



TESIS DOCTORAL

**Función de Sok1 en el inicio del
crecimiento hifal en *Candida albicans*.**

ANTONIO ESPERILLA MUÑOZ

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN
BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR, BIOMEDICINA Y
BIOTECNOLOGÍA**

Conformidad del director/a: Jaime Correa Bordes

Esta tesis cuenta con la autorización del director de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

2023

Reconocimientos.

A lo largo de los años de desarrollo de esta Tesis Doctoral hemos recibido la valiosa ayuda de otros investigadores. Por ello, expresamos nuestro agradecimiento:

Al Dr. Carlos Vázquez de Aldana por su colaboración en los trabajos de microscopía de fluorescencia e ideas.

Al Dr. Andrés Clemente Blanco por su ayuda en los trabajos de inmunoprecipitación de cromatina y los consejos.

Financiación.

Antonio Esperilla Muñoz ha sido beneficiario de una beca predoctoral de la Junta de Extremadura, financiada por el Fondo Social Europeo (FSE), Ref. PD18066.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (PID2020-118109RB-I00), el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) junto con la Consejería de Economía e Infraestructuras de la Junta de Extremadura (IB16147) y la Ayuda a Grupo de la Junta de Extremadura (GR21117).



Unión Europea



Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital



Una manera de hacer Europa



Consejería de Economía e Infraestructuras



ÍNDICE.

ABEVIATURAS	1
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	11
1. <i>Candida albicans</i>: comensal y patógeno.	13
2. Morfotipos celulares e interacción con el hospedador.	13
3. Características generales de las redes transcripcionales que regulan los morfotipos.	18
4. Regulación de la transición levadura-hifa.	19
4.1. Rutas de señalización del crecimiento hifal.	19
4.2. Reguladores negativos del crecimiento hifal.	21
4.3. El represor Nrg1 en <i>C. albicans</i>.	23
4.3.1. Regulación de Nrg1 la miceliación.	24
5. Inicio y mantenimiento del crecimiento hifal.	26
5.1. Importancia de la degradación de Nrg1 al inicio del crecimiento hifal.	27
5.2. Reordenamiento nucleosomal y mantenimiento del desarrollo hifal.	27
5.2.1. Regulación del factor de transcripción Brg1.	29
5.2.2. Importancia de Ume6 en el mantenimiento del desarrollo hifal.	31
OBJETIVOS	35
RESULTADOS	39
1. Antecedentes.	41

2.	La señal nuclear de Nrg1-GFP se reduce rápidamente en respuesta a suero.	41
3.	La exportina Crm1 es necesaria para la degradación de Nrg1 en respuesta a suero.	43
4.	La fosforilación de Nrg1 es necesaria para su degradación en respuesta a suero.	45
5.	El inicio del crecimiento hifal es independiente de la disociación de Nrg1 de los promotores.	49
6.	El mutante <i>nrg1-7E</i> tiene fenotipo de pérdida de función.	50
7.	La reducción de los niveles de Sok1 suprime el crecimiento hifal constitutivo del mutante <i>nrg1-7E</i> .	53
8.	La delección de <i>SOK1</i> no modifica la afinidad de la proteína Nrg1-7E por el promotor de <i>ALS3</i> .	56
9.	Relaciones epistáticas entre <i>nrg1-7A</i> y <i>sok1Δ</i> .	57
10.	Análisis de la unión de Nrg1 al promotor de <i>ALS3</i> en los mutantes <i>nrg1-7A-HA</i> y <i>sok1Δ nrg1-7A-HA</i> .	61
11.	Sok1 es necesario para el reclutamiento de Brg1 a los promotores al inicio del crecimiento hifal.	63
12.	Nrg1-7A se disocia del promotor de <i>BRG1</i> de forma independiente de Sok1 en respuesta a suero	64
13.	Estudio de la localización subcelular de Sok1 en levaduras	67
14.	Sok1 es excluido del núcleo al inicio del crecimiento hifal.	70
15.	Sok1 se une al promotor de <i>BRG1</i> y <i>ALS3</i> en las mismas regiones que Brg1.	72

16.	Sok1 es necesaria para regular los niveles de la proteína Brg1 al inicio del crecimiento hifal.	74
17.	Sok1 es necesaria para la exportación nuclear de Brg1 y Nrg1 al inicio del crecimiento hifal.	76
	DISCUSIÓN	81
1.	La degradación de Nrg1 al inicio de la respuesta a suero se regula mediante dos mecanismos independientes que requieren a la exportina Crm1.	85
2.	La disociación de Nrg1 de los promotores de los HSGs no es necesaria para el crecimiento hifal.	88
3.	Sok1 colabora en la disociación de Nrg1 y la unión de Brg1 a los promotores de los HSGs durante el inicio del crecimiento hifal.	90
4.	La unión de Brg1 a su propio promotor no es necesaria para activar su expresión.	93
	CONCLUSIONES	97
	MATERIAL Y MÉTODOS	103
1.	Microorganismos utilizados.	105
2.	Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.	105
3.	Construcción de cepas de <i>C. albicans</i> .	106
4.	Transformación de <i>C. albicans</i> .	107
4.1.	Transformación por electroporación.	107
4.2.	Transformación por acetato de litio.	108
5.	Transformación de <i>E. coli</i> .	109

6.	Análisis y manejo de ácidos nucleicos.	109
6.1.	Extracción de DNA plasmídico.	109
6.2.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	109
6.3.	Digestión enzimática.	110
6.4.	Ligación de vectores y fragmentos de DNA.	110
6.5.	Ensamblaje mediante <i>NEBuilder</i> .	110
6.6.	Cuantificación y visualización de DNA y RNA.	111
6.7.	Análisis de colonias de levadura.	111
6.7.1.	Comprobación rápida de colonias.	112
6.7.2.	Extracción de DNA genómico de <i>C. albicans</i> .	112
6.7.3.	Extracción de DNA genómico mediante <i>Master Pure™ Yeast Purification Kit</i> .	113
6.8.	Secuenciación de ácidos nucleicos.	113
6.9.	Inmunoprecipitación de cromatina.	113
6.10.	PCR a tiempo real.	115
7.	Análisis de RNA.	115
7.1.	Extracción de RNA.	115
7.2.	Obtención de cDNA.	116
8.	Estudio de proteínas.	117
8.1.	Precipitación de extractos proteicos con TCA.	117
8.2.	<i>Western-blot</i> .	117
8.3.	Concentraciones de anticuerpos utilizados.	118
9.	Determinación de sensibilidad en placa.	119
10.	Técnicas de microscopía.	119

10.1.	Preparación de muestras.	119
10.2.	Microscopía óptica.	119
10.3.	Microscopía de fluorescencia.	120
10.4.	Microscopía confocal: <i>Time-Lapse</i>.	120
ANEXOS		123
BIBLIOGRAFÍA		141

ABREVIATURAS

ABEVIATURAS:

Δ: disrupción

μ: micro

7A: Nrg1-7A

A: Alanina

aa: aminoácidos

AcLi: Acetato de Litio

AMPc: Adenosín Monofosfato cíclico

ATP: Adenosín Trifosfato

ChIP: *Chromatin immunoprecipitation*

CYS: cisteína

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

cDNA: complementary DNA

DO: Densidad Óptica

DTT: Ditioneitol

E: Ácido glutámico

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EtOH: etanol

FBS: *Fetal bovine serum*

GFP: *Green-fluorescence protein*

GlcNAc: N-acetil-β-D-glucosamina

GUT: *Gastrointestinally induced transition*

h: horas

HAT: *Histone acetyltransferases*

HDAC: *Histone deacetylases*

HSG: *Hypha-specific genes*

IP: Inmunoprecipitado

Kb: Kilobases

LB: Luria Bertani (Caldo de cultivo Luria Bertani)

LMB: Leptomicina B

M: Molar

MAPK: *Mitogen-activated protein kinases*

Mb: Megabases

ABREVIATURAS

Met: metionina

min: minutos

MM: Medio Mínimo

n: número

NA: No Anticuerpo

NAT: *Nourseothricin N-acetyl transferase*

NES: *Nuclear export signal*

NFR: *Nuclear free region*

NLS: *Nuclear localization sequence*

O/N: Over-night

°C: grados centígrados

OFF: apagado

ON: encendido

PAGE:

pb: pares de bases

PBS: *Phosphate-buffered saline*

PCR: *Polymerase chain reaction*

PEG: Polietilenglicol

PKA: Protein kinase A

PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride*

PrLDs: *Prion-like domains*

qPCR: *quantitative Polymerase chain reaction*

RNA: ácido ribonucleico

mRNA: *Ribonucleic acid messenger*

Rpm: Revolución por minuto

RT-PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction*

SD: *Standard deviation*

SDS: Dodecilsulfato sódico

SEM: *Standard error of the mean*

ssDNA: *Salmon sperm DNA carrier*

t0: tiempo inicial, 0 minutos

t_{1/2}:

TAE: Tris, acetato, EDTA buffer

TCA: *Trichloroacetic acid*

TE: Tris EDTA

TF: *Transcriptional factor*

TFG: Trabajo Fin de Grado

TOR: *Target of rapamycin pathway*

UA: Unidades Arbitrarias

UTR: Untranslated region

V: Voltaje

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

WB: *Western blotting*

WT: *Wild type*

YPD: Yeast extract peptone dextrose

YPM: *Yeast extract peptone maltose*

ZnF: *Zinc finger*

RESUMEN

Resumen.

El hongo *Candida albicans* es un importante patógeno fúngico en pacientes inmunocomprometidos. Una característica fundamental de su virulencia es la gran plasticidad fenotípica que le permite realizar cambios reversibles entre levadura e hifa. El inicio de la formación de una hifa requiere de la rápida degradación de Nrg1, el principal represor del crecimiento hifal. El modelo actual propone que esta degradación es esencial para generar una ventana de oportunidad en los promotores de los Genes Específicos de Hifa (HSGs) que permita la unión del factor de transcripción Brg1 para activar la expresión de estos genes. En esta tesis hemos estudiado la función de Sok1 y los factores que regulan la disociación de Nrg1 de los promotores de los HSGs y de *BRG1* durante el inicio del crecimiento hifal. Los resultados obtenidos demuestran que disociación y degradación de Nrg1 no es necesaria para crear la ventana de oportunidad que active la transcripción del programa hifal. También, se ha puesto de manifiesto mecanismos diferentes de regulación para el despegue de Nrg1 de los promotores de los HSGs y *BRG1*. En el primer caso, Nrg1 se despega de los promotores de los HSGs mediante un mecanismo que requiere la fosforilación de un grupo de 7 sitios S/TP presentes en el extremo N-terminal de Nrg1 y de la acción de Sok1. Una vez Nrg1 es disociada de la cromatina, se exporta al citoplasma para su degradación de forma dependiente de la exportina Crm1 y Sok1. Respecto al promotor de *BRG1*, Nrg1 se separa del DNA por un nuevo mecanismo independiente de la proteína Sok1 y la fosforilación de Nrg1. Por último, hemos identificado a Sok1 como un nuevo factor necesario para que Brg1 se una a los promotores de los HSGs para activar la transcripción del programa de desarrollo hifal, fundamental para la virulencia de este importante patógeno oportunista.

Abstract.

The fungus *Candida albicans* is an important fungal pathogen in immunocompromised patients. A fundamental characteristic of its virulence is the great phenotypic plasticity that allows it to make reversible changes between yeast and hyphae. The initiation of hyphal formation requires rapid degradation of Nrg1, the main repressor of hyphal growth. The current model proposes that this degradation is essential to generate a window of opportunity at the promoters of hyphal-specific genes (HSGs) that allows the binding of the transcription factor Brg1 to activate the expression of these genes. In this thesis, we have studied the function of Sok1 and the factors that regulate the dissociation of Nrg1 from the promoters of HSGs and *BRG1* during the initiation of hyphal growth. The results obtained demonstrate that dissociation and degradation of Nrg1 is not necessary to create the window of opportunity to activate transcription of the hyphal program. Also, different mechanisms of regulation for Nrg1 detachment from the promoters of HSGs and *BRG1* have been revealed. In the first case, Nrg1 detaches from the promoters of HSGs by a mechanism that requires phosphorylation of a cluster of 7 S/TP sites present at the N-terminal end of Nrg1 and the action of Sok1. Once Nrg1 is dislodged of chromatin, it is exported to the cytoplasm for degradation in a Crm1 and Sok1 exportin-dependent manner. With respect to the *BRG1* promoter, Nrg1 is dislodged off DNA by a novel mechanism independent of Sok1 protein and Nrg1 phosphorylation. Finally, we have identified Sok1 as a novel factor required for Brg1 to bind to the promoters of HSGs to activate transcription of the hyphal developmental program, critical for virulence of this important opportunistic pathogen.

INTRODUCCIÓN

1. *Candida albicans*: comensal y patógeno.

Durante su evolución, los microorganismos han desarrollado mecanismos para generar una gran diversidad fenotípica como herramienta para adaptarse rápidamente a las condiciones ambientales fluctuantes [1]. En patógenos, estos cambios fenotípicos son esenciales para facilitar la colonización e infección del hospedador [2].

El hongo *Candida albicans* es un **organismo diploide** que forma parte de la microbiota comensal de las mucosas del tracto gastrointestinal (GI) y genitourinario de seres humanos. Sin embargo, puede comportarse como un **patógeno oportunista** en pacientes con disbiosis intestinal o inmunocomprometidos. En la mayoría de los afectados produce infecciones leves en mucosas, aunque existe una población de riesgo donde éstas pueden derivar en infecciones sistémicas con una alta tasa de mortalidad (40%). En este grupo se encuentran pacientes de UCI, neonatos prematuros, pacientes con quimioterapia, trasplantados y aquellos infectados por VIH [3]. En Europa y Norteamérica, las candidiasis ocupan el segundo lugar entre las infecciones sistémicas de pacientes de UCI [4]. La alta incidencia en estos grupos de riesgo, junto con la elevada morbilidad y mortalidad, generan un impacto en la estancia media hospitalaria y un coste sanitario que están convirtiendo a las candidiasis en un problema clínico en expansión [5].

Una de las principales características de *C. albicans* es su gran **plasticidad fenotípica** que le permite realizar cambios reversibles entre múltiples tipos celulares (células levaduriformes *white*, hifas, pseudohifas, células *opaque* y células GUT). Cada uno de estos morfotipos expresan genes específicos necesarios para adaptarse mejor a los diferentes nichos que coloniza en el hospedador. El estudio de estas transiciones fenotípicas es esencial para entender el comportamiento de *C. albicans* como comensal o patógeno en humanos [2].

2. Morfotipos celulares e interacción con el hospedador.

Como ya se ha comentado, *C. albicans* puede adoptar diferentes morfologías en función de las señales ambientales presentes en el hospedador. En las condiciones estándar de laboratorio, el morfotipo por defecto es la levadura, también conocido como **célula *white***. Este morfotipo se caracteriza por estar formado por células redondeadas u

ovaladas que se separan fácilmente tras la mitosis, por lo que se consideran estructuras unicelulares. El resto de morfotipos (hifas, células *opaque*, células GUT) se activan cuando las células *white* se incuban en condiciones ambientales presentes en el hospedador. Todas estas transiciones son reversibles y cuando desaparecen las señales externas vuelven al morfotipo levadura.

Las **hifas** son estructuras tubulares multicelulares en las que únicamente la célula apical se divide activamente, ya que los compartimentos subapicales se encuentran bloqueados en G1. Este tipo de crecimiento es muy invasivo en medio sólido debido a la fuerza física producida por el rápido crecimiento del ápice de la hifa (0.01-0.1 $\mu\text{N}/\mu\text{m}$, fuerza suficiente para penetrar una placa de agar al 8%). Las pseudohifas comparten características de las levaduras y las hifas. Al igual que las hifas, las células permanecen unidas tras la citocinesis, aunque presentando constricciones en los lugares de formación del septo, mostrando una estructura ramificada a diferencia de la forma tubular de las hifas (**Figura 1A**). Las clamidosporas son un tipo celular redondeado, que se origina en respuesta a condiciones adversas como inanición o hipoxia, caracterizado por tener una pared celular gruesa y localizarse en los extremos distales de los filamentos (**Figura1B**).

Tradicionalmente, las hifas se han considerado las formas patógenas puesto que expresan numerosos factores de virulencia como adhesinas, proteasas que degradan la matriz tisular y toxinas citotóxicas que lisan las células epiteliales de las mucosas como la candidalislina Ece1 [6]. Su potencial virulento frente a las levaduras ha quedado patente en modelos de infección localizada como orofaríngea [7] y vulvovaginal [8]. Sin embargo, esta dicotomía entre hifas virulentas y levaduras comensales no puede aplicarse a las infecciones sistémicas ya que mutantes bloqueados en cualquiera de las dos formas muestran menor virulencia [9]. En resumen, estas observaciones sugieren que las transiciones dinámicas y bidireccionales entre levaduras e hifas son realmente importantes en la interacción con el hospedador. Estudios recientes en modelos comensales de ratón han puesto de manifiesto que el hospedador tolera las formas levaduriformes, pero monitoriza indirectamente el nivel de las formas hifales a través de la detección de proteínas pro-inflamatorias específicas de hifas, como la proteasa Sap6. Se ha propuesto que cuando dichos marcadores sobrepasan un umbral, se activa una respuesta antifúngica localizada que mantiene el nivel de hifas bajo control [10].

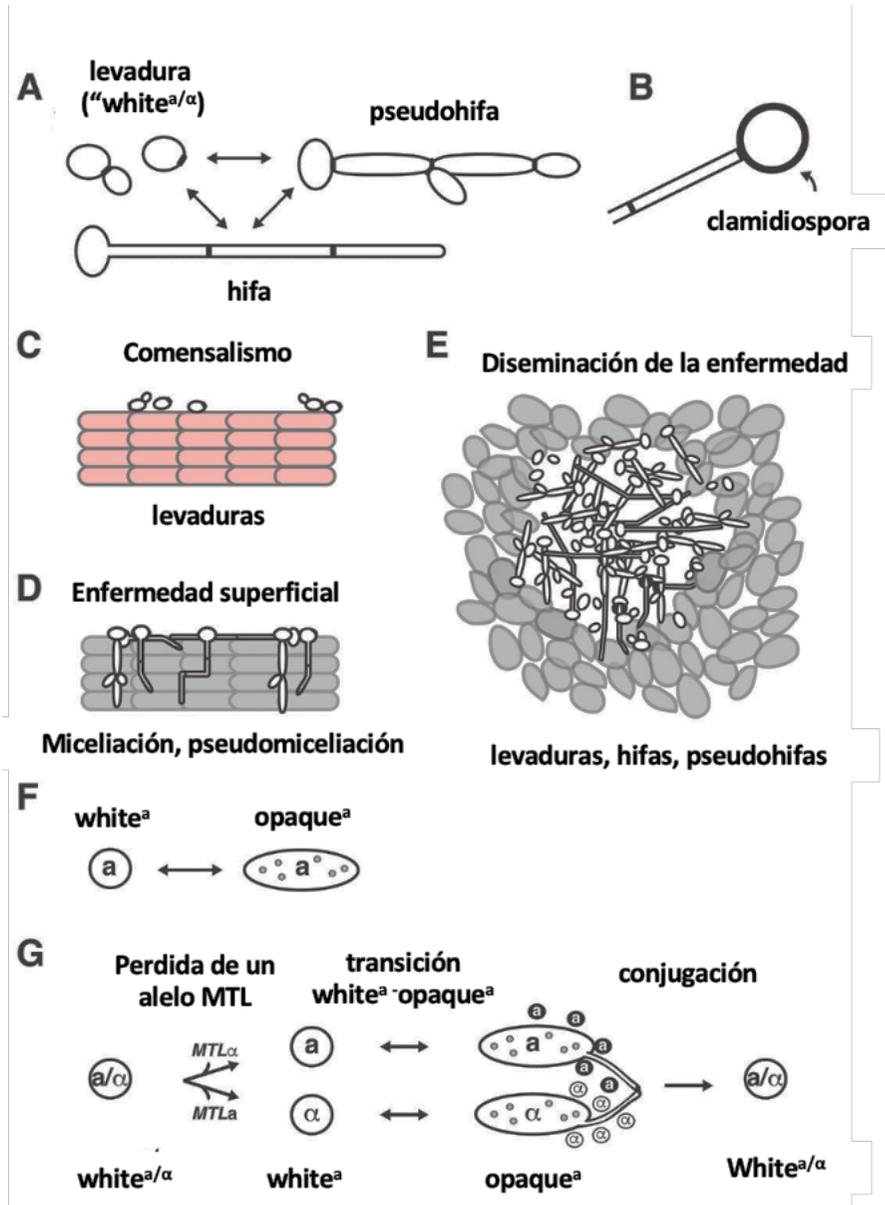


Figura 1. Morfologías, comensalismo y patogenicidad de *C. albicans*. Imagen modificada de [2].

En condiciones de laboratorio, las células *white* pueden dar lugar, de forma estocástica y con baja frecuencia (1 cambio cada 10^4 divisiones), a una célula *opaque*. Estas células son elipsoidales y aproximadamente 2-3 veces más grandes que las células

white. Además, estos dos tipos celulares se diferencian en la expresión de más de 1000 genes que modifican su competencia para el apareamiento, la virulencia y el metabolismo [11]–[13]. La importancia de las células *opaque* radica en que son las formas competentes para iniciar el **ciclo parasexual** de *C. albicans* (**Figura 1G**). El mecanismo de transición *white-opaque* está formado por una compleja red de factores de transcripción (TFs) entre los que destacan Efg1 y Wor1 [14]. La expresión de Efg1 promueve la aparición del estado *white* mientras que la expresión de Wor1 da lugar a células *opaque*. La expresión de Wor1 está reprimida por el heterodímero $\alpha 1/\alpha 2$ presente en las células *white*. Por tanto, el inicio de la transición *white-opaque* requiere la pérdida funcional de $\alpha 1/\alpha 2$. En condiciones de laboratorio, el ruido de este sistema transcripcional, que se manifiesta cada 10^4 divisiones, da lugar a un pequeño incremento en los niveles de expresión de Wor1 que estabiliza el estado *opaque* mediante dos mecanismos. Por un lado, Wor1 es capaz de unirse a su propio promotor activando su propia transcripción (retroalimentación positiva). Por otro lado, Wor1 bloquea el estado *white* ya que se une al promotor de *EFG1* actuando como represor transcripcional. En consecuencia, una vez que se manifiesta el fenotipo *opaque*, este se mantiene estable durante generaciones gracias a la retroalimentación positiva mediada por Wor1. Además del circuito de TFs, la regulación de la cromatina también es importante para regular la transición *white-opaque* [15]

Las **células GUT** representan un estado comensal adaptado al nicho intestinal, ya que la expresión de este fenotipo GUT reduce la expresión de genes relacionados con virulencia e incrementa la permanencia intestinal de *C. albicans* en modelos murinos de comensalismo [16], [17]. Morfológicamente, son células elipsoidales parecidas a las células *opaque*. Sin embargo, mientras que las células *opaque* no están adaptadas al intestino y expresan genes relacionados con rutas implicadas en respiración oxidativa, las células *GUT* muestran un metabolismo optimizado para los nutrientes presentes en el tracto intestinal (GlcNAc y ácidos grasos de cadena corta). La transición *white-GUT*, que tiene lugar en el intestino, también depende del factor de transcripción Wor1. Las células del mutante *wor1Δ* son incapaces de competir en el nicho intestinal y desaparecen rápidamente de la microbiota presente en heces mientras que cepas que sobreexpresan Wor1 desplazan rápidamente a las células *white* control [17]. En resumen, la existencia de las células *GUT* sugieren que la coevolución con el hospedador ha seleccionado un

mecanismo de desarrollo que permite al hongo adaptarse al ecosistema intestinal sin causar daño al hospedador y ser competitivo en un ambiente dominado por la microbiota procariota intestinal.

Por último, *C. albicans* muestra una gran capacidad de formar biopelículas (**biofilms**), tanto en superficies bióticas como abióticas, por lo que pacientes con implantes o catéteres tienen alto riesgo de infección [18]. La formación del *biofilm* se puede dividir en cuatro fases bien diferenciadas (**Figura 2**). En primer lugar, se produce la adhesión de las células en forma de levadura a una superficie, la segunda fase se caracteriza por una elevada proliferación de las levaduras generando una capa basal de anclaje, en la tercera fase se produce el desarrollo filamentoso mediante el crecimiento de pseudohifas e hifas extensas además de la producción de la matriz extracelular usada como protección para las propias células y por último una fase de dispersión de las células en forma de levaduras desde el *biofilms* para colonizar nuevas superficies [19]. Este tipo

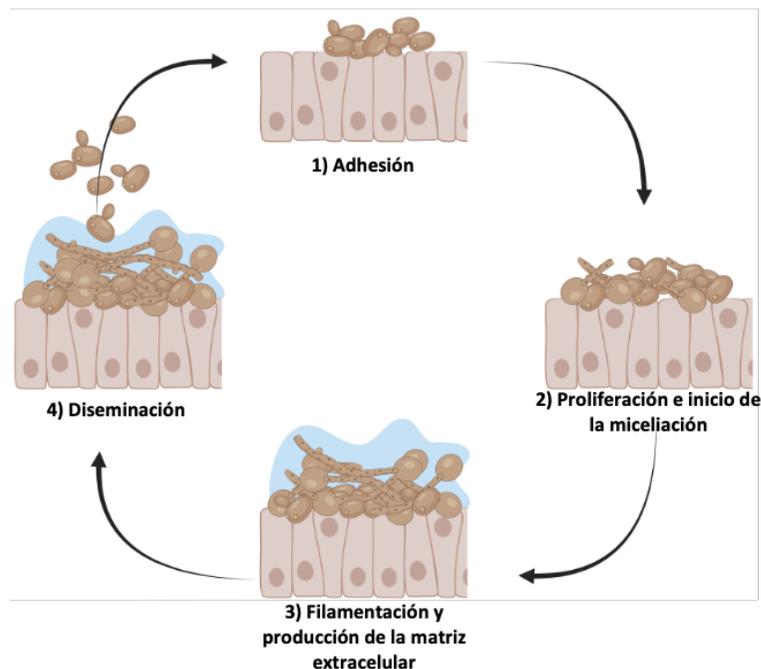


Figura 2. Proceso de formación del *biofilm* en *C. albicans*. Las levaduras se adhieren a una superficie (1), posteriormente se produce la proliferación celular y el inicio de la miceliación (2), las hifas se desarrollan y se genera la matriz extracelular (3). Por último, se produce la dispersión de las levaduras no adheridas diseminándose a través del torrente sanguíneo para dar lugar a la formación de nuevos *biofilms* (4). Imagen propia, generado en BioRender.

de estructura desarrollada por *C. albicans* le confiere una mayor resistencia a las drogas antifúngicas y a los factores inmunológicos del hospedador [18], [20].

3. Características generales de las redes transcripcionales que regulan los morfotipos.

En las últimas dos décadas se han identificado numerosos factores de transcripción (TFs) implicados en las principales transiciones morfológicas y la formación de *biofilms*, necesarias para su interacción con el hospedador [2], [12], [17], [21]. En todas estas transiciones, existen un grupo de TFs principales y otros auxiliares, que actúan de forma concertada para activar a los genes dianas en respuesta a las señales ambientales.

Una característica común de la arquitectura de las redes transcripcionales que regulan estas transiciones reversibles entre morfotipos es la existencia de regiones promotoras grandes en los genes dianas que actúan como *super-enhancers* [22].

Por ejemplo, mientras que el tamaño medio de las regiones intergénicas de *C. albicans* es de 557bp, los genes diana de los TFs que regulan la transición *white-opaque* tiene un tamaño medio >7Kb. En estas regiones promotoras se reclutan numerosos TFs principales y auxiliares, incluso en ausencia de motivos de unión a DNA específicos, indicando que su unión al promotor está mediada, probablemente, por interacciones proteína-proteína [22]. En la transición *white-opaque* se ha observado que estos reclutamientos pueden estar mediados por dominios

semejante a priones (*Prion-Like-Domains*, PrLDs) presentes en los TFs. Los PrLDs son dominios de baja complejidad estructural desorganizados, ricos en residuos de asparragina/glutamina y algunos aminoácidos hidrofóbicos (*Bioinformatics*, [23]) Recientemente se ha observado que 7 de los 8 TFs que forman esta ruta tienen PrLDs que

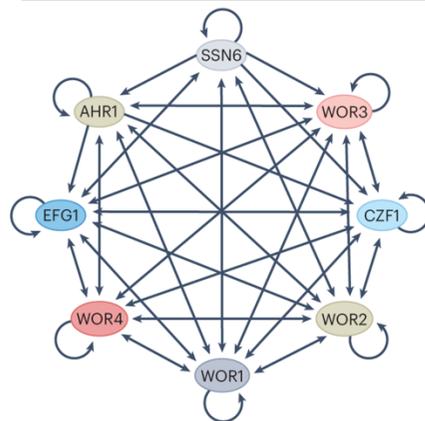


Figura 3. La transición *white-opaque* está regulada por una red transcripcional cuyos TFs se unen a sus propios promotores y a los del resto de TFs que forman la red.

favorecen interacciones proteína-proteína, tanto homotípicas como heterotípicas, que son críticos para su función *in vivo* [24].

Por último, los TFs centrales de estas redes suelen estar interconectados ya que se unen a sus propios promotores, amplificando su transcripción, y a los promotores de los otros TFs de la red para regularlos positiva o negativamente (**Figura 3**). Se cree que este tipo de organización de redes transcripcionales muestra una gran sensibilidad a perturbaciones externas lo que permite rápidamente adaptarse a condiciones presentes en el nicho del hospedador [22].

4. Regulación de la transición levadura-hifa.

Debido a su importancia en virulencia, la transición levadura-hifa es una de las transiciones entre morfotipos más estudiadas en *C. albicans*. En respuesta a una gran variedad de estímulos ambientales (**Figura 4**), el morfotipo de levadura activa la expresión de genes específicos de hifas (HSGs: *Hypha Specific Genes*) entre los que se encuentran numerosos factores de virulencia [6], [19], [25]–[27]. Durante el crecimiento levaduriforme, los HSGs no se expresan porque las proteínas Tup1, Nrg1 y Rfg1 se unen a sus promotores reprimiendo su transcripción [28].

4.1. Rutas de señalización del crecimiento hifal.

Basándose en estudios *in vitro*, se han identificado múltiples rutas de señalización implicadas en la activación de numerosos TFs necesarios para transcribir los HSGs (**Figura 4**). Como se ha comentado, estos HSGs codifican para diversos factores de virulencia entre los que se encuentran las adhesinas (como Als3 y Als8) [20], [29], proteínas de pared celular que al ser O-manosiladas aumentan la capacidad de adhesión de las células (como Hwp1) [30], la toxina candidalísina (Ece1) que induce la lisis celular al provocar la permeabilización de las membranas de las células del hospedador [31] y otros productos de secreción que degradan la matriz extracelular como las aspartil-proteasas (Sap4, Sap5 y Sap6), las fosfolipasas (Plb1–5) o las lipasas (Lip1–10) [18], [20]

Entre las diferentes rutas de señalización identificadas, la ruta de protein-quinasa A dependiente de AMPc (AMPC-PKA) es de las más importantes para iniciar el crecimiento hifal ya que el mutante carente del gen *CYR1*, que codifica para la enzima adenilato ciclasa, o el doble mutante deficiente en las dos subunidades catalíticas de la PKA (*tpk1/2*) permanecen bloqueados en el morfotipo de levadura en todas las condiciones inductoras de crecimiento hifal ensayadas [32]. Tras la activación de la PKA, esta quinasa fosforila numerosos sustratos entre los que se encuentra la proteína Efg1 [32], [33].

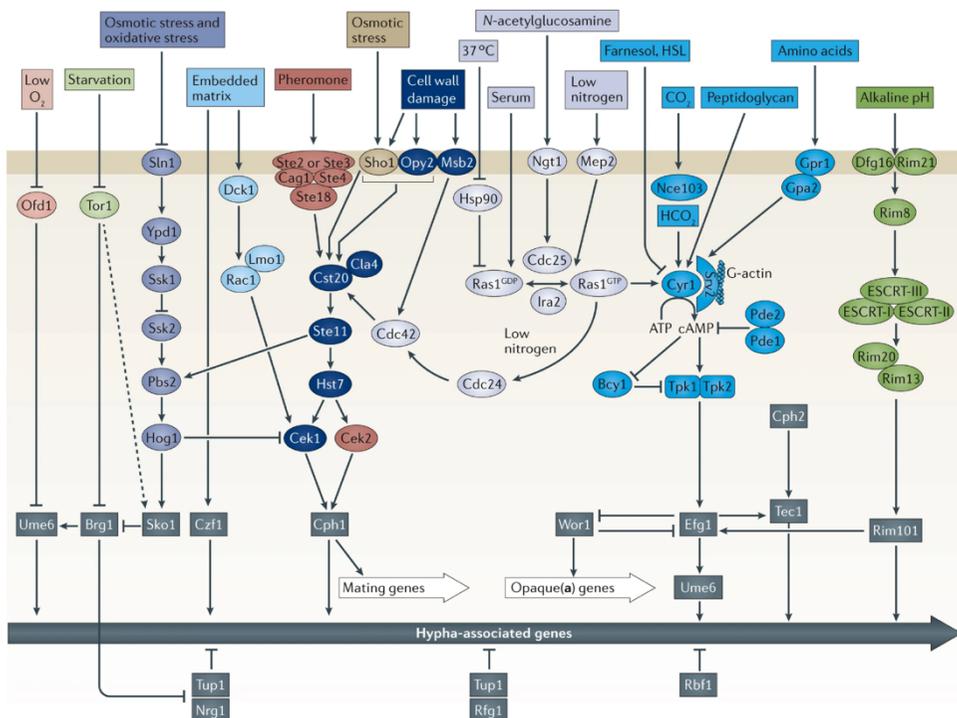


Figura 4. Rutas de señalización de activación del crecimiento hifal. En rectángulos grises se representan los reguladores transcripcionales de la expresión de los HSGs. Imagen modificada de [2].

La proteína Efg1 pertenece a la familia de TFs basic-Helix-loop-Helix (bHLH) [34] En concreto, pertenece a una subcategoría de los TFs bHLH denominados APSES. En hongos, esta subcategoría está formada por proteínas de unión a DNA que pueden actuar como activadores o represores de la transcripción, dependiendo de señales ambientales, en procesos como esporulación, conjugación o morfogénesis. Dado que Efg1 es necesario

para la formación de hifas en respuesta a una gran variedad de señales como la presencia de suero, 37°C, GlcNAc, aminoácidos, peptidoglicanos, CO₂ o baja cantidad de nitrógeno [2] se cree que es esencial regular las interacciones de *C. albicans* con el hospedador. De hecho, este TF desempeña un papel central en todas las redes transcripcionales que controlan las transiciones entre los diferentes morfotipos (Levadura/hifa, White/Opaque, GUT y biofilms) [35].

4.2. Reguladores negativos del crecimiento hifal.

Durante el morfotipo de levadura, la expresión de los HSGs se encuentra reprimida por la acción de las proteínas Tup1, Nrg1 y Rfg1. La delección de cualquiera de estos tres genes da lugar a un crecimiento hifal constitutivo en ausencia de señales inductoras de miceliación [28], [36]–[38] (**Figura 4**). Mediante el uso de microarrays de DNA, Kadosh y col. identificaron los genes reprimidos por estas tres proteínas y establecieron las relaciones funcionales entre los 3 represores transcripcionales (**Figura 5**) [28]. Dado que Tup1 es la única de las tres proteínas que no tiene dominios de unión a DNA, y en analogía de lo que ocurre en *Saccharomyces cerevisiae*, se cree que Tup1 forma complejos con Nrg1 y Rfg1 para unirse a los promotores [39].

Sin embargo, respecto al complejo Tup1/Nrg1, existen evidencias que sugieren que Tup1 y Nrg1 tienen funciones genéticamente separables, no esperables si funcionaran como un solo complejo. Recientemente, estudios genéticos han puesto de manifiesto que el crecimiento hifal constitutivo del mutante *tup1Δ*, tanto *in vitro* como *in vivo*, depende de Efg1. Sin embargo, la filamentación del mutante *nrg1Δ* es independiente de Efg1 [40]. Teniendo en cuenta estos resultados, junto a otros descritos en la literatura, Wakade y col proponen un modelo en el que las funciones represoras de Tup1 y Nrg1 se llevarían a cabo de forma independiente. Estos autores proponen que Tup1, en lugar de formar complejo con Nrg1, se uniría a Efg1 para inhibir su función. Una vez que Efg1 se activara en respuesta a las señales inductoras del crecimiento hifal, éste desplazaría a Nrg1 de los promotores de los HSG y favorecería la unión de otros TFs, como Brg1 y Tec1, que serían los responsables de activar el programa transcripcional. Por tanto, Efg1 desempeñaría un papel indirecto en la regulación de los HSGs a través de la inactivación de Nrg1, dejando la activación directa de los genes a los TFs Brg1, Tec1 y Rob1 (**Figura 6**).

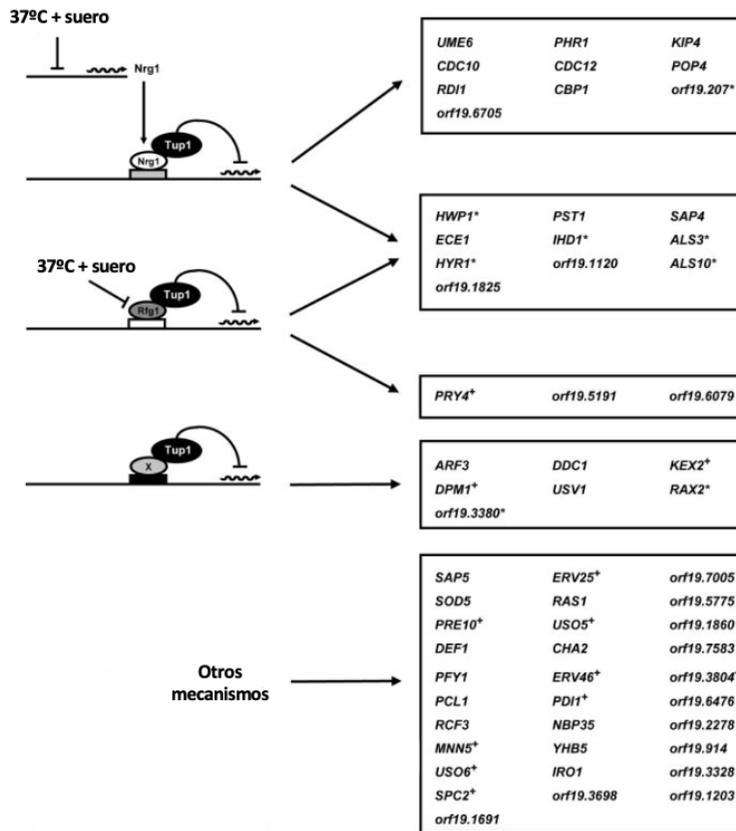


Figura 5. Genes específicos de hifas regulados negativamente por Tup1, Nrg1 y Rfg1. Imagen modificada de [28].

Por último, en determinadas condiciones de estrés oxidativo, osmótico o daño celular se puede producir la represión de la transición levadura-hifa a través de la activación de la ruta de señalización de Hog1 (Figura 4). Estas condiciones de estrés mencionadas son detectadas a través de las proteínas Sln1 o Sho1 que inducen la fosforilación de la MAPK Hog1 que tras su activación puede bloquear tanto a Cek1 como la expresión del factor de transcripción Brg1, mediante la activación del represor Sko1, impidiendo que se produzca el crecimiento hifal [2].

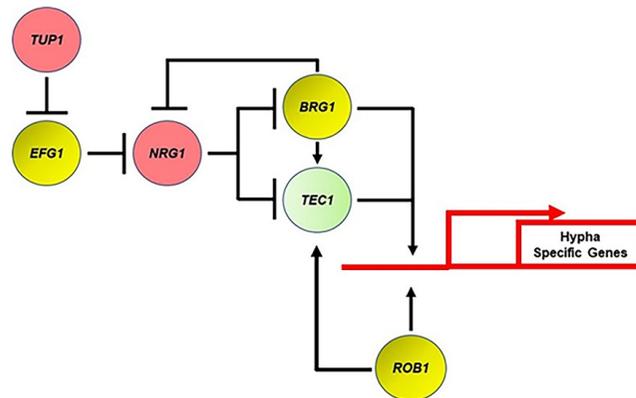


Figura 6. Circuito transcripcional regulador de la expresión de los HSGs. Círculos rojos: represores de filamentos; Amarillos: TFs centrales; verdes: TF auxiliares. Tomado de [40].

4.3. El represor Nrg1 en *C. albicans*.

Tras la identificación de Tup1 como represor del crecimiento hifal [37], se buscaron proteínas de unión a DNA que confirieran a Tup1 su capacidad de unirse al DNA. Para ello, se buscaron en el genoma de *C. albicans* secuencias similares a represores dependientes de Tup1 de *S. cerevisiae* [36]. Se identificaron las secuencias de los ortólogos de los represores Sko1, Mig1 y Nrg1. La delección de los tres genes puso de manifiesto que sólo el mutante *nrg1Δ* daba lugar a un crecimiento hifal constitutivo, similar al mutante *tup1Δ*. Dado que ambos mutantes mostraban el mismo fenotipo y compartían perfiles transcripcionales de HSGs similares [28], se propuso que Nrg1 era la proteína de unión a DNA responsable de reclutar al represor general Tup1 a los promotores de los HSGs. Aunque como hemos comentado, resultados muy recientes postulan otra relación funcional entre ambas proteínas en la represión de los HSGs (**Figura 6**).

En *C. albicans*, Nrg1 es una proteína de 310 aminoácidos (34 kDa) que tiene una secuencia de exportación nuclear (NES, *Nuclear Export Signal*) en el extremo N-terminal y dos dominios de unión a DNA del tipo dedos de Zinc (ZNF: *zinc fingers*) en el extremo C-terminal, entre los residuos 225 y 284. La proteína Nrg1 de *C. albicans* no tiene homología con el Nrg1 de *S. cerevisiae*, salvo en los dominios ZNF que tienen 61% de identidad [36].

La importancia de Nrg1 como represor general del crecimiento hifal se puso de manifiesto al realizar el análisis fenotípico de una colección de 143 mutantes de delección de TFs no esenciales en la que se observó que únicamente los mutantes *nrg1Δ* y *tup1Δ* son los que muestran un crecimiento hifal constitutivo en todas las condiciones ensayadas [41] Además, la expresión ectópica de *NRG1* inhibe el crecimiento hifal, tanto *in vitro* como en modelos de ratón [42], [43], lo que sugiere que las señales que inducen la miceliación deberían inhibir la función represora de Nrg1. De hecho, se ha observado que las señales inductoras del crecimiento hifal bloquean la función represora de Nrg1 mediante dos mecanismos diferentes (ver más adelante).

Por un lado, se inhibe la transcripción de *NRG1* de forma dependiente de PKA y por otro se induce la degradación del represor [44]. Al inicio del crecimiento hifal, se genera una ventana de unos 30 min iniciales en la que Nrg1 se degrada rápidamente. Transcurrido ese tiempo, los niveles del represor vuelven a alcanzar los niveles del morfotipo de levaduras. Sin embargo, Nrg1 es incapaz de reprimir a los HSGs durante el mantenimiento del crecimiento hifal, ya que se produce un reposicionamiento de nucleosomas que oculta los sitios de unión de Nrg1 en los promotores de los HSGs [45].

4.3.1. Regulación de Nrg1 la miceliación.

Durante el inicio del crecimiento hifal, la proteína Nrg1 desaparece rápidamente mediante dos mecanismos complementarios: la inhibición de la transcripción de *NRG1* y la degradación de la proteína Nrg1 [45].

Respecto al control de los niveles de mRNA de *NRG1*, se ha descrito que depende de la ruta AMPc-PKA y de los TFs morfogenéticos Efg1, Flo8, que ejercen su función aguas debajo de PKA [45]–[47]. También se ha descrito otro mecanismo dependiente del TF Brg1 en el que se bloquea la transcripción de *NRG1* mediante RNAs antisense [48].

En paralelo a la represión de la expresión de *NRG1*, se produce una rápida, aunque transitoria, degradación del represor mediante un mecanismo independiente de la ruta de AMPc-PKA. Con el fin de identificar posibles quinasas implicadas en la ruta de degradación de Nrg1, Lu y col realizaron un escrutinio de una colección de mutantes de

delección de quinasas de *C. albicans* e identificaron a Sok1 como una proteína requerida para degradar a Nrg1 en respuesta a la inducción hifal [49].

En *S. cerevisiae*, el gen *SOK1* (*Suppressor Of Kinase*) se identificó como supresor multicopia del defecto de crecimiento del triple mutante de PKA (*tpk1 tpk2 tpk3*) [50]. El gen *SOK1* codifica para una proteína nuclear cuya secuencia de aminoácidos no sugiere ninguna función o actividad obvia. Únicamente se ha descrito un 25% de identidad y 49% de similitud con la proteína PBS13 de ratón, de función desconocida y que se expresa en testículos. En esta levadura, se ha propuesto que Sok1 forma parte de una ruta paralela a la vía de señalización de PKA, necesaria para el crecimiento vegetativo [50]. Dado que los mutantes *sok1Δ* crecen normalmente, la función de Sok1 sería menos importante que la desempeñada por PKA. También se ha observado que la sobreexpresión de *SOK1* reduce el crecimiento pseudohifal de *S. cerevisiae* [51].

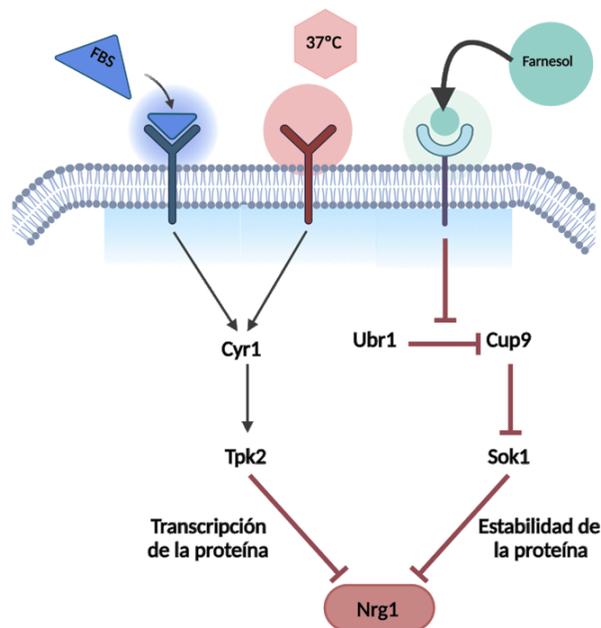


Figura 7. Regulación de Nrg1 al inicio de la respuesta hifal. Los niveles de Nrg1 en el comienzo de la miceliación son regulados a través de dos rutas paralelas. Por un lado, se produce el bloqueo de la transcripción de *NRG1* mediante la activación de la ruta AMPc-PKA y por otro, se activa la degradación de Nrg1 tras producirse la liberación de la inhibición por farnesol. Imagen propia generada en BioRender.

En *C. albicans*, como ya hemos comentado, Sok1 es necesaria para degradar a Nrg1 durante la inducción hifal mediante un mecanismo independiente de la ruta de AMPc-PKA [49]. La expresión de *SOK1* se encuentra regulada por farnesol, una molécula de *quorum sensing* que inhibe la transición levadura-hifa [52]. En presencia de farnesol, el represor Cup9 inhibe la expresión de *SOK1*, estabilizando así a Nrg1 y, por tanto, inhibiendo la transición levadura-hifa. La sobreexpresión de Sok1 es capaz de inducir el crecimiento hifal en presencia de farnesol [49]. Estos autores han observado que cuando se elimina el farnesol, el represor Cup9 es degradado de forma dependiente de la E3 ligasa Urb1, lo que induce la expresión de *SOK1*, implicado en la degradación de Nrg1 mediante un mecanismo (**Figura 7**).

5. Inicio y mantenimiento del crecimiento hifal.

Teniendo en cuenta la bibliografía actual, el desarrollo de la miceliación en *C. albicans* puede dividirse en dos fases: inicio y mantenimiento [45] (**Figura 8**). Estas etapas pueden diferenciarse en primer lugar según los niveles de acumulación del represor Nrg1, y en segundo lugar e igualmente importante mediante el posicionamiento de los nucleosomas en los promotores de los HSGs. En este proceso de reordenamiento nucleosomal tienen una gran importancia las proteínas acetiltransferasas (HATs) y las deacetilasas (HDACs), encargadas de modificar los niveles de acetilación de las histonas, que junto con los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP modulan la apertura y el cierre de la cromatina en zonas específicas durante la transición levadura-hifa [44], [45], [53], [54].

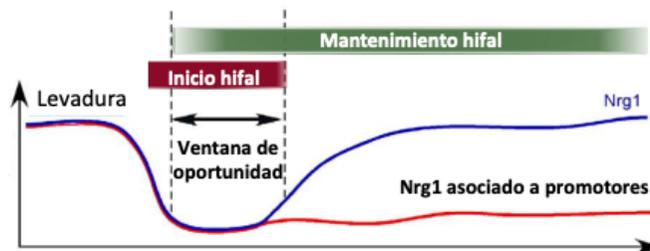


Figura 8. Fases del desarrollo hifal en *C. albicans*. Imagen modificada de [45].

5.1. Importancia de la degradación de Nrg1 al inicio del crecimiento hifal.

Durante la primera fase, como ya se ha dicho anteriormente en presencia de ciertas señales ambientales que inducen miceliación se produce un bloqueo de la transcripción de *NRG1*, a través de la ruta AMPc-PKA, junto con una rápida expulsión de Nrg1 de las zonas promotoras de los genes que reprime, seguido de una casi instantánea degradación del represor mediada por la proteína Sok1 [45], [49]. Esta eliminación transitoria de Nrg1 da lugar a la denominada como *ventana de oportunidad* (**Figura 8**), momento en el que se ve favorecida tanto la unión de factores de transcripción necesarios para la activación de la expresión de los HSGs como la muy importante remodelación de la cromatina, indispensable para posteriormente bloquear la unión de Nrg1 a los promotores de los HSGs durante el mantenimiento del desarrollo hifal [36], [45]. Aunque la reducción de Nrg1 en la célula es temporal, esta degradación es primordial para que pueda llevarse a cabo la remodelación de la cromatina que oculta, mediante el reposicionamiento de nucleosomas, el sitio de unión del represor. Este proceso de remodelación es esencial para que, una vez vuelva a acumularse Nrg1 a niveles del morfotipo de levadura, ésta no pueda unirse al DNA, lo que permite la correcta elongación de la hifa durante la fase de mantenimiento de la filamentación [45].

5.2. Reordenamiento nucleosomal y mantenimiento del desarrollo hifal.

Como ya hemos mencionado, durante la ventana de oportunidad que genera la degradación de Nrg1 se produce un reordenamiento de los nucleosomas en los promotores de los HSGs que tendrá un impacto posterior en el mantenimiento del crecimiento hifal (**Figura 9**) [45], [53], [55].

En el morfotipo de levaduras, Efg1 atrae al complejo histona acetiltransferasa conocido como NuA4 [56] a las zonas promotoras de los HSGs. NuA4 se une a la cromatina formando un supercomplejo con SWR que, por su parte, está implicada en la deposición de la variante de histona H2A.Z en los nucleosomas [57] (**Figura9**). La histona H2A.Z está relacionada con genes pobremente expresados [58]–[61]. Durante el crecimiento levaduriforme, la actividad acetiltransferasa del complejo NuA4 se ve bloqueada por la

presencia de la deacetilasa Rpd3 en las zonas promotoras de los genes HSGs reprimidos [45].

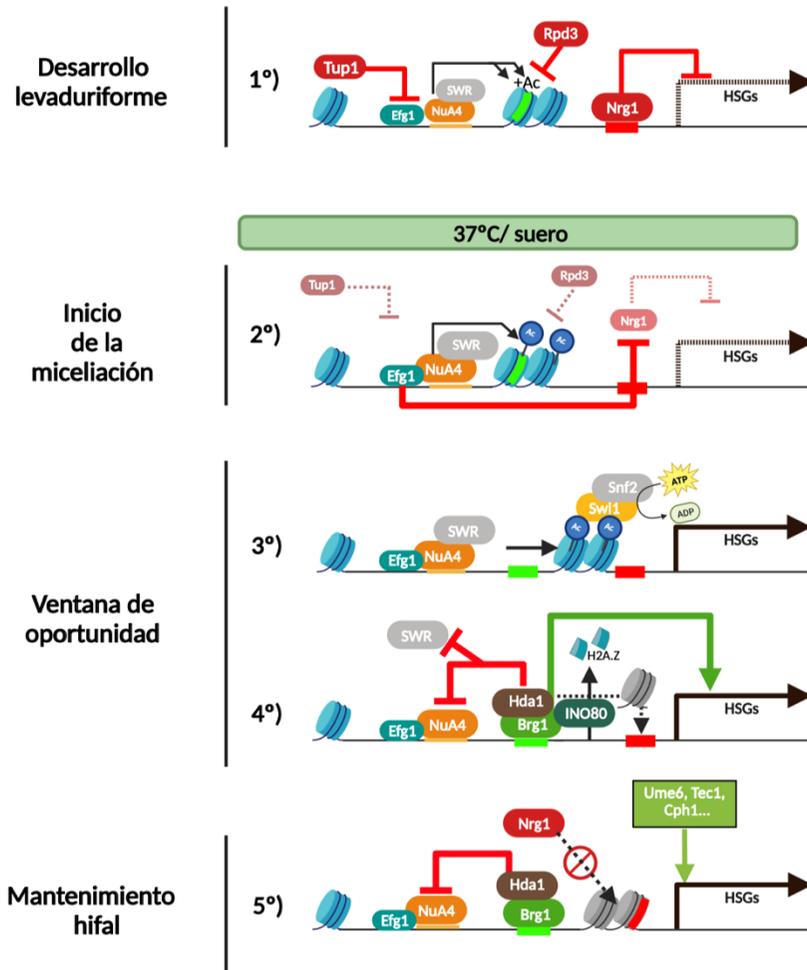


Figura 9. Remodelación de la cromatina durante el inicio y mantenimiento del crecimiento hifal. Imagen propia generada en BioRender.

En el inicio del crecimiento hifal, junto a la degradación de Nrg1, se produce la disociación de la deacetilasa Rpd3 de los promotores lo que permite la acetilación de la histona H4 por parte de NuA4 [45], [56]. Esta modificación post-transcripcional de histonas en las zonas promotoras ha sido asociada con genes cuya transcripción esta activa [62], [63]. Como resultado de las acetilaciones, se produce la unión del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF a los promotores de los HSGs[54], [56], [64] (**Figura**

9). El ensamblaje de este complejo SWI/SNF provoca, a través de su actividad remodeladora dependiente de ATP, el desplazamiento de los nucleosomas cercanos a la región donde se une, generando regiones NFR (*Nucleosome Free Regions*) en la que quedan expuestos los sitios de unión de diferentes TFs [54], [56], [65]. Entre estos TFs, destaca Brg1 que, una vez unido al promotor, recluta a la deacetilasa Hda1 (**Figura 9**), unión que solo puede darse si previamente Nrg1 se ha eliminado completamente [53]. Además, el ensamblaje de Brg1 favorece la llegada de INO80, complejo encargado de la eliminación de la histona H2A.Z de los nucleosomas, lo que es necesario para la expresión de los HSGs en la transición levadura-hifa [61].

Por último, la deacetilasa Hda1 provoca la deacetilación de Yng2 (integrante del complejo NuA4) inactivando la actividad HAT del complejo NuA4. Asimismo, Hda1 deacetila a Eaf1 proteína de andamiaje del complejo NuA4 lo que causa la escisión del supercomplejo NuA4-SWR, perdiéndose la unión del complejo SWR a las zonas promotoras. Esta pérdida de SWR impide la entrada de la variante H2A.Z a los nucleosomas que se van ensamblando [57], [58], [60].

En resumen, estas continuas acetilaciones y deacetilaciones en el inicio del crecimiento hifal tienen como finalidad modificar la posición de los nucleosomas, respecto al lugar que ocupan durante el morfotipo de levadura, en los promotores de los. Este proceso es fundamental para el posterior mantenimiento de la miceliación, debido a que el nuevo posicionamiento de los nucleosomas produce un enmascaramiento de los sitios de unión reconocidos por el represor Nrg1 en los promotores (**Figura 9**) [53]. Este ocultamiento de las regiones de reconocimiento del represor es necesario para una correcta elongación durante el crecimiento hifal ya que, a pesar de recuperarse los niveles proteicos iniciales de Nrg1 (tras finalizar la ventana de oportunidad), el represor no puede unirse a sus sitios de unión porque se encuentran ocultas por el nuevo posicionamiento de los nucleosomas [45], [53].

5.2.1. Regulación del factor de transcripción Brg1.

La proteína Brg1 es un factor de transcripción GATA esencial para el desarrollo hifal, tanto *in vitro* como *in vivo* [40]. Su expresión se encuentra reprimida en el morfotipo de levadura de forma dependiente de la ruta TOR y Nrg1 [48], [66]. Tras la expresión de

BRG1, este factor de transcripción posteriormente se localiza en el núcleo independientemente de las condiciones ambientales inductoras [53].

La proteína quinasa Tor1 es fundamental en la ruta central de señalización en respuesta a nutrientes que favorece el crecimiento y la proliferación celular. En condiciones ricas en nutrientes, Tor1 favorece el desarrollo levaduriforme mediante dos mecanismos. En primer lugar, Tor1 activa al represor Sko1 de forma dependiente de Hog1, el cual bloquea la transcripción de *BRG1*. En segundo lugar, Tor1 promueve la expresión de los represores de la miceliación Nrg1 y Tup1 [66], [67]. Cuando se dan condiciones de inanición, bajos niveles de nitrógeno, pH alcalino o presencia de rapamicina, la quinasa Tor1 se inhibe lo que induce la expresión de *BRG1* al inactivarse Sko1 [2], [66]–[68]. Además, se ha descrito un bucle de respuesta negativa entre Brg1 y Nrg1. El represor Nrg1 reprime la transcripción de *BRG1* durante el crecimiento levaduriforme y, en el morfotipo de hifa donde se expresa *BRG1*, Brg1 regula negativamente la expresión de *NRG1* [40], [48], [53]. Por tanto, la activación de la expresión del factor de transcripción *BRG1* se produce tanto al inhibir el efecto represor de Sko1, bloqueando la ruta TOR, como eliminando a Nrg1 a través de la vía AMPc-PKA y Sok1.

Una vez que se activa su transcripción durante el inicio del crecimiento hifal, la proteína se une a los promotores de los HSGs, durante la ventana de oportunidad como hemos descrito en el apartado anterior, para favorecer la expresión de genes de virulencia (*ALS3*, *ECE1* o *HWP1* entre otros) y de otros asociados con la regulación del mantenimiento de la filamentación como *UME6* y *HGC1*. Por último, como ya hemos comentado, desempeña un papel importante en el mantenimiento del crecimiento hifal debido a su función de atraer a remodeladores de cromatina como INO80 y Hda1 [53]. **(Figura 9).**

Dado que Brg1 sería importante para facilitar tanto el inicio como el mantenimiento del desarrollo hifal, se ha demostrado que la delección de este gen afecta a la formación del tubo germinativo en presencia de señales de inducción hifal como suero, 37°C o GlcNAc [48], [69], [70]. Sin embargo, otros autores han reportado que en presencia de rapamicina la eliminación de *BRG1* solo provoca defectos en mantenimiento ya que células deficientes en Brg1 pueden emitir el tubo germinativo de forma similar al control

silvestre [53]. A pesar de estas contradicciones, los diferentes fenotipos encontrados tras la delección de *BRG1* puede deberse a la señal de inducción de la miceliación utilizada en cada uno de los estudios realizados. Sin embargo, aún en presencia de rapamicina, se siguen observando grandes defectos en cuanto a la correcta elongación de la hifa, consistente con la idea de que la actividad de Brg1 es imprescindible para el correcto reposicionamiento de los nucleosomas, reorganización implicada en impedir la unión del represor Nrg1 durante la fase de elongación. Además, Brg1 junto con Hda1 son imprescindibles para favorecer la expresión de *UME6*, factor de transcripción que toma el control de la miceliación durante la fase de mantenimiento de la filamentación [53].

En cuanto a la sobreexpresión de Brg1 también hay resultados contradictorios. Según [53], la expresión ectópica de Brg1 bajo el promotor de *MAL2* no induce el desarrollo hifal en condiciones de crecimiento levaduriforme, según postulan debido a la presencia del represor Nrg1 en los promotores de los HSGs. Sin embargo, la sobreexpresión de *BRG1* bajo el promotor regulable *tet* induce el desarrollo hifal bajo condiciones de crecimiento levaduriforme [48] (YPD a 28°C). Además, estos mismos autores [48] reportaron que la inhibición del crecimiento hifal por sobreexpresión de *NRG1* se suprime parcialmente por la sobreexpresión de *BRG1* a 37°C.

5.2.2. Importancia de Ume6 en el mantenimiento del desarrollo hifal.

Una de las características especiales de *C. albicans* es su capacidad de mantener la elongación hifal. En la transición desde el tubo germinativo, observado al inicio del crecimiento hifal, a una verdadera hifa, desempeña un papel clave el factor de transcripción Ume6, tanto para la expresión de los HSGs como para mantener controlados los niveles de Nrg1 en respuesta a suero y 37°C [71]. Su homólogo en *S. cerevisiae* también conocido como Ume6, codifica para una proteína de unión a DNA mediante *zinc fingers* que actúa como un factor de transcripción indispensable para una multitud de procesos entre los que se encuentra la expresión de los genes esenciales de meiosis temprana o la reparación del DNA [72], [73].

En *C. albicans*, la transcripción de *UME6* se produce mediante la unión a su promotor de Brg1 tras la degradación de Nrg1, [53], [71], [74]. Este factor de transcripción, Ume6, es esencial durante el mantenimiento hifal, aunque no es necesario

para la formación del tubo germinativo [71]. Por otra parte, se sabe que la sobreexpresión de *UME6* provoca una activación de la miceliación en condiciones de crecimiento levaduriforme [74], [75] además de revertir el fenotipo de pérdida de mantenimiento del desarrollo hifal del mutante *hda1Δ*, sugiriendo que la función principal de Brg1 junto con la deacetilasa Hda1 es la de expresar a *UME6*, para que tome el control del mantenimiento del desarrollo hifal [53].

OBJETIVOS

Los objetivos concretos del proyecto de tesis son:

- 1) Estudiar la relevancia fisiológica de la fosforilación de Nrg1 en la inhibición de su actividad represora en el inicio del crecimiento hifal.
- 2) Estudiar los mecanismos de disociación de Nrg1 de los promotores de HSGs y *BRG1*.
- 3) Caracterizar la función de Sok1 en el inicio del crecimiento hifal.

RESULTADOS

1. Antecedentes.

La proteína de unión a DNA Nrg1 juega un papel fundamental en la represión del crecimiento hifal [36]. En respuesta a suero, un fuerte inductor hifal, la proteína es degradada durante el inicio de la respuesta para luego acumularse durante el mantenimiento del crecimiento hifal [45], [49].

A pesar de la importancia de este represor en el control de la transición levadura-hifa, poco se conoce sobre los mecanismos implicados en su degradación y sobre cuál podría ser la función de Nrg1 cuando se acumula durante el mantenimiento del crecimiento hifal, ya que está descrito que Nrg1 no puede unirse a los promotores de los HSGs en esta fase de la filamentación [45]. El objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido profundizar en la regulación de este importante represor principalmente durante el inicio de la miceliación.

2. La señal nuclear de Nrg1-GFP se reduce rápidamente en respuesta a suero.

En una primera aproximación al estudio del represor, se analizó el comportamiento de la proteína Nrg1 al inicio de la respuesta a suero. Para ello, realizamos experimentos de microscopía de fluorescencia a lo largo del tiempo (*time-lapse*) de células que expresaban niveles fisiológicos de Nrg1-GFP en un fondo histona Hhf1-Cherry.

Como puede observarse en la **Figura 10**, la cuantificación de la intensidad media de la señal nuclear de Nrg1 mostró una rápida reducción que alcanzó niveles mínimos en los primeros 10 minutos, antes de que las células empezaran a emitir el tubo germinativo que da lugar a la hifa (Flecha, **Figura 10A**).

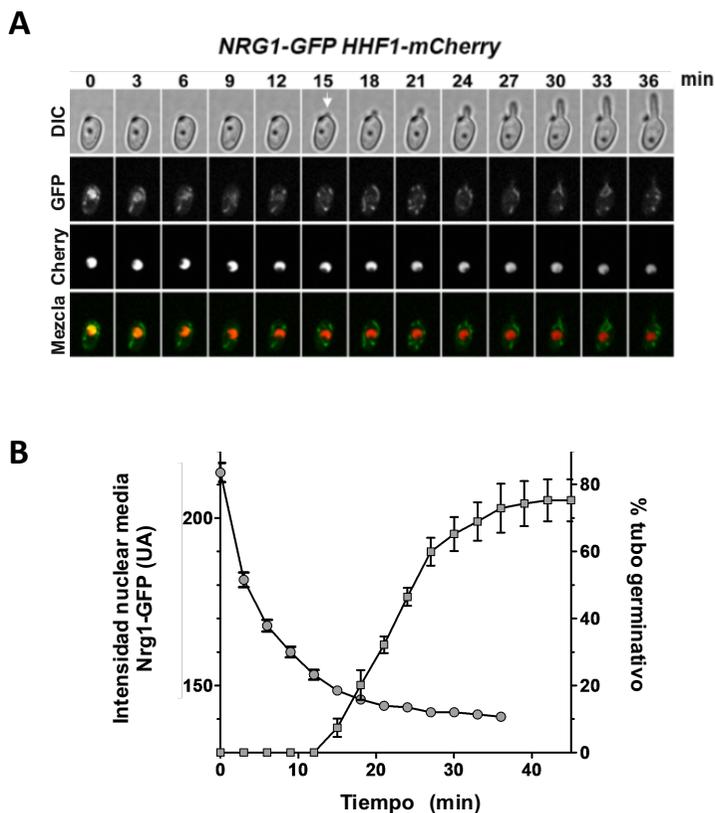


Figura 10. La señal nuclear de Nrg1-GFP se reduce rápidamente al inicio del crecimiento hifal. A) Análisis de la localización nuclear de Nrg1-GFP mediante microscopía de fluorescencia de la cepa *NRG1-GFP HHF1-mCherry* (JC2611) cada 3 min después de la inducción hifal (37°C + 10% FBS). Las imágenes de fluorescencia son la proyección máxima de 3 planos adquiridos cada 0,4 μm . La flecha en el minuto 15 indica la aparición del tubo germinativo. **B)** Cuantificación de la intensidad media nuclear de Nrg1-GFP y porcentaje de células con tubo germinativo del experimento mostrado en A (n=35 células).

Para poder determinar si esta reducción de la señal nuclear de Nrg1 se debía a una degradación de la proteína en el núcleo o en el citoplasma, se determinaron los niveles de Nrg1 en un mutante de la exportina Crm1 en presencia de suero.

3. La exportina Crm1 es necesaria para la degradación de Nrg1 en respuesta a suero.

El transporte núcleo-citoplasma de proteínas está mediado por las exportinas [76], [77]. Estas proteínas, altamente conservadas en la evolución, contienen un dominio N-terminal que interacciona con los componentes del poro nuclear y un bolsillo hidrofóbico que reconoce las secuencias de exportación nuclear (NES) presentes en las proteínas cargo.

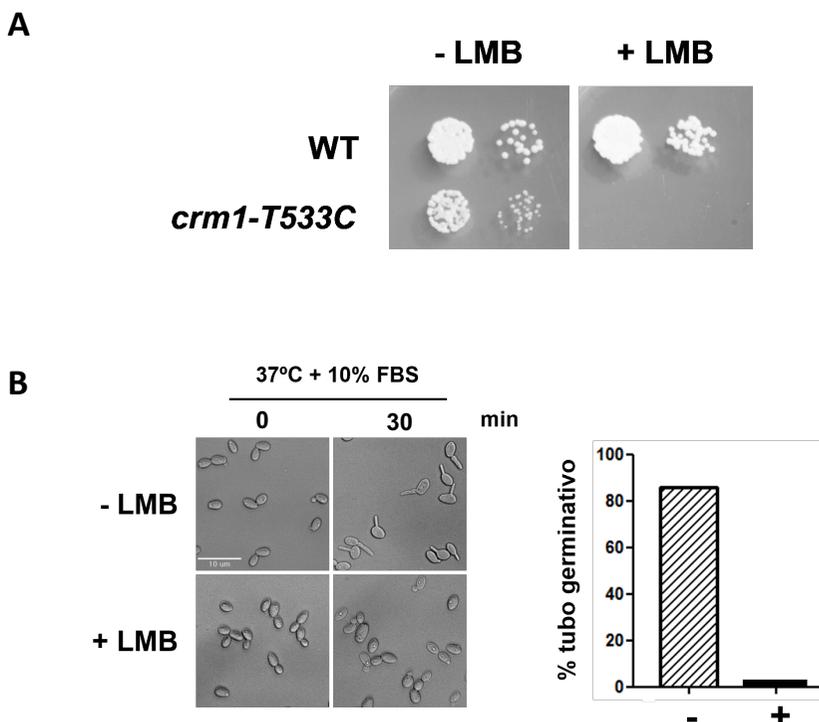


Figura 11. La mutación *crm1-T533C* genera sensibilidad a leptomicina (LMB) en *C. albicans*. **A)** Diluciones seriadas 1:10 de cultivos en fase exponencial de crecimiento de la cepa silvestre *CRM1* (JC2459) y *crm1-T533C* (JC2460) sembradas en placas de YPD en ausencia o presencia de 100 ng/ml de LMB. **B)** La inactivación de la exportina Crm1 bloquea el inicio del crecimiento hifal. Células en crecimiento levaduriforme de la cepa *crm1-T533C* (JC2460) se incubaron en ausencia o presencia de 100 ng/ml de LMB durante 30 min a 28°C. Posteriormente, los cultivos se incubaron en condiciones de miceliación durante 30 min y se cuantificó el porcentaje de células capaces de formar tubo germinativo. Barra: 10 µm.

La leptomicina B (LMB) es un policétido de 540 Da con actividad antifúngica, sintetizado por bacterias del género *Streptomyces*. Algunas levaduras, como *Schizosaccharomyces pombe*, son sensibles a LMB ya que poseen una cisteína en el bolsillo hidrofóbico de la exportina Crm1. Esta molécula inhibe específicamente la función de Crm1 al unirse covalentemente a la cisteína y bloquear la interacción de Crm1 con las

secuencias NES de las proteínas que tienen que ser exportadas al citoplasma [76], [78], [79]. Sin embargo, existen otras levaduras, como *S. cerevisiae* o *C. albicans*, que son resistentes a LMB por la presencia de una treonina en lugar de cisteína en esta región hidrofóbica. Con el fin de obtener un alelo de *CRM1* de *C. albicans* sensible a LMB, se generó una cepa que expresaba el alelo *crm1-T533C* como única exportina (Ángel Ruiz Enamorado, TFG 2019, UEX). Como se advierte en la **Figura 11A**, mientras que la cepa silvestre *CRM1* fue capaz de crecer en placas de YPD suplementada con 100 ng/ml de LMB, la cepa *crm1-T533C* mostró sensibilidad a la droga.

Una vez generado este alelo de *CRM1* sensible a LMB, se construyó la cepa *crm1-T533C NRG1-HA* (JC2640) para estudiar si la degradación de Nrg1 en respuesta a suero dependía de su exportación al citoplasma. Para ello, células de dicha cepa, crecidas en condiciones de crecimiento levaduriforme (YPD a 28°C), se incubaron en presencia o ausencia de LMB (100 ng/ml) durante 30 minutos. Posteriormente, los cultivos se incubaron en condiciones de crecimiento hifal, con y sin LMB, y se recogieron muestras a los 0, 30 y 60 minutos. Tras la obtención de extractos celulares, los niveles de Nrg1 se analizaron mediante *Western-blot*, usándose el anticuerpo anti-HA para la detección de la proteína Nrg1-HA y el anticuerpo anti-PSTAIRE frente a CDKs como control de carga.

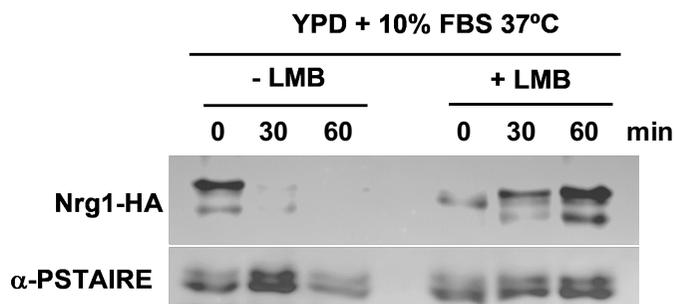


Figura 12. La degradación de Nrg1 al inicio del crecimiento hifal depende de la exportina Crm1. Un cultivo de la cepa *crm1-T533C NRG1-HA* (JC2640) se creció en condiciones de crecimiento hifal (37°C + 10% FBS) en ausencia o presencia de 100 ng/ml de LMB y se recogieron muestras a los tiempos indicados para la obtención de extractos proteicos con TCA. Posteriormente, se analizaron los niveles de Nrg1 mediante *Western-blot* con anticuerpos anti-HA. Se utilizó como control de carga el anticuerpo anti-PSTAIRE.

Teniendo en cuenta los resultados mostrados en la **Figura 12**, puede decirse que la adición de LMB bloqueó la degradación de Nrg1 en respuesta a suero visto que, a diferencia del control sin LMB, los niveles del represor se acumularon a lo largo del

experimento. Además, en las muestras con LMB se observó un aumento de la movilidad electroforética de Nrg1, lo que podría sugerir que esta proteína se fosforila en respuesta a suero. Esta incapacidad de degradar al represor Nrg1 en presencia de LMB se correlaciona con una pérdida completa de la formación de tubos germinativos (**Figura 11B**).

En resumen, estos resultados indican que la exportina Crm1 es necesaria para la degradación de Nrg1 en respuesta a suero, sugiriendo que el represor tiene que ser primero disociado de los promotores y luego exportado al citoplasma para ser degradado en respuesta a las señales que inducen miceliación.

4. La fosforilación de Nrg1 es necesaria para su degradación en respuesta a suero.

Los resultados del apartado anterior sugieren que Nrg1 es fosforilado en respuesta a suero y exportado al citoplasma para su degradación. En trabajos previos del grupo, se iniciaron los estudios sobre la regulación del represor Nrg1 (Tesis Guadalupe Bermejo, 2016). En dicha tesis se demostró que Nrg1 es una fosfoproteína dado que su movilidad electroforética se modifica tras el tratamiento con λ -fosfatasa (**Figura 13B**). Además, el estado de fosforilación de la proteína depende de un grupo de 7 sitios S/TP que se concentran mayoritariamente en el extremo N-terminal (**Figura 13A**). La construcción de un mutante en el que todos los posibles aminoácidos fosfoaceptores se cambiaron por alanina, alelo *nrg1-7A*, dio lugar a una proteína que muestra diferencias electroforéticas con la proteína silvestre, tanto en geles *SDS-PAGE* como bidimensionales (**Figura 13C**). Sin embargo, el estudio fenotípico del mutante *nrg1-7A* puso de manifiesto que estos residuos no son importantes para regular la función represora de Nrg1 porque las células muestran un fenotipo silvestre, tanto en crecimiento levaduriforme como en su respuesta a suero (**Figura 14B**). En levaduras, la única diferencia observada con respecto a la cepa silvestre es que en el mutante *nrg1-7A* se acumula más cantidad de esta proteína represora en el núcleo (**Figura 15**), pudiendo sugerir que la fosforilación de estos sitios estaría implicada en la regulación del transporte entre el núcleo y citoplasma. En hifas, el fenotipo más relevante es que, a pesar de responder al inductor hifal con una cinética similar al control silvestre (**Figura 14C**), los niveles de la proteína Nrg1-7A no disminuyen tras la adición de suero (**Figura 14A**), indicando que estos sitios son importantes para activar su degradación.

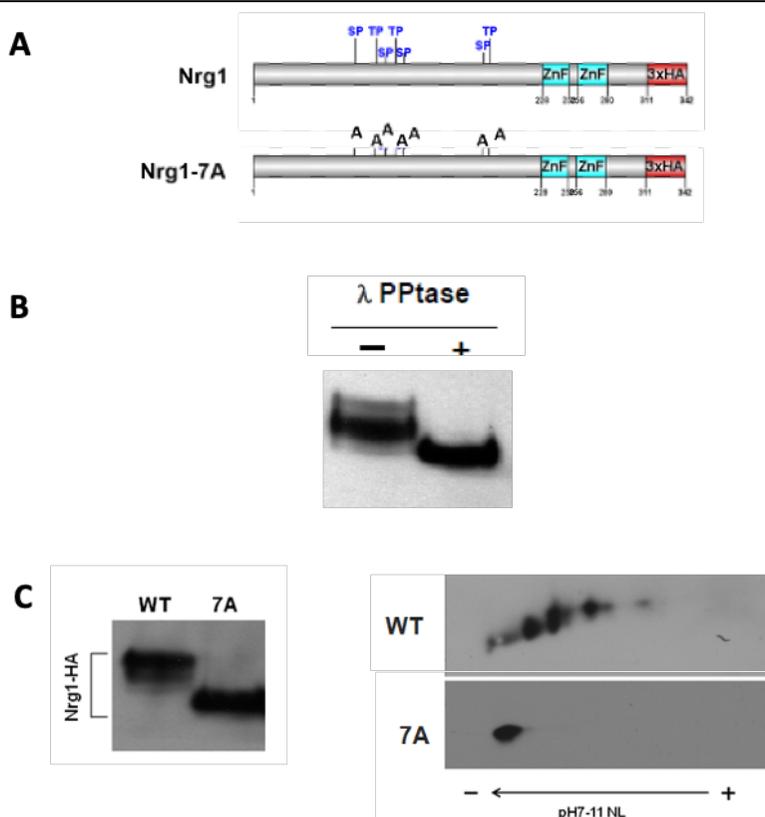


Figura 13. El represor Nrg1 es una fosfoproteína. A) Representación de los potenciales sitios de fosforilación S/TP en la proteína Nrg1 y la proteína mutante Nrg1-7A. Caja celeste: dominios ZnF. Caja roja: 3 copias del epítipo HA. **B)** Extractos celulares de una cepa silvestre *NRG1-HA* (JC1139) se incubaron en presencia o ausencia de λ -fosfatasa y el patrón electroforético de Nrg1 se analizó mediante *Western-blot* con anticuerpos anti-HA. **C)** El estado de fosforilación de Nrg1 depende de los sitios S/TP. Extractos celulares de las cepas silvestres *NRG1-HA* (JC1139) y mutante *nrg1-7A-HA* (JC1359) se utilizaron para la analizar el comportamiento electroforético de Nrg1 en geles SDS-PAGE (izquierda) o geles bidimensionales (derecha). Tomado de la Tesis de Guadalupe Bermejo Pulido, 2016.

Con el objetivo de profundizar en esta idea, en la presente tesis comparamos la estabilidad de las proteínas silvestre y Nrg1-7A en condiciones de crecimiento levaduriforme e hifal mediante experimentos de represión del promotor. Para ello, se construyeron las cepas JC1211 (*pMET3-NRG1-HA/NRG1*) y JC2309 (*pMET3-nrg1-7A-HA/NRG1*). En dichas cepas, los alelos de *NRG1* etiquetados con el epítipo HA se encontraban bajo los órdenes del promotor regulable del gen *MET3* reprimido cuando hay metionina y cisteína en el medio de cultivo. Para realizar el experimento, cultivos de ambas cepas crecidos en MM a 28°C (levaduras, promotor *ON*), se transfirieron a condiciones de represión del promotor (5 mM metionina y 1mM de cisteína) a 28°C (levaduras, *OFF*) o 37°C con 10% FBS (hifas, *OFF*), recogiendo muestras cada 20 minutos

durante un periodo de 1h. Posteriormente, se obtuvieron extractos y se determinaron los niveles de Nrg1 mediante *Western-blot* con anticuerpos anti-HA (**Figura 16**).

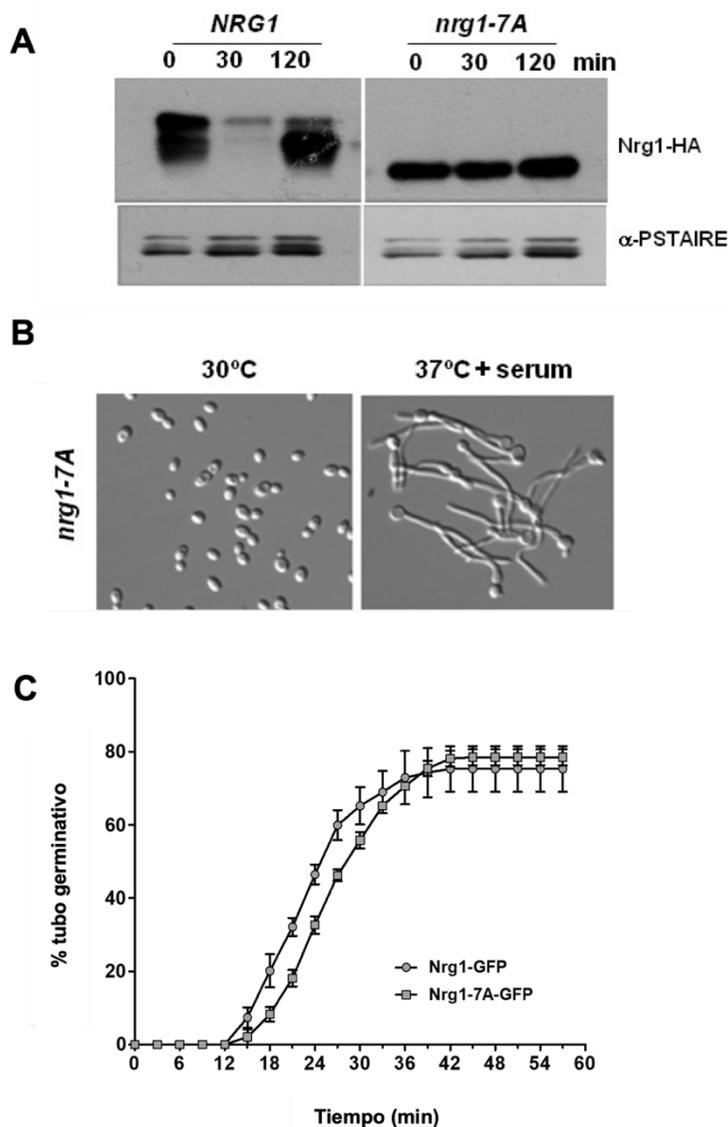


Figura 14. A) La degradación de Nrg1 en respuesta a suero depende los sitios S/TP. Una cepa silvestre *NRG1-HA* (JC1139) y un mutante *nrg1-7A-HA* (JC1359) se pusieron en condiciones de crecimiento hifal (37°C + 10%suero), recogiendo muestras a los tiempos indicados en la figura analizándolas mediante *Western-blot* con anticuerpos anti-HA. Para el control de carga se utilizó anticuerpos anti-PSTAIRA. **B) El crecimiento levaduriforme y micelar es independiente de los sitios S/TP.** Morfología de las células del mutante *nrg1-7A* crecidas a 30°C y a 37°C suplementado con 10% de suero. Tomado de la Tesis de Guadalupe Bermejo. **C) Porcentaje de células con tubo germinativo** de una cepa silvestre *NRG1-GFP* (JC2611) y mutante *nrg1-7A-GFP* (JC2608) tras incubarlas en YPD suplementado con 10% de suero a 37°C. La grafica muestra la media de tres experimentos independientes con células incubadas en cámaras Ibidi en el microscopio y las barras de error corresponden a la SEM.

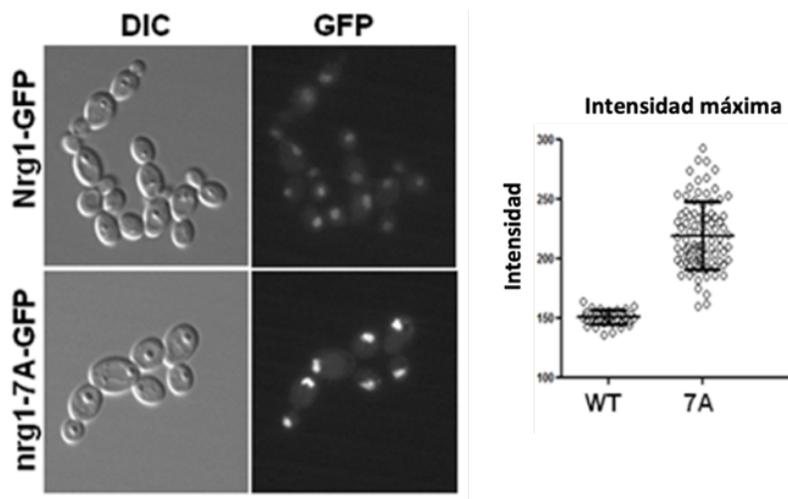


Figura 15. Localización de Nrg1 en levaduras de la cepa *nrg1-7A*. Tomado de la Tesis de Guadalupe Bermejo.

Como se aprecia en la **Figura 16**, no se observaron diferencias en la estabilidad de ambas proteínas en condiciones de crecimiento levaduriforme. En cambio, bajo condiciones de desarrollo hifal, la proteína silvestre se degradó rápidamente en los primeros 20 min mientras que no se observó variación alguna en los niveles de Nrg1-7A. Por tanto, estos resultados indican que la fosforilación de los sitios S/TP regula la estabilidad del represor específicamente al inicio del crecimiento hifal.

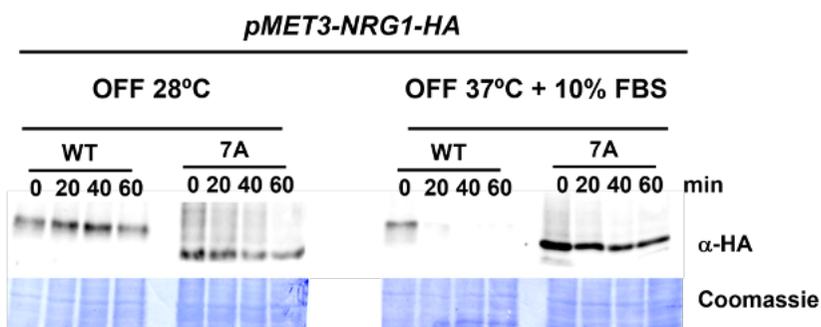


Figura 16. La inestabilidad de Nrg1 al inicio del crecimiento hifal depende de los sitios S/TP. Cultivos de las cepas silvestre *pMET3-NRG1-HA* (JC1211) y mutante *pMET3-nrg1-7A-HA* (JC2309) crecidos en MM a 28°C (levaduras, promotor ON) se inocularon en condiciones de represión del promotor *pMET3* (MM + 5 mM Met + 1 mM Cys) a 28°C (levaduras) o 37°C suplementado con 10% de suero (hifas). Posteriormente, se tomaron muestras a los tiempos indicados para obtener extractos proteicos con TCA y se realizaron *Western-blot* con el fin de analizar los niveles de Nrg1 con anticuerpos anti-HA. La tinción con Coomassie se utilizó como control de carga.

5. El inicio del crecimiento hifal es independiente de la disociación de Nrg1 de los promotores.

El hecho de que el mutante *nrg1-7A* fuera capaz de responder a suero sugería que, a pesar de no degradar al represor, debería tener lugar la expresión de genes específicos de hifas. Con el fin de confirmar este punto, se analizó, mediante qRT-PCR, la expresión de los genes *ECE1*, *HWP1* y *ALS3* en muestras de cultivos de la cepa silvestre *NRG1-HA* (JC1139) y del mutante *nrg1-7A-HA* (JC1359) tras la adición de suero a 37°C. Como cabía esperar, la estabilización del represor en el mutante *nrg1-7A* no afectó a la inducción de los genes *ECE1*, *HWP1* y *ALS3*, aunque inesperadamente se observó una mayor expresión de los genes en el mutante frente al control silvestre (**Figura 17**).

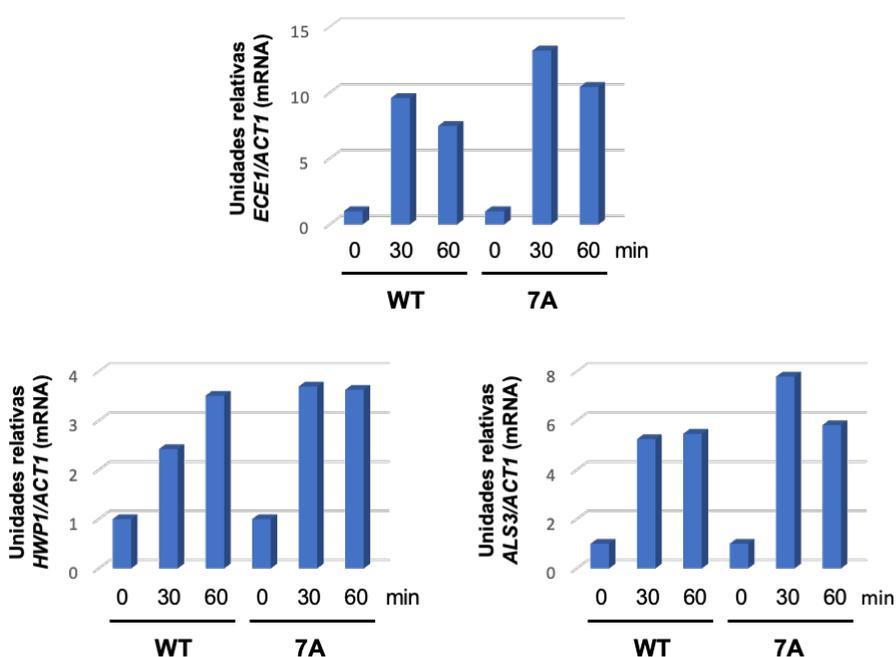


Figura 17. La mutación *nrg1-7A* no afecta a la expresión de *ECE1*, *HWP1* y *ALS3*. Expresión de los genes específicos de hifas *ECE1*, *HWP1* y *ALS3* en las cepas silvestre *NRG1-HA* (JC1139) y mutante *nrg1-7A-HA* (JC1359) tras la inducción del crecimiento hifal. Se obtuvo mRNA de cada cepa a los tiempos indicados y se cuantificó la expresión de *ECE1*, *HWP1* y *ALS3* mediante RT-qPCR utilizando el gen *ACT1* como control interno. El valor normalizado de cada gen a t0 se le dio el valor 1. El resto de los valores normalizados se referenciaron al tiempo t0. Las gráficas incluyen la media de dos qRT-PCRs.

Por tanto, si el mutante *nrg1-7A* era capaz de activar la expresión de *ECE1*, *HWP1* y *ALS3* la adición de suero debería inducir la disociación del represor de los promotores. Para comprobar esta hipótesis, realizamos experimentos de inmunoprecipitación de

cromatina (ChIP) en células de la cepa *nrg1-7A-HA* (JC1359), en las que se analizó la interacción de Nrg1 a una región del promotor de *ALS3*, tanto en levaduras (t_0) como al inicio de la respuesta a suero (t_{30} min). Sorprendentemente, la adición del suero tuvo el efecto contrario al esperado ya que en lugar de detectar menos unión de Nrg1 al promotor, se observó un enriquecimiento cuatro veces superior al t_0 de levaduras (**Figura 18A**). Un comportamiento similar se observó cuando se analizó el promotor de *ECE1* (**Figura 18B**). Por tanto, en contraste con trabajos previos [45], estos resultados sugieren que la activación del programa transcripcional de hifas es independiente de la disociación y degradación del represor Nrg1.

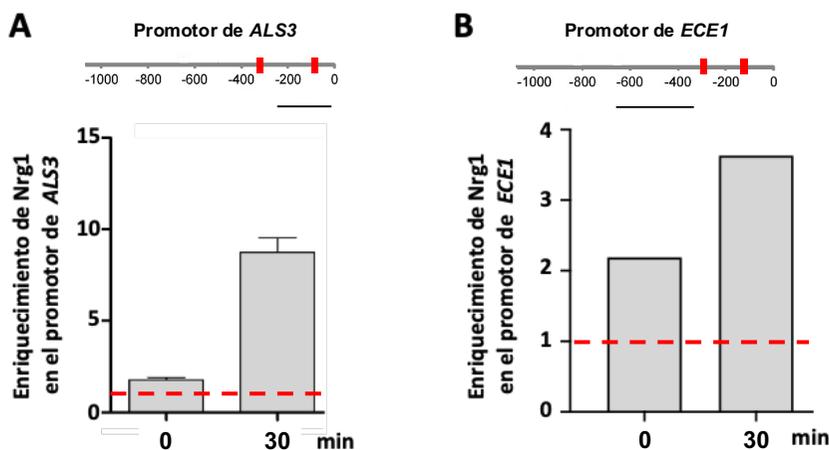


Figura 18. La proteína Nrg1-7A no se disocia del promotor de *ALS3* en respuesta a suero. A, B) Células de la cepa *nrg1-7A-HA* (JC1359) se recogieron a 0 y 30 min tras la inducción hifal y se procesaron para realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con el fin de determinar la unión de Nrg1 a una región del promotor de *ALS3* a -0,2 kb del ATG iniciador y a una región del promotor de *ECE1* a -0,6 kb del ATG iniciador. Los datos de cada tiempo se normalizaron con la señal del control de carga (input). Las gráficas representan el enriquecimiento relativo al control negativo sin anticuerpo. La gráfica perteneciente al promotor de *ALS3* incluye la media \pm SEM procedente de 3 experimentos independientes mientras que en la gráfica referente al promotor de *ECE1* se representa la media de dos qPCRs. El valor 1 representa el nivel de enriquecimiento obtenido en el promotor de *CDC12*, gen no regulado por Nrg1. Líneas rojas: Posibles sitios de unión de Nrg1.

6. El mutante *nrg1-7E* tiene fenotipo de pérdida de función.

Los datos mostrados en el apartado anterior indican que la proteína Nrg1-7A no puede disociarse de los promotores en respuesta a suero, sugiriendo que la fosforilación de los sitios S/TP podrían contribuir a su despegue de los promotores. Si esta idea fuera

cierta, cabría esperar que un mutante fosfomimético *nrg1-7E* se comportara como un mutante de pérdida de función lo que daría lugar a la formación de hifas en condiciones de crecimiento levaduriforme.

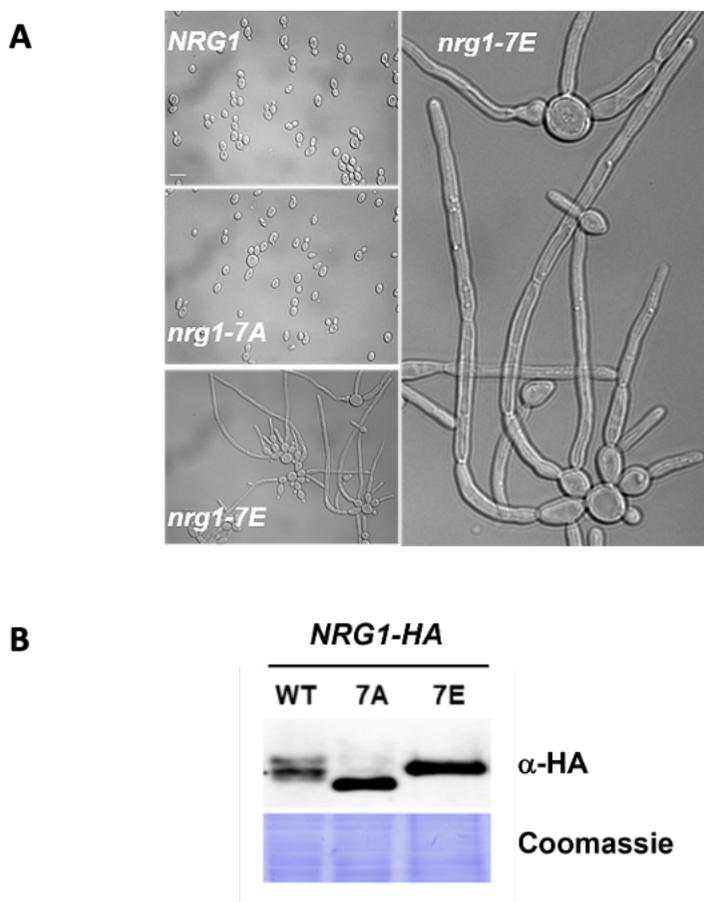


Figura 19. La mutación *nrg1-7E* genera un fenotipo de pérdida de función. A) Morfología de las células de la cepa silvestre *NRG1-HA* (JC1139), *nrg1-7A-HA* (JC1359) y *nrg1-7E-HA* (JC2273) crecidas en condiciones de crecimiento levaduriforme a 28°C. **B)** Niveles de la proteína Nrg1 en extractos celulares de cultivos asincrónicos de las cepas indicadas en A) crecidas a 28°C. La tinción con Coomassie se utilizó como control de carga.

Para comprobar esta hipótesis, se construyó un alelo *nrg1-7E-HA* mediante síntesis génica (gBlocks, IDT) y se utilizó para sustituir el alelo silvestre de una cepa heterocigótica *NRG1/nrg1 Δ* (JC2273: *nrg1-7E-HA/nrg1 Δ*), dando lugar a células que sólo expresaban la forma mutada del represor. Con la finalidad de analizar su fenotipo, se determinó la morfología de las células de la cepa silvestre *NRG1-HA* (JC1139), *nrg1-7A-HA* (JC1359) y *nrg1-7E-HA* (JC2273) crecidas en condiciones de crecimiento levaduriforme a 28°C. Como

puede observarse en la **Figura 19A**, únicamente las células de la cepa *nrg1-7E* eran capaces de formar hifas a 28°C. Este fenotipo no era consecuencia de que las mutaciones presentes en la proteína Nrg1-7E desestabilizaran la proteína puesto que los niveles de Nrg1 presente en los extractos celulares de las tres cepas era similar (**Figura 19B**). Tampoco se debía a que dichas mutaciones excluyeran a la proteína del núcleo al ser detectada señal nuclear de GFP en células de la cepa *NRG1/nrg1-7E-GFP* (JC2790) (datos no mostrados). Además, dichas células crecían en forma de levadura a 28°C, indicando que la mutación *nrg1-7E* era recesiva.

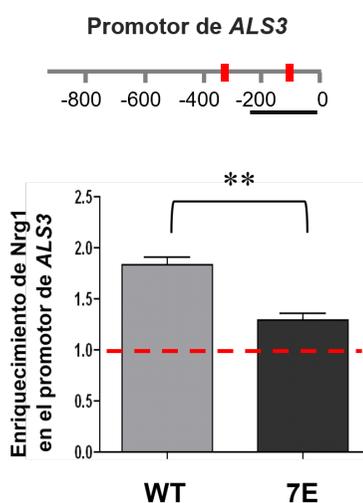


Figura 20. La proteína Nrg1-7E tiene menor afinidad por el promotor de ALS3 en levaduras. Células de la cepa silvestre *NRG1-HA* (JC1139) y el mutante *nrg1-7E-HA* (JC2273) se recogieron en fase exponencial de crecimiento a 28°C y se procesaron para realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con el fin de determinar la unión de Nrg1 a una región del promotor de *ALS3* a -0,2 kb del ATG iniciador. Los datos de cada tiempo se normalizaron con la señal del control de carga (input). Las gráficas representan el enriquecimiento relativo al control negativo sin anticuerpo. Las gráficas incluyen la media \pm SEM procedente de 3 experimentos independientes. La significación estadística de las diferencias se realizó mediante el unpaired t test. (**P=0,006). Líneas rojas: posibles sitios de unión de Nrg1. El valor 1 representa el nivel de enriquecimiento obtenido en el promotor de *CDC12*, gen no regulado por Nrg1.

En conjunto, estos datos sugieren que la proteína Nrg1-7E tiene menor afinidad por el DNA que el represor silvestre, por lo que decidimos realizar experimentos de ChIP para comparar la capacidad de unión de Nrg1 al promotor de *ALS3* en condiciones de crecimiento levaduriforme en la cepa control *NRG1-HA* (JC1139) y el mutante *nrg1-7E-HA* (JC2273). En todos los experimentos de ChIP, los valores de enriquecimiento obtenidos se normalizaron con el valor de enriquecimiento de Nrg1 en el promotor de *CDC12*, gen no regulado por el represor. Por tanto, valores de enriquecimiento de Nrg1 en el promotor de *ALS3* de 1 son indicativos de ausencia de unión al DNA. En la **Figura 20**, se representan los valores medios de enriquecimiento de Nrg1 en el promotor de *ALS3* de 3 réplicas biológicas independientes de las cepas silvestre y mutante. Como se aprecia en la figura, se obtuvo una reducción significativa en el enriquecimiento de Nrg1 en la cepa

nrg1-7E-HA respecto al control, alcanzando valores próximos a 1. En resumen, todos estos datos indican que la mutación *nrg1-7E* reduce la afinidad de la proteína por el DNA.

7. La reducción de los niveles de Sok1 suprime el crecimiento hifal constitutivo del mutante *nrg1-7E*.

El farnesol es una molécula de *quorum sensing* sintetizada por *C. albicans* que actúa como un potente inhibidor de la transición levadura-hifa [49]. Recientemente, se ha demostrado que el farnesol inhibe el inicio del desarrollo hifal porque bloquea la degradación de Nrg1 [49]. Por tanto, el mutante *nrg1-7E* debería ser insensible al farnesol porque, aunque esta molécula inhibiera la degradación de Nrg1 en respuesta a suero, el

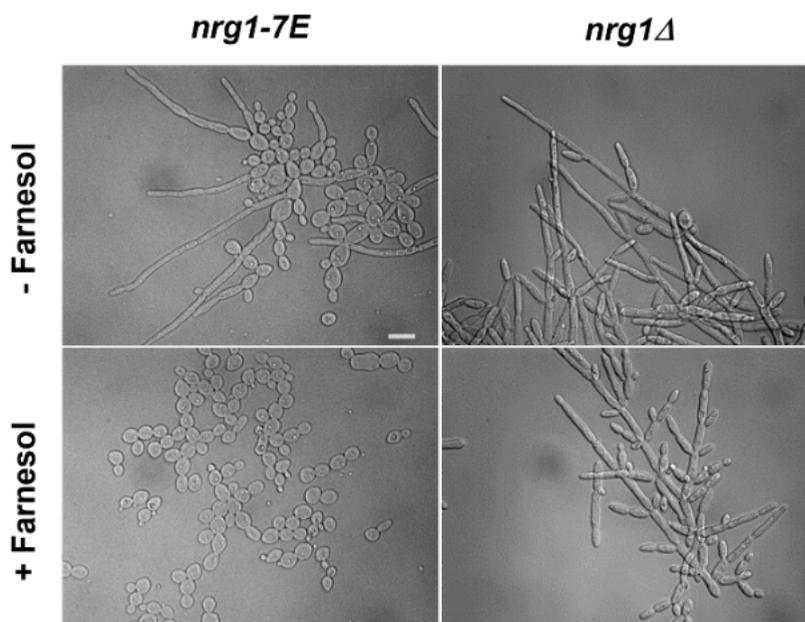


Figura 21. La molécula de *quorum sensing* farnesol suprime el fenotipo de *nrg1-7E*. Morfología de las células de la cepa *nrg1-7E-HA* (JC2273) y *nrg1Δ* (JC1054) crecidas en condiciones de crecimiento levaduriforme a 28° en ausencia o presencia de 25 mM de farnesol. Barra de escala: 5 μ m.

represor no podría reprimir la transcripción del programa hifal al tener reducida su capacidad de unirse al DNA. Sorprendentemente, la adición de 25 μ M de farnesol suprimió el crecimiento hiperpolarizado en las células *nrg1-7E* (Figura 21). Dado que concentraciones elevadas de esta molécula puede inhibir el crecimiento celular [52], [80],

decidimos comprobar si esta supresión era consecuencia indirecta del farnesol sobre el crecimiento o estaba relacionado con la inhibición del programa hifal. Para ello, analizamos el efecto del farnesol sobre el crecimiento hiperpolarizado del mutante *nrg1Δ* que crece constitutivamente en forma de hifa [36]. Como puede observarse en la **Figura 21**, las células de la cepa *nrg1Δ* (JC1054) mantenían el crecimiento hiperpolarizado tras la adición de farnesol. Por tanto, estos resultados sugieren que el farnesol estabiliza la unión de Nrg1-7E a los promotores.

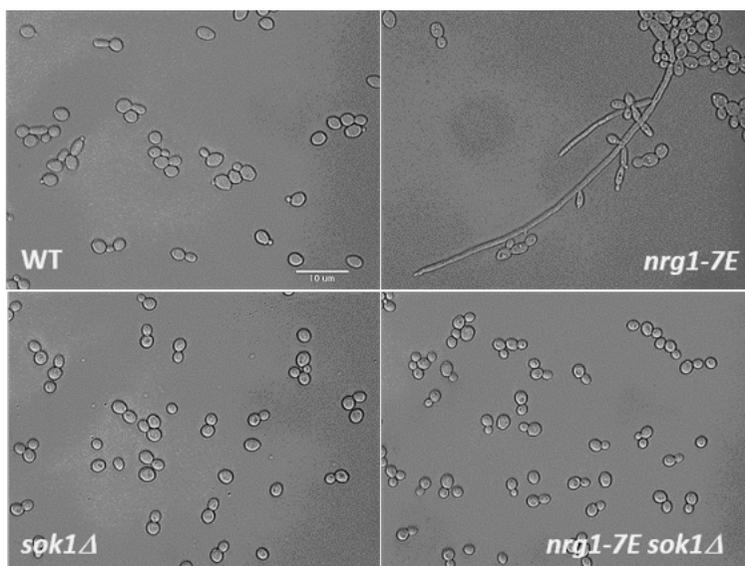


Figura 22. La delección de *SOK1* suprime el fenotipo del *nrg1-7E*. Morfología de las células de la cepa silvestre *NRG1-HA* (JC1139), *nrg1-7E-HA* (JC2273), *sok1Δ* (JC1803) y *sok1Δ nrg1-7E-HA* (JC2407) crecidas en condiciones de crecimiento levaduriforme a 28°C. Barra de escala: 10 μm.

¿Cuál podría ser el mecanismo? Se ha descrito que el farnesol estabiliza al represor Nrg1 porque inhibe la transcripción de *SOK1*, proteína requerida para la degradación de Nrg1 [49]. Por tanto, si Sok1 estuviera implicado en la inhibición del crecimiento hifal del mutante *nrg1-7E* en presencia del farnesol, la delección de *SOK1* en un fondo *nrg1-7E/nrg1Δ* debería también suprimir el fenotipo en ausencia de farnesol. Para estudiar esta hipótesis, se construyó el doble mutante *sok1Δ nrg1-7E-HA/nrg1Δ* (JC2407) y se comparó su morfología a 28°C con el control silvestre BWP17 y los mutantes *nrg1-7E-HA/nrg1Δ* (JC2273) y *sok1Δ* (JC1803). Efectivamente, la eliminación de *SOK1* suprimió

completamente el fenotipo hifal de las células *nrg1-7E* (Figura 22). Por tanto, estos resultados indican que la mutación *nrg1-7E* *per se* no inactiva la función represora de Nrg1, sino que su inactivación depende de la presencia de la proteína Sok1.

Esta conclusión nos permitió plantear la hipótesis de que la función de Sok1 podría ser inducir el despegue de Nrg1 de los promotores cuando dicho represor estuviera fosforilado en los sitios S/TP (Figura 23A). Por tanto, en el contexto del inicio del crecimiento hifal, Nrg1 y Sok1 podrían ser dianas de las rutas ambientales que inducen la miceliación y que ambas, tras sus respectivas modificaciones postraduccionales, colaboraran en la disociación del represor para que posteriormente, éste fuera exportado al citoplasma donde se degradaría (Figura 23B).

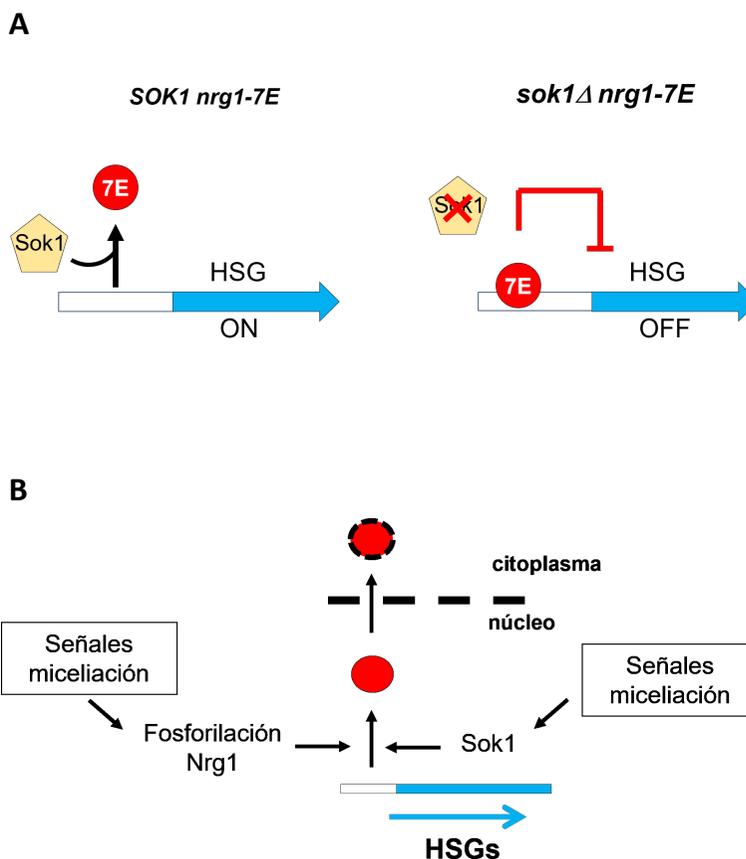


Figura 23. Modelo sobre la interacción entre la delección de *SOK1* y la mutación *nrg1-7E*.

8. La delección de *SOK1* no modifica la afinidad de la proteína Nrg1-7E por el promotor de *ALS3*.

La hipótesis planteada en la **Figura 23** implica que el fenotipo del doble mutante *nrg1-7E-HA/nrg1Δ sok1Δ* se debe a que la proteína Nrg1-7E recupera su capacidad de unirse al DNA en ausencia de Sok1. Para confirmar esta idea, se determinó el enriquecimiento de Nrg1 en el promotor de *ALS3* mediante experimentos de ChIP a partir de cultivos de la cepa silvestre *NRG1* (JC1139) y los mutantes *sok1Δ* (JC2004), *nrg1-7E/nrg1Δ* (JC2273) y *sok1Δ nrg1-7E-HA/nrg1Δ* (JC2407) crecidos a 28°C. Contrariamente a lo esperado, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de Nrg1 unida al DNA de las cepas *nrg1-7E* y el doble mutante *nrg1-7E sok1Δ* (**Figura 24**), lo que podría sugerir que, contrariamente a lo pensado inicialmente, Sok1 no estaría implicada en la disociación de Nrg1 de los promotores.

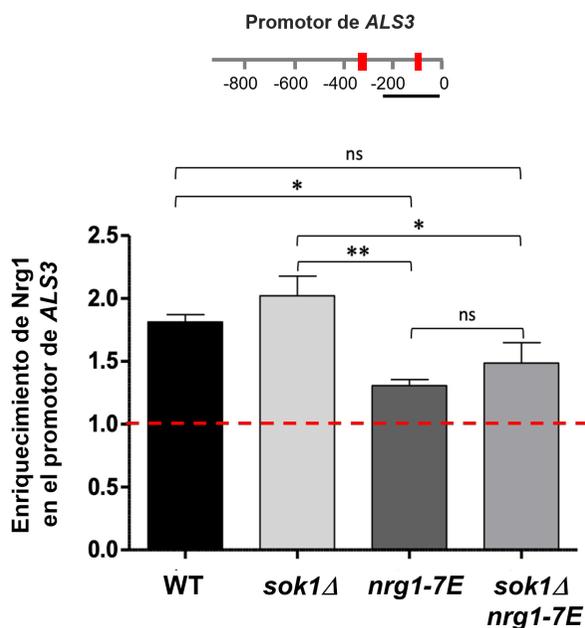


Figura 24. La delección de *SOK1* no modifica la afinidad de la proteína Nrg1-7E por el promotor de *ALS3*. Células de la cepa silvestre *NRG1-HA* (JC1139), y los mutantes *sok1Δ NRG1-HA* (JC2004), *nrg1-7E-HA* (JC2273) y *sok1Δ nrg1-7E-HA* (JC2407) se recogieron en fase exponencial de crecimiento a 28°C y se procesaron para realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con el fin de determinar la unión de Nrg1 a una región del promotor de *ALS3* a -0,2 kb del ATG iniciador. Los datos de cada tiempo se normalizaron con la señal del control de carga (input). Las gráficas representan el enriquecimiento relativo al control negativo sin anticuerpo. Las gráficas incluyen la media \pm SD procedente de 3 experimentos independientes. La significación estadística de las diferencias se realizó mediante ANOVA one-way. ($P < 0,05$. ns: no significativo). Líneas rojas en promotor: posibles sitios de unión de Nrg1. El valor 1 representa el nivel de enriquecimiento obtenido en el promotor de *CDC12*, gen no regulado por Nrg1.

9. Relaciones epistáticas entre *nrg1-7A* y *sok1Δ*.

Con el propósito de seguir indagando en la posible función de Sok1, y dado que observamos interacciones genéticas entre *nrg1-7E* y *sok1Δ*, decidimos investigar si existían relaciones epistáticas entre *nrg1-7A* y *sok1Δ*. Para ello, se comparó la respuesta

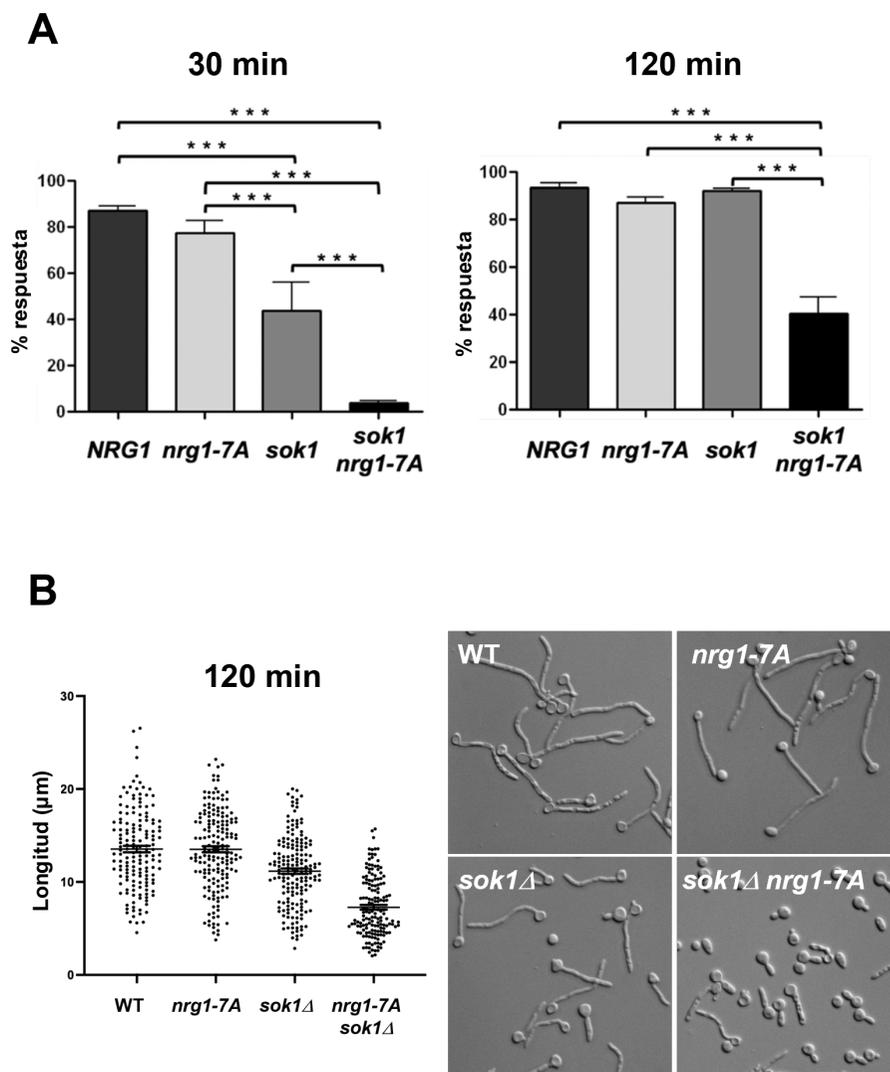


Figura 25. Interacciones genéticas entre las mutaciones *nrg1-7A* y *sok1Δ*. **A)** Porcentaje de formación de tubos germinativos de células de las cepas silvestre *NRG1-HA* (JC1139), *nrg1-7A-HA* (JC1359), *sok1Δ NRG1-HA* (JC2004) y *sok1Δ nrg1-7A-HA* (JC2001) tras 30 min en presencia de 10% de suero a 37°C. La gráfica representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. N=50 células por cada cepa y experimento, La significación estadística de las diferencias se realizó mediante ANOVA one-way. ($P < 0,05$. ns: no significativo). **B)** Medida de la longitud de las hifas y morfología tras 120 minutos de crecimiento en condiciones de miceliación de las cepas del experimento mostrado en A. La gráfica representa la longitud de cada hifa medida y la media \pm SEM.

a suero del doble mutante *sok1Δ nrg1-7A-HA/nrg1Δ* (JC2001) frente a los controles *NRG1-HA/nrg1Δ* (JC1139), *nrg1-7A-HA/nrg1Δ* (JC1359) y *sok1Δ* (JC2004).

Este análisis puso de manifiesto que el inicio de la respuesta a suero se ve severamente afectado en la cepa *nrg1-7A sok1Δ* respecto a los mutantes sencillos (Figura 25A). Tras 30 min en presencia de suero, el 80% de las células *nrg1-7A* y el 40% del cultivo de *sok1Δ* mostraban tubos germinativos mientras que las células del doble mutante fueron incapaces de responder. Sin embargo, tras 120 min de incubación, el 40 % de las células del doble mutante formaron tubos germinativos. Como consecuencia de este retraso, la longitud de las hifas era significativamente más cortas que el control silvestre y los mutantes sencillos (WT: $13,5 \pm 0,347 \mu\text{m}$; *nrg1-7A*: $13,55 \pm 0,324 \mu\text{m}$; *sok1Δ*: $11,2 \pm 0,292 \mu\text{m}$; *nrg1-7A sok1Δ*: $7,05 \pm 0,256 \mu\text{m}$; $n > 150$). El análisis de las células del doble mutante capaces de emitir tubos germinativos hizo patente que las hifas eran también más gruesas. Estos resultados sugieren que el doble mutante además de presentar un retraso en el inicio de la respuesta no puede mantener el crecimiento hiperpolarizado de la hifa (Figura 25B).

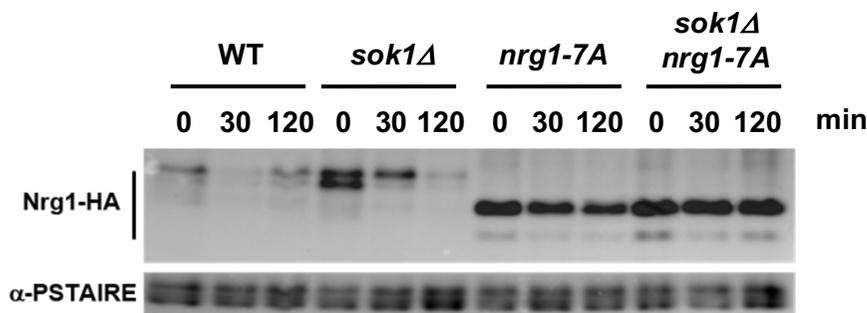


Figura 26. La degradación de Nrg1 en el inicio de la miceliación depende de Sok1 y las fosforilaciones de los sitios S/TP. Células de las cepas *NRG1-HA* (JC1139), *nrg1-7A-HA* (JC1359), *sok1Δ NRG1-HA* (JC2004) y *sok1Δ nrg1-7A-HA* (JC2001) se incubaron en condiciones de crecimiento hifal (37°C y 10% de suero) y se tomaron muestras a los tiempos indicados para obtener extractos proteicos con TCA y analizar los niveles de Nrg1 mediante *Western-blot* con anticuerpos anti-HA. Se utilizó el anti-PSTAIRE como control de carga.

Respecto a los niveles de Nrg1 presente en estas muestras, se puede ver claramente como la eliminación del gen *SOK1* provoca un retraso significativo en la degradación de Nrg1 a los 30 min con respecto al control silvestre. Además, el hecho de que los niveles de Nrg1 presentes en los mutantes *nrg1-7A* y *sok1Δ nrg1-7A* sean similares (Figura 26)

indica que la estabilización de Nrg1 provocada por la pérdida de Sok1 no es aditiva a las mutaciones en los sitios S/TP.

Por último, analizamos la expresión de *ALS3*, *HWP1* y *ECE1*, genes cuya expresión se encuentra reprimida por Nrg1 [28], [81]. Para ello, cultivos de las cuatro cepas se inocularon en YPD suplementado con 10% de suero a 37°C y se recogieron muestras a t0, t30 y t60 min para la extracción de los mRNAs y su posterior cuantificación mediante RT-

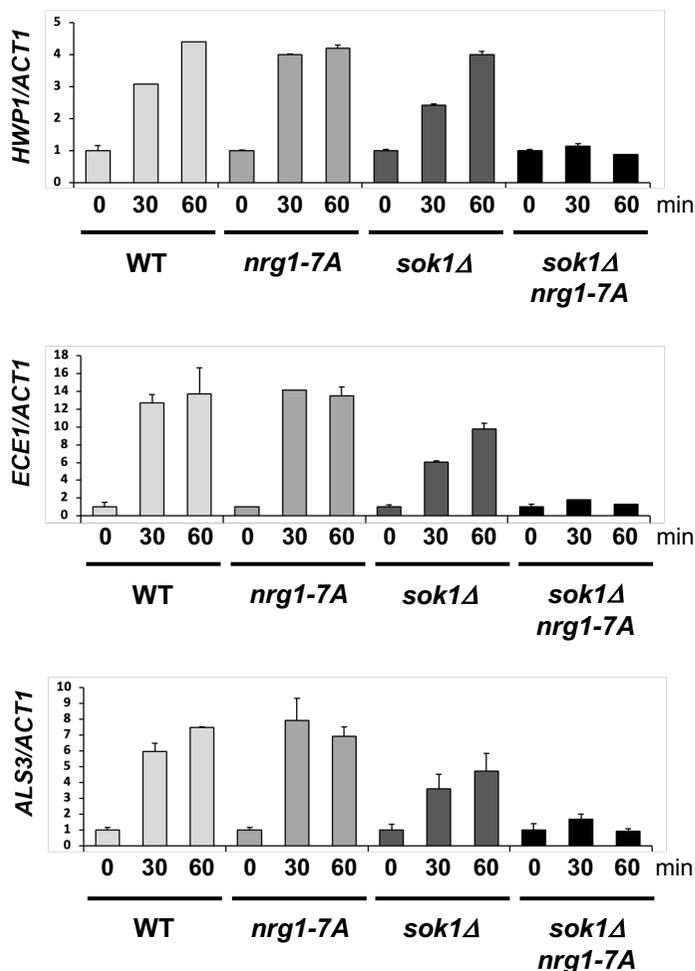


Figura 27. El doble mutante *sok1Δ nrg1-7A* no activa la expresión de Genes Específicos de Hifas (HSGs). Análisis de la transcripción de los HSGs *HWP1*, *ECE1* y *ALS3* mediante RT-qPCR. Cultivos de las cepas silvestre *NRG1-HA* (JC1139), *nrg1-7A-HA* (JC1359), *sok1ΔNRG1-HA* (JC2004) y *sok1Δ nrg1-7A-HA* (JC2001) se inocularon en YPD suplementado con 10% de suero a 37°C. Posteriormente, se recogieron muestras a t0, t30 y t60 min para la extracción de los mRNAs. Los niveles de mRNA de cada gen se determinaron mediante RT-qPCR. La señal obtenida de la expresión del mRNA de *ACT1* se utilizó como control de carga para normalizar las muestras. El valor normalizado de cada gen a t0 se le dio el valor 1. El resto de los valores normalizados se referenciaron al tiempo t0. Los datos mostrados representan los valores medios \pm SD de 2 experimentos independientes.

qPCR (Figura 27). Mientras que en la cepa silvestre y los mutantes simples se observó la inducción de la expresión de los genes en condiciones de crecimiento hifal, las células del doble mutante *sok1Δ nrg1-7A* fueron incapaces de activar la transcripción de dichos genes.

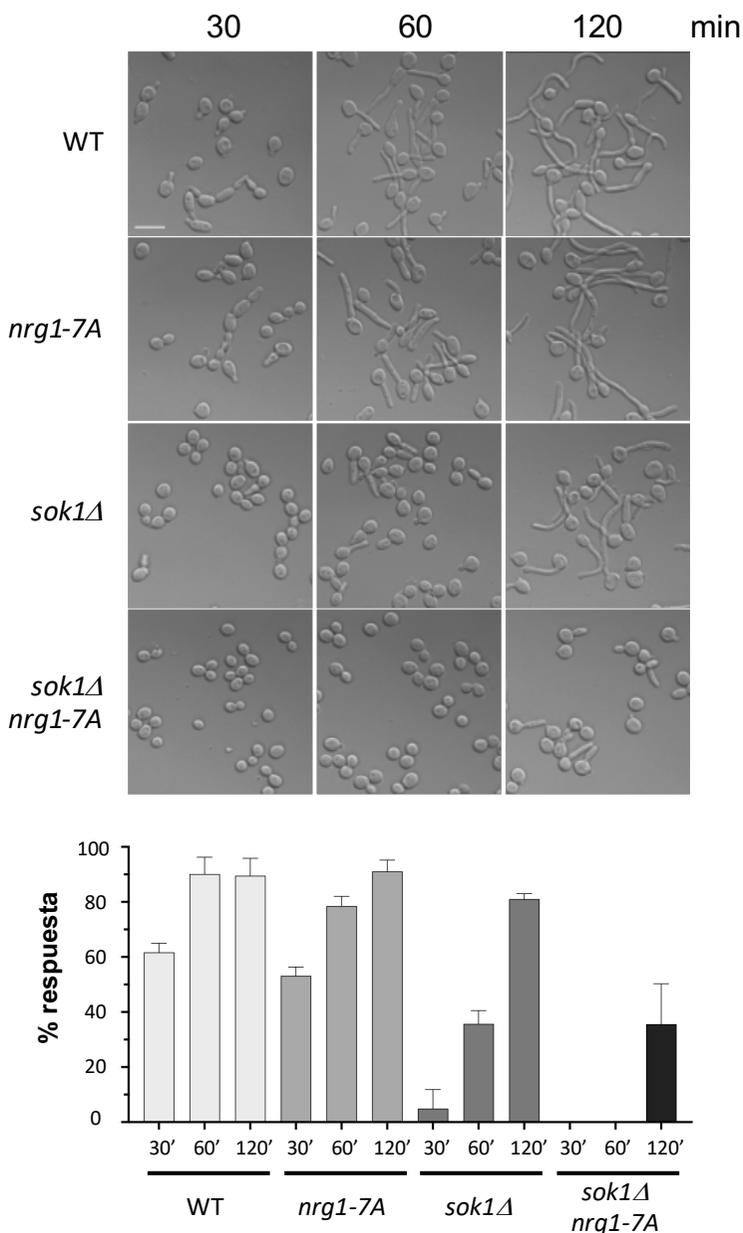


Figura 28. El doble mutante *sok1Δ nrg1-7A* también presenta una gran pérdida de miceliación en presencia de GlcNAc. Morfología de las cepas *NRG1-HA* (JC1139), *nrg1-7A-HA* (JC1359), *sok1Δ NRG1-HA* (JC2004) y *nrg1-7A-HA sok1Δ* (JC2001) a tiempos 30, 60 y 120 minutos en presencia de condiciones inductoras de la filamentosidad (37°C y 2% glucosamina). Barra 10 μm.

Con el fin de determinar si esta relación epistática se mantenía utilizando otras señales ambientales, decidimos estudiar el comportamiento de las cuatro cepas en presencia de 2% de N-acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc), otro potente inductor hifal [82], [83]. Como puede verse en la **Figura 28**, el doble mutante responde mucho peor que los mutantes sencillos a la GlcNAc. Por tanto, podemos concluir que Sok1 y la fosforilación de Nrg1 colaboran en activar el inicio del crecimiento hifal mediante dos mecanismos independientes, tanto en suero como en GlcNAc. En resumen, todos estos datos indican claramente que existe una interacción negativa entre las mutaciones *sok1 Δ* y *nrg1-7A* en el inicio del crecimiento hifal en respuesta a suero.

10. Análisis de la unión de Nrg1 al promotor de ALS3 en los mutantes *nrg1-7A-HA* y *sok1 Δ nrg1-7A-HA*.

El hecho de que el doble mutante *sok1 Δ nrg1-7A-HA* fuera incapaz de responder a suero podría deberse a un mayor incremento en la cantidad del represor unido a los promotores respecto al mutante sencillo *nrg1-7A-HA*. Con la finalidad de profundizar en esta idea, decidimos analizar la unión de Nrg1 al promotor de *ALS3* con más detalle. En un primer lugar, mediante experimentos de ChIP se analizó una región de 1 Kb del promotor con diferentes parejas de cebadores para determinar cuáles eran las regiones con enriquecimientos significativos de Nrg1 (datos no mostrados). Este estudio preliminar nos permitió identificar a las parejas A6 (-672/-447 del ATG iniciador) y A8 (-254/-1 del ATG iniciador) como aquellas más apropiadas para estudiar la interacción de Nrg1 con el promotor de *ALS3* a t0 y t30 min (**Figura 29A**). Una vez establecidos los cebadores, y dado que los niveles de Nrg1 eran similares en las cepas *nrg1-7A-HA* (JC1359) y *sok1 Δ nrg1-7A-HA* (JC2001) (**Figura 26**), se analizó el enriquecimiento de Nrg1 en las regiones A6 y A8 del promotor *ALS3* en ambas cepas a t0 y t30 min después de la inducción del crecimiento hifal. En levaduras (t0), no se observaron diferencias en las regiones A6 y A8 entre ambas cepas (**Figura 29**). Tras la adición de suero, tampoco se observaron diferencias significativas en la región A8. En los dos casos se obtuvieron enriquecimientos 4 veces superiores a los obtenidos a t0. Donde sí se apreciaron diferencias claras fue en la región A6 a t30 min, zona del promotor de *ALS3* donde se une el factor de transcripción Brg1 requerido para la expresión de los HSGs [40], [53], [69]. Según los resultados obtenidos, el sitio A6 no se encuentra ocupado por el represor Nrg1-7A en el mutante simple, ya que

se obtuvo un enriquecimiento de 1 tras normalizar los valores de la qPCR respecto al valor obtenido para *CDC12*. Por tanto, este resultado sugiere que en el mutante *nrg1-7A*, la región A6 se encuentra disponible para la llegada y unión del factor de transcripción Brg1. En cambio, en el doble mutante *sok1Δ nrg1-7A* se detectó un valor de enriquecimiento cercano a 4, indicando que la delección de *SOK1* permite que el represor pueda posicionarse en la zona de unión de Brg1, lo que podría explicar la ausencia de transcripción de HSGs del doble mutante. En resumen, estos datos sugieren que Sok1 podría ser necesario para favorecer la unión del factor de transcripción Brg1 a la región A6 del promotor de *ALS3*. En ausencia de Sok1, el acceso de Brg1 al promotor se vería impedido y Nrg1-7A ocuparía su lugar. Este modelo podría explicar las diferencias fenotípicas observadas entre las cepas *nrg1-7A* y *sok1Δ nrg1-7A* (Figura 30).

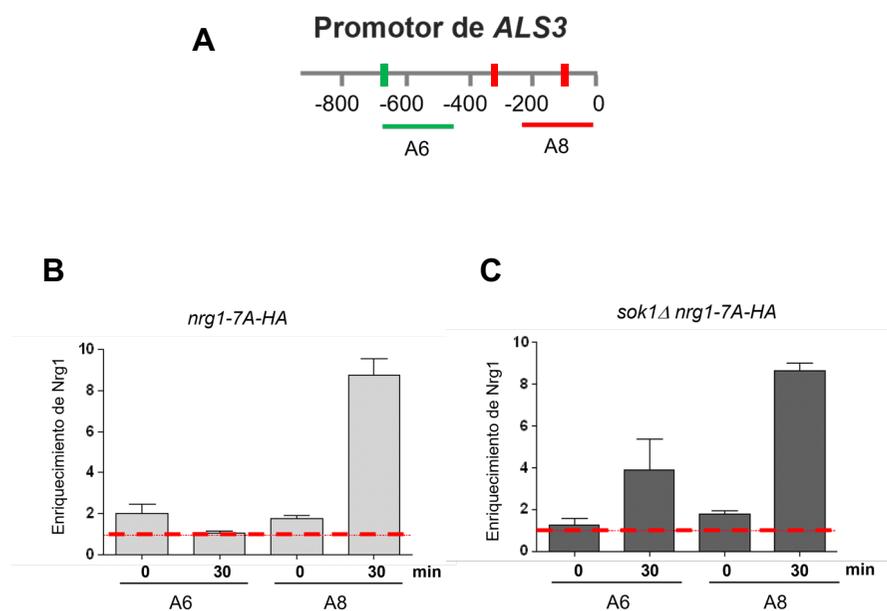


Figura 29. Análisis de la unión de Nrg1 al promotor de ALS3 en los mutantes *nrg1-7A-HA* y *sok1Δ nrg1-7A-HA*. **A)** Localización de los posibles sitios de unión al factor de transcripción Brg1 (verde) y el represor Nrg1 (rojo). Las posiciones de las parejas de cebadores para el análisis del promotor se representan como A6 y A8. **B, C)** Células de las cepas *nrg1-7A-HA* (JC1359) y *sok1Δ nrg1-7A-HA* (JC2001) se recogieron a 0 y 30 min tras la inducción hifal y se procesaron para realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con el fin de determinar la unión de Nrg1 a -0,6 kb y -0,2 kb del ATG iniciador del gen *ALS3*. Los datos de cada tiempo se normalizaron con la señal del control de carga (input). Las gráficas representan el enriquecimiento relativo al control negativo sin anticuerpo. Las gráficas incluyen la media \pm SEM procedente de 2 experimentos independientes. La línea roja punteada marca el nivel de enriquecimiento obtenido en el promotor de *CDC12*, gen no regulado por Nrg1 y marca el valor 1.

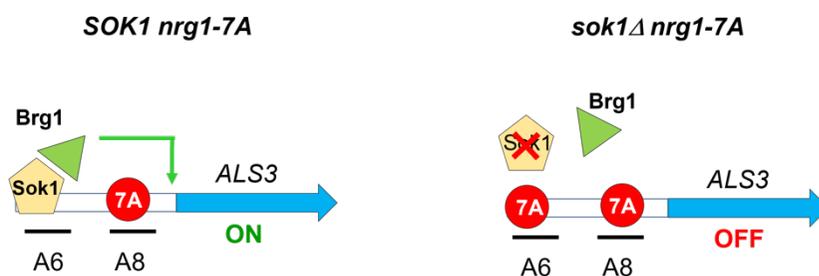


Figura 30. Modelos sobre la interacción entre la delección de *SOK1* y la mutación *nrg1-7A*.

11. Sok1 es necesario para el reclutamiento de Brg1 a los promotores al inicio del crecimiento hifal.

Los resultados del apartado anterior sugieren que Sok1 podría ser necesario para la unión de Brg1 a los promotores de los HSG. Para profundizar en esta idea, se etiquetó Brg1 con el epítipo myc en su extremo carboxi-terminal en un fondo silvestre (JC2895 *BRG1-myc*) y *sok1Δ* (JC2942: *sok1Δ BRG1-myc*). Una vez construidas las cepas, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpos anti-myc para analizar el enriquecimiento obtenido en los promotores de *ALS3* y *HWP1*.

Para ello, la cromatina inmunoprecipitada de células en las que se había inducido el crecimiento hifal (t30 min) se utilizó como molde con los pares de cebadores A6 (*ALS3*) y H3 (*HWP1*) que hibridan a 0,6 kb y 1,3 kb del ATG iniciador de los respectivos promotores. Estos estudios de ChIP pusieron en evidencia que, mientras Brg1 estaba presente en ambos promotores de células silvestres, no se detectó enriquecimiento alguno en la cepa deficiente en Sok1 (**Figura 31A-B**). Este resultado podría ser consecuencia de que en la cepa *sok1Δ* no se expresara Brg1 o que la proteína Sok1 fuera necesaria para la unión del factor de transcripción a los promotores. Para dilucidar entre estas dos opciones, se analizó, mediante *Western-blot*, los niveles de Brg1 presentes en los extractos de células *BRG1-myc* y *sok1Δ BRG1-myc* incubadas en ausencia o presencia de suero (t0 y t30 min). Como se muestra en la **Figura 31C**, no se observaron diferencias entre ambas cepas en los niveles de la proteína Brg1. Por tanto, en conjunto, los resultados mostrados en este apartado indican que Sok1 es necesaria para que Brg1 pueda unirse a los promotores de los genes *ALS3* y *HWP1*.

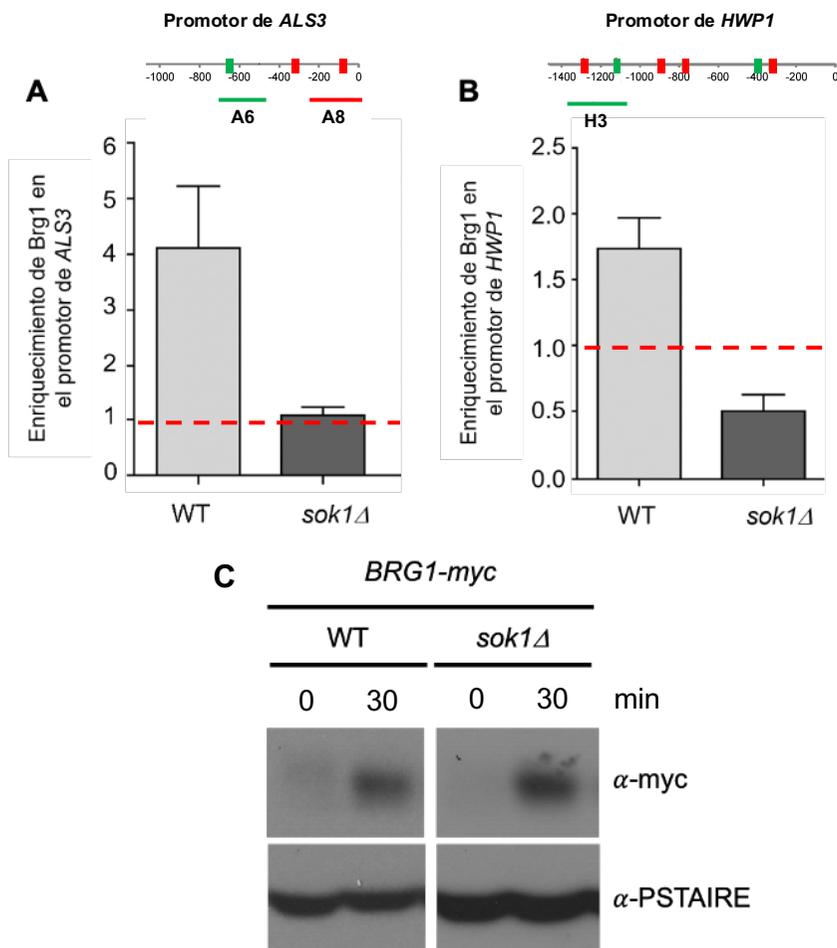


Figura 31. Sok1 es necesaria para la unión de Brg1 a los promotores de HSGs al inicio del crecimiento hifal. Células de las cepas silvestre *BRG1-myc* (JC2895) y *sok1Δ BRG1-myc* (JC2942) se recogieron tras 30 min en condiciones de crecimiento hifal y se procesaron para realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con el fin de determinar la unión de Brg1 a los promotores de *ALS3* (A) y *HWP1* (B) con los pares de primers A6 y H3 que hibridan a -0,6 kb y -1,3 kb de los respectivos promotores. Los datos de cada tiempo se normalizaron con la señal del control de carga (input). Las gráficas representan el enriquecimiento relativo al control negativo sin anticuerpo. Las gráficas incluyen la media \pm SEM procedente de 2 experimentos independientes. El valor 1 representa el nivel de enriquecimiento obtenido en el promotor de *CDC12*, gen no regulado por Brg1. C) Niveles de la proteína Brg1 a t0 y t30 min tras la inducción hifal de las cepas del experimento mostrado en A-B. La tinción con Coomassie se utilizó como control de carga

12. Nrg1-7A se disocia del promotor de *BRG1* de forma independiente de Sok1 en respuesta a suero

Una vez que Nrg1 ha sido degradado en respuesta a suero, Brg1 se une a su propio promotor y retroalimenta positivamente su expresión [40], [53]. Estudios de ChIP, en los

que se analizaron unas 7 kb del promotor de *BRG1*, han puesto de manifiesto que Nrg1 y Brg1 se unen a la misma región del promotor (par de cebadores B6, **Figura 32**). La competencia de ambas proteínas por el DNA del promotor de *BRG1* podría ser la causa por la cual Brg1 no puede unirse a su promotor cuando se expresa ectópicamente en levaduras ya que Nrg1 ocupa el sitio [53]).

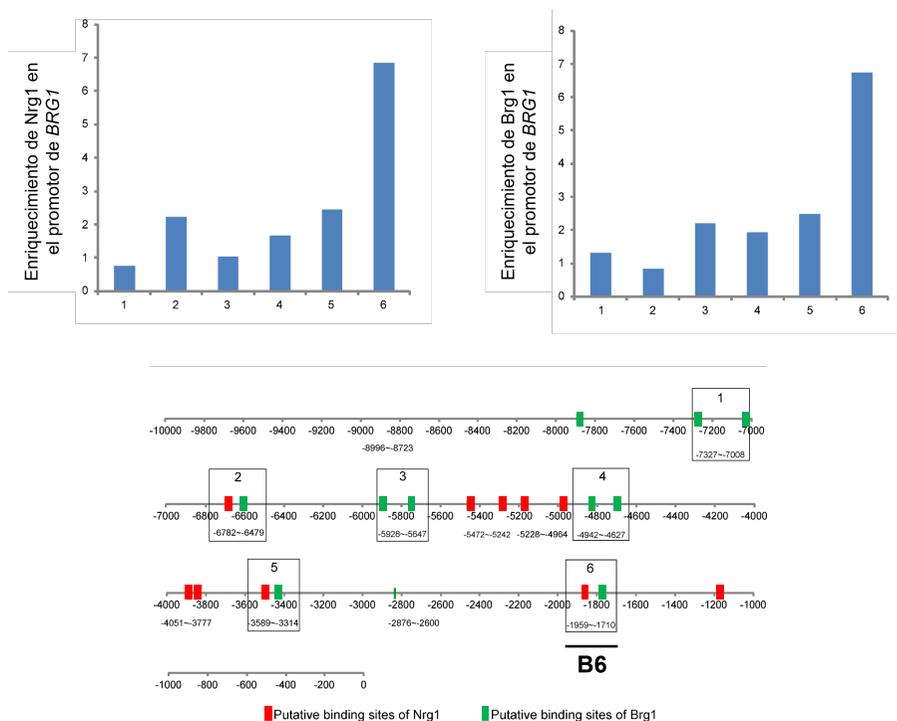


Figura 32. Nrg1 y Brg1 se unen a la misma región del promotor de *BRG1*. Enriquecimiento de Nrg1 y Brg1 en diferentes regiones del promotor de *BRG1*. Células silvestres que expresan Nrg1-Myc o Brg1-Myc crecidas, respectivamente, en YPD a 25°C o YPD+10 nM de rapamicina a 37°C durante 6h se utilizaron para ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Como control se utilizó la cepa silvestre SC5314 sin marcar. Las gráficas representan los enriquecimientos obtenidos sobre la muestra no marcada. La figura inferior representa 10 kb de la región promotora de *BRG1* y la localización de posibles sitios de unión de Brg1 (rojo) y Nrg1 (verde). Las cajas 1-6 representan la posición de los pares de cebadores utilizados. En nuestros estudios, hemos utilizado el par B6. Tomado de [53].

Por tanto, si Brg1 y Nrg1 compiten por unirse al promotor de *BRG1* y nuestros datos indican que la proteína Nrg1-7A no se disocia de los promotores de *ALS3* y *ECE1* en respuesta a suero (**Figura 18**), parece contradictorio que se active la transcripción de los HSGs en el mutante *nrg1-7A*. Para resolver esta paradoja, determinamos la unión de Nrg1 y Brg1 al promotor de *BRG1* a t0 y t 30 min después de inducir el crecimiento hifal.

Inicialmente, realizamos experimentos de ChIP en los que se analizaron mediante qPCR los niveles de enriquecimiento de Nrg1-7A en esta zona B6 del promotor de *BRG1* en las cepas *nrg1-7A-HA* (JC1359) y *sok1Δ nrg1-7A* (JC2001). Estos estudios mostraron un enriquecimiento muy significativo (x6) de Nrg1 en las levaduras del mutante *nrg1-7A-HA* (**Figura 33**). Sin embargo, contrariamente a lo observado en los promotores de *ALS3* y *ECE1*, la adición de suero indujo la disociación de Nrg1-7A del promotor. Esta pérdida de unión al DNA es independiente de Sok1 ya que también se observó en células deficientes en Sok1 (**Figura 33**). Por tanto, a diferencia de lo que ocurre en los promotores de *ALS3* y *ECE1*, estos resultados indican claramente que la disociación de Nrg1 del promotor de *BRG1* es independiente de los sitios S/TP y Sok1. En resumen, todas estas observaciones sugieren mecanismos de disociación de Nrg1 diferentes en los promotores de los HSGs y *BRG1*.

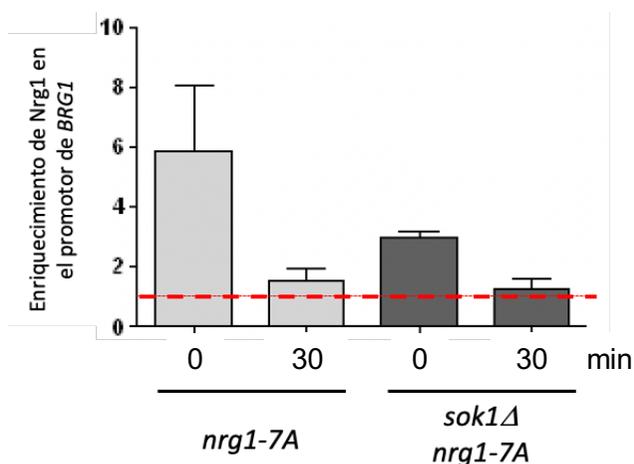


Figura 33. Nrg1-7A se disocia del promotor de BRG1 de forma independiente de Sok1. Células de las cepas *nrg1-7A-HA* (JC1359) y *sok1Δ nrg1-7A-HA* (JC2001) se recogieron a 0 y 30 min tras la inducción hifal y se procesaron para realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con el par de cebadores B6 (-1959/-1710) para determinar la unión de Nrg1 al promotor del gen *BRG1*. Los datos de cada tiempo se normalizaron con la señal del control de carga (input). Las gráficas representan el enriquecimiento relativo al control negativo sin anticuerpo. Las gráficas incluyen la media \pm SEM procedente de 2 experimentos independientes. La línea roja punteada marca el nivel de enriquecimiento obtenido en el promotor de *CDC12*, gen no regulado por Nrg1.

A continuación, se realizaron experimentos similares para estudiar la unión de Brg1 a su propio promotor a los 30 min de inducción del crecimiento hifal con las cepas *BRG1-myc* (JC2895), *nrg1-7A-HA BRG1-myc* (JC2896), *sok1Δ BRG1-myc* (JC2942) y *sok1Δ nrg1-7A-HA BRG1-myc* (JC2897). Como se muestra en la **Figura 34**, la unión de Brg1 a su propio

promotor depende de Sok1 ya que no se detectó enriquecimiento de la proteína en los promotores correspondientes a las cepas *sok1Δ* y *sok1Δ nrg1-7A*.

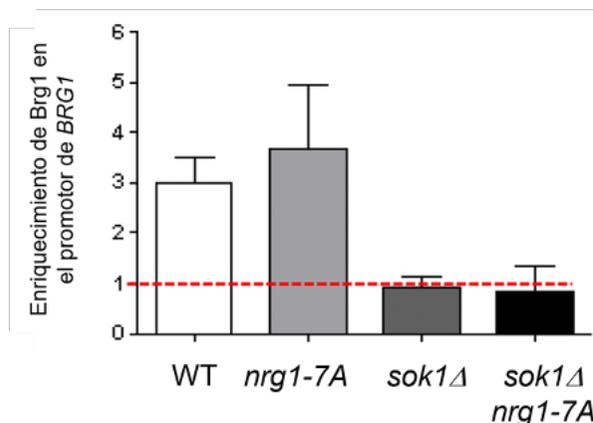


Figura 34. Sok1 es necesaria para la unión de Brg1 al promotor de BRG1 al inicio del crecimiento hifal. Células de las cepas silvestre *BRG1-myc* (JC2895), *BRG1-myc nrg1-7A-HA* (JC2896), *sok1Δ BRG1-myc* (JC2942) y *sok1Δ nrg1-7A-HA BRG1-myc* (JC2897) se recogieron tras 30 min en condiciones de crecimiento hifal y se procesaron para realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con el fin de determinar la unión de Brg1 a su propio promotor con el par B6 que hibrida a -1,9 kb antes del ATG iniciador. Los datos de cada tiempo se normalizaron con la señal del control de carga (input). Las gráficas representan el enriquecimiento relativo al control negativo sin anticuerpo. Las gráficas incluyen la media \pm SEM procedente de 2 experimentos independientes. El valor 1 representa el nivel de enriquecimiento obtenido en el promotor de *CDC12*, gen no regulado por Brg1.

En resumen, los resultados mostrados en este apartado demuestran que el represor fosfodeficiente no interfiere en la accesibilidad de Brg1 a su propio promotor ya que se produce una rápida expulsión de Nrg1-7A a los 30 minutos de inducir la miceliación, pero la falta de Sok1 provoca que Brg1 no pueda interactuar de forma adecuada con su propio promotor a pesar de estar libre su sitio de unión.

13. Estudio de la localización subcelular de Sok1 en levaduras

La caracterización de los fenotipos asociados a la pérdida de Sok1 sugieren que la proteína se encuentra localizada en el núcleo. Por tanto, dado que nada se sabía sobre su localización subcelular, se construyó la cepa *SOK1-GFP HHF1-cherry* (JC2593) que expresaba niveles fisiológicos de una proteína Sok1-GFP funcional y la histona Hhf1-cherry como marcador nuclear. La observación de un cultivo de dicha cepa crecido en YPD a 28°C reveló que Sok1 se localizaba tanto en el núcleo como en el citoplasma de las levaduras en crecimiento exponencial (**Figura 35A**). Tras comprobar su presencia nuclear,

nos propusimos identificar la secuencia de localización nuclear (NLS) de esta proteína de 815 aa para, posteriormente, generar un alelo mutante de *SOK1* que fuera incapaz de acumular la proteína en el núcleo debido a la inactivación de la NLS. Este alelo sería una herramienta muy poderosa para determinar si las funciones de *SOK1* en el inicio de la respuesta a suero están relacionadas con su presencia en el núcleo.

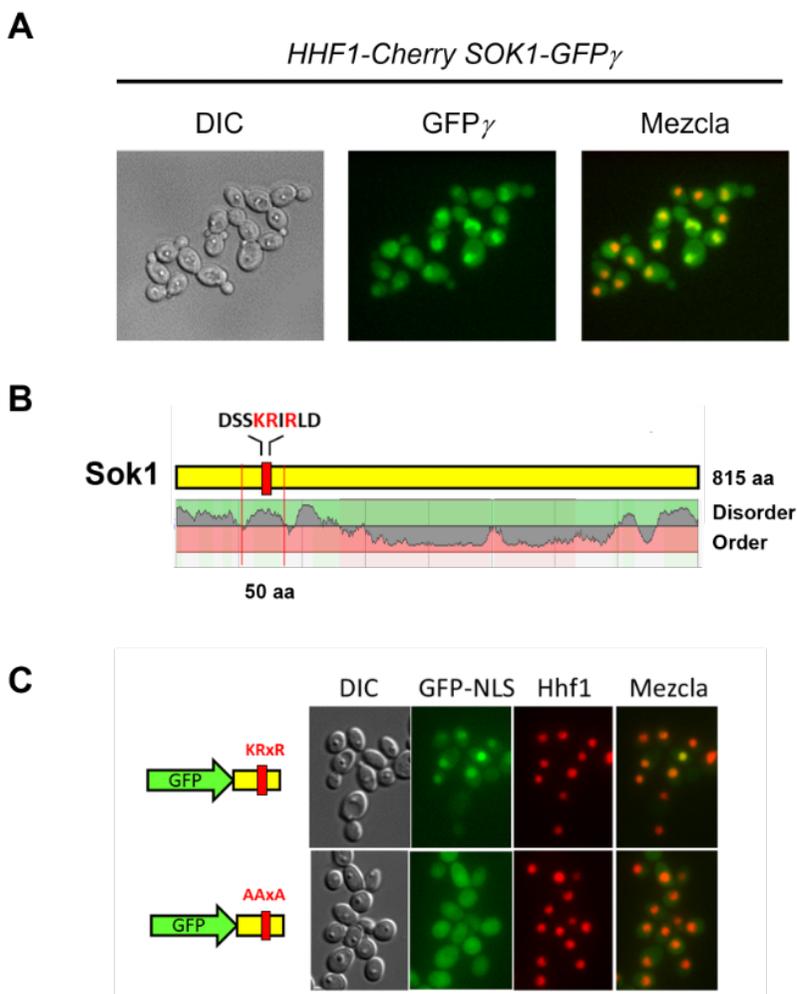


Figura 35. Localización de Sok1 en levaduras. **A)** Visualización de la proteína Sok1-GFP mediante microscopía de fluorescencia de células levaduriformes en crecimiento exponencial de la cepa *SOK1-GFP HHF1-Cherry* (JC2593). **B)** Representación de la proteína Sok1 (815 aa) y la secuencia ¹⁴²DSSKRIRLD¹⁵⁰ identificada como supuesta NLS mediante el algoritmo *cNLS Mapper* (<http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/>) que se encuentra en una región desordenada del extremo N-terminal. En rojo, los aminoácidos básicos supuestamente importantes para interaccionar con la importina. **C)** Caracterización de la Secuencia de Localización Nuclear (NLS) de Sok1. La secuencia ¹⁴²DSSKRIRLD¹⁵⁰ de Sok1 se comporta como una NLS. Células de las cepas *pMAL2-GFP-NLS^{SOK1}* (JC2487) y *pMAL2-GFP-NLS -3A^{SOK1}* (JC2491) crecidas en YPM se analizaron mediante microscopía de fluorescencia para observar la localización de las quimeras formadas por la secuencia de 50 aa de la NLS silvestre y mutante fusionadas al extremo C-terminal de la GFP.

Para ello, utilizamos el algoritmo *cNLS Mapper* (disponible en <http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/>) que identificó a la secuencia ¹⁴²DSSKRIRLD¹⁵⁰, con un valor de 4.2, como una posible secuencia NLS monopartita localizada en una región desorganizada del extremo N-terminal de Sok1 (**Figura 35B**). Según el servidor, secuencias NLS con valores entre 3 y 5 son propias de proteínas con localización nuclear y citoplasmática. Una vez identificada, procedimos a demostrar si esta secuencia se comportaba realmente como una NLS. Si tuviera capacidad de interactuar con las importinas debería reunir dos requisitos. Primero, localizar en el núcleo una proteína citoplasmática y segundo, dicha localización tendría que ser dependiente de los aminoácidos básicos presentes en la secuencia NLS, que son los responsables de interactuar con las importinas que las transportan del citoplasma al núcleo.

Para analizar la funcionalidad de esta secuencia, se construyeron los plásmidos pMAL2-GFP-NLS^{SOK1} y pMAL2-GFP-NLS-3A^{SOK1} en los que fragmentos de 50 aa de Sok1 (¹¹⁰GLAAA...NPIL¹⁶⁰), portador de la NLS silvestre o la forma mutada (NLS-3A, ¹⁴²DSSAAIALD¹⁵⁰) en la que los tres aminoácidos básicos se sustituyeron por alanina, se fusionaron al extremo carboxilo de la GFP (**Figura 35C**). A partir de estos plásmidos, se obtuvieron los casetes de transformación que se integraron en el locus *NEUT5L* en un fondo *HHF1-Cherry* para dar lugar a las cepas JC2487 (*NEUT5L::HIS1-pMAL2-GFP-NLS^{SOK1} HHF1-cherry*) y JC2491 (*NEUT5L::HIS1-pMAL2-GFP-NLS-3A^{SOK1} HHF1-cherry*). Construidas las cepas, estas se crecieron en medio con maltosa (YPM) durante 8 horas, para inducir la expresión de las quimeras de GFP, y se observaron al microscopio de fluorescencia con el fin de analizar la distribución subcelular de la GFP. Este análisis mostró que la secuencia ¹⁴²DSSKRIRLD¹⁵⁰ era capaz de concentrar a la GFP en el núcleo de forma dependiente de los tres aminoácidos básicos presentes en ella (**Figura 35C**). Por tanto, la secuencia ¹⁴²DSSKRIRLD¹⁵⁰ identificada por el algoritmo tiene actividad NLS y puede ser la responsable de la acumulación de Sok1 en el núcleo.

Finalmente, identificada dicha secuencia, diseñamos una estrategia para construir una cepa que expresara niveles fisiológicos de Sok1 con la NLS mutada para averiguar si la expresión de la forma citoplasmática de Sok1 mostraba los mismos fenotipos que las células *sok1Δ*. Tras construir los plásmidos adecuados, fuimos incapaces de obtener los transformantes con la NLS mutada. Por tanto, la construcción de este alelo *sok1-NLS-3A-GFP* ha quedado pendiente para estudios posteriores.

14. Sok1 es excluido del núcleo al inicio del crecimiento hifal.

Con el fin de conocer si la proteína Sok1 sufría cambios en su localización subcelular al inicio del crecimiento hifal, un cultivo de la cepa *SOK1-GFP HHF1-cherry* (JC2593) se incubó a 37°C en presencia de 10% de suero y se tomaron muestras a t0, t30 y t60 min para su observación en un microscopio de fluorescencia. Este experimento reveló que a t30 la señal nuclear de Sok1 era más débil que en ausencia de suero, mientras que a t60 la totalidad de las células mostraba una señal citoplasmática difusa (**Figura 36**). Por tanto, estos resultados indican Sok1 es excluida del núcleo en respuesta a suero, aunque con una cinética más lenta que Nrg1 (**Figura 10**).

Esta exportación nuclear no se correlacionó con una degradación de la proteína como ocurría con Nrg1 ya que los niveles de Sok1 no disminuyeron en respuesta a suero, aunque se observó la aparición de una banda de menor movilidad electroforética a partir de los 60 min (**Figura 37**).

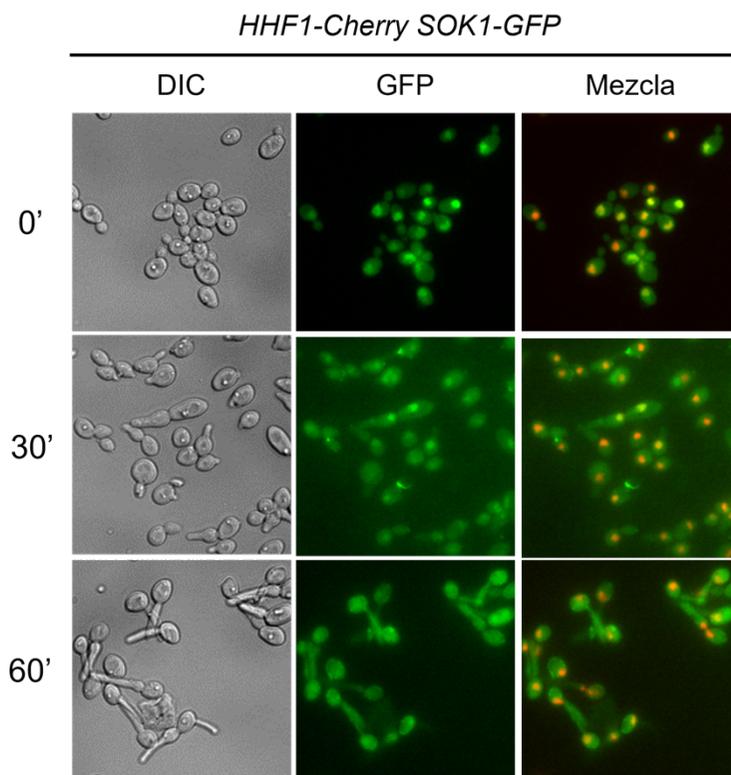


Figura 36. Dinámica de exclusión nuclear de Sok1 durante la respuesta a suero. Células de la cepa silvestre *SOK1-GFP HHF1-Cherry* (JC2593) se incubaron en YPD + 10% de suero a 37°C y se recogieron muestras a los tiempos indicados para su observación al microscopio de fluorescencia.

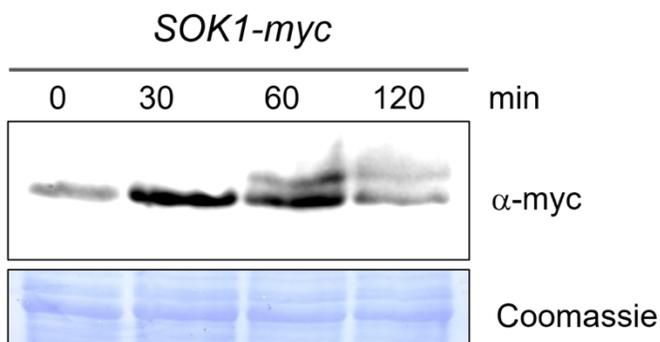


Figura 37. Estudio de la dinámica de Sok1 en la transición levadura-micelio. Células de la cepa silvestre *SOK1-myc* (JC2802) se incubaron en YPD + 10% de suero a 37°C y se recogieron muestras a los tiempos indicados para obtener extractos mediante TCA. Posteriormente, se analizaron los niveles de Sok1 mediante *Western-blot* con anticuerpos anti-myc. Se utilizó como control de carga la tinción con Coomassie.

La exclusión nuclear de Sok1 únicamente tiene lugar únicamente durante el inicio de la respuesta a suero puesto que, a tiempos más largos (3h), durante el mantenimiento del crecimiento hifal en el que existen varios compartimentos subcelulares, volvimos a detectar Sok1 en todos los núcleos de la hifa. (**Figura 38**).

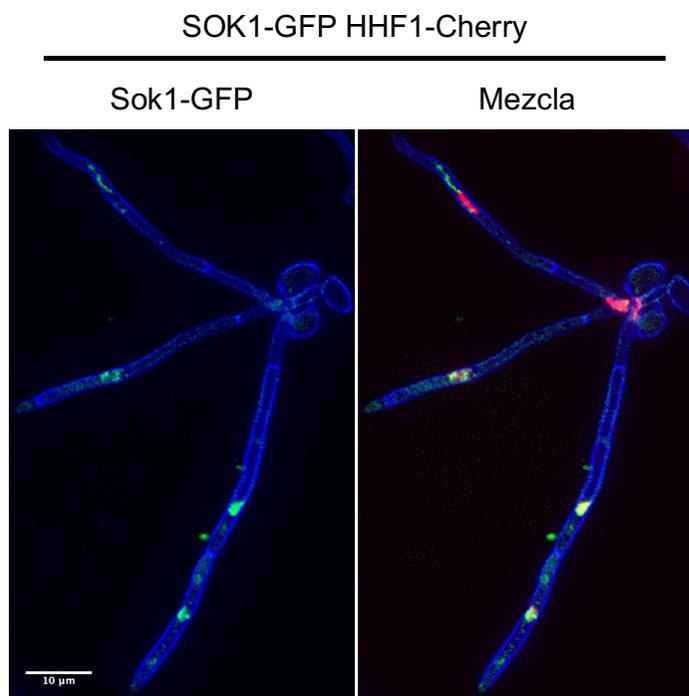


Figura 38. Localización de Sok1 durante el mantenimiento del crecimiento hifal. Células de la cepa silvestre *SOK1-GFP HHF1-Cherry* (JC2593) se incubaron en YPD + 10% de suero a 37°C durante 3 horas antes de su observación al microscopio de fluorescencia.

15. Sok1 se une al promotor de *BRG1* y *ALS3* en las mismas regiones que Brg1.

Puesto que Brg1 es un factor de transcripción y nuestros resultados indicaban que existía una conexión entre Sok1 y Brg1, nos plantemos estudiar si Sok1 se encontraba asociada a la cromatina en lugares ocupados por Brg1 en los promotores. Como primera aproximación, estudiamos su posible interacción con el promotor de *BRG1*. Para ello, se tomaron muestras para ChIP de un cultivo de la cepa *SOK1-myc* (JC2802) a t0, t30 y t60 después de añadir suero a 37°C. La cromatina obtenida se utilizó para analizar los niveles de enriquecimiento de Sok1 en la región B6 del promotor de *BRG1* (**Figura 39**). Estos experimentos mostraron que Sok1 se encontraba unido al promotor de *BRG1* en levaduras (t0). Sin embargo, la adición de suero produjo una pérdida progresiva de la proteína unida a la cromatina, siendo indetectable a los 60 min. Esta cinética de disociación de Sok1 del promotor de *BRG1* es similar a la de exclusión nuclear de Sok1 mostrada en la **Figura 36**.

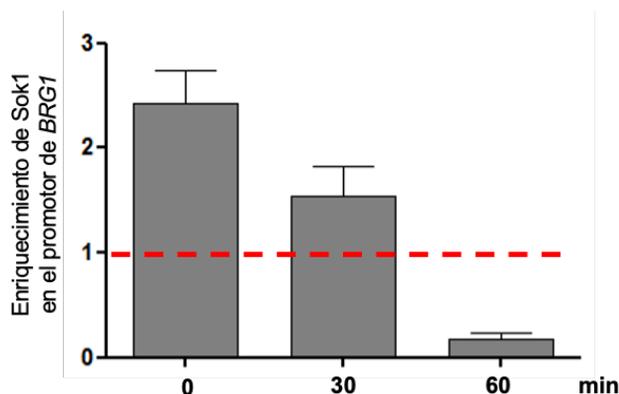


Figura 39. La proteína Sok1 se encuentra unida al promotor de *BRG1* en levaduras. Enriquecimiento de Sok1 en el promotor de *BRG1* durante el inicio del crecimiento hifal. Células de la cepa silvestre *SOK1-myc* (JC2802) se incubaron en YPD + 10% de suero a 37°C y se recogieron muestras a t0, t30 y t60 min para realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con el fin de determinar la unión de Sok1 al promotor de *BRG1* con el par de cebadores B6, que hibrida a -1,9 kb antes del ATG iniciador. Los datos de cada tiempo se normalizaron con la señal del control de carga (input). Las gráficas representan el enriquecimiento relativo al control negativo sin anticuerpo. Las gráficas incluyen la media \pm SEM procedente de 2 experimentos independientes. El valor 1 representa el nivel de enriquecimiento obtenido en el promotor de *CDC12*.

Posteriormente, a partir de las mismas muestras de cromatina, se estudió la interacción de Sok1 con el promotor de *ALS3* con los cebadores A6 y A8, que amplifican regiones de enriquecimiento de Brg1 y Nrg1 respectivamente (**Figura 29**, [53]). Una vez realizadas las qPCR con los cebadores A6 y A8, el análisis de los datos puso de manifiesto que Sok1 no estaba presente en ninguna de las dos regiones del promotor de *ALS3*

durante el crecimiento levaduriforme ya que los valores obtenidos a t_0 en ambos casos fue 1 (**Figura 40**). Sin embargo, a los 30 min de la adición de suero se obtuvieron valores que indicaban asociación de Sok1 al promotor de *ALS3* en la región A6, sitio de unión de Brg1, pero no en la A8 donde se localiza Nrg1 (**Figura 40A-B**), asociación eso sí transitoria dado que desapareció en la muestra t_{60} (**Figura 40A**). En este análisis, como control adicional de interacciones inespecíficas, se determinó el nivel de enriquecimiento de Sok1 sobre el promotor de *CDC3* y se normalizó respecto al control interno *CDC12*. Este control en todas las muestras de cromatina debería ser igual a 1 dado que Brg1 no está implicado en regular a *CDC3*, por lo que Sok1 tampoco debería estar presente en el promotor de este gen. Efectivamente como se muestra en la **Figura 40C**, se obtuvo un valor de 1 en las tres muestras de cromatina, lo cual validaba como enriquecimiento específico a todo valor que se obtuviera por encima de 1.

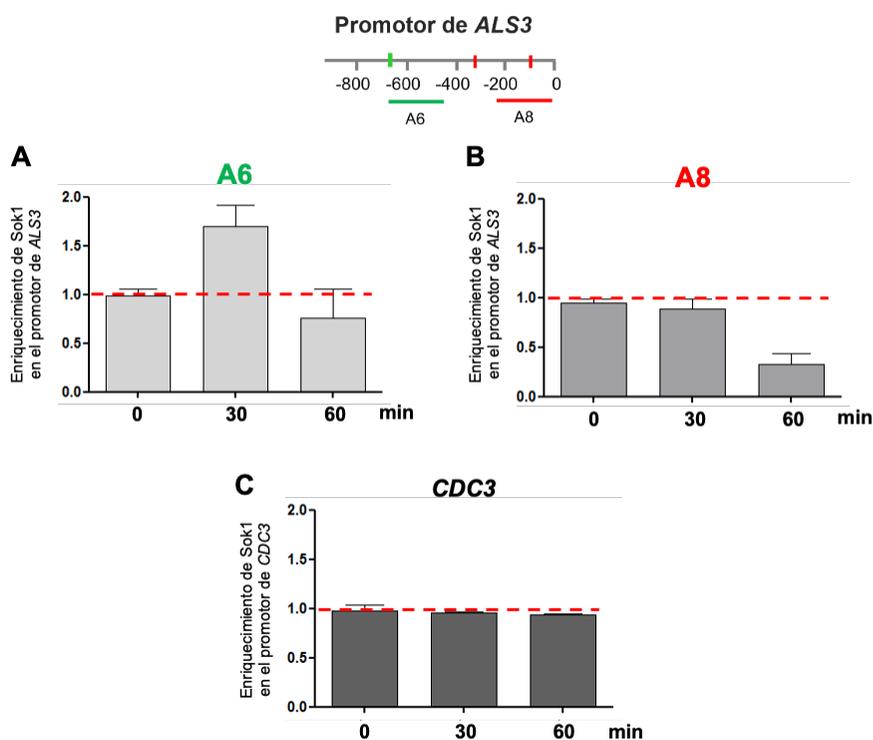


Figura 40. Sok1 se recluta a la región de unión de Brg1 en el promotor de *ALS3* durante el inicio del crecimiento hifal. Células de la cepa *SOK1-myc* (JC2802) se incubaron en YPD + 10% de suero a 37°C y se recogieron a los tiempos indicados para realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con el fin de determinar la unión de Sok1 al promotor de *ALS3* (**A y B**). Como control adicional del experimento, se determinó el nivel de enriquecimiento de Sok1 en el promotor de *CDC3* (**C**). Las gráficas representan el enriquecimiento relativo al control negativo sin anticuerpo. Las gráficas incluyen la media \pm SEM procedente de 2 experimentos independientes. El valor 1 representa el nivel de enriquecimiento obtenido en el promotor de *CDC12*.

En resumen, estos resultados nos muestran que Sok1 es capaz de asociarse a la cromatina de dos HSGs, aunque con diferentes dinámicas temporales. En las levaduras, la proteína Sok1 se encuentra asociado al promotor de *BRG1*, pero no al de *ALS3*, mientras que al inicio del crecimiento hifal, Sok1 se disocia del promotor de *BRG1* y se une, de forma transitoria, en la región del promotor de *ALS3* que ocupa Brg1.

16. Sok1 es necesaria para regular los niveles de la proteína Brg1 al inicio del crecimiento hifal.

Teniendo en cuenta que Brg1 retroalimenta su propia transcripción al inicio del crecimiento hifal [40], [53] y que la ausencia de Sok1 impide la unión de Brg1 a su propio promotor (**Figura 34**), la expresión de *BRG1* debería encontrarse afectada en células deficientes en Sok1. Para comprobar esta hipótesis, se analizaron los niveles de mRNA de *BRG1* en las cepas *BRG1-myc* (JC2895), *nrg1-7A BRG1-myc* (JC2896), *sok1Δ BRG1-myc* (JC2942) y *sok1Δ nrg1-7A BRG1-myc* (JC2897) a t30 y t60 min después de exponerlas a la presencia de un 10% de suero y 37°C. Sorprendentemente, no se observaron diferencias en los niveles del RNA mensajero de *BRG1* en las cuatro cepas analizadas (**Figura 41A**). Por tanto, estos resultados indican que las mutaciones *nrg1-7A* y *sok1Δ* no afectan la transcripción de *BRG1*, por lo que cabría esperar que los niveles de proteína Brg1 fueran similares en estas cepas.

Sin embargo, los *Westen-blots* de extractos celulares de estas cuatro cepas tras la inducción del tubo germinativo revelaron resultados no esperados (**Figura 41B**). En la cepa silvestre se detectó una rápida acumulación de la proteína Brg1 a los 30 min de inducción que desapareció a t60. En los mutantes sencillos *nrg1-7A* y *sok1Δ*, se alcanzaron niveles de proteína similar al silvestre a los 30 min. Sin embargo, mientras que las células *nrg1-7A* fueron capaces de degradar Brg1 con una cinética silvestre, las células deficientes en Sok1 mostraron un retraso en su degradación. En contraposición a lo esperado, el doble mutante *sok1Δ nrg1-7A* mostró un incremento considerable en los niveles de Brg1 a partir de t30 que se mantuvo estable durante las 2h del experimento. Puesto que este incremento en los niveles de proteína no se debía a una mayor transcripción de *BRG1* (**Figura 41A**), estos resultados sugieren que la proteína Brg1 es más estable en el doble mutante en presencia de suero.

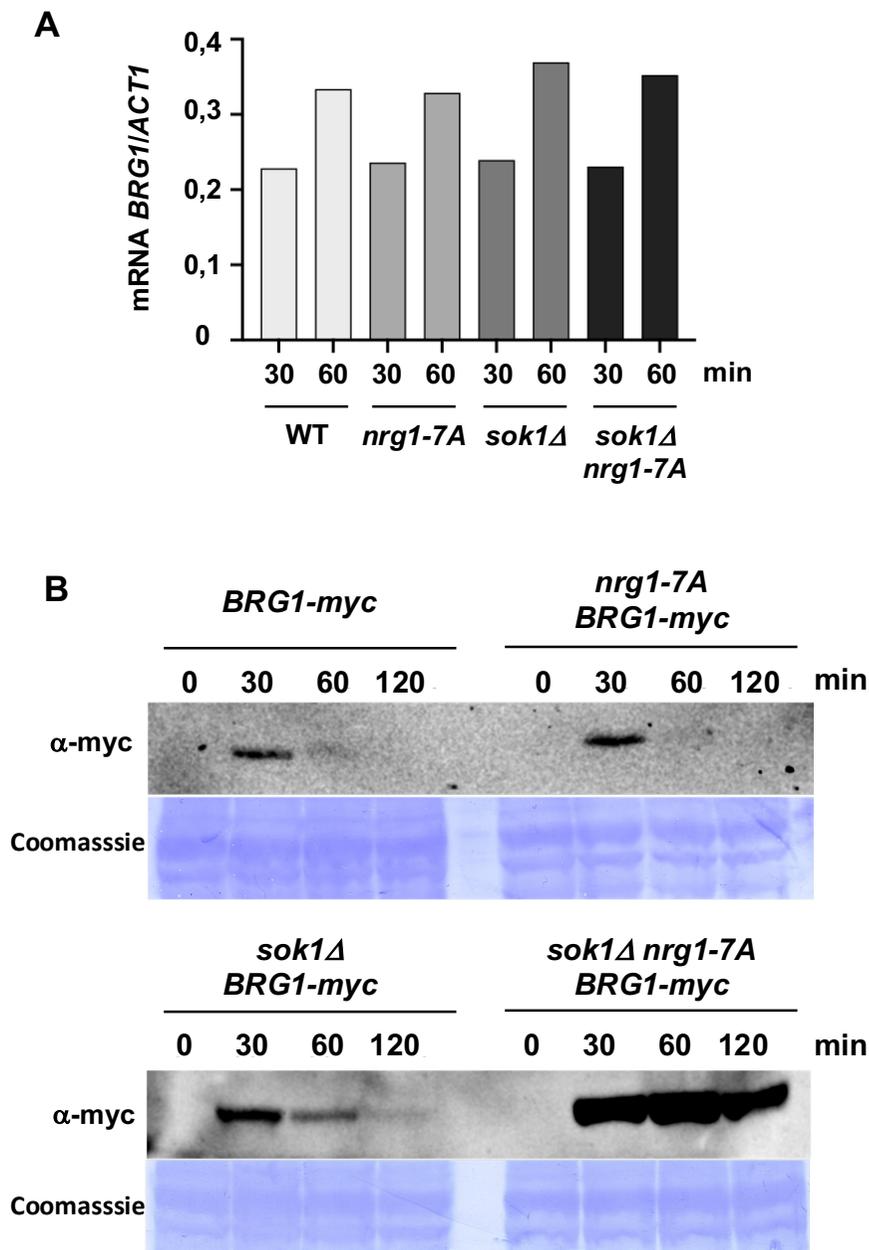


Figura 41. Niveles de la proteína Brg1 durante el inicio del crecimiento hifal. A) Las mutaciones *nrg1-7A* y *sok1Δ* no afectan la transcripción de *BRG1* al inicio del crecimiento hifal. Células de las cepas *BRG1-myc* (JC2895), *nrg1-7A BRG1-myc* (JC2896), *sok1Δ BRG1-myc* (JC2942) y *sok1Δ nrg1-7A BRG1-myc* (JC2897) se recogieron a los tiempos indicados tras incubarlas en condiciones de crecimiento hifal y se procesaron para extraer mRNAs y determinar los niveles del transcrito de *BRG1* mediante RT-qPCR. Las gráficas representan los valores obtenidos normalizados respecto a los niveles del mRNA de *ACT1*. **B)** Niveles de la proteína Brg1-myc presentes en extractos celulares de las mismas cepas utilizadas en A) a los tiempos indicados tras la incubación en 10% suero a 37°C. La tinción con Coomassie se utilizó como control de carga.

17. Sok1 es necesaria para la exportación nuclear de Brg1 y Nrg1 al inicio del crecimiento hifal.

El patrón de acumulación de los niveles de Brg1 de la cepa silvestre mostrado en el apartado anterior, sugiere que la proteína es degradada tras iniciar el programa de transcripción hifal. Si Brg1 fuera exportada al citoplasma para su degradación, como hemos demostrado con Nrg1, los altos niveles de proteína detectada en *nrg1-7A sok1Δ* podría ser consecuencia de una deficiente exclusión nuclear en respuesta a suero.

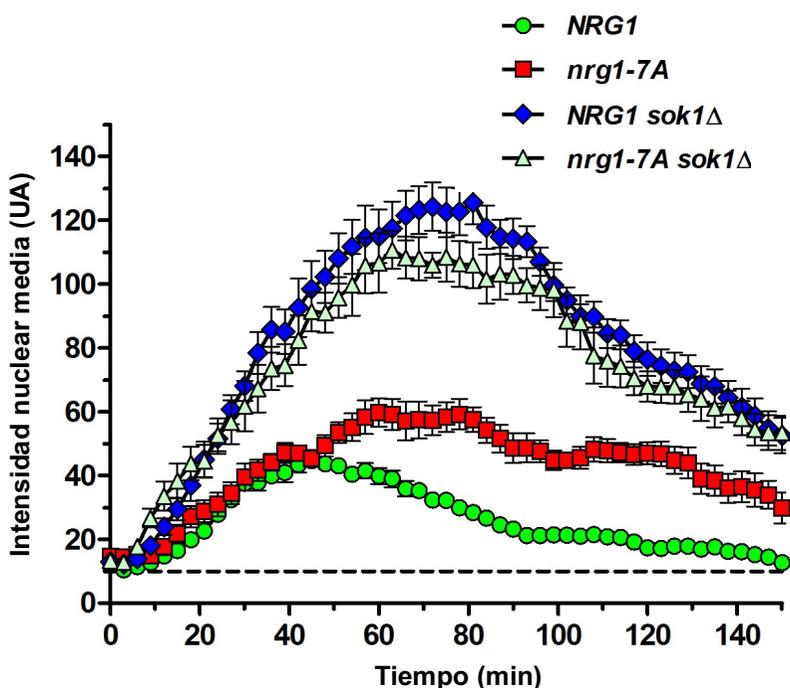


Figura 42. Análisis mediante microscopía de fluorescencia de la señal nuclear de Brg1 en respuesta a suero de las cepas indicadas. Para la cuantificación de la señal Brg1-GFP, cultivos de las cepas *BRG1-GFP* (JC2900), *nrg1-7A BRG1-GFP* (JC2917), *sok1Δ BRG1-GFP* (JC2903) y *nrg1-7A sok1Δ BRG1-GFP* (JC2931) se incubaron a 37°C suplementado con 10% de suero y se tomaron imágenes a intervalos de 3 min durante 2,5h. Cada imagen de fluorescencia corresponde a una proyección máxima de 2 planos adquiridos cada 0,5 μm. Las gráficas representan la intensidad nuclear media ± SD de Brg1-GFP a lo largo del tiempo en condiciones de crecimiento hifal. Para cada punto se analizaron entre 10-20 células.

Para poder explorar esta idea, analizamos la dinámica de acumulación nuclear de Brg1-GFP en presencia de suero de las cepas silvestre *BRG1-GFP* (JC2900), *nrg1-7A BRG1-GFP* (JC2917), *sok1Δ BRG1-GFP* (JC2903) y *nrg1-7A sok1Δ BRG1-GFP* (JC2931). Para ello,

se tomaron imágenes de fluorescencia cada 3 minutos durante un periodo de 2.30h y se cuantificó la señal nuclear mediante ImageJ (**Figura 42**). En las células silvestres, el máximo de intensidad de Brg1 se alcanzó a los 30-40 min de iniciar la respuesta y disminuyó a niveles basales a las 2h. Sin embargo, en el doble mutante *nrg1-7A sok1Δ*, la dinámica de Brg1 se alteró significativamente, ya que la intensidad de su señal nuclear fue significativamente superior (x3) y persistió durante más tiempo en el núcleo que las cepas control. De la misma forma, este perfil fue muy similar en el mutante sencillo *sok1Δ*. Por tanto, estos resultados no explican las diferencias observadas en los niveles de proteína Brg1 detectados en los extractos de las cepas *sok1Δ* y *nrg1-7A sok1Δ BRG1* (**Figura 41**), ya que ambos mutantes mostraron similares cinéticas de exportación nuclear de Brg1, pero diferentes niveles de proteína en extractos totales. Sin embargo, el hecho que la falta de Sok1, ya sea en un fondo silvestre o *nrg1-7A*, incremente considerablemente la permanencia de Brg1 en el núcleo durante el inicio del crecimiento hifal sugiere que Sok1 participa en la exclusión nuclear de Brg1 en respuesta a suero.

Por último, nos preguntamos si Sok1 podría estar implicada en la exclusión nuclear de Nrg1 ya que los mutantes *sok1Δ* mostraban un retraso en la degradación del represor (**Figura 26**, t30). Para ello, se realizaron experimentos de time-lapse de células *SOK1 NRG1-GFP* (JC2611) y *sok1Δ NRG1-GFP* (JC2367) crecidas en condiciones de crecimiento hifal y se tomaron imágenes cada 3 min durante un periodo de 60 min (**Figura 43A**). Posteriormente, se cuantificó la intensidad de la fluorescencia en 96 células a lo largo del tiempo y se representó la intensidad media \pm SEM, como muestra la **Figura 43B**. Con el propósito de tener un dato cuantitativo relativo a la exportación de Nrg1 en ambas cepas, se determinó el tiempo requerido para reducir la señal nuclear inicial de Nrg1-GFP (t0) a la mitad. Para ello, se realizó una nueva gráfica en la que los valores obtenidos en la **Figura 43B** se normalizaban respecto a la intensidad a t0. Una vez representados los datos, determinamos el $t_{1/2}$ de Nrg1-GFP en la cepa silvestre y el mutante *sok1Δ*. Este análisis puso de manifiesto, un retraso muy significativo en la exclusión nuclear de Nrg1 en respuesta a suero en las células deficientes en Sok1, ya que mientras el control silvestre mostró un $t_{1/2}$ de 3.9 min, las células del mutante *sok1Δ* tenían un $t_{1/2}$ de 10 min (**Figura 43C**).

En resumen, los resultados mostrados en este apartado indican que la dinámica de la exclusión nuclear en respuesta a suero del represor Nrg1 y el factor de transcripción Brg1 se encuentra ralentizada en células deficientes en Sok1.

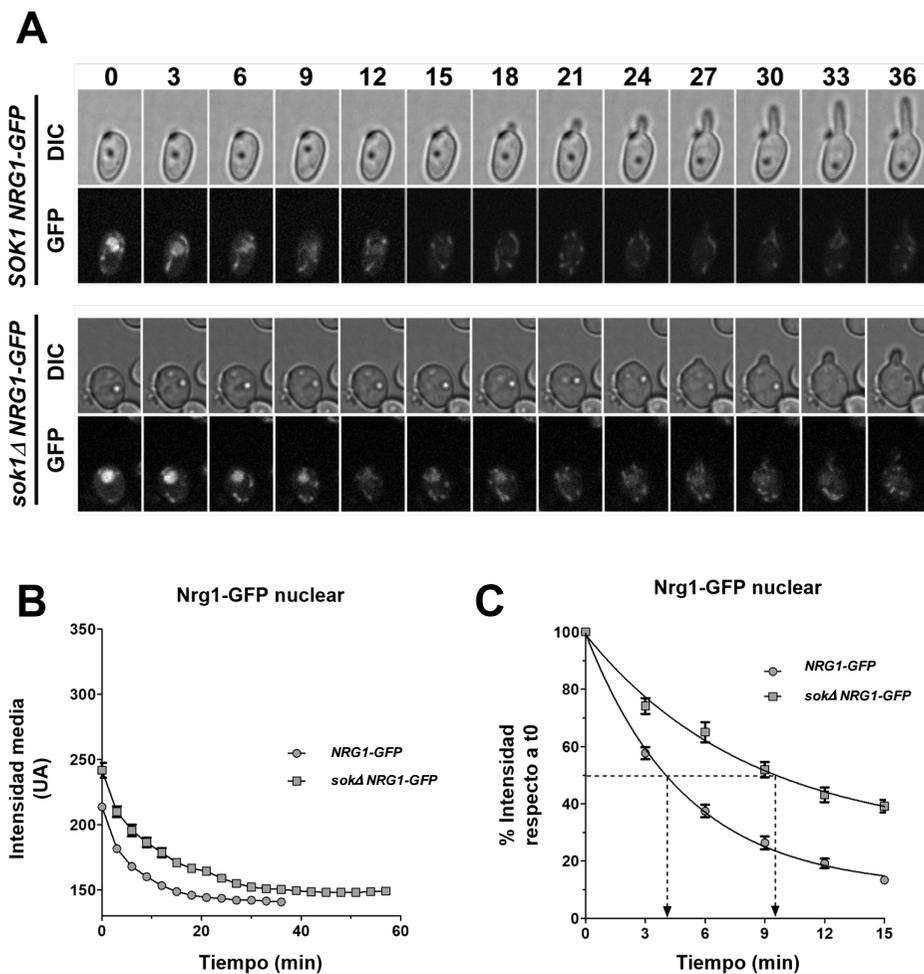


Figura 43. Análisis mediante microscopía de fluorescencia de la dinámica de exclusión nuclear de Nrg1 en respuesta a suero del mutante *sok1Δ*. **A)** Imágenes tomadas a intervalos de 3 min de células de la cepa silvestre *SOK1 NRG1-GFP* (JC2611) y *sok1Δ NRG1-GFP* (JC2367) después de la inducción hifal (37°C +10% FBS). Las imágenes de fluorescencia son la proyección máxima de 3 planos adquiridos cada 0,4 μm. **B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia nuclear de Nrg1 del experimento mostrado en A. Se muestra la intensidad media ± SD. n=96 células para cada cepa. UA: Unidades Arbitrarias. **C)** Determinación de $t_{1/2}$ de exclusión nuclear de Nrg1. La gráfica representa los valores de intensidad de cada punto referenciados al momento inicial (t_0). $t_{1/2}$ se define como el tiempo transcurrido para reducir la intensidad nuclear inicial de Nrg1-GFP a la mitad. WT $t_{1/2}$ = 3,93 min. *sok1Δ* $t_{1/2}$ = 10,01 min.

DISCUSIÓN

Una de las características fundamentales de la biología de *C. albicans* es su gran plasticidad morfológica que le permite realizar transiciones reversibles entre diferentes morfotipos, siendo la transición levadura-hifa la más estudiada por su importancia en la virulencia. En el morfotipo de levadura, el programa hifal se encuentra regulado negativamente mediante diferentes factores que se unen a los promotores de los genes específicos de hifas (HSGs) para reprimir su transcripción. Entre dichos factores, los represores Nrg1 y Tup1 desempeñan un papel fundamental ya que son los únicos factores descritos cuyos mutantes muestran un crecimiento hifal constitutivo en todas las condiciones ensayadas [36], [37], [39], [84], [85]. Por analogía con *S. cerevisiae*, se pensaba que ambas proteínas formaban un complejo proteico, donde Nrg1 sería responsable de atraer al represor general Tup1 a los promotores de los HSGs [36]. Sin embargo, recientemente se ha puesto de manifiesto que las funciones de ambas proteínas en la represión son independientes ya que mientras que el crecimiento hifal constitutivo del mutante *tup1Δ* depende de Efg1, tanto *in vitro* como *in vivo*, el fenotipo del mutante *nrg1Δ* es independiente de Efg1 [40]. Según estos autores, en el morfotipo de levadura, Tup1 reprimiría a Efg1 bloqueando así la regulación negativa que Efg1 ejerce sobre Nrg1. En respuesta a señales inductoras del programa hifal, Efg1 quedaría liberado de la acción de Tup1, activando así los mecanismos implicados en la inhibición de la actividad represora de Nrg1, lo que daría lugar a la activación del programa de transcripción hifal (**Figura 44**).

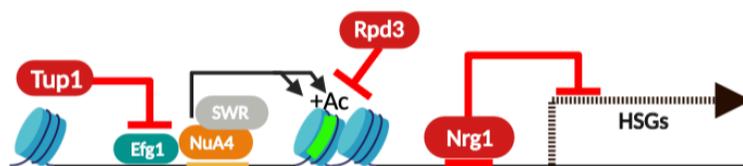


Figura 44. Nuevo modelo de actuación de las proteínas Tup1 y Nrg1. Imagen realizada en Biorender siguiendo el nuevo modelo propuesto por [40].

La inactivación de Nrg1 en respuesta a las señales inductoras se realiza mediante dos mecanismos complementarios que garantizan una rápida reducción de los niveles de Nrg1 durante el inicio del crecimiento hifal. Por un lado, se inhibe la transcripción de *NRG1* mediada por la ruta de AMPc-PKA [45] y por otra se induce la degradación de Nrg1 a

través de la proteína Sok1 y el eje NDR quinasa Cbk1-Ssd1 [49], [86]. Según los trabajos del grupo de la Dra. Haoping Liu, la eliminación de Nrg1 es fundamental para inducir los cambios de cromatina necesarios en los promotores de los HSGs que garantice el mantenimiento del programa hifal [44], [45], [49], [53], [54], [56], [57], [61], [66]. Por tanto, podemos conceptualizar el inicio del crecimiento hifal, donde se reducen los niveles de Nrg1, como una *ventana de oportunidad* para garantizar el mantenimiento en el tiempo del desarrollo hifal. Por tanto, la variabilidad morfológica observada *in vivo* en un determinado nicho del hospedador, donde encontramos los morfotipos de levaduras, pseudohifas e hifas, podría ser consecuencia de la variación del tiempo en que dicha ventana se encuentra operativa en cada célula [44].

El mantenimiento del crecimiento hifal requiere que el control de la expresión de los HSGs se realice a través del factor de transcripción Ume6, uno de los HSGs que se activan de forma dependiente de Brg1 [53]. Se ha descrito que los niveles de Ume6 determinan la duración del programa hifal, así como los morfotipos de pseudohifas e hifas [71], [74], [75]. *C. albicans* utiliza dos estrategias diferentes para mantener el crecimiento hifal en función de la concentración de O₂ y CO₂. En aerobiosis y limitación de nutrientes, se activa la ruta Brg1-Hda1 requerida para inducir los cambios de cromatina necesarios para activar la transcripción de los Hypha-Specific Genes (ej. *ALS3*, *HWP1*, *ECE1*, *UME6*, *HGC1*). Todos ellos tienen sitios de unión a Nrg1 y Brg1 [53]. La función de Brg1 en la elongación es garantizar la expresión de *UME6* ya que la expresión ectópica de *UME6* rescata los defectos de crecimiento hifal de los mutantes *brg1Δ* y *hda1Δ* [53]. En anaerobiosis e hipercarbia (5% CO₂), se activa una ruta dependiente del sensor de O₂ Ofd1 cuya finalidad es estabilizar los niveles de Ume6, ya que es una proteína inestable en presencia de O₂ [66], [87]. *In vitro*, la eliminación de cada ruta bloquea la elongación en respuesta a sus correspondientes señales inductoras. Sin embargo, es necesario eliminar ambas vías para afectar el crecimiento hifal y la virulencia de *C. albicans in vivo* [66], [87]. Estas observaciones sugieren que este hongo es capaz de detectar la escasez de nutrientes, la hipoxia y altas concentraciones de CO₂ a través de rutas paralelas que inducen el crecimiento hifal y la patogenicidad durante las infecciones sistémicas.

En esta memoria hemos profundizado en la regulación de Nrg1 al inicio del crecimiento hifal y hemos puesto de manifiesto que la proteína Sok1 y la fosforilación de Nrg1 en un grupo de sitios S/TP, agrupados en un dominio Prion-like (PrL) central de la

proteína (**Figura 45**), colaboran en la degradación de Nrg1. Además, los estudios de inmunoprecipitación de cromatina realizados con el mutante *nrg1-7A* han puesto de manifiesto que las células son capaces de activar el crecimiento hifal sin necesidad de disociar y degradar a Nrg1 de los promotores de los HSGs, desafiando el modelo actual que subraya la importancia de la desaparición del represor para generar la ventana de oportunidad necesaria para mantener el crecimiento hifal. Por último, hemos identificado a Sok1 como un nuevo componente del eje Brg1-Hda1 necesario para el mantenimiento del crecimiento hifal ya que esta proteína es necesaria para que Brg1 pueda unirse a los promotores de *ALS3*, *HWP1* y *BRG1* en respuesta a suero, un fuerte inductor hifal. En buena correlación con esta función, hemos detectado a Sok1 en la cromatina de los promotores de *ALS3* y *BCR1* en las mismas regiones donde se une Brg1.

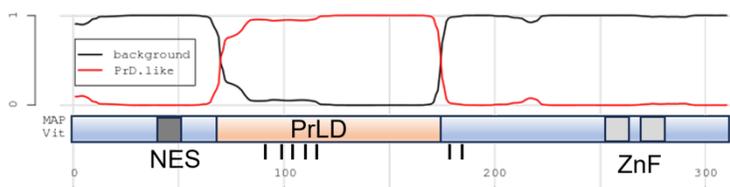


Figura 45. Análisis PLAAC (<http://plaac.wi.mit.edu/>) de Nrg1 para identificar dominios Prion-Like (PrLD). Se representan también la posición relativa de la secuencia NES, los dominios ZnF y los 7 sitios S/TP analizados en este estudio.

1. La degradación de Nrg1 al inicio de la respuesta a suero se regula mediante dos mecanismos independientes que requieren a la exportina Crm1.

En una tesis previa del grupo se generaron mutantes fosfodeficientes de Nrg1 en potenciales sitios de fosforilación de las quinasas Cdk1 (*nrg1-7A*) y Cbk1 (*nrg1-3A*). La razón de construir estos mutantes fosfodeficientes se debía a que la inhibición de la actividad quinasa de Cdk1-as o la ausencia de actividad Cbk1 estabilizaban al represor Nrg1 en respuesta a suero (Tesis Guadalupe Bermejo). Si ambas quinasas regularan la estabilidad del represor de forma directa, cabía esperar que los mutantes de Nrg1 carentes de los aminoácidos fosfoaceptores de Cdk1 y Cbk1 se mostraran estables en respuesta a suero. El estudio de la estabilidad de las proteínas mutantes puso de manifiesto que mientras la proteína Nrg1-7A (sitios Cdk) no se degrada, la proteína

fosfodeficiente en los sitios Cbk1 (Nrg1-3A) desaparece con la misma cinética que el control. Por tanto, estos resultados sugerían que mientras Cdk1 podría desempeñar un papel directo en la regulación de Nrg1, la quinasa Cbk1 ejercería su función indirectamente a través de la fosforilación de otro sustrato que regulara a su vez la estabilidad de Nrg1.

La actividad de la NDR quinasa Cbk1 es necesaria para iniciar el crecimiento hifal [88], [89] y uno de sus principales sustratos es la proteína de unión a mRNAs Ssd1, que posee 9 sitios consenso de fosforilación por Cbk1 en el extremo N-terminal de la proteína [86]. La expresión del alelo fosfomimético *ssd1-9E* o la eliminación de *SSD1* restauran la capacidad de degradar a Nrg1 y de polarizar el crecimiento de un mutante *cbk1Δ* en respuesta a suero [86]. Dado que la fosforilación de Ssd1 dependiente de Cbk1 permite la traducción de los mRNAs a los que se encuentra asociados Ssd1 [90] estos resultados sugieren que algún transcrito unido a Ssd1 codificaría para una proteína implicada en degradar a Nrg1. Trabajos preliminares de nuestro grupo han identificado, mediante RT-PCR, al mRNA de *SOK1* en un inmunoprecipitado de Ssd1 en células levaduriformes (Antonia Ciudad, comunicación personal). En buena correlación con este resultado, hemos identificado la secuencia $_{-103}ATCCATTCATT_{-93}$ en la región 5'-UTR de *SOK1* como posible sitio de unión a Ssd1 [91]. Además, la delección de *SOK1* en un fondo *cbk1Δ ssd1Δ* suprime el rescate de la pérdida de *SSD1* en un fondo *cbk1Δ* ya que las células *cbk1Δ ssd1Δ sok1Δ* son incapaces de responder a suero (Antonio Esperilla, datos no mostrados). Dado que Sok1 es necesario para exportar a Nrg1 al citoplasma para su degradación en respuesta a suero (ver más adelante), estos resultados preliminares del grupo sugieren que una función importante de Cbk1 en el inicio del crecimiento hifal podría ser permitir la traducción del mRNA de *SOK1* que se encuentra asociado a Ssd1. Dado que hemos observado que Sok1 se expresa y localiza en el núcleo de levaduras, tal vez la activación del eje Cbk1-Ssd1-Sok1 sea un mecanismo rápido de respuesta que permita incrementar los niveles de Sok1 en el núcleo para potenciar una brusca bajada de los niveles de Nrg1.

En esta Tesis hemos observado que la señal nuclear de Nrg1 desaparece rápidamente en respuesta a suero. Esta disminución es consecuencia de su exportación al citoplasma para que la proteína sea degradada, ya que la inactivación de la exportina Crm1-T533C con LMB estabiliza a Nrg1 en presencia de suero (**Figura 12**). Además, la proteína que se acumula tiene una menor movilidad electroforética que la existente en

el morfotipo de levadura, lo que sugiere que el represor se fosforila en respuesta a suero. Aunque no hemos realizado un experimento similar con el mutante *nrg1-7A* en un fondo *crm1-T533C* para ver si desaparece dicha modificación, parece lógico pensar que la fosforilación de estos sitios podría aumentar su afinidad por la exportina Crm1 ya que la proteína Nrg1-7A no se degrada en presencia del inductor hifal (**Figura 16**). En correlación con esta hipótesis, Nrg1-7A se excluye del núcleo más lentamente (**Figura 46**). Sin embargo, no podemos descartar que este retraso en la exclusión nuclear de Nrg1-7A sea consecuencia de la menor disociación de Nrg1 de los promotores observada en el mutante *nrg1-7A* (**Figura 18**).

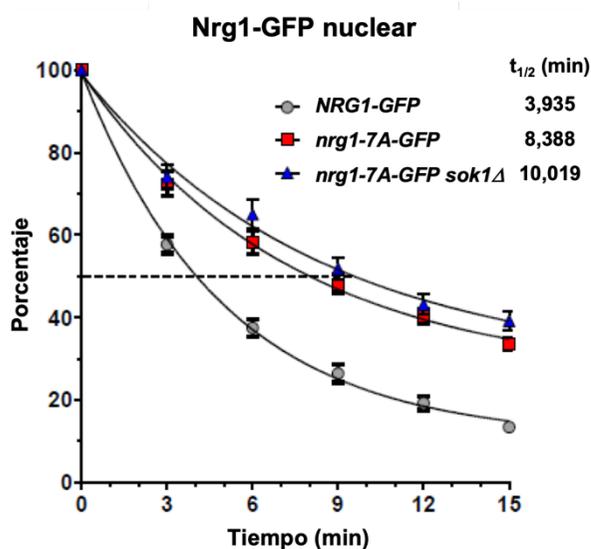


Figura 46. La exclusión nuclear de Nrg1 en respuesta a suero depende de los sitios S/TP de Nrg1 y de Sok1. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia nuclear de Nrg1 en las cepas *NRG1-GFP* (JC1370), *nrg1-7A-GFP* (JC1398) y *sok1Δ nrg1-7A-GFP* (JC2756) de imágenes tomadas a intervalos de 3 min tras la inducción hifal de las cepas indicadas. Se muestra la intensidad media \pm SD. $n=96$ células para cada cepa. La gráfica representa los valores de intensidad de cada punto referenciados al momento inicial (t_0). $t_{1/2}$ se define como el tiempo transcurrido para reducir la intensidad nuclear inicial de Nrg1-GFP a la mitad ($t_{1/2}$). WT $t_{1/2} = 3,93$ min; *nrg1-7A* $t_{1/2} = 8,38$ min; *sok1Δ* $t_{1/2} = 10,01$ min.

Esta exclusión nuclear también depende de Sok1 ya que el $t_{1/2}$ del mutante *sok1Δ* es de 10 min, frente a los 4 min del silvestre. En esta memoria hemos puesto de manifiesto que Sok1 es una proteína de localización tanto citoplasmática como nuclear en el morfotipo de levadura y que es rápidamente excluida del núcleo al inicio del crecimiento hifal (**Figura 36**). Dicha exclusión es transitoria ya que durante la elongación se vuelve a localizar en el núcleo. Tras analizar la secuencia de aminoácidos de Sok1 identificamos

una secuencia de localización nuclear funcional (NLS) en su dominio N-terminal (**Figura 35**). Sin embargo, no fuimos capaces de detectar ninguna secuencia de exportación nuclear (NES) con los algoritmos disponibles en la web. Aunque no es descartable que exista alguna secuencia NES en Sok1, otro escenario posible que explicara su exclusión nuclear sería que interaccionara con otra proteína con secuencia NES para ser exportada al citoplasma en respuesta a suero.

El hecho de que Nrg1 tenga que ser exportado al citoplasma para su degradación implica que el represor tiene que ser primero disociado de los promotores y luego excluido del núcleo a través de la exportina Crm1. Los resultados presentados en esta memoria demuestran que la fosforilación de los sitios S/TP de Nrg1 es necesaria para despegar al represor de los promotores (**Figura 18 y 20**) sólo en presencia de señales inductoras de crecimiento hifal, y que Sok1 es necesaria para su exportación al citoplasma. Por tanto, proponemos un modelo especulativo que integra todas estas observaciones. Según este modelo, la fosforilación del grupo de sitios S/TP presentes en el PrLD de Nrg1 disociaría a Nrg1 de los promotores (ver más adelante) y permitiría su asociación con Sok1. Los PrLD promueven el ensamblaje de complejos macromoleculares favoreciendo la interacción entre proteínas [92]. Esta interacción podría producir un cambio conformacional de Nrg1 que expusiera su secuencia NES para interactuar con Crm1, lo que permitiría la salida al citoplasma de ambas proteínas de una forma dependiente de suero. Entendemos que este modelo es meramente especulativo, pero nos permite hacer predicciones que confirmen o rechacen este marco teórico. Son necesarias responder a varias preguntas antes de validarlo. ¿Existe interacción entre Sok1 y Nrg1 en los primeros minutos de la inducción? ¿La interacción de Nrg1 con la exportina Crm1 depende de los sitios S/TP y Sok1? ¿Se encuentra afectada la exclusión de Sok1 en un mutante *nrg1-7A*?

2. La disociación de Nrg1 de los promotores de los HSGs no es necesaria para el crecimiento hifal.

Como ya hemos comentado en la introducción, Nrg1 se encuentra unido a los promotores de los HSGs en el morfotipo de levadura y se disocia rápidamente de la cromatina, mediante un mecanismo desconocido, al inicio de la activación del programa hifal [45]. En esta tesis hemos estudiado la asociación de la proteína Nrg1-7A en los

promotores de *ALS3*, *HWP1*, *ECE1* y *BRG1* durante el inicio de la respuesta a suero, un fuerte inductor hifal que activa las misma respuesta que la adición de rapamicina [53], [66]. Todos estos promotores tienen sitios de unión a Nrg1 y Brg1 [53]. En estos estudios de inmunoprecipitación de cromatina hemos utilizado las parejas de cebadores ya descritos para detectar el enriquecimiento específico de cada proteína en los promotores estudiados [45].

En la Tesis de Guadalupe Bermejo se puso de manifiesto que el mutante *nrg1-7A* mostraba una respuesta a suero silvestre a pesar de presentar altos niveles del represor, lo que sugería que la proteína Nrg1-7A debería ser capaz de disociarse de los promotores para permitir la expresión del programa hifal. Sin embargo, el trabajo presentado en esta memoria demuestra claramente que el mutante *nrg1-7A* es capaz de activar la transcripción de *ALS3*, *HWP1* y *ECE1* en respuesta a suero sin haber disociado al represor de los promotores (**Figura 18, 27 y 29**). Sorprendentemente, cuando analizábamos el enriquecimiento de Nrg1-7A en los promotores a t30 min de inducción, siempre encontrábamos una mayor asociación del represor respecto a t0 (**Figura 18**). Si durante el morfotipo de levadura todos los sitios de unión (par A8) estuvieran ocupados por Nrg1 y la proteína Nrg1-7A no se despegara de los promotores en respuesta a suero, deberíamos observar el mismo enriquecimiento a t0 y t30. Una posible explicación a este comportamiento no esperado podría ser la existencia de variabilidad en la población celular respecto a los mecanismos utilizados para reprimir los HSGs. Es posible que una parte del cultivo mantenga la represión a través de su unión del represor y otra subpoblación a través de compactación de la cromatina. Si esto fuera así, la pérdida de nucleosomas inducida por las señales inductoras expondría nuevos sitios que antes no estaban disponibles, lo que aumentaría la cantidad de Nrg1 asociada a A8.

Por tanto, el hecho de que la proteína Nrg1 fosfodeficiente mantuviera su afinidad por los promotores al inicio de la respuesta a suero sugería que la fosforilación de estos residuos es importante para su disociación. En buena correlación con esta idea, hemos observado que la mutación fosfomimética *nrg1-7E* se comporta como una mutación de pérdida de función porque el mutante muestra un crecimiento hifal constitutivo en condiciones de levadura, a pesar de expresar la proteína Nrg1-7E a niveles fisiológicos y localizarse en el núcleo (**Figura 19 y 20**).

El hecho de que el mutante *nrg1-7A* sea capaz de inducir una respuesta hifal aparentemente normal, con el represor unido a los promotores, implica que debe de existir otro mecanismo no descrito que inactive a Nrg1 independiente de la disociación del represor al inicio del crecimiento hifal. Además, estos resultados desafían el concepto de la ventana de oportunidad que supone el despegue y posterior degradación de Nrg1 para realizar las remodelaciones de cromatina dependientes de Brg1 [45], [49], [53]. Como veremos más adelante, Brg1 es capaz de unirse a los promotores en un mutante *nrg1-7A* por lo que suponemos que dichas remodelaciones tienen lugar en las células que expresan Nrg1-7A.

3. Sok1 colabora en la disociación de Nrg1 y la unión de Brg1 a los promotores de los HSGs durante el inicio del crecimiento hifal.

En *C. albicans*, la degradación de Nrg1 al inicio del crecimiento hifal depende de la proteína Sok1 [49]. Aunque erróneamente se le ha atribuido una actividad quinasa a Sok1 debido a que se aisló como un supresor multicopia de un triple mutante *tpk1/tpk2/tpk3* en *S. cerevisiae* (*SOK1*: Suppressor Of Kinase) [50] y en *C. albicans*, el mutante *sok1Δ* se incluyó en una colección de mutantes de quinasas [49], [93], no se puede inferir su actividad bioquímica a pa

rtir de su secuencia de aminoácidos. El estudio de las interacciones genéticas entre el mutante *sok1Δ* y los mutantes de *nrg1* afectados en la fosforilación de los sitios S/TP nos han permitido identificar nuevas funciones de Sok1 al inicio del crecimiento hifal.

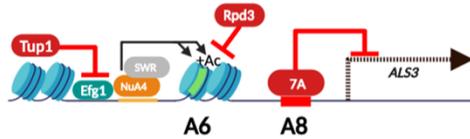
En primer lugar, observamos que la delección de *SOK1* suprime el crecimiento hifal constitutivo del mutante *nrg1-7E* (**Figura 22**). Dado que, en nuestros experimentos, Sok1 se expresa y localiza en el núcleo de las células levaduriformes en crecimiento exponencial (**Figura 35**), esta supresión sugiere que la proteína Nrg1-7E es sensible a la presencia de los niveles de Sok1. En otras palabras, Sok1 podría colaborar en el despegue del represor, una vez éste fuera fosforilado en los sitios S/TP. En concordancia con esta idea, la sobreexpresión de *SOK1* en un fondo *nrg1-7A* no tiene ningún fenotipo mientras que en un fondo silvestre da lugar a un 35% de pseudohifas (Antonio Esperilla datos no mostrados). Si la razón por la cual las células *nrg1-7E sok1Δ* recuperan el morfotipo de levadura se debe a que la proteína Nrg1-7E vuelve a unirse a los promotores, debería

observarse un incremento en la cantidad de Nrg1 asociado al promotor de *ALS3* en los experimentos de CHIP. Aunque efectivamente detectamos un incremento en el enriquecimiento en el doble mutante respecto al mutante *nrg1-7E*, dicho incremento no fue estadísticamente significativo (**Figura 24**). Podemos imaginar dos escenarios que expliquen este resultado. Por un lado, la unión de Nrg1-7E en el doble mutante es real pero muy lábil respecto a la proteína silvestre, lo que daría lugar a una constante asociación/disociación de Nrg1 del DNA. En ese caso, el resultado del CHIP reflejaría el número de moléculas presentes en el promotor en el momento de fijar las células con formaldehído. Por otro, Sok1 no estaría implicado en la disociación de Nrg1 en respuesta a suero sino en la activación del programa transcripcional hifal de forma independiente de Nrg1. Dado que nuestros resultados demuestran que Sok1 es necesaria para la exclusión nuclear de Nrg1 y para la unión de Brg1 a los promotores de los HSGs (ver más adelante), puede que ambos escenarios sean posibles.

Otra interacción epistática interesante la encontramos entre las mutaciones *sok1Δ* y *nrg1-7A*, ya que el doble mutante *sok1Δnrg1-7A* no forma tubos germinativos a diferencia de los mutantes simples (**Figura 25A**). La caracterización del doble mutante ha puesto de manifiesto que sus niveles de Nrg1, así como la cantidad del represor unido al promotor de *ALS3* (A8) son similares a las del mutante simple *nrg1-7A* tras 30 min en presencia de suero a 37°C (**Figura 26 y 29**). Sin embargo, mientras que el mutante *nrg1-7A* es capaz de activar la transcripción de los HSGs *ALS3*, *HWP1* y *ECE1*, no se observa inducción de dichos genes en el doble mutante *sok1Δnrg1-7A* (**Figura 27**).

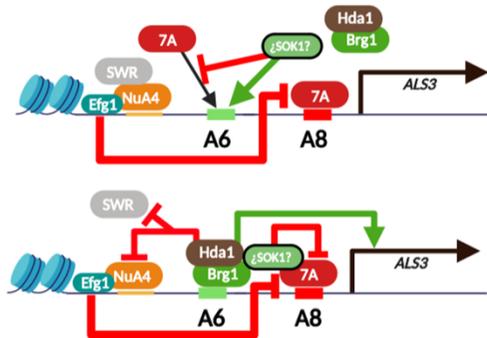
Con el fin de comprender mejor las diferencias en la activación del programa transcripcional entre estas dos cepas, analizamos el promotor de *ALS3* con más detalle, centrándonos en las regiones A6 y A8 que corresponden a los sitios de enriquecimiento a Brg1 y Nrg1 respectivamente [45], [53]. Mientras que en el mutante *nrg1-7A*, el represor sólo ocupa la zona correspondiente a su sitio consenso en la región A8, en ausencia de *SOK1*, la proteína Nrg1-7A se posiciona en ambas regiones (A6 y A8), ocupando la zona de unión del factor de transcripción Brg1 (**Figura 29 y 47**).

**Desarrollo
levaduriforme**



37°C/ suero

nrg1-7A



37°C/ suero

***sok1Δ
nrg1-7A***

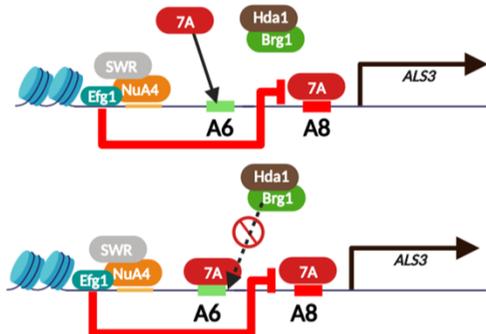


Figura 47. Modelo de la regulación del promotor de *ALS3* en las cepas *nrg1-7A* y *sok1Δ nrg1-7A*. Modelo basado en los datos obtenidos en los experimentos de ChIP que explicarían las diferencias en la activación transcripcional de *ALS3* en ambas cepas. Imagen propia generada en Biorender.

Por tanto, este resultado nos sugería que en ausencia de Sok1, el factor de transcripción Brg1 no podía unirse a su región A6 del promotor *ALS3*. Esta idea se confirmó cuando realizamos los experimentos de ChIP con Brg1 donde observamos que la delección de *SOK1* provoca la pérdida de unión de Brg1 en las zonas consenso descritas por [53] en los promotores de *ALS3*, *HWP1* y *BRG1* a los 30 min de inducción (**Figura 31 y 34**). Dado que esta ausencia de Brg1 en los promotores no se debía a que diferencias en

los niveles de proteína Brg1 en los extractos de la cepa *sok1Δ* respecto al control silvestre (**Figura 31C**), estos resultados demuestran que la unión de Brg1 a los promotores de los HSGs dependen de Sok1, lo que podría explicar el fenotipo del doble mutante en respuesta a suero. Dado que la expresión ectópica de *UME6* rescata el fenotipo del mutante *brg1Δ* en respuesta a señales inductoras del crecimiento hifal [53], nos planteamos en un futuro cercano ver si ocurre lo mismo con el doble mutante *sok1Δnrg1-7A*.

4. La disociación de Nrg1 de los promotores de HSGs y *BRG1* se regula mediante mecanismos diferentes.

La expresión de los genes HSGs y *BRG1* se encuentran regulados por Nrg1 y Brg1. Todos los promotores de los HSGs analizados tienen sitios de unión a Brg1 y Nrg1 próximos, mientras que en el promotor de *BRG1* se encuentran solapados [53]. Además, las señales ambientales que regulan la asociación de Brg1 a los promotores de los HSGs y *BRG1* son diferentes [53]. Mientras que la unión de Brg1 a los promotores de los HSGs solo requiere la señal de 37°C que induce la degradación inicial de Nrg1, la unión a su propio promotor requiere 37°C y rapamicina (limitación de nutrientes). Es decir, la expresión de los HSGs responde a una puerta lógica NOT (No Nrg1, Si HSG) y la regulación de *BRG1* responde a una puerta lógica AND (no Nrg1 Y no nutrientes, Si Brg1). Por tanto, parece que el promotor de *BRG1* es diferente al de los HSGs en cuanto a las señales que recibe. En el morfotipo de levadura, Nrg1 se une al promotor de *BRG1* y reprime su transcripción. Tras la degradación del represor al inicio del crecimiento hifal, Brg1 se une a la misma región del promotor de *BRG1* para retroalimentar su propia transcripción.

En este trabajo hemos analizado la unión de Nrg1-7A y Brg1 en la región B6 del promotor de *BRG1* a los 30 min de inducción, región donde se consigue mayor enriquecimiento de ambas proteínas [53]. Respecto al represor, los resultados demuestran que la disociación de Nrg1 del promotor de *BRG1* es independiente de los sitios S/TP y Sok1 (**Figura 33**), a diferencia de lo que ocurre en los promotores de los HSGs. ¿Cuál podría ser el mecanismo que indujera la pérdida de afinidad de Nrg1-7A por el promotor de *BRG1*? Tal vez, el responsable de dicha disociación sea Efg1. Como ya hemos comentado en la introducción, Efg1 es un factor de transcripción esencial en todas las

transiciones entre morfotipos de *C. albicans* [35]. Recientemente, se ha postulado que Efg1 inhibe la función de Nrg1 y que regula la expresión de los HSGs de forma indirecta, a través de otros factores de transcripción como Brg1 [40]. Por tanto, las señales inductoras del crecimiento hifal podrían modificar a Efg1 para que desplazara a Nrg1 del sitio B6 del promotor de *BRG1*, lo que permitiría la entrada de Brg1 para retroalimentar su propia transcripción.

CONCLUSIONES

- 1) La degradación de Nrg1 en respuesta a suero depende de la exportina Crm1 y de los sitios S/TP presentes en Nrg1, lo que indica que Nrg1 tiene que ser disociado de los promotores y exportado al citoplasma para su proteólisis.
- 2) La activación del programa hifal es independiente de la disociación y degradación de Nrg1, lo que desafía el modelo de la ventana de oportunidad para modificar la cromatina de los promotores de los HSGs.
- 3) La fosforilación de los sitios S/TP presentes en Nrg1 es necesaria para inducir la disociación del represor de los promotores de los HSGs al inicio del crecimiento hifal.
- 4) Sok1 es necesaria para orquestar una rápida respuesta a las señales inductoras del crecimiento hifal.
- 5) La proteína Sok1 colabora con la fosforilación del grupo de S/TP de Nrg1 en activar el programa de transcripción hifal en respuesta a suero mediante dos mecanismos independientes.
- 6) A diferencia de lo que ocurre en los promotores de los HSGs, el mecanismo de disociación de Nrg1 en el promotor de *BRG1* es independiente de la fosforilación de los sitios S/TP de Nrg1 y de Sok1.
- 7) Sok1 es necesaria para la unión de del factor de transcripción Brg1 a los promotores de los HSGs y *BRG1*.
- 8) Las dinámicas de unión de Nrg1-7A y Brg1 en los promotores de *ALS3* y *BRG1* en las cepas analizadas sugieren que Nrg1 y Brg1 compiten por aquellas regiones de los promotores de HSGs en los que los sitios de unión de ambas proteínas se encuentran solapados.
- 9) Sok1 es una proteína que presenta localización nuclear durante el crecimiento exponencial en condiciones de desarrollo levaduriforme y es exportada al citoplasma tras la inducción del crecimiento hifal.

CONCLUSIONES

- 10) La exclusión nuclear de Nrg1 y Brg1 al inicio del crecimiento hifal dependen de Sok1

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Microorganismos utilizados.

Para el desarrollo de esta tesis se usó como modelo el hongo *Candida albicans*. Todas las cepas utilizadas en este trabajo aparecen en la **Tabla 1** donde se describen las características y la procedencia de cada una de ellas, compartiendo todas ellas el fondo genético BWP17 [94].

Las distintas cepas de la bacteria *Escherichia coli* DH5 α .™ (*Invitrogen*™) y XL10-Gold® *Ultracompetent Cells* (*Stratagene*) fueron empleadas para los experimentos de clonación molecular y como hospedador de los plásmidos empleados a lo largo de este estudio, los cuales pueden consultarse en la **Tabla 2**. La cepa NEB 5-alpha Competent *E. coli* (*High Efficiency*) se utilizaron para transformar los plásmidos construidos mediante ensamblaje usando el kit *NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix* (*New England BioLabs*).

Tanto las cepas de levaduras como las de bacterias se conservaron a -80°C en crioviales con glicerol al 20%.

2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

C. albicans se creció de forma rutinaria a 28°C en medio rico YPD (2% de peptona bacteriológica, 2% de dextrosa, 1% de extracto de levadura) o en medio mínimo (MM) (2% de dextrosa y 0,7% de base nitrogenada sin aminoácidos) suplementando los medios siempre que fuera necesario en función de la cepa crecida con aminoácidos a una concentración final de 40 mg/ml para histidina y arginina y 80 mg/ml para uridina. Para miceliación también se utilizó un medio a base de N-acetil- β -D-glucosamina (2% de peptona bacteriológica, 2% de GlcNAC, 1% de extracto de levadura). Los experimentos de miceliación se realizaron diluyendo los preinóculos del día anterior a una D.O.₆₀₀ entre 0,3 y 0,4 en medio líquido YPD, MM o GlcNAC suplementado con un 10% de suero bovino incubándose constantemente en agitación a una temperatura de 37°C. Para la represión de los genes bajo el control del promotor *MET3* se suplementó el medio de crecimiento con 5mM de metionina y 1mM de cisteína. En cuanto a la expresión de los genes bajo el control del promotor *MAL2* las células se crecieron en medio YPM (2% de peptona bacteriológica, 2% de maltosa, 1% de extracto de levadura).

Los cultivos de *E. coli* se crecieron en medio LB (Sigma) a 37°C. La selección de los transformantes se realizó en placas de LB suplementadas con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml.

Todos los medios utilizados se suplementaron con un 2% de agar para la preparación de medios sólidos, siendo esterilizados todos a 121°C durante 20 minutos en autoclave.

3. Construcción de cepas de *C. albicans*.

Tanto la delección de genes en *C. albicans* como la construcción de proteínas de fusión mediante la adición en fase de las proteínas fluorescentes GFP o mCherry y los epítomos MYC y HA, se realizaron aprovechando el sistema de recombinación homóloga de *C. albicans* que da la posibilidad de integrar un fragmento de DNA exógeno. Los fragmentos de DNA se amplificaron por PCR usando como molde los plásmidos pFA [95], [96] junto con la utilización de un nuevo sistema de plásmidos reciclables pFA-Clox [97]. Estos plásmidos pFA-Clox utilizan el módulo pFA integrando en ellos los marcadores auxotróficos reciclables del sistema *Cre-loxP* [98]. Los productos de PCR, usados para la construcción de las diferentes cepas, fueron amplificados mediante cebadores largos (recogidos en la **Tabla 3.1**) de 120 nucleótidos que permiten dirigir la integración al locus deseado del genoma de *C. albicans*. La selección de los transformantes de *C. albicans* se llevó a cabo mediante el crecimiento en placas de MM suplementado con los aminoácidos necesarios en función de los marcadores auxotróficos integrados y ya presentes en su genoma, o en YPD suplementado con nourseotricina (*clonNAT*) a una concentración de 200 mg/ml (Werner BioAgents Jena, Germany) para la selección de transformantes en los que se haya integrado una cassette con el marcador SAT1. Además, las cepas en las que se generaron proteínas de fusión se consideraron funcionales siempre y cuando las cepas heterocigóticas para ese gen, teniendo como única fuente de proteína el alelo con el epítomo, mostraran un comportamiento de crecimiento silvestre.

En el caso de construcciones en las que se introducían alelos con mutaciones puntuales, las cepas se transformaron mediante fragmentos linealizados obtenidos a partir de digestiones con enzimas de restricción de plásmidos que contenían un marcador de selección flanqueado a un lado por el alelo mutado y al otro por una región 3'UTR del locus al que se dirigía la integración.

4. Transformación de *C. albicans*.

Para la construcción de las diferentes cepas usamos dos protocolos de transformación, siendo más comúnmente utilizado el protocolo de transformación por electroporación y en menor medida la transformación por acetato de litio para aquellas cepas en las que no obteníamos resultados satisfactorios mediante electroporación.

4.1. Transformación por electroporación.

El protocolo de electroporación usado fue el descrito por Reuß y colaboradores [99], [100] con modificaciones que mejoraron la eficiencia de transformación en nuestro laboratorio. El cultivo nocturno de la cepa a transformar se diluyó en 50 ml de YPD a una D.O.₆₀₀ de 0,5 dejándose crecer a 28°C en agitación hasta una D.O.₆₀₀ entre 2-4, recogién dose posteriormente las células durante su fase de crecimiento exponencial por centrifugación. El pellet de células se lavó con agua estéril y se resuspendió en 10 ml de solución TE1X-AcLi (Tris-HCl 10 mM pH=7,5, EDTA 1 mM pH=8 y acetato de litio 100 mM pH=7,5) manteniéndose en agitación a 28°C durante 1 hora. Pasado este tiempo se añadieron 250 µL de DTT 1M (para una concentración final de 25 mM) dejándose en agitación a 28°C durante 30 minutos más. Tras estos tiempos de incubación, las células se lavaron una vez con 50 ml de agua estéril, dos veces más con 25 ml de agua estéril fría y un último lavado con 5 ml de sorbitol 1M. Finalmente, estas células competentes se recogieron por centrifugación, resuspendiéndose en 200 µL de sorbitol 1M. Un total de 40 µl de células competentes se mezclaron con entre 1 y 5 µl de DNA incubándose 5 minutos en hielo. Pasada la incubación, las células competentes se pasaron a una cubeta de 0,2 cm para su electroporación a 1,8 mA en un electroporador *Gene Pulser*[®] (Biorad). Las células se recuperaron con 1 ml de sorbitol 1M y se pasaron a un tubo de microcentrífuga para la obtención del pellet de células transformadas por centrifugación. Por último, el pellet se resuspendió con 100 µL de sorbitol 1M para sembrar las células en placas de medio selectivo.

4.2. Transformación por acetato de litio.

En determinadas ocasiones la transformación por electroporación no fue efectiva, cambiando al protocolo de transformación por acetato de litio descrito por Walther y colaboradores [101], [102] con algunas modificaciones que mejoraron la eficiencia. El pre-inóculo crecido durante la noche se diluyó en 25 ml de YPD a una D.O.₆₀₀ de 0,5 incubándolo a 28°C en agitación hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 1,8. Seguidamente se recogieron las células a transformar en crecimiento exponencial mediante centrifugación lavándose primero con 25 ml de agua estéril fría y después con 1 ml de agua estéril fría transfiriéndose a un tubo de microcentrífuga, centrifugándose para obtener el pellet de células. Este pellet se resuspendió en 1,5 ml de AcLi-sol 2X (200 mM AcLi, 20 mM Tris-HCl y 2 mM EDTA) estéril. Para cada una de las transformaciones a realizar, previamente se mezclaron 100 µg de ssDNA (esperma de salmón, “DNA carrier” 10 mg/ml) desnaturalizado y 1-5 µg de DNA a integrar incubándose en hielo 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 100 µl de las células ya preparadas en la solución de AcLi 2X, incubándose de nuevo 5 minutos en hielo y añadiendo por último 600 µl de PEG/AcLi-sol 2X (PEG 4000 al 50% en la solución de AcLi 2X) esterilizada previamente por filtración. Todo el contenido fue vortexado brevemente y se mantuvo durante toda la noche a 28°C en agitación. Seguidamente, esta mezcla de células-DNA en PEG/AcLi-sol 2X se sometió a un choque térmico incubándose a 44°C durante 15 minutos. Para finalizar, las células se lavaron con 1 ml de MM, resuspendiendo las células en 100 µL de MM para ser sembradas en las placas de selección adecuadas.

Independientemente del método utilizado para la construcción de nuevas cepas, en aquellas transformaciones en las que se usó como marcador de selección *SAT1*, las células tras la electroporación o choque térmico se incubaron en 2 ml de YPD (con adición de metionina y cisteína si el cassette de transformación utilizado contenía la recombinasa Cre precedida del promotor *MET3*, bloqueando así su expresión) a 28°C con agitación durante 2 horas para permitir su recuperación antes de ser sembradas. Posteriormente se recogieron las células y se resuspendieron en 100 µL de sorbitol 1 M para sembrarlas en placas de YPD suplementadas con 200 µg/ml de *clonNAT* junto con metionina y cisteína en aquellos casos necesarios.

5. Transformación de *E. coli*.

Para la transformación de plásmidos purificados se utilizó la cepa DH5 α [™] (*Invitrogen*[™]) utilizando el protocolo descrito por el fabricante.

Para una mayor eficiencia, cuando se realizaron transformaciones de productos obtenidos mediante ligación de varios fragmentos se usaron células competentes de la cepa XL10-GOLD[®] (*Stratagene*). Estas se transformaron siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

En el caso de los productos obtenidos mediante ensamblaje con el kit *NEBuilder[®] HiFi DNA Assembly Master Mix (New England BioLabs)*, se usaron las cepas NEB 5-alpha Competent *E. coli (High Efficiency)* suministradas en conjunto con el kit, transformándose según el protocolo descrito por la casa comercial.

6. Análisis y manejo de ácidos nucleicos.

6.1. Extracción de DNA plasmídico.

Para la obtención del DNA plásmido contenido en las diferentes cepas de *E. coli* se usaron dos kits en función de la calidad requerida en la obtención de dichos plásmidos. Para las extracciones rutinarias se utilizó el kit de purificación de plásmidos *GeneJET[™] Plasmid Miniprep kit (Thermo Scientific)* siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial. Cuando se querían obtener los plásmidos contenidos en diferentes colonias de transformantes de *E. coli* procedentes de ligaciones de varios fragmentos y buscábamos una mayor calidad de purificación se usó el kit *Monarch[®] Plasmid Miniprep kit (New England BioLabs)* siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

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

Las amplificaciones de los fragmentos de DNA se realizaron en un termociclador *SimpliAMP[™] Thermal Cycler (Life Technologies[™])* utilizando dos tipos de polimerasas en función de la finalidad del producto de PCR y distintas condiciones de reacción. Las

amplificaciones rutinarias se llevaron a cabo con la polimerasa *Dream Taq™* Green PCR Master Mix 2X (*Thermo Scientific*) mientras que para aquellas reacciones en las que se necesitaba una alta fidelidad de copia se empleó la polimerasa *KAPA HiFi HotStart PCR Kit* (*KAPA Biosystems*). En cuanto a las condiciones de amplificación se siguió las recomendaciones de la empresa fabricante con algunas variaciones entre diferentes reacciones en función de la polimerasa utilizada, del tamaño de amplificación y de la temperatura ideal de anillamiento de los cebadores usados.

En líneas generales, primero se desnaturalizó el DNA molde durante 5 minutos a 95°C seguido de 25 ciclos repitiendo los siguientes pasos: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura de anillamiento específico de los cebadores usados, 1 minuto de extensión por cada kilobase del fragmento de amplificación a 72°C y una etapa final de extensión de 10 minutos a 72°C. Tras la finalización de la PCR, los productos se mantuvieron en el termociclador a una temperatura de 10°C o en refrigeración a 4°C hasta su análisis.

6.3. Digestión enzimática.

En todas las digestiones enzimáticas se utilizó la línea de enzimas de restricción *Fast Digest™* (*Thermo Scientific*). El protocolo seguido fue el sugerido por el fabricante manteniendo la reacción de restricción a 37°C durante al menos 15 minutos.

6.4. Ligación de vectores y fragmentos de DNA.

Para las ligaciones de insertos con vectores previamente digeridos ambos con las enzimas de restricción adecuadas se empleó el kit *Rapid DNA Ligation Kit* (*Thermo Scientific*). Para la reacción se siguieron las indicaciones recomendadas por la empresa incubándose la ligación con los productos necesarios durante 15 minutos a 22°C.

6.5. Ensamblaje mediante *NEBuilder*.

Durante el desarrollo de esta tesis implementamos un nuevo sistema de ensamblaje de fragmentos de DNA utilizando el kit *NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix* (*New*

England BioLabs). Este sistema consiste en el ensamblaje de un vector linearizado mediante corte con enzimas de restricción y productos de PCR amplificados con oligonucleótidos que presentan extremos homólogos al sitio de ensamblaje. Para estas reacciones se siguieron las instrucciones del fabricante.

6.6. Cuantificación y visualización de DNA y RNA.

La concentración de DNA se obtuvo midiendo la absorbancia a 260 nm mediante el equipo *Qubit™ 3.0. Fluorometer (Invitrogen™)*. Tanto las reacciones como las cuantificaciones se realizaron siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Para la medición de la concentración de RNA, se utilizó el equipo espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific)*. La pureza del RNA medido se determinó mediante la relación de absorbancias A260/280 que con un valor entre 2,0-2,2 se considera indicativa de un RNA de pureza óptima.

Todos los fragmentos de DNA fueron visualizados cargando una alícuota en geles de agarosa al 0,7-1% teñidos con *Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics)* en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH=7,5) para las observaciones de DNA en luz ultravioleta. En cuanto a la visualización de los RNA se usaron geles de agarosa al 1,8% teñidos con bromuro de etidio (*Sigma*) a una concentración de 0,5 mg/ml observándose tras la electroforesis mediante luz ultravioleta.

6.7. Análisis de colonias de levadura.

Todas las transformaciones realizadas en las cepas de *C. albicans* se llevaron a cabo mediante la integración de productos de PCR. Las colonias crecidas en las placas de selección se analizaron mediante PCR para confirmar la correcta inserción del fragmento de integración. A lo largo de la tesis, se utilizaron varios protocolos para la extracción de DNA genómico en función de la finalidad y las dificultades que se tuvieron para conseguir reacciones de PCR positivas.

Todas las reacciones de comprobación por PCR se cargaron en geles de agarosa para visualizar los fragmentos de DNA amplificados y validar la correcta construcción de las cepas generadas.

6.7.1. Comprobación rápida de colonias.

Una pequeña parte de las colonias crecidas en placa se picaron con una punta estéril y se resuspendieron en 3 μ l de agua estéril hirviéndose a 95°C durante 10 minutos para provocar la rotura de las células seguido de 5 minutos en hielo. Posteriormente, se le añadió la mezcla de reacción hasta un volumen final de 25 μ l tras lo cual se pasó al termociclador para un proceso de amplificación con condiciones específicas según el fragmento a amplificar.

6.7.2. Extracción de DNA genómico de *C. albicans*.

En determinadas ocasiones, la extracción rápida antes descrita no funcionaba correctamente, realizándose la extracción del DNA genómico siguiendo protocolos más eficientes para así obtener una mejor calidad y cantidad de molde de reacción.

Uno de los métodos aplicados fue el de extracción por acetato de litio-SDS [103] Parte de las colonias se resuspendieron en 100 μ l de 200 mM acetato de litio con 1% SDS, incubándose durante 15 minutos a 70°C. Pasado este tiempo, las muestras se dejaron 5 minutos en hielo, se añadieron 300 μ l de EtOH 96% frío para precipitar el DNA mezclándose por inversión de los tubos. Se centrifugó durante 3 minutos a 13.000 rpm y se resuspendió el pellet en 100 μ l de agua estéril libre de DNAasa y RNAasa. Se volvió a centrifugar a 13.000 rpm 1 minuto para separar los restos celulares del DNA presente en el sobrenadante. Para el análisis mediante PCR se tomó 1 μ l de este sobrenadante como molde de reacción.

6.7.3. Extracción de DNA genómico mediante *Master Pure™ Yeast Purification Kit*.

Cuando se requería una mayor calidad de extracción de DNA genómico por no tener resultados positivos con las otras técnicas de extracción o para reacciones de PCR enviadas a secuenciación se recurría al kit *Master Pure™ Yeast Purification Kit (Epicentre)* siguiendo el protocolo descrito por la empresa fabricante.

6.8. Secuenciación de ácidos nucleicos.

Las secuenciaciones de todos los fragmentos de DNA fueron realizadas en los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Extremadura.

6.9. Inmunoprecipitación de cromatina.

Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizaron a partir de 50 ml de cultivo a una D.O.₆₀₀ de 0,5 fijadas con formaldehído a una concentración final de 1,42% durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente desactivando la fijación mediante la adición de 0,125 mM de glicina incubándose 5 minutos en agitación a temperatura ambiente. Tras esto, las células se recuperaron por centrifugación a 4.000 rpm durante 2 minutos. Los *pellets* se lavaron con PBS (eliminándose completamente tras una segunda centrifugación), se congelaron en hielo seco y se conservaron a -20°C hasta su procesamiento.

Las células se descongelaron en hielo para resuspenderse en 100 µl de tampón IP (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH=7,5, 5 mM EDTA, NP-40 0,5% v/v, Triton X-100 1% v/v) junto con 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) e inhibidores de proteasas (*complete Lysis-M EDTA free, Roche*). A las células resuspendidas se le añadieron 500 µl de bolas de vidrio para llevar a cabo la rotura celular mediante el equipo *FastPrep (MPBio)* con un total de 3 ciclos durante 20 segundos a una velocidad de 5,5 incubándose 5 minutos en hielo entre cada rotura para evitar el sobrecalentamiento de las muestras. Tras la rotura, los tubos se perforaron por la parte inferior y se colocaron sobre tubos de microcentrifuga limpios para centrifugar a 1.600 rpm durante 2 minutos en frío. Sobre los

tubos con las bolas de vidrio se añadieron 300 μ l más del tampón IP preparado anteriormente para lavar las bolas y recolectar todo el contenido celular centrifugándose de nuevo en las mismas condiciones. El extracto total recolectado se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 13.000 rpm en frío eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en 1,5 ml del tampón IP con inhibidores y PMSF evitando la generación de espuma. Las muestras ya resuspendidas se sonicaron durante 1 hora en un equipo *Bioruptor®Plus (Diagenode)*, aplicando ciclos de 30 segundos de sonicación y 30 segundos de reposo, a máxima potencia en frío (4°C). Terminada la sonicación, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos en frío recuperándose el sobrenadante (cromatina sonicada) que se dividió en tres alícuotas diferentes, 150 μ l como control de carga (*inputs*), 600 μ l para la realización de las inmunoprecipitaciones (*IPs*) y otros 600 μ l como control de la inmunoprecipitación al que no se añadió el anticuerpo usado (*NA*). Los *inputs* se precipitaron añadiendo 0,3M de acetato potásico y 2,5 volúmenes de EtOH absoluto frío mezclándose todo por inversión e incubándolas durante al menos 2 horas a -20°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm durante 5 minutos en frío, eliminando el sobrenadante completamente mediante vacío para no dejar restos de EtOH. Estos pellets se resuspendieron con 100 μ l de agua ultrapura, se mezclaron con 250 μ l de *Chelex®100 (Bio Rad)* al 10% m/v y se hirieron a 95°C durante 20 minutos. Tras una centrifugación a 13.000 rpm durante 1 minuto, del sobrenadante se tomaron 100 μ l para purificarlos mediante el *Kit de purificación de banda de gel y DNA para PCR illustra™ GFX™ (Cytiva)* siguiendo el protocolo descrito por el fabricante y eluyendo el DNA en 250 μ l de agua ultrapura, almacenándose a -20°C. En cuanto a las *IPs*, se añadieron a los 600 μ l entre 2 y 5 μ g de anticuerpo anti-HA (12CA5, *Roche*) o anti-MYC (9E11, *Abcam*) según el epítipo de la proteína marcada. Tanto la mezcla *IPs*-anticuerpo como los *NAs* se sometieron a una sonicación suave durante 30 minutos en el equipo *Bioruptor®Plus (Diagenode)*, aplicando ciclos de 30 segundos de sonicación y 30 segundos de reposo, a mínima potencia y a 4°C. Tras esta segunda sonicación, las *IPs* y los *NAs* se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm durante 2 minutos en frío, transfiriéndose el sobrenadante a un nuevo tubo donde se mezclaron con 45 μ l de bolas recubiertas con *Protein A Sepharose (GE Healthcare)* equilibradas en tampón *IP* manteniéndose en incubación durante 2 horas a 10°C en agitación. Posteriormente las bolas fueron lavadas 6 veces con tampón de *IP*. Terminado el último lavado y eliminado completamente cualquier resto de tampón de *IP*, las bolas se mezclaron con 250 μ l de *Chelex®100 (Bio*

Rad) al 10% m/v, hirviéndose a 95°C durante 20 minutos. Por último, se centrifugaron las muestras (tanto de *IPs* como de *NAs*) a 13.000 rpm durante 1 minuto transfiriéndose el sobrenadante a tubos limpios de microcentrífuga, almacenándose a -20°C.

6.10. PCR a tiempo real.

Las reacciones de PCR a tiempo real tomando como molde tanto los *inputs* como los *IPs* y *NAs* obtenidos mediante ChIP se realizaron con el kit *SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus, Takara)*. Las mezclas de reacción se realizaron según indica el fabricante en un volumen final de 12 µl que incluía 3µl correspondían al DNA molde correspondiente *inputs*, *IP* o *NA* y el volumen correspondiente de los cebadores específicos en cada reacción a una concentración final de 1,5 µM. El equipo utilizado para las reacciones de amplificación fue un termociclador *Bio Rad C1000* junto con el sistema de lectura a tiempo real *Bio Rad CFX96* con las condiciones de reacción siguientes: una fase inicial de 95°C/30 segundos y 42 ciclos de 95°C/5 segundos seguidos de 60°C/30 segundos. Se analizaron las curvas de disociación para cada una de las parejas de cebadores usadas para así poder descartar la presencia de productos inespecíficos en la reacción. Los datos se analizaron utilizando el software *CFX (Bio Rad)*, normalizando los valores obtenidos en las muestras de *IPs* primero con respecto a los resultados obtenidos tanto en los *inputs* como en el *NA* y por último se hizo una última normalización respecto al gen *CDC12* como control negativo al no unirse el represor *Nrg1* en su promotor. En el caso de las qPCR a partir de los cDNA obtenidos de las extracciones de RNA, se normalizaron los datos de expresión en cada tiempo con respecto a la expresión del gen *ACT1*. En la **Tabla 3.6.** se encuentran recogidos los oligonucleótidos utilizados para analizar la unión de las diferentes proteínas estudiadas en los promotores tanto de los *HSGs* como del factor de transcripción *BRG1*.

7. Análisis de RNA.

7.1. Extracción de RNA.

Para la extracción de RNA se realizó previamente una lisis mecánica de las células seguida de la purificación del RNA mediante el kit *RNeasy Micro Kit (Qiagen)*. Se partió de

20 ml de un cultivo en fase exponencial a una D.O.₆₀₀ de 0,5, recogiendo las células mediante centrifugación a 4.000 rpm durante 2 minutos. El *pellet* se lavó con PBS centrifugándose de nuevo para congelar el *pellet* en hielo seco y almacenarlo a -80°C hasta su procesamiento. El *pellet* se resuspendió en 600 µl de buffer RLT (*Qiagen*) con 10 µl de β-mercaptoetanol homogenizándose el contenido mediante vortex, añadiendo después 500 µl de bolas de vidrio para realizar la rotura de las células mediante el equipo *FastPrep (MPBio)* con un total de 3 ciclos durante 20 segundos a una velocidad de 5,5 incubándose 5 minutos en hielo entre cada ciclo para evitar el sobrecalentamiento de las muestras. Se transfirieron 350 µl de sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga para seguir con el protocolo según las instrucciones dadas por la casa comercial *Qiagen*. Antes de la elución del RNA, las columnas *Rneasy spin* fueron tratadas con DNAasa (*RNAse-free DNase Set, Qiagen*) para una completa eliminación de DNA de la muestra. Finalmente, el RNA fue eluido con 50 µl de agua estéril libre de RNAasa y se almacenó a -80°C hasta su retrotranscripción a cDNA.

7.2. Obtención de cDNA.

La obtención del cDNA a partir del RNA extraído se realizó con el kit *Biotools High Retrotranscriptase (Biotools)* siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante.

En primer lugar, se determinó la concentración de RNA en cada una de las muestras por duplicado, para cargar un total de 800 ng de RNA por cada una con el fin de observar la calidad de los RNA extraídos y para poder visualizar el equilibrio de cargas entre las diferentes muestras del ensayo. Seguidamente, se igualaron todas las muestras a una concentración de 100 ng/µl, añadiéndose un total de 200 ng de RNA como molde para las reacciones de retrotranscripción necesarias. Las muestras de cDNA se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento. Se realizó una dilución 1/120 del cDNA para su uso como molde en las reacciones de RT-qPCR desarrolladas en las mismas condiciones explicadas anteriormente.

8. Estudio de proteínas.

8.1. Precipitación de extractos proteicos con TCA.

La extracción de las proteínas se llevó a cabo con el protocolo de extracción mediante ácido tricloroacético (TCA). Las células se recogieron a una D.O.₆₀₀ y volumen total según las necesidades de cada ensayo, generalmente 10 ml en fase exponencial a D.O. comprendidas entre 0,3-2. Las células se lavaron con 1 ml de agua estéril y se pasaron a un tubo de rosca previamente pesado. Se recogió por centrifugación el *pellet* para resuspenderse en 1 ml de TCA 20%, para seguidamente eliminar completamente el sobrenadante y obtener por diferencia de pesada la cantidad de *pellet* total recogido en cada muestra. Finalmente, las células se resuspendieron en 100 μ l de TCA 20% almacenándose a -80°C durante al menos 1 hora. Las muestras se descongelaron en hielo mezclándose con 300 μ l de bolas de vidrio (425-600 μ m; *Sigma-Aldrich*), lisándose las células mediante 3 ciclos de 15 segundos a una velocidad de 5,5 en el equipo *FastPrep* (*MPBio*) dejando las células 5 minutos en hielo entre cada ciclo de rotura para así evitar el sobrecalentamiento del contenido. Los tubos de rotura se perforaron en la parte inferior colocándose debajo tubos de recolección limpios recogiendo el lisado mediante centrifugación a 2.000 rpm durante 1 minuto. Las bolas de vidrio se lavaron con 200 μ l de TCA 5% para recuperar los extractos completamente mediante una segunda centrifugación a 3.000 rpm durante 5 minutos sobre el mismo tubo de recolección anterior. El sobrenadante se eliminó completamente y el *pellet* se resuspendió en los volúmenes correspondientes de *2X Sample Buffer* (100 mM Tris-HCl, 4%SDS, 200 mM DTT, 20% Glicerol, trazas de Azul de Bromofenol) y de Tris 2M para neutralizar las muestras (estos volúmenes se calcularon en función del peso del *pellet* en cada muestra, normalizándolas entre ellas para tener la misma concentración proteica).

8.2. *Western-blot*.

El análisis de las proteínas se hizo mediante *Western-blot* separándolas mediante geles de SDS-poliacrilamida al 8% o 10%. Por cada muestra se cargaron entre 40 y 50 μ g de extracto proteico corriéndose a un voltaje constante entre 75 y 100 V utilizando el

sistema de electroforesis *Mini Protean II* (*Bio Rad*) en tampón de carrera Tris-Glicina (Tris-base 3 g/l, Glicina 18,8 g/l, SDS 1 g/l). La electrotransferencia en húmedo a membranas 0,45 µm de PVDF *Hybond* (*GE Healthcare Life science*) se realizó mediante el sistema *Mini-Trans-Blot* (*BioRad*) en tampón CAPS-Metanol (0,01M CAPS, 10% Metanol) durante 60 minutos a 50V/membrana. La membrana con las proteínas ya transferidas se bloqueó con un 10% de leche desnatada en tampón PBS-Tween (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0,01% Tween®20). Posteriormente, la membrana bloqueada se incubó durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario necesario a la concentración deseada diluido en PBS-Tween con 10% de leche desnatada. Al día siguiente la membrana fue lavada 6 veces durante 5 minutos cada lavado con PBS-Tween a temperatura ambiente tras lo cual se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente esta vez con el anticuerpo secundario específico frente al primario usado diluido en PBS-Tween con 10% de leche desnatada. Tras la segunda incubación, la membrana se lavó con PBS-Tween un total de 8 veces con una duración de 5 minutos cada lavado. Por último, se procedió a la detección de los complejos antígeno-anticuerpo sobre la membrana mediante la reacción de quimioluminiscencia desarrollada por la peroxidasa ligada al anticuerpo secundario, añadiéndole el sustrato *Supersignal West Femto Trial kit* (*Pierce Biotechnology*) durante 5 minutos seguido de la exposición a un sistema de adquisición de imagen de *Western-blot* por quimioluminiscencia.

8.3. Concentraciones de anticuerpos utilizados.

Para la detección de proteínas marcadas con los epítomos HA el anticuerpo primario utilizados fue *Rat anti-HA 3F10* (*Roche*, cat nº 11867423001) a una concentración 1:10000 o mientras que para la detección de proteínas con el epítomo MYC se usó el primario *mouse anti-myc 9E10* (*Santa Cruz*, SC-40) a una concentración 1:1000. El anticuerpo *mouse anti-PSTAIRE* (*Sigma Aldrich*, P-7962) se utilizó a una concentración 1:5000.

La concentración de los anticuerpos secundarios fue 1:10000 *Goat anti-rat* (*Santa Cruz*, SC-2006) y 1:5000 *Goat anti-mouse* (*Santa Cruz*, SC2005) y 1:5000 *Mouse anti-rabbit*.

9. Determinación de sensibilidad en placa.

Los ensayos de viabilidad en placa se hicieron a partir de diluciones seriadas en agua estéril de las células de cada cepa a estudiar. Para ello se partió de un cultivo de 100 μ l a una D.O.₆₀₀ de 1 a partir del cual se realizaron 3 diluciones seriadas 1:10 en placas de 96 pocillos. Se utilizó un replicador R2383-1EA (Sigma-Aldrich) para sembrar en torno a 5 μ l de cada dilución en placas de YPD sin y con 100 ng/ μ l de leptomicina, compuesto que provoca el bloqueo de la exportina Crm1 únicamente si esta presenta la mutación T533C. Las células se incubaron a 28°C durante 48 horas.

10. Técnicas de microscopía.

10.1. Preparación de muestras.

En los experimentos de microscopía, las muestras que no podían ser estudiadas en el momento de su recogida se fijaron con paraformaldehído al 4% preservando así su morfología. Además, aquellas muestras que provenían de ensayos de miceliación se trataron con proteinasa K (1 mg/ml) compuesto que degrada las adhesinas de pared las cuales provocan la aglomeración de las hifas. Así, conseguíamos poder estudiar la morfología de las células adecuadamente pudiendo definir de forma correcta su fenotipo. Las células se recogieron por centrifugación resuspendiéndose en 1 ml de paraformaldehído 4% incubándose en agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 100 μ l de PBS. Por último, en aquellas muestras en las que se necesitara separar las aglomeraciones celulares se añadió 1 μ l de proteinasa K incubándose durante al menos 30 minutos a 37°C. Terminados los tratamientos, las células se almacenaron hasta su estudio por microscopía a 4°C.

10.2. Microscopía óptica.

Las células se observaron a través de un microscopio *Leica DM-6000B*, equipado con lentes para óptica *Nomarski* y una cámara de alta resolución acoplada, *CoolSNAP HQ2*

(*Photometrics*) que nos permitió tomar fotografías de las muestras utilizando el software *Metamorph*[®] de adquisición. Las imágenes fueron procesadas con el programa *MetaMorph*[®] (*MDS Analytical Technologies*), *Adobe Photoshop Elements 7.0*. (*Adobe System, Inc*) y *Fiji* (<https://imagej.net/software/fiji/>).

10.3. Microscopía de fluorescencia.

En la observación de proteínas de fusión fluorescentes se empleó el microscopio *Leica DM-6000B* utilizando los filtros específicos para la proteína fluorescente verde (GFP) o roja (mCherry) junto con la cámara de alta resolución acoplada, *CoolSNAP HQ2* (*Photometrics*), y el microscopio *ANDOR Dragonfly Spinning disk Nikon Ti2-E microscope* equipado con una cámara *sCMOS Sona 4.2B-11* junto con el software *ANDOR Fusion software*. Las imágenes fueron procesadas con los programas *MetaMorph* (*MDS Analytical Technologies*), *Fiji* (<https://imagej.net/software/fiji/>) e *Imaris* (*Oxford Instruments*).

10.4. Microscopía confocal: *Time-Lapse*.

Los experimentos de time-lapse se realizaron en cámaras de ocho pocillos μ -Slide 8 Well (iBidi μ -slide) recubiertas previamente con 15 μ l de lectina 5mg/ml (Lectin from Glycine max, Sigma). En cada pocillo se añadían 300 μ l del cultivo de células a estudiar fijándose durante 5 minutos, lavándose 2 veces con el medio de cultivo necesario para el experimento. Finalmente, se añadían 300 μ l de volumen final del medio en las condiciones necesarias para el ensayo suplementado con suero en caso de tener que activar la miceliación. Para estos experimentos se usó nuevamente el microscopio *ANDOR Dragonfly Spinning disk Nikon Ti2-E microscope* equipado con una cámara *sCMOS Sona 4.2B-11* junto con el software *ANDOR Fusion software* dotado, de una campana termostatazada para mantener la temperatura de incubación constante. Las imágenes fueron procesadas con los programas *Fiji* (<https://imagej.net/software/fiji/>) e *Imaris* (*Oxford Instruments*).

Tabla 1. Cepas de *C. albicans* usadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Procedencia
JC1054	<i>nrg1::ARG4/nrg1::URA3</i>	JCB
JC1075	<i>nrg1::URA3/NRG1</i>	JCB
JC1139	<i>nrg1::URA3/nrg1::NRG1-HA::HIS1</i>	JCB
JC1211	<i>NRG1/ARG4::pMET3-NRG1-HA::HIS1</i>	JCB
JC1359	<i>nrg1::URA3/nrg1 7A-HA::ARG4</i>	JCB
JC1370	<i>nrg1::URA3 /NRG1-GFP::ARG4</i>	JCB
JC1398	<i>nrg1::URA3/nrg1 7A-GFP::HIS1</i>	JCB
JC1641	BWP17	Wilson
JC1803	<i>sok1::URA3/sok1::HIS1</i>	Yu Wang
JC1879	<i>sok1::URA3/sok1::HIS1 nrg1-7E-HA::ARG4</i>	JCB
JC2001	<i>sok1::URA3/sok:HIS1 nrg1-7A-HA::ARG4/nrg1::SAT1</i>	JCB
JC2004	<i>sok1:URA3/sok:ARG4 NRG1-HA::HIS1/nrg1::SAT1</i>	JCB
JC2218	<i>pECE1-GFP-HIS1</i>	Esta tesis
JC2273	<i>nrg1::URA3/nrg1-7E-HA::ARG4</i>	Esta tesis
JC2309	<i>URA3::pMET3-nrg1-7A-HA::ARG4</i>	Esta tesis
JC2317	<i>sok1::URA3/sok1::HIS1 hog1::loxP/hog1::loxP</i>	Esta tesis
JC2367	<i>sok1::URA3/sok1::HIS1 NRG1-GFP::ARG4</i>	Esta tesis
JC2407	<i>sok1::URA3/sok1::HIS1</i>	Esta tesis

Estirpe	Genotipo	Procedencia
	<i>nrg1-7E-HA::ARG4/nrg1::SAT1</i>	
JC2459	<i>crm1::LHL/CRM1-URA3 NRG1-GFP::LAL</i>	JCB
JC2460	<i>crm1::LHL/CRM1(T533C)-URA3 NRG1-GFP::LAL</i>	JCB
JC2487	<i>NEUT5L::HIS1-pMAL-GFP(6xGA)-NLS-SOK1 HHF1-cherry:LUL</i>	JCB
JC2491	<i>NEUT5L::HIS1-pMAL-GFP(6xGA)-NLS-3A-SOK1 HHF1-cherry:LUL</i>	JCB
JC2505	<i>HHF1-mCherry::LHL</i>	Esta tesis
JC2593	<i>SOK1-GFP::LAL HHF1-mCherry::LHL</i>	Esta tesis
JC2608	<i>nrg1::URA3/nrg1 7A-GFP::HIS1 HHF1-mCherry::LAL</i>	Esta tesis
JC2609	<i>sok1::URA3/sok1::HIS1 NRG1-HA::ARG4 / nrg1::SAT</i>	Esta tesis
JC2611	<i>nrg1::URA3/NRG1-GFP::ARG4 HHF1-mCherry::LHL</i>	Esta tesis
JC2640	<i>crm1::loxP/crm1T533c::URA3 NRG1-GFP::loxP NRG1-HA::loxP</i>	Esta tesis
JC2756	<i>sok1::URA3/sok1::HIS1 nrg1-7A-GFPg::loxP/nrg1::LAL</i>	Esta tesis
JC2802	<i>sok1::LHL SOK1-MYC::LAL</i>	Esta tesis
JC2895	<i>NRG1-HA::HIS1/nrg1::URA3 BRG1-MYC::loxP BRG1-MYC::loxP</i>	Esta tesis
JC2896	<i>nrg1-7A-HA::ARG4/nrg1::URA3 BRG1-MYC::loxP BRG1-MYC::loxP</i>	Esta tesis
JC2897	<i>sok1::HIS1 sok1::loxP nrg1-7A::ARG4/nrg1::loxP BRG1-MYC::loxP BRG1-MYC::loxP</i>	Esta tesis

Estirpe	Genotipo	Procedencia
JC2900	<i>nrg1::URA3 NRG1-HA-HIS1 BRG1-GFP-LAL</i>	Esta tesis
JC2903	<i>sok1::HIS/ sok1::lox nrg1-HA::ARG4/nrg1::lox BRG1-GFP-Lox</i>	Esta tesis
JC2917	<i>nrg1::URA/ nrg1-7A-HA-ARG4 BRG1-GFP-LHL</i>	Esta tesis
JC2931	<i>sok1::HIS1/sok1::lox NRG1-7A-HA- ARG4/nrg1::lox BRG1-GFP-LUL</i>	Esta tesis
JC2942	<i>sok1::HIS1/ sok1::loxP nrg1-HA::ARG4/nrg1::loxP BRG1-MYC::loxP BRG1-MYC::loxP</i>	Esta tesis

Tabla 2. Plásmidos empleados en la tesis.

Nombre	Tipo	Procedencia
pFA-GFP γ -LAL	Etiquetado con GFP	(Dueñas-Santero et al.,2019)
pFA-GFP γ -LHL	Etiquetado con GFP	(Dueñas-Santero et al.,2019)
pFA-GFP γ -LUL	Etiquetado con GFP	(Dueñas-Santero et al.,2019)
pFA-GFP γ -URA3-Clox	Etiquetado con GFP	(Dueñas-Santero et al.,2019)
pFA-HA-LAL	Etiquetado con HA	(Dueñas-Santero et al.,2019)
pFA-HA-LHL	Etiquetado con HA	(Dueñas-Santero et al.,2019)
pFA-HA-LUL	Etiquetado con HA	(Dueñas-Santero et al.,2019)
pFA-HA-NAT1-Clox	Etiquetado con HA	(Dueñas-Santero et al.,2019)
pFA-HA-URA3-Clox	Etiquetado con HA	(Dueñas-Santero et al.,2019)
pFA-LAL	Disrupción génica	(Dueñas-Santero et al.,2019)
pFA-LHL	Disrupción génica	(Dueñas-Santero et al.,2019)
pFA-LUL	Disrupción génica	(Dueñas-Santero et al.,2019)
pFA-mCherry-LAL	Etiquetado con mCherry	(Dueñas-Santero et al.,2019)
pFA-mCherry-LHL	Etiquetado con mCherry	(Dueñas-Santero et al.,2019)

Nombre	Tipo	Procedencia
pFA-mCherry-LUL	Etiquetado con mCherry	(Dueñas-Santero et al., 2019)
pFA-mCherry-NAT1-Clox	Etiquetado con mCherry	(Dueñas-Santero et al., 2019)
pFA-mCherry-URA3-Clox	Etiquetado con mCherry	(Dueñas-Santero et al., 2019)
pFA-MYC-LAL	Etiquetado con MYC	(Dueñas-Santero et al., 2019)
pFA-MYC-LHL	Etiquetado con MYC	(Dueñas-Santero et al., 2019)
pFA-MYC-LUL	Etiquetado con MYC	(Dueñas-Santero et al., 2019)
pFA-MYC-NAT1-Clox	Etiquetado con MYC	(Dueñas-Santero et al., 2019)
pFA-MYC-URA3-Clox	Etiquetado con MYC	(Dueñas-Santero et al., 2019)
pFA-NAT1-Clox	Disrupción génica	(Dueñas-Santero et al., 2019)
pFA-URA3-Clox	Disrupción génica	(Dueñas-Santero et al., 2019)
pFA-ARG4	Disrupción génica	(Gola et al., 2003)
pFA-ARG4-MAL2p	Cambio promotor	(Gola et al., 2003)
pFA-GFP-ARG4	Etiquetado con GFP	(Gola et al., 2003)
pFA-GFP-HIS1	Etiquetado con GFP	(Gola et al., 2003)
pFA-GFP-URA3	Etiquetado con GFP	(Gola et al., 2003)
pFA-HIS1	Disrupción génica	(Gola et al., 2003)
pFA-HIS1-MAL2p	Cambio promotor	(Gola et al., 2003)

Nombre	Tipo	Procedencia
pFA-HIS1-MET3prom	Cambio promotor	(Gola et al., 2003)
pFA-URA3	Disrupción génica	(Gola et al., 2003)
pFA-URA3-MET3prom	Cambio promotor	(Gola et al., 2003)
pFA-HA-ARG4	Etiquetado con HA	(Lavoie et al., 2008)
pFA-HA-HIS1	Etiquetado con HA	(Lavoie et al., 2008)
pFA-HA-URA3	Etiquetado con HA	(Lavoie et al., 2008)
pFA-MYC-ARG4	Etiquetado con GFP	(Lavoie et al., 2008)
pFA-SAT	Disrupción génica	(Schaub et al., 2006)
pFA-SAT1-pMET3	Cambio promotor	(Schaub et al., 2006)
pFA-NAT1-Clox-TDH3prom	Cambio promotor	Carlos Vázquez
pFA-URA3-Clox-TDH3prom	Cambio promotor	Carlos Vázquez
pFA-nrg1-7A-HA-ARG4-3'UTR	Síntesis génica	Jaime Correa
pFA-nrg1-7A-HA-URA3	Síntesis génica	Jaime Correa
pFA-nrg1-7E-HA::ARG4-3'UTR	Síntesis génica	Jaime Correa

Tabla 3.1. Cebadores usados en este trabajo: delección de genes.

Nombre	Secuencia	Número
S1-NRG1	AGAATCTGAAACAGGTATTATATAAATAACAAATAAACATC GTTATCCTGTTTCTCATCTCAAATTTTTCCCTGCTAGTTTCAT TAAGAATCAAACAATGAagcttcgtacgctgcaggtc	#768
S2-NRG1	TTTGGAGGTAAGTATATTAGAAAAAGAACCTATACATGA ACCAGTAACCATAACAAAAAACTAAACCCAAGCAATTA ACCATCAAATTTAACCCtctgatatcatcgatgaattcgag	#769
HOG1	ATTCAAGTCGTCTTTGAAAACATACACCGTGGAATAATAACA ACAACATTTTAAACAAGTTATAGAAAGAAAATTTTTACAAAG ATAAAAGCATATAAGAAGAagcttcgtacgctgcaggtc	#905
HOG1	ATATATTTAATCAAATTAATAATGTAAAGTTAATAGTAATA GTAATAGTAATACATATTTCACTTTTAAATTTATTTCTATAATT GCTAGCTTGTATTTTTGAAGTCTGatcatcgatgaattcgag	#906
S1-SOK1	CATTCAATAACACCGGTAATTTTATTGAAGCTAAGTTTTACT CACTATTCATTAATACCCACTTTCTAATATAGCACAAACACAGT TTACATATTAAGGgaagcttcgtacgctgcaggtc	#1082
S2-SOK1	CAGTTAACAACCCCTTCCAACCACCGAAGAACGATTCCAA CAGGCAATATTTATAATATAATGTAATGTGAAATAATATTAA TATATATATGTATGAGtctgatcatcgatgaattcgag	#1083
S1-NEUT5L	GTAAGAATGACAAGTATCAGTTGAGAAAAAAGTAACAAAG AGAAAGCTCGGAGGAGGCTCCCCAAAGTTTTATCACCAAT GGTGGTACCACTAACCCAgagcttcgtacgctgcaggtc	#1382
S2-NEUT5L	CCCCTGAATTCTACATCGAACAAGAGAAACCTTTTTTTTAC TTTTTTCAAACCTGAACAAAGAAAAGAAAAAGAAAAAGAAA AAGCAATCACAGCTTAgactcactatagggagaccgg	#1383
S1-BRG1	TTAATAATTGGTACTACTGTTTCATATTTGATATTTCAACGTTA TTTCTCCATCCATACTGTTACATTATAAATATTCATCTACTATT CCAGAAATTCAAATGgaagcttcgtacgctgcaggtc	#1552
S2-BRG1	ACTGTAGCAGAAAACAAAGAATGTGCAAAAAATTAATTA AACTATTTAATGACGAATTAAGGAATTTGGGTTGGGTAA GCAACAGGAATACCGCCAtctgatcatcgatgaattcgag	#1553

Tabla 3.2. Cebadores usados en este trabajo: marcaje de genes.

Nombre	Secuencia	Número
S1-pECE1-GFP	AAATAACCCACCTATTTCAAATTGTTTTATTTTGTATCTC TACAACAAACAACCTTTCCTTTATTTACTACCAACTATTTTCCA TTCGTTAAATGggtgctggcgcaggtgcttc ATTTCCATTCGTTAAATGGGTGCTGGCGCAGGTGCTTC	#367
S2-pECE1-GFP	AAGCAATTC AACACCACCACAAAAACAACATTA AAAAAA TCAGTTACAGCAAAAGTGTCACAAGACTTATGGAATAAAAG ATTAAGCTTGGA AACtctgatcatcatgatgaattcgag	#368
S1-NRG1-HA	CAAGACTCATACCAATGGGAAAAACAACGCAACAGACAAC AACACAGGACTTTAGAAGCTTCACATGTTGGAACAAAATAC AACACCAAGAGCCTAGTACCCggttaccatacaggttcc	#864
S2-NRG1-HA	ACTCAAATTCGTGTACTTTGCTTATGCCAGATACTTAGCACT GGGAAATTGTTACAACCCCATTTCTGGAATGT AACGTCACC TGAAACCATCTTATGTCATCGATGAATTCGAGCTCGTT	#865
S1-NRG1-GFP	CAAGACTCATACCAATGGGAAAAACAACGCAACAGACAAC AACACAGGACTTTAGAAGCTTCACATGTTGGAACAAAATAC AACACCAAGAGCCTAGTAggtgctggcgcaggtgcttc	#902
S2-NRG1-HA/GFP	TTTTGATATTTATAATAATAGGTCACCTGTTTTGAGTATTTCC TACAGGGACTTTTATTTTCATAAGGTGGATATGCTATCACTT GGTCTGATATCATCGATGAATTCGAG	#904
S2-SOK1	CAGTTAACAAACCCTTCCAACCACCAGAAGAAACGATTCCAA CAGGCAATATTTATAATATAATGTAATGTGAAATAATATTA TATATATATGTATGAGtctgatcatcatgatgaattcgag	#1083
S1-SOK1-GFP	GATGATAATAAAGCCAATAATACTAATCCAACATCTCATCGT GGTGGTAAAATAATTCAAACATTGATAATACTACTTCAGCC CCATTAAGTATGTTATCAGGTGCTGGCGCAGGTGCTTC	#1084
S2-SOK1-3xGFP	CCTAAATATTAATTAATTTAACAAAAAAGGAAAAGAAAA GAAAAACCGTAAAATAAACGTAAGGAAAAATAAAAAACATT	#1317

Nombre	Secuencia	Número
	TCTTTATTTTTTTAATTGGTGGggatctgatcatcgatgaattcga gctcg	
S2-CRM1	GTAAATTTAATTTAGTGATATTAATAAAGTGGTAATAAAAC TCTTTTGTAGGCTTTTTGGGGTGGGGAAAGTCAACTGTA GAACTAGAAGGTTTCctgatcatcgatgaattcga	#1379
S1-SOK1-MYC	ATAATAAGCCAATAATACTAATCCAACATCTCATCGTGGTG GTGAAAATAATTCAAACATTGATAATACTACTTCAGCCCCAT TAAGTATGTTATCACCCGGGAACAGAAGCTTATATCC	#1398
S1-HHF1-GFP	TGTTACTTACTGAAACACGCTAAAAGAAAAACCGTCACTTC ATTGGATGTTGTTTACGCTTTGAAGAGACAAGGTAGAACCTT GTATGGTTTCGGTGGTggtgctggcgcaggtgcttc	#1410
S2-HHF1	CATTTTACTAGGCAACTGACTTTGCCACTAAGAAGTAGGAAA ATCCTCACCCCTTTTCATACTACAACCTAAATGATATTTTCA AAACGTTATACtctgatcatcgatgaattcga	#1411
S1-CRM1-MYC	GCTGAAGATAAAACAATAGAAAGAGAAGAACAAGATAGAT TACAAAGAGAACGAGACATGCAAGTTGGTGGGTTAATTAGA CCTTCTGAAATGGATGACGAAgaagcttcgtacgtgcaggtc	#1450
S2-BRG1	ACTGTAGCAGAAAACAAAGAATGTGCAAAAAATTAATTA AACTATTTAATGACGAATTAAGGAATTTGGGTGGGTAA GCAACAGGAATACCGCCAtctgatcatcgatgaattcga	#1553
S1-BRG1-MYC	TTGATGCACGGCCAATATCCAACAATGTGAACAATCTTGTC ATTCATCAACCACCACCACAACAACAACAACAACAGCAA CACAACAACATATGTgaagcttcgtacgtgcaggtc	#1554
S1-BRG1-GFP	TTGATGCACGGCCAATATCCAACAATGTGAACAATCTTGTC ATTCATCAACCACCACCACAACAACAACAACAACAGCAA CACAACAACATATGTggtgctggcgcaggtgcttc	#1597

Tabla 3.3. Cebadores usados en este trabajo: comprobaciones de integración.

Nombre	Secuencia	Número
<i>G2-ECE1</i>	CCCCAGACGTTGGTTGCAAAC	#370
<i>X2-SAT1</i>	GCACACACTACTTAATATACACAGC	#519
<i>X3-SAT1</i>	GTGAAGTGTGAAGGGGGAG	#521
<i>X2-CaARG4</i>	AATGGATCAGTGGCACCGGTG	#543
<i>X3-CaARG4</i>	GCTCTTGGTGGTACTGCTAAAAGTGCCG	#544
<i>X2-CaURA3</i>	GTGTTACGAATCAATGGCACTACAGC	#545
<i>X3-CaURA3</i>	GGAGTTGGATTAGATGATAAAGGTGATGG	#546
<i>X2-CaHIS1</i>	CAACGAAATGGCCTCCCCTACCACAG	#547
<i>X3-CaHIS1</i>	GGACGAATTGAAGAAAGCTGGTGCAACCG	#548
<i>G1-NRG1</i>	CCCCTCCTTGCTTTCATCTTGTTGTCAC	#770
<i>G2-NRG1</i>	GGCCCTGGAATATAATACTCCTGTAG	#771
<i>NRG1-S1</i>	GCAACCCCAACAAACTAC	#828
<i>NRG1-S2</i>	CCCAAGAAGAAAACACG	#829
<i>G4-NRG1</i>	CCACGATGGCCAAAAGAAATCTAAAGTTGGC	#866
<i>GST-Sall-NRG1</i>	gctagtgcacttaCGATCTCGAACACACTTGCAGACGTG	#961
<i>G2-SOK1</i>	GTTACACCTGATTTAACCCTCTCG	#1085
<i>G1-SOK1</i>	CACTAACACACACTCACACTAACACATTC	1086#
<i>X3-GFP</i>	CCAATTGGCGATGGCCCTGTCCT	#1163
<i>G2-NRG1-Sec</i>	CATGCATTTACTTATAATGGCGCGCCTA	#1186

Nombre	Secuencia	Número
X2-NAT1	CGATACTAACGCCGCATCC	#1258
Cre1-F	CCGGTGCTATGGTTAGATTGTTGG	#1259
CRM1-Seq7	CTCAACCAGATCATAAAGCAGGAT	#1395
CRV2353 G1-NEUT5L	TGCTGAATCACTTGATAGGATTTAGTTCC	#1400
CRV2377 G02-NEUT5L	CACGACCTTGGAGTGATCTTTTTTC	#1401
G2-HHF1	CGACAAAGATGAAGACATGAAAG	#1412
G2-BRG1	TTCGGTTTGATCCAGCTCAGG	#1556
G1-BRG1	GGTCATAGATCCCTGAAAATCTC	#1557

Tabla 3.4. Cebadores usados en este trabajo: comprobación internos del gen.

Nombre	Secuencia	Número
I1-NRG1	CCACCACCATATCCAATGAGCTCGC	#403
I2-NRG1	CCAGTATGGATACGATTGTGTCTAGCTAA	#404
I1-SOK1	CCGCCACCAACAATACAGC	#1098
I2-SOK1	CCGTTTGCCGCGTTCACCA	#1099
I1-HOG1	TTGTGGTCTGTGGGTTGTATC	#1326
I2-HOG1	CTGGCAAGTCTGCGTCATTA	#1327
I3-SOK1	GAAGTGC GGAAAGAATGTCAAG	#1328
I4-SOK1	CGGGCATCAGCTCTCAATAA	#1329

Tabla 3.5. Cebadores usados en este trabajo: cambio de promotor.

Nombre	Secuencia	Número
S1-MET3- NRG1	AAAATATCAAAAATAATCCTATTATCAGTTATTATATACTAG GATTTGTTATTACAATTTGCTTTACAAGAGAAACCTCATTGTT CAAGTATCTTCCAGAAGAagcttcgtacgtgcaggtc	#885
S2-MET3- NRG1	ACAACGTGCAACCACCGTCAATTATAGAAGCTGTGGATGTA CTACCAGCAGCACTAGCATTAAATAACTTATTTGTTATTGGA ATATGATTGTTGATAAAGCATGTtttctggggagggtatttac	#886
S1-SOK1	CATTCAATAACACCGGCTAATTTTATTGAAGCTAAGTTTTACT CACTATTCATATTACCCACTTCTAATATAGCACAAACACAGT TTACATATTAAGGaaagcttcgtacgtgcaggtc	#1082
S2-pMAL2- SOK1	CAGCAGCAGCAGTAGCTGAAGCTGGTGATGAAGCAGTGGC AATATTGTATCCTGTTGCTGTTGTTGTTGTTGTAATGTTGT CCATTTGTTGAAGTCATcattgtagttgattattagtaaaccac	#1095
S1-BRG1	TTAATAATTGGTACTACTGTTTCATATTTGATATTTCAACGTTA TTTCTCCATCCATACTTGTACATTATAAATATTCACTACTATT CCAGAAATTCAAATTgaagcttcgtacgtgcaggtc	#1552
S2-pMET- BRG1	TGGTTGATCGTGAAGTCAATTCATTATTGATGGTAAACGAA TACGTGCACTGTTGTTGTTGTCAGTAGTAGTAGATGAAGAT AAAGATGATGAACTGGAcattgttttctggggagggtattta	#1598
S2-pTDH3- BRG1	TGGTTGATCGTGAAGTCAATTCATTATTGATGGTAAACGAA TACGTGCACTGTTGTTGTTGTCAGTAGTAGTAGATGAAGAT AAAGATGATGAACTGGACATTGTTAATTAATTTGATTGTA GTTTGTGATG	#1599

Tabla 3.6. Cebadores usados en este trabajo: qPCRs y RT-qPCRs.

Nombre	Secuencia	Número
pALS3-A6-fwd	ATGAGCCAAACAATCCGAAGC	#1604
pALS3-A6-rev	ATCAAAAAGTGGGCAACCAGC	#1605
pALS3-A8-fwd	GTCCGCCATTTTCGTATTCG	Andrés Clemente (#742)
pALS3-A8-rev	TCAGACCTCAATTCAAGGGAG	Andrés Clemente (#743)

Nombre	Secuencia	Número
<i>pECE1-E6-fwd</i>	GTTGTATAGTTGTATGACGCC	#1642
<i>pECE1-E6-rev</i>	GGGCTTTACAAGTTTAGGCGC	#1643
<i>pHWP1-H3-Fwd</i>	TACGTTGTTGTTGTCCTCGTC	#1562
<i>pHWP1-H3-Rev</i>	GCATCAGGAAAAACCTTAGCC	#1563
<i>pBRG1-B6-fwd</i>	ACAAAGTGAACGGGACTACGG	#1600
<i>pBRG1-B6-rev</i>	TGGTTTGCCCTTCGGATTTTC	#1601
<i>ECE1-fwd- RT-qPCR</i>	CCATGACTTCTGTTGCTTCT	#966
<i>ECE1-rev-RT-qPCR</i>	ATCTGGAACGCCATCTCTCT	#967
<i>HWP1-fwd-RT-qPCR</i>	AGTTTCTACTGCTCCAGCCACT	Carlos Vázquez (#1610)
<i>HWP1-rev-RT-qPCR</i>	CGGTACAAGAGCTTTCAGAACA	Carlos Vázquez (#1611)
<i>ALS3-fwd-RT-qPCR</i>	CCAGGTGGAAGTACTGATACTGTGA	Carlos Vázquez (#1614)
<i>ALS3-rev-RT-qPCR</i>	ACAACCTTTATCACCTTCACAGC	Carlos Vázquez (#1621)
<i>BRG1-fwd-RT-qPCR</i>	AATAAAGTCTACCGTTGGCGG	Andrés Clemente (#953)
<i>BRG1-rev-RT-PCR</i>	AGGAGGTAATTGTGGCTGTTG	Andrés Clemente (#954)
<i>ACT1-fwd-RT-PCR</i>	CGATAACGGTCTGGTATGTG	Andrés Clemente (#746)
<i>ACT1-rev-RT-PCR</i>	TTTGGATTGGGCTTCATCACC	Andrés Clemente (#747)
<i>CDC3-fwd</i>	GCCATTGGTGAAAGTGGATT	Carlos Vázquez (#2169)

Nombre	Secuencia	Número
<i>RCDC3-rev</i>	TCAAATTCATCGGAATCGTG	Carlos Vázquez (#2170)
<i>Cdc12-RTu</i>	AAAGAGGGTGCCACATTAC	Carlos Vázquez (#2175)
<i>Cdc12-RTd</i>	CTTGGCTCTTGGTGTGGTTT	Carlos Vázquez (#2176)

Tabla 3.7. Cebadores usados en este trabajo: secuenciación.

Nombre	Secuencia	Número
<i>M1-NRG1-Sall</i>	GCTAGTCGACACAGCTTCTATAATTGACGGTGGTTGCAC	#772

BIBLIOGRAFÍA

-
- [1] B. M. Martins and J. C. Locke, "Microbial individuality: how single-cell heterogeneity enables population level strategies," *Curr Opin Microbiol*, vol. 24, pp. 104–112, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.mib.2015.01.003.
- [2] S. M. Noble, B. A. Gianetti, and J. N. Witchley, "Candida albicans cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host.," *Nat Rev Microbiol*, vol. 15, no. 2, pp. 96–108, Feb. 2017, doi: 10.1038/nrmicro.2016.157.
- [3] F. Bongomin, S. Gago, R. Oladele, and D. Denning, "Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision," *Journal of Fungi*, vol. 3, no. 4, p. 57, Oct. 2017, doi: 10.3390/jof3040057.
- [4] M. C. Arendrup, "Epidemiology of invasive candidiasis," *Curr Opin Crit Care*, vol. 16, no. 5, pp. 445–452, Oct. 2010, doi: 10.1097/MCC.0b013e32833e84d2.
- [5] M. Puig-Asensio *et al.*, "Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in Candida bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 20, no. 4, pp. O245–O254, Apr. 2014, doi: 10.1111/1469-0691.12380.
- [6] P. E. Sudbery, "Growth of Candida albicans hyphae," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 9, no. 10, pp. 737–748, Oct. 2011, doi: 10.1038/nrmicro2636.
- [7] D. L. Moyes *et al.*, "A Biphasic Innate Immune MAPK Response Discriminates between the Yeast and Hyphal Forms of Candida albicans in Epithelial Cells," *Cell Host Microbe*, vol. 8, no. 3, pp. 225–235, Sep. 2010, doi: 10.1016/j.chom.2010.08.002.
- [8] Q. T. Phan *et al.*, "Als3 Is a Candida albicans Invasin That Binds to Cadherins and Induces Endocytosis by Host Cells," *PLoS Biol*, vol. 5, no. 3, p. e64, Feb. 2007, doi: 10.1371/journal.pbio.0050064.
- [9] H.-J. Lo, J. R. Köhler, B. DiDomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti, and G. R. Fink, "Nonfilamentous C. albicans Mutants Are Avirulent," *Cell*, vol. 90, no. 5, pp. 939–949, Sep. 1997, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80358-X.

- [10] J. N. Witchley, P. Penumetcha, N. V. Abon, C. A. Woolford, A. P. Mitchell, and S. M. Noble, "Candida albicans Morphogenesis Programs Control the Balance between Gut Commensalism and Invasive Infection," *Cell Host Microbe*, vol. 25, no. 3, pp. 432–443.e6, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.chom.2019.02.008.
- [11] D. R. Soll, "Why does *Candida albicans* switch?," *FEMS Yeast Res*, vol. 9, no. 7, pp. 973–989, Nov. 2009, doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00562.x.
- [12] M. B. Lohse and A. D. Johnson, "White–opaque switching in *Candida albicans*," *Curr Opin Microbiol*, vol. 12, no. 6, pp. 650–654, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.mib.2009.09.010.
- [13] A. Johnson, "The biology of mating in *Candida albicans*," *Nat Rev Microbiol*, vol. 1, no. 2, pp. 106–116, Nov. 2003, doi: 10.1038/nrmicro752.
- [14] R. E. Zordan, M. G. Miller, D. J. Galgoczy, B. B. Tuch, and A. D. Johnson, "Interlocking Transcriptional Feedback Loops Control White-Opaque Switching in *Candida albicans*," *PLoS Biol*, vol. 5, no. 10, p. e256, Sep. 2007, doi: 10.1371/journal.pbio.0050256.
- [15] M. N. Qasim, A. Valle Arevalo, C. J. Nobile, and A. D. Hernday, "The Roles of Chromatin Accessibility in Regulating the *Candida albicans* White-Opaque Phenotypic Switch," *Journal of Fungi*, vol. 7, no. 1, p. 37, Jan. 2021, doi: 10.3390/jof7010037.
- [16] N. A. R. Gow, "A developmental program for *Candida* commensalism," *Nat Genet*, vol. 45, no. 9, pp. 967–968, Sep. 2013, doi: 10.1038/ng.2737.
- [17] K. Pande, C. Chen, and S. M. Noble, "Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism," *Nat Genet*, vol. 45, no. 9, pp. 1088–1091, Sep. 2013, doi: 10.1038/ng.2710.
- [18] D. L. Moyes, J. P. Richardson, and J. R. Naglik, "*Candida albicans*- epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface," *Virulence*, vol. 6, no. 4, pp. 338–346, May 2015, doi: 10.1080/21505594.2015.1012981.

-
- [19] C. J. Nobile *et al.*, "A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*," *Cell*, vol. 148, no. 1–2, pp. 126–138, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.cell.2011.10.048.
- [20] F. L. Mayer, D. Wilson, and B. Hube, "*Candida albicans* pathogenicity mechanisms," *Virulence*, vol. 4, no. 2, pp. 119–128, Feb. 2013, doi: 10.4161/viru.22913.
- [21] C. J. Nobile and A. D. Johnson, "*Candida albicans* Biofilms and Human Disease," *Annu Rev Microbiol*, vol. 69, no. 1, pp. 71–92, Oct. 2015, doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104330.
- [22] M. Adnan *et al.*, "SNARE Protein Snc1 Is Essential for Vesicle Trafficking, Membrane Fusion and Protein Secretion in Fungi," *Cells*, vol. 12, no. 11, p. 1547, Jun. 2023, doi: 10.3390/cells12111547.
- [23] A. K. Lancaster, A. Nutter-Upham, S. Lindquist, and O. D. King, "PLAAC: a web and command-line application to identify proteins with prion-like amino acid composition," *Bioinformatics*, vol. 30, no. 17, pp. 2501–2502, Sep. 2014, doi: 10.1093/bioinformatics/btu310.
- [24] C. Frazer *et al.*, "Epigenetic cell fate in *Candida albicans* is controlled by transcription factor condensates acting at super-enhancer-like elements," *Nat Microbiol*, vol. 5, no. 11, pp. 1374–1389, Jul. 2020, doi: 10.1038/s41564-020-0760-7.
- [25] S. Biswas, P. Van Dijck, and A. Datta, "Environmental Sensing and Signal Transduction Pathways Regulating Morphopathogenic Determinants of *Candida albicans*," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 71, no. 2, pp. 348–376, Jun. 2007, doi: 10.1128/MMBR.00009-06.
- [26] Q. Feng, E. Summers, B. Guo, and G. Fink, "Ras Signaling Is Required for Serum-Induced Hyphal Differentiation in *Candida albicans*," *J Bacteriol*, vol. 181, no. 20, pp. 6339–6346, Oct. 1999, doi: 10.1128/JB.181.20.6339-6346.1999.
- [27] E. Leberer *et al.*, "Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus

- Candida albicans*,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 93, no. 23, pp. 13217–13222, Nov. 1996, doi: 10.1073/pnas.93.23.13217.
- [28] D. Kadosh and A. D. Johnson, “Induction of the *Candida albicans* Filamentous Growth Program by Relief of Transcriptional Repression: A Genome-wide Analysis,” *Mol Biol Cell*, vol. 16, no. 6, pp. 2903–2912, Jun. 2005, doi: 10.1091/mbc.e05-01-0073.
- [29] Y. Fu *et al.*, “*Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway,” *Mol Microbiol*, vol. 44, no. 1, pp. 61–72, Apr. 2002, doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02873.x.
- [30] J. F. Staab, Y.-S. Bahn, C.-H. Tai, P. F. Cook, and P. Sundstrom, “Expression of Transglutaminase Substrate Activity on *Candida albicans* Germ Tubes through a Coiled, Disulfide-bonded N-terminal Domain of Hwp1 Requires C-terminal Glycosylphosphatidylinositol Modification,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 39, pp. 40737–40747, Sep. 2004, doi: 10.1074/jbc.M406005200.
- [31] D. L. Moyes *et al.*, “Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection,” *Nature*, vol. 532, no. 7597, pp. 64–68, Apr. 2016, doi: 10.1038/nature17625.
- [32] C. Cao *et al.*, “Global regulatory roles of the c <sc>AMP/PKA</sc> pathway revealed by phenotypic, transcriptomic and phosphoproteomic analyses in a null mutant of the <sc>PKA</sc> catalytic subunit in <sc>C</sc> *andida albicans*,” *Mol Microbiol*, vol. 105, no. 1, pp. 46–64, Jul. 2017, doi: 10.1111/mmi.13681.
- [33] A. Sonneborn, D. P. Bockmuhl, M. Gerads, K. Kurpanek, D. Sanglard, and J. F. Ernst, “Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*,” *Mol Microbiol*, vol. 35, no. 2, pp. 386–396, Jan. 2000, doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01705.x.
- [34] V. R. Stoldt, A. Sonneborn, C. E. Leuker, and J. F. Ernst, “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*, vol. 16, no. 8, pp. 1982–1991, Apr. 1997, doi: 10.1093/emboj/16.8.1982.
- [35] V. E. Glazier, “EFG1, Everyone’s Favorite Gene in *Candida albicans*: A Comprehensive Literature Review,” *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 12, Mar. 2022, doi: 10.3389/fcimb.2022.855229.
- [36] B. R. Braun, D. Kadosh, and A. D. Johnson, “NRG1, a repressor of filamentous growth in *C.albicans*, is down-regulated during filament induction.,” *EMBO J*, vol. 20, no. 17, pp. 4753–61, Sep. 2001, doi: 10.1093/emboj/20.17.4753.
- [37] B. R. Braun and A. D. Johnson, “Control of Filament Formation in *Candida albicans* by the Transcriptional Repressor TUP1,” *Science (1979)*, vol. 277, no. 5322, pp. 105–109, Jul. 1997, doi: 10.1126/science.277.5322.105.
- [38] D. Kadosh and A. D. Johnson, “Rfg1, a Protein Related to the *Saccharomyces cerevisiae* Hypoxic Regulator Rox1, Controls Filamentous Growth and Virulence in *Candida albicans*,” *Mol Cell Biol*, vol. 21, no. 7, pp. 2496–2505, Apr. 2001, doi: 10.1128/MCB.21.7.2496-2505.2001.
- [39] S. García-Sánchez *et al.*, “Global Roles of Ssn6 in Tup1- and Nrg1-dependent Gene Regulation in the Fungal Pathogen, *Candida albicans*,” *Mol Biol Cell*, vol. 16, no. 6, pp. 2913–2925, Jun. 2005, doi: 10.1091/mbc.e05-01-0071.
- [40] R. S. Wakade, L. C. Ristow, M. Wellington, and D. J. Krysan, “Intravital imaging-based genetic screen reveals the transcriptional network governing *Candida albicans* filamentation during mammalian infection,” *Elife*, vol. 12, Feb. 2023, doi: 10.7554/eLife.85114.
- [41] O. R. Homann, J. Dea, S. M. Noble, and A. D. Johnson, “A Phenotypic Profile of the *Candida albicans* Regulatory Network,” *PLoS Genet*, vol. 5, no. 12, p. e1000783, Dec. 2009, doi: 10.1371/journal.pgen.1000783.
- [42] Y.-N. Park and J. Morschhäuser, “Tetracycline-Inducible Gene Expression and Gene Deletion in *Candida albicans*,” *Eukaryot Cell*, vol. 4, no. 8, pp. 1328–1342, Aug. 2005, doi: 10.1128/EC.4.8.1328-1342.2005.

- [43] S. P. Saville *et al.*, "Inhibition of Filamentation Can Be Used To Treat Disseminated Candidiasis," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 50, no. 10, pp. 3312–3316, Oct. 2006, doi: 10.1128/AAC.00628-06.
- [44] Y. Lu, C. Su, and H. Liu, "Candida albicans hyphal initiation and elongation," *Trends in Microbiology*, vol. 22, no. 12. Elsevier Ltd, pp. 707–714, Dec. 01, 2014. doi: 10.1016/j.tim.2014.09.001.
- [45] Y. Lu, C. Su, A. Wang, and H. Liu, "Hyphal development in Candida albicans requires two temporally linked changes in promoter chromatin for initiation and maintenance," *PLoS Biol*, vol. 9, no. 7, Jul. 2011, doi: 10.1371/journal.pbio.1001105.
- [46] F. Cao *et al.*, "The Flo8 Transcription Factor Is Essential for Hyphal Development and Virulence in *Candida albicans*," *Mol Biol Cell*, vol. 17, no. 1, pp. 295–307, Jan. 2006, doi: 10.1091/mbc.e05-06-0502.
- [47] D. P. Bockmühl and J. F. Ernst, "A Potential Phosphorylation Site for an A-Type Kinase in the Efg1 Regulator Protein Contributes to Hyphal Morphogenesis of *Candida albicans*," *Genetics*, vol. 157, no. 4, pp. 1523–1530, Apr. 2001, doi: 10.1093/genetics/157.4.1523.
- [48] I. A. Cleary, A. L. Lazzell, C. Monteagudo, D. P. Thomas, and S. P. Saville, "BRG1 and NRG1 form a novel feedback circuit regulating Candida albicans hypha formation and virulence," *Mol Microbiol*, vol. 85, no. 3, pp. 557–573, Aug. 2012, doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08127.x.
- [49] Y. Lu, C. Su, O. Unoje, and H. Liu, "Quorum sensing controls hyphal initiation in Candida albicans through Ubr1-mediated protein degradation," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 111, no. 5, pp. 1975–1980, Feb. 2014, doi: 10.1073/pnas.1318690111.
- [50] M. P. Ward and S. Garrett, "Suppression of a Yeast Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Defect by Overexpression of *SOK1*, a Yeast Gene Exhibiting Sequence Similarity to a Developmentally Regulated Mouse Gene," *Mol Cell Biol*, vol. 14, no. 9, pp. 5619–5627, Sep. 1994, doi: 10.1128/mcb.14.9.5619-5627.1994.

-
- [51] R. Jin, C. J. Dobry, P. J. McCown, and A. Kumar, "Large-Scale Analysis of Yeast Filamentous Growth by Systematic Gene Disruption and Overexpression," *Mol Biol Cell*, vol. 19, no. 1, pp. 284–296, Jan. 2008, doi: 10.1091/mbc.e07-05-0519.
- [52] J. M. Hornby *et al.*, "Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol," *Appl Environ Microbiol*, vol. 67, no. 7, pp. 2982–2992, Jul. 2001, doi: 10.1128/AEM.67.7.2982-2992.2001.
- [53] Y. Lu, C. Su, and H. Liu, "A GATA transcription factor recruits Hda1 in response to reduced Tor1 signaling to establish a hyphal chromatin state in *Candida albicans*," *PLoS Pathog*, vol. 8, no. 4, Apr. 2012, doi: 10.1371/journal.ppat.1002663.
- [54] X. Mao, F. Cao, X. Nie, H. Liu, and J. Chen, "The Swi/Snf chromatin remodeling complex is essential for hyphal development in *Candida albicans*," *FEBS Lett*, vol. 580, no. 11, pp. 2615–2622, May 2006, doi: 10.1016/j.febslet.2006.04.009.
- [55] S. Khorasanizadeh, "The Nucleosome," *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 259–272, Jan. 2004, doi: 10.1016/S0092-8674(04)00044-3.
- [56] Y. Lu, C. Su, X. Mao, P. Palaraniga, H. Liu, and J. Chen, "Efg1-mediated Recruitment of NuA4 to Promoters Is Required for Hypha-specific Swi/Snf Binding and Activation in *Candida albicans*," *Mol Biol Cell*, vol. 19, pp. 4260–4272, 2008, doi: 10.1091/mbc.E08-02-0173.
- [57] X. Wang, W. Zhu, P. Chang, H. Wu, H. Liu, and J. Chen, "Merge and separation of NuA4 and SWR1 complexes control cell fate plasticity in *Candida albicans*," *Cell Discov*, vol. 4, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41421-018-0043-0.
- [58] B. D. Giaimo, F. Ferrante, A. Herchenröther, S. B. Hake, and T. Borggrefe, "The histone variant H2A.Z in gene regulation," *Epigenetics Chromatin*, vol. 12, no. 1, p. 37, Dec. 2019, doi: 10.1186/s13072-019-0274-9.
- [59] B. Li *et al.*, "Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 102, no. 51, pp. 18385–18390, Dec. 2005, doi: 10.1073/pnas.0507975102.

- [60] Z. Guan and H. Liu, "Overlapping Functions between *SWR1* Deletion and H3K56 Acetylation in *Candida albicans*," *Eukaryot Cell*, vol. 14, no. 6, pp. 578–587, Jun. 2015, doi: 10.1128/EC.00002-15.
- [61] Q. Zhao, B. Dai, H. Wu, W. Zhu, and J. Chen, "Ino80 is required for H2A.Z eviction from hypha-specific promoters and hyphal development of *Candida albicans*," *Mol Microbiol*, vol. 118, no. 1–2, pp. 92–104, Jul. 2022, doi: 10.1111/mmi.14954.
- [62] R. J. Price, E. Weindling, J. Berman, and A. Buscaino, "Chromatin Profiling of the Repetitive and Nonrepetitive Genomes of the Human Fungal Pathogen *Candida albicans*," *mBio*, vol. 10, no. 4, Aug. 2019, doi: 10.1128/mBio.01376-19.
- [63] E. Iracane, S. Vega-Estévez, and A. Buscaino, "On and Off: Epigenetic Regulation of *C. albicans* Morphological Switches," *Pathogens*, vol. 10, no. 11, p. 1463, Nov. 2021, doi: 10.3390/pathogens10111463.
- [64] V. K. Balachandra and S. K. Ghosh, "Emerging roles of SWI/SNF remodelers in fungal pathogens," *Curr Genet*, vol. 68, no. 2, pp. 195–206, Apr. 2022, doi: 10.1007/s00294-021-01219-7.
- [65] J. Kim, J. E. Lee, and J. S. Lee, "Histone deacetylase-mediated morphological transition in *Candida albicans*," *Journal of Microbiology*, vol. 53, no. 12. Microbiological Society of Korea, pp. 805–811, Dec. 01, 2015. doi: 10.1007/s12275-015-5488-3.
- [66] C. Su, Y. Lu, and H. Liu, "Reduced TOR signaling sustains hyphal development in *Candida albicans* by lowering Hog1 basal activity," *Mol Biol Cell*, vol. 24, no. 3, pp. 385–397, Jan. 2013, doi: 10.1091/mbc.E12-06-0477.
- [67] R. J. Bastidas, J. Heitman, and M. E. Cardenas, "The Protein Kinase Tor1 Regulates Adhesin Gene Expression in *Candida albicans*," *PLoS Pathog*, vol. 5, no. 2, p. e1000294, Feb. 2009, doi: 10.1371/journal.ppat.1000294.
- [68] S. W. Kim, Y. J. Joo, Y. J. Chun, Y. K. Park, and J. Kim, "Cross-talk between Tor1 and Sch9 regulates hyphae-specific genes or ribosomal protein genes in a mutually

- exclusive manner in *Candida albicans*,” *Mol Microbiol*, vol. 112, no. 3, pp. 1041–1057, Sep. 2019, doi: 10.1111/mmi.14346.
- [69] C. Su, J. Yu, Q. Sun, Q. Liu, and Y. Lu, “Hyphal induction under the condition without inoculation in *Candida albicans* is triggered by Brg1-mediated removal of *NRG1* inhibition,” *Mol Microbiol*, vol. 108, no. 4, pp. 410–423, May 2018, doi: 10.1111/mmi.13944.
- [70] R. Parvizi Omran *et al.*, “The zinc cluster transcription factor Rha1 is a positive filamentation regulator in *Candida albicans*,” *Genetics*, vol. 220, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.1093/genetics/iyab155.
- [71] M. Banerjee *et al.*, “*UME6*, a Novel Filament-specific Regulator of *Candida albicans* Hyphal Extension and Virulence,” *Mol Biol Cell*, vol. 19, no. 4, pp. 1354–1365, Apr. 2008, doi: 10.1091/mbc.e07-11-1110.
- [72] D. H. Sweet, Y. K. Jang, and G. B. Sancar, “Role of *UME6* in Transcriptional Regulation of a DNA Repair Gene in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Mol Cell Biol*, vol. 17, no. 11, pp. 6223–6235, Nov. 1997, doi: 10.1128/MCB.17.11.6223.
- [73] R. Strich, R. T. Surosky, C. Steber, E. Dubois, F. Messenguy, and R. E. Esposito, “*UME6* is a key regulator of nitrogen repression and meiotic development,” *Genes Dev*, vol. 8, no. 7, pp. 796–810, Apr. 1994, doi: 10.1101/gad.8.7.796.
- [74] U. Zeidler *et al.*, “*UME6* is a crucial downstream target of other transcriptional regulators of true hyphal development in *Candida albicans*,” *FEMS Yeast Res*, vol. 9, no. 1, pp. 126–142, Feb. 2009, doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00459.x.
- [75] P. L. Carlisle, M. Banerjee, A. Lazzell, C. Monteagudo, J. L. López-Ribot, and D. Kadosh, “Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, no. 2, pp. 599–604, Jan. 2009, doi: 10.1073/pnas.0804061106.
- [76] S.-C. Fu, H. Y. J. Fung, T. Cağatay, J. Baumhardt, and Y. M. Chook, “Correlation of CRM1-NES affinity with nuclear export activity,” *Mol Biol Cell*, vol. 29, no. 17, pp. 2037–2044, Aug. 2018, doi: 10.1091/mbc.E18-02-0096.

- [77] M. Fornerod, M. Ohno, M. Yoshida, and I. W. Mattaj, "CRM1 Is an Export Receptor for Leucine-Rich Nuclear Export Signals," *Cell*, vol. 90, no. 6, pp. 1051–1060, Sep. 1997, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80371-2.
- [78] S. Kosugi, M. Hasebe, M. Tomita, and H. Yanagawa, "Nuclear Export Signal Consensus Sequences Defined Using a Localization-Based Yeast Selection System," *Traffic*, vol. 9, no. 12, pp. 2053–2062, Dec. 2008, doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00825.x.
- [79] Q. Sun *et al.*, "Nuclear export inhibition through covalent conjugation and hydrolysis of Leptomycin B by CRM1," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, no. 4, pp. 1303–1308, Jan. 2013, doi: 10.1073/pnas.1217203110.
- [80] R. A. Hall *et al.*, "The Quorum-Sensing Molecules Farnesol/Homoserine Lactone and Dodecanol Operate via Distinct Modes of Action in *Candida albicans*," *Eukaryot Cell*, vol. 10, no. 8, pp. 1034–1042, Aug. 2011, doi: 10.1128/EC.05060-11.
- [81] A. M. A. Murad *et al.*, "Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1," *Mol Microbiol*, vol. 42, no. 4, pp. 981–993, Nov. 2001, doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02713.x.
- [82] P. A. Sullivan and M. G. Shepherd, "Gratuitous induction by N-acetylmannosamine of germ tube formation and enzymes for N-acetylglucosamine utilization in *Candida albicans*," *J Bacteriol*, vol. 151, no. 3, pp. 1118–1122, Sep. 1982, doi: 10.1128/jb.151.3.1118-1122.1982.
- [83] L. Kappel, R. Gaderer, M. Flipphi, and V. Seidl-Seiboth, "The *N*-acetylglucosamine catabolic gene cluster in *Trichoderma reesei* is controlled by the Ndt80-like transcription factor RON1," *Mol Microbiol*, vol. 99, no. 4, pp. 640–657, Feb. 2016, doi: 10.1111/mmi.13256.

-
- [84] A. M. Murad *et al.*, “NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*,” *EMBO J*, vol. 20, no. 17, pp. 4742–52, Sep. 2001, doi: 10.1093/emboj/20.17.4742.
- [85] C. A. Keleher, M. J. Redd, J. Schultz, M. Carlson, and A. D. Johnson, “Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast,” *Cell*, vol. 68, no. 4, pp. 709–719, Feb. 1992, doi: 10.1016/0092-8674(92)90146-4.
- [86] H. J. Lee, J. M. Kim, W. Kyu Kang, H. Yang, and J. Y. Kim, “The NDR kinase Cbk1 downregulates the transcriptional repressor Nrg1 through the mRNA-binding protein Ssd1 in *Candida albicans*,” *Eukaryot Cell*, vol. 14, no. 7, pp. 671–683, Jul. 2015, doi: 10.1128/EC.00016-15.
- [87] Y. Lu, C. Su, N. V. Solis, S. G. Filler, and H. Liu, “Synergistic Regulation of Hyphal Elongation by Hypoxia, CO₂, and Nutrient Conditions Controls the Virulence of *Candida albicans*,” *Cell Host Microbe*, vol. 14, no. 5, pp. 499–509, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.chom.2013.10.008.
- [88] M. D. McNemar and W. A. Fonzi, “Conserved Serine/Threonine Kinase Encoded by *CBK1* Regulates Expression of Several Hypha-Associated Transcripts and Genes Encoding Cell Wall Proteins in *Candida albicans*,” *J Bacteriol*, vol. 184, no. 7, pp. 2058–2061, Apr. 2002, doi: 10.1128/JB.184.7.2058-2061.2002.
- [89] Y. Song *et al.*, “Role of the RAM Network in Cell Polarity and Hyphal Morphogenesis in *Candida albicans*,” *Mol Biol Cell*, vol. 19, no. 12, pp. 5456–5477, Dec. 2008, doi: 10.1091/mbc.e08-03-0272.
- [90] J. M. Jansen, A. G. Wanless, C. W. Seidel, and E. L. Weiss, “Cbk1 Regulation of the RNA-Binding Protein Ssd1 Integrates Cell Fate with Translational Control,” *Current Biology*, vol. 19, no. 24, pp. 2114–2120, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.cub.2009.10.071.
- [91] D. J. Hogan, D. P. Riordan, A. P. Gerber, D. Herschlag, and P. O. Brown, “Diverse RNA-Binding Proteins Interact with Functionally Related Sets of RNAs, Suggesting an Extensive Regulatory System,” *PLoS Biol*, vol. 6, no. 10, p. e255, Oct. 2008, doi: 10.1371/journal.pbio.0060255.

- [92] M. I. Staples, C. Frazer, N. L. Fawzi, and R. J. Bennett, "Phase separation in fungi," *Nat Microbiol*, vol. 8, no. 3, pp. 375–386, Feb. 2023, doi: 10.1038/s41564-022-01314-6.
- [93] J. R. Blankenship, S. Fanning, J. J. Hamaker, and A. P. Mitchell, "An Extensive Circuitry for Cell Wall Regulation in *Candida albicans*," *PLoS Pathog*, vol. 6, no. 2, p. e1000752, Feb. 2010, doi: 10.1371/journal.ppat.1000752.
- [94] R. B. Wilson, D. Davis, and A. P. Mitchell, "Rapid Hypothesis Testing with *Candida albicans* through Gene Disruption with Short Homology Regions," *J Bacteriol*, vol. 181, no. 6, pp. 1868–1874, Mar. 1999, doi: 10.1128/JB.181.6.1868-1874.1999.
- [95] S. Gola, R. Martin, A. Walther, A. Dünkler, and J. Wendland, "New modules for PCR-based gene targeting in *Candida albicans* : rapid and efficient gene targeting using 100 bp of flanking homology region," *Yeast*, vol. 20, no. 16, pp. 1339–1347, Dec. 2003, doi: 10.1002/yea.1044.
- [96] Y. Schaub, A. Dünkler, A. Walther, and J. Wendland, "New pFA-cassettes for PCR-based gene manipulation in *Candida albicans*," *J Basic Microbiol*, vol. 46, no. 5, pp. 416–429, Oct. 2006, doi: 10.1002/jobm.200510133.
- [97] E. Dueñas-Santero, A. Santos-Almeida, P. Rojo-Dominguez, F. del Rey, J. Correa-Bordes, and C. R. Vázquez de Aldana, "A new toolkit for gene tagging in *Candida albicans* containing recyclable markers," *PLoS One*, vol. 14, no. 7, p. e0219715, Jul. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0219715.
- [98] S. Shahana *et al.*, "New Clox Systems for Rapid and Efficient Gene Disruption in *Candida albicans*," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, p. e100390, Jun. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0100390.
- [99] O. Reuß, Å. Vik, R. Kolter, and J. Morschhäuser, "The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*," *Gene*, vol. 341, pp. 119–127, Oct. 2004, doi: 10.1016/j.gene.2004.06.021.
- [100] G. A. Köhler, T. C. White, and N. Agabian, "Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific

- inhibitor mycophenolic acid," *J Bacteriol*, vol. 179, no. 7, pp. 2331–2338, Apr. 1997, doi: 10.1128/jb.179.7.2331-2338.1997.
- [101] A. Walther and J. Wendland, "An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*," *Curr Genet*, vol. 42, no. 6, pp. 339–343, Mar. 2003, doi: 10.1007/s00294-002-0349-0.
- [102] R. D. Gietz, R. H. Schiestl, A. R. Willems, and R. A. Woods, "Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure," *Yeast*, vol. 11, no. 4, pp. 355–360, Apr. 1995, doi: 10.1002/yea.320110408.
- [103] M. Lööke, K. Kristjuhan, and A. Kristjuhan, "Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications," *Biotechniques*, vol. 50, no. 5, pp. 325–328, May 2011, doi: 10.2144/000113672.