Wiertz, E.J.H.J., Tortorella, D., Bogoy, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A. & Ploegh, H. 1996. "Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction". *Nature* 384: 432-438.
- Wilkinson, K.D. 1988. "Purification and structural properties of ubiquitin". En: Bonner. pp. 5-38.
- Wilkinson, K.D. 1997. "Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes". *FASEB J.* 11: 1245-1256.
- Wu, C. 1995. "Heat shock transcription factors: structure and regulation". *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11: 441-469.
- Yaglom, J., Linskens, M.H., Sadis, S., Rubin, D.M., Fitcher, B. & Finley, D. 1995. "p34<sup>Cdc28</sup>-mediated control of Cln3 cyclin degradation". *Mol. Cell. Biol.* 15: 731-741.

**Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J.** 1985. "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors". *Gene* 33: 103-119.

**Yesland, K. & Fonzi, W.A.** 2000. "Allele-specific gene targeting in *Candida albicans* results from heterology between alleles". *Microbiology* 146: 2097-2104.

**Yu, L., Lee, K.K., Ens, K., Doig, P.C., Carpenter, M.R., Staddon, W., Hodges, R.S., Paranchych, W. & Irvin, R.T.** 1994a. "Partial characterization of a *Candida albicans* fimbrial adhesin". *Infect. Immun.* 62: 2834-2842.

**Yu, L., Lee, K.K., Sheth, H.B., Lane-Bell, P., Srivastava, G., Hindsgaul, O., Paranchych, W., Hodges, R.S. & Irvin, R.T.** 1994b. "Fimbria-mediated adherence of *Candida albicans* to glycosphingolipid receptors on human buccal epithelial cells". *Infect. Immun.* 62: 2843-2848.

**Zaret K.S. & Sherman, F.** 1982. "DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast". *Cell* 28: 563-573.

**Zhao, J., Tenev, T., Martins, L.M., Downward, J. & Lemoine, N.R.** 2000. "The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner". *J. Cell Science* 113: 4363-4371.

**Zitomer, R.S. & Lowry, C.V.** 1992. "Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiol. Rev.* 56: 1-11.





