



**Tesis**

**SEÑALIZACIÓN POR NDR QUINASAS EN LA  
INTERACCIÓN PATÓGENO-HOSPEDADOR**

**Elvira Patricia Rojo Domínguez**

**BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR, BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA**

**2018**



JAIME CORREA BORDES, profesor del Departamento de CIENCIAS BIOMÉDICAS de la Universidad de Extremadura.

CERTIFICA:

Que D. ELVIRA PATRICIA ROJO DOMÍNGUEZ ha realizado bajo su dirección la tesis doctoral titulada “Señalización por NDR quinasas en la interacción patógeno-hospedador” perteneciente al programa de doctorado “Biología Molecular y Celular, Biomedicina y Biotecnología” y considera que la memoria reúne los requisitos para ser defendida como un trabajo de Tesis Doctoral. Por todo ello,

AUTORIZA:

Su presentación y defensa pública frente al tribunal designado al efecto de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 99/2011 de 28 de Enero.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Badajoz a 3 de Septiembre de 2018.

Fdo. Jaime Correa Bordes

## Reconocimientos.

Para la realización del presente trabajo de Tesis Doctoral hemos recibido la inestimable 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.

A la Dra. Pilar Gutiérrez Escribano por compartir resultados no publicados sobre la interacción Cbk1-Cdc14.

## Financiación.

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad (BIO2015-70195-c2-2R) y del Plan de Ayuda a grupos del Gobierno de Extremadura (GR15008). Toda la financiación recibida está cofinanciada por el programa FEDER de la Unión Europea.

**JUNTA DE EXTREMADURA**

Consejería de Economía e Infraestructuras



**Unión Europea**

Fondo Europeo  
de Desarrollo Regional  
"Una manera de hacer Europa"





## ***ÍNDICE***

---

## Índice

ÍNDICE.....	1
ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	14
1. Introducción General.....	15
1.1. El genoma de <i>C. albicans</i> y sus modificaciones genéticas.....	17
1.2. Morfologías de <i>C. albicans</i> .....	18
1.2.1. Morfología hifal y el daño al hospedador.....	19
1.3. El citoesqueleto.....	20
1.3.1. Las septinas se localizan de manera diferente según la morfología adoptada por <i>C.albicans</i> .....	21
1.4. Rutas de transducción de señales ambientales implicadas en la formación de la hifa.....	22
1.5. La quinasa dependiente de ciclinas Cdc28 controla la progresión del ciclo celular y morfogénesis.....	24
1.5.1. La ciclina de G1 Hgc1 promueve el desarrollo hifal en <i>C. albicans</i> .....	25
1.5.2. Dianas de Cdc28 durante el crecimiento polarizado.....	26
1.6. Determinantes de polaridad en <i>C. albicans</i> .....	28
1.6.1. Polarisoma, Spitzenkörper y Exocisto.....	29
2. Las NDR quinasas .....	31
2.1. NDR quinasas en hongos .....	32
2.1.1. Características estructurales y regulación de las NDR quinasas .....	33
2.2. Salida de mitosis en levaduras.....	34
2.2.1. Cdc14 es un regulador central de la salida de mitosis.....	36
2.2.2. Control de la separación celular y entrada en G1.....	37
2.2.3. Cdc14 en <i>C.albicans</i> .....	39
2.3. Morfología celular y ruta RAM en levaduras.....	42
2.3.1. Estructura y fosforregulación de Cbk1-Mob2 .....	44
2.3.2. La proteína de unión a mRNA, Ssd1.....	46
OBJETIVOS .....	49

## Índice

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO 1. Regulación y función de la NDR quinasa Cbk1 en la transición levadura-hifa.....</b>	<b>52</b>
<b>1. Regulación de Cbk1.....</b>	<b>53</b>
<b>1.1. Cbk1 modifica su estado de fosforilación en respuesta al crecimiento hifal.</b>	<b>53</b>
<b>1.2. Mutaciones fosfodeficientes en sitios Cdk afectan a la función de Cbk1 en hifas.....</b>	<b>56</b>
<b>1.3. La actividad de la Cdk Cdc28 es necesaria para la fosforilación de Cbk1 en respuesta a suero.....</b>	<b>57</b>
<b>1.4. La fosforilación de Cbk1 específica de miceliación depende de la ciclina Hgc1 .....</b>	<b>59</b>
<b>1.5. Importancia relativa de los sitios Cdk en la función de Cbk1 en hifas.....</b>	<b>60</b>
<b>1.6. El alelo <i>cbk1-T548D</i> activa la separación celular en hifas.....</b>	<b>61</b>
<b>1.6.1. Importancia de la T548 durante crecimiento levaduriforme.....</b>	<b>63</b>
<b>1.6.2. La localización de Cbk1 no se encuentra afectada en los mutantes ...</b>	<b>65</b>
<b>1.7. Importancia de la proteína de unión a mRNA Ssd1 en la regulación de Cbk1.....</b>	<b>67</b>
<b>1.7.1. Función dual de Cbk1 durante la respuesta a suero.....</b>	<b>67</b>
<b>1.7.2. La defosforilación de Cbk1 depende de Ssd1.....</b>	<b>69</b>
<b>1.7.3. Las fosfatasa Ptp3 y Rts3 no son necesarias en la regulación de Cbk1.....</b>	<b>70</b>
<b>1.8. La actividad fosfatasa de Cdc14 es necesaria en la regulación de Cbk1 al inicio del crecimiento hifal.....</b>	<b>71</b>
<b>1.9. La fosfatasa Cdc14: posible diana de PKA en el inicio del crecimiento hifal..</b>	<b>72</b>
<b>2. Estudio de la función de Cbk1.....</b>	<b>73</b>
<b>2.1. Construcción de un mutante <i>cbk1-as</i>.....</b>	<b>73</b>
<b>2.2. Estudio del mutante <i>cbk1-as</i> durante el crecimiento hifal.....</b>	<b>75</b>
<b>2.2.1. Implicación de Cbk1 en la regulación de Spa2.....</b>	<b>78</b>
<b>CAPÍTULO 2. Relación funcional de la fosfatasa Cdc14 y la NDR quinasa Cbk1.....</b>	<b>82</b>
<b>1. La fosfatasa Cdc14 es una fosfoproteína.....</b>	<b>83</b>

## Índice

2. Construcción de mutantes fosfodeficientes de <i>CDC14</i> .....	85
2.1. Estudio de los fenotipos mutantes de Cdc14 en los sitios de fosforilación por Cbk1 y por CDKs.....	86
3. La Cdk Cdc28 regula el estado de fosforilación de Cdc14.....	88
4. La desfosforilación de Cdc14 depende de su propia actividad fosfatasa.....	89
5. Interacciones intermoleculares de Cdc14 <i>in vivo</i> .....	90
6. La señalización dependiente de Cbk1 es necesaria para regular el estado de fosforilación de la fosfatasa Cdc14.....	92
DISCUSIÓN.....	93
CONCLUSIONES.....	107
MATERIALES Y MÉTODOS.....	110
1. Microorganismos utilizados.....	111
2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	111
3. Procedimientos generales de clonación molecular.....	112
3.1. Obtención de DNA plasmídico mediante el kit comercial iNtRON Biotechnology.....	112
3.2. Extracción de DNA genómico de <i>Candida albicans</i> .....	112
3.2.1. Extracción mediante el kit <i>MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit</i> .....	112
3.2.2. Extracción mediante lisis de colonias con Acetato de Litio y SDS.....	112
3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	113
3.4. Manipulación del DNA.....	113
3.4.1. Obervación de los fragmentos de DNA.....	113
3.4.2. Digestiones enzimáticas.....	113
3.4.3. Ligación de los fragmentos de DNA a los vectores de clonación.....	113
4. Construcción de cepas.....	114
4.1. Construcción de cepas mediante PCR con plásmidos pFA.....	114
4.2. Construcción del plásmido pFA <i>3xmyc-CBK1:URA3</i> .....	115
4.2.1. Mutagénesis dirigida de los alelos de <i>CBK1</i> .....	117
4.3. Síntesis génica de alelos mutantes de <i>CDC14</i> .....	119

## Índice

4.3.1. Construcción de los plásmidos con los alelos mutantes de <i>CDC14</i> ....	120
4.4. Eliminación de genes mediante el plásmido pSFS2-A.....	121
4.4.1. Construcción del Cassette <i>SAT1-flipper-SSD1</i> .....	124
5. Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	125
5.1. Transformación de XL1-Blue Competent Cells.....	125
5.2. Transformación de XL-Gold Ultracompetent Cells.....	125
6. Transformación de <i>Candida albicans</i> .....	126
6.1. Transformación con Acetato de litio.....	126
6.2. Transformación por electroporación.....	126
7. Extracción de RNA para RT-PCR.....	127
8. Extracción, detección y análisis de proteínas.....	127
8.1. Obtención de extractos proteicos con TCA.....	127
8.2. Obtención de extractos proteicos para IP .....	128
8.3. Obtención de extractos proteicos para Co-iP con GFP-Trap.....	129
8.4. Separación electroforética e inmunodetección de proteínas en SDS-PAGE .....	129
8.5. Separación electroforética específica de proteínas fosforiladas en geles de Acrilamida Phos-tag <sup>TM</sup> .....	130
8.6. Inmunoprecipitaciones y co-Inmunoprecipitaciones de proteínas.....	131
8.6.1. Concentraciones de anticuerpos utilizadas.....	131
8.7. Tratamiento con Lambda Fosfatasa ( $\lambda$ -PPTasa).....	132
9. Técnicas de microscopía.....	132
9.1. Preparación de las muestras.....	132
9.2. Tinción con calcoflúor.....	133
9.3. Microscopía óptica.....	133
9.4. Microscopía de fluorescencia.....	133
9.5. Microscopía confocal: <i>Time-lapse</i> .....	133
ANEXOS.....	135
BIBLIOGRAFÍA.....	145

## ***ABREVIATURAS***

---

## Abreviaturas

<b>Δ</b>	Disrupción
<b>AcLi-Sol</b>	solución acetato de litio
<b>Amp</b>	ampicilina
<b>C</b>	cisteína
<b>Cdk</b>	quinasa dependiente de ciclina
<b>CS</b>	sitio catalítico
<b>DIC</b>	<i>differential interference contrast</i> (contraste diferencial de interferencia)
<b>DNA</b>	<i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
<b>DO</b>	densidad óptica
<b>DSG</b>	<i>daughter specific genes</i> (genes específicos de la hija)
<b>EDTA</b>	ácido etileno diamonitetracético
<b>GAP</b>	<i>GTPase activating protein</i> (proteína activadora de GTPasa)
<b>GDP</b>	guanosín difosfato
<b>GTP</b>	guansín trifosfato
<b>H</b>	Histidina
<b>HSG</b>	<i>hypha specific genes</i> (genes específicos de la hifa)
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>K</b>	lisina
<b>MEN</b>	<i>Mitotic Exit Network</i>
<b>MM</b>	medio mínimo
<b>MOR</b>	<i>Morphogenesis Related NRD Kinase</i>
<b>mRNA</b>	ARN mensajero
<b>Nou<sup>R</sup></b>	Noursotricina resistente
<b>Nou<sup>S</sup></b>	Noursotricina sensible
<b>NRD</b>	<i>Nuclear Dfb2-related Family</i>
<b>P</b>	prolina
<b>PAGE</b>	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida)
<b>pb</b>	pares de bases

## Abreviaturas

<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
<b>R</b>	arginina
<b>RAM</b>	<i>Regulation of Ace2 Activity and Cellular Morphogenesis</i>
<b>RNA</b>	<i>ribonucleic acid</i>
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>S/Ser</b>	serina
<b>SB</b>	suero bovino
<b>SDS</b>	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (dodecil sulfato sódico)
<b>SIN</b>	<i>Septation Initiation Network</i>
<b>SPB</b>	<i>spindle pole body</i> (cuerpo polar del huso, centrosoma)
<b>T/Thr</b>	treonina
<b>Tyr</b>	tirosina
<b>UTR</b>	<i>UnTranslated Region</i> (Región no traducida)
<b>WBs</b>	<i>Western Blots</i>
<b>WT</b>	<i>wild type</i> (silvestre)

***RESUMEN***

---

## Resumen

El hongo *Candida albicans* forma parte de la microbiota de las mucosas superficiales de los tractos gastrointestinal y genitourinario de seres humanos. Sin embargo, el incremento de prácticas médicas que inducen la inmunodepresión del paciente han aumentado la incidencia de las infecciones fúngicas sistémicas que muestran una alta tasa de mortalidad. Su gran plasticidad morfológica, que le permite adaptarse a diferentes nichos en el hospedador, es un factor de virulencia importante. *C. albicans* es un hongo pleomórfico, capaz de realizar transiciones reversibles entre tres variedades celulares diferentes: célula levaduriforme, pseudohifa filamentosa e hifa verdadera. En eucariotas, las NDR quinasas son componentes esenciales de las rutas que regulan la polaridad y el ciclo celular, y están implicadas en la morfogénesis de este patógeno humano. En este trabajo de investigación nos hemos centrado en estudiar el papel de la NDR quinasa Cbk1 en la transición levadura-hifa, así como su relación funcional con la fosfatasa Cdc14.

El primer capítulo de este trabajo está basado en el estudio de la regulación y función de Cbk1 durante el desarrollo hifal. En la primera parte se demuestra que existe una correlación entre la dinámica de fosforilación de Cbk1 y las fases del desarrollo hifal en respuesta a señales ambientales que inducen la miceliación. Mediante *Western Blot* hemos puesto de manifiesto que Cbk1 se defosforila en el inicio de la respuesta para volver a fosforilarse durante la fase de mantenimiento del crecimiento hiperpolarizado. El análisis del estado de fosforilación de varios mutantes desveló que Cbk1 es sustrato de la CDK Cdc28 y su ciclina asociada Hgc1 durante el mantenimiento de la hifa. El análisis fenotípico de los mutantes defectivos en los seis sitios de fosforilación por Cdc28 reflejó que la fosforilación de dichos residuos era necesaria para el correcto desarrollo hifal. El estudio del fenotipo de mutantes individuales en los residuos fosforilables por CDKs puso de manifiesto la importancia de la dinámica fosforilación/defosforilación de la treonina 548, mientras que la mimetización de una fosforilación constitutiva activaba separación celular en las hifas, el mutante fosfodeficiente en dicha treonina da lugar a células redondas durante el crecimiento levaduriforme, fenotipo asociado a un déficit en la actividad quinasa, insuficiente para activar el crecimiento polarizado de la yema. Además, experimentos de RT-PCR mostraron que en las hifas del mutante *cbk1-T548D* se produce un incremento en la expresión de genes diana de Ace2, corroborando su implicación en la

## Resumen

separación celular. El análisis de la fosforilación de Cbk1 en mutantes de la PKA *tpk2Δ* y *cdc14-CS* (catalíticamente inactivo) puso de manifiesto la implicación de ambas proteínas en la defosforilación inicial de Cbk1. La función de Tpk2 en este proceso se correlacionó con su acción sobre la fosfatasa Cdc14 en las fases tempranas del inicio de la respuesta, puesto que se identificaron nueve sitios consenso de fosforilación por PKA en la secuencia de aminoácidos de Cdc14 que fueron reconocidos por anticuerpos fosfoespecíficos anti-PKA *substrate* a los 10 minutos de inducción hifal. Por otro lado, la eliminación de Ssd1 en un mutante *cbk1-KD* (*Kinase dead*) puso de manifiesto que Cbk1 se requiere en el inicio de la formación del tubo germinativo esencialmente, para inactivar a Ssd1 y, además, que su defosforilación inicial también es dependiente de su acción sobre Ssd1. La segunda parte de este capítulo se centra en estudiar la función de Cbk1 durante la fase de mantenimiento de la hifa mediante la utilización de un mutante condicional *cbk1-as* (*Analogue sensitive*). La inactivación de la quinasa en un momento concreto de el desarrollo de la hifa provocó una pérdida de la polaridad del crecimiento y una activación de la gemación lateral, indicando que Cbk1 es necesaria para mantener el crecimiento apical y que, de alguna manera, está implicado en la regulación del ciclo celular. El marcaje de la proteína Spa2 del polarisoma con GFP en la cepa *cbk1-as* nos permitió estudiar la función de Cbk1 en la regulación del polarisoma; mediante experimentos de microscopía *time-lapse* determinamos que Cbk1 no es necesaria para la colocación de Spa2 en el polarisoma pero sí para mantenerla concentrada en la punta de la hifa de manera independiente del ciclo celular.

El segundo capítulo de este trabajo está enfocado en el estudio de la relación funcional de la fosfatasa Cdc14 y la NDR quinasa Cbk1. *C. albicans*. Cdc14 desempeña un papel fundamental en el control de la separación celular a través de su interacción con las Cdk y sus ciclinas asociadas. Esta fosfatasa también participa en la activación de Cbk1, que se encarga de dirigir el factor de transcripción Ace2 al núcleo de la célula hija donde se expresan los genes implicados en la separación celular y en el crecimiento polarizado. En el análisis de la secuencia de aminoácidos de Cdc14 identificamos dos sitios consenso de fosforilación para Cbk1 y dos para CDKs. Mediante la construcción de cepas fosfodeficientes para los sitios de consenso identificados demostramos que mientras que la fosforilación por Cbk1 no era

## Resumen

importante para la regulación de Cdc14, el mutante fosfodeficiente en los sitios consenso de CDKs presentaba defectos únicamente durante el crecimiento levaduriforme, en el que se inhibía la separación celular, similares a un mutante catalíticamente inactivo de la quinasa (*cdc14-CS*). La separación de los extractos proteicos de estas cepas mediante geles de acrilamida *Phos-Tag* desveló que Cdc14 es una fosfoproteína, y que la fosforilación de los sitios CDKs es fundamental para la aparición de las diferentes fosfoisoformas de Cdc14. Además, demostramos que Cdc28 es la CDK responsable de dicha fosforilación, y que también está involucrada en la estabilidad de la fosfatasa. El análisis de la proteína Cdc14-CS puso de manifiesto la aparición de bandas altamente fosforiladas que volvían a generar un patrón silvestre cuando se co-expresaban moléculas de Cdc14 con actividad, demostrando que su propia defosforilación depende de su actividad fosfatasa. Este resultado se complementó con ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) que revelaron la existencia de interacción entre moléculas de Cdc14, apoyando la idea de que Cdc14 catalizaba su propia defosforilación. Por último, el uso de geles de acrilamida *Phos Tag* también reveló que en mutantes de la ruta RAM, Cdc14 desarrollaba un patrón de hiperfosforilación similar al de la fosfatasa inactiva., sugiriendo que el complejo Cbk1/Mob2 es necesario para activar a la fosfatasa Cdc14. El conjunto de resultados obtenidos en este proyecto sugiere una regulación recíproca entre Cbk1 y Cdc14.

-

## ***INTRODUCCIÓN***

---

## Introducción

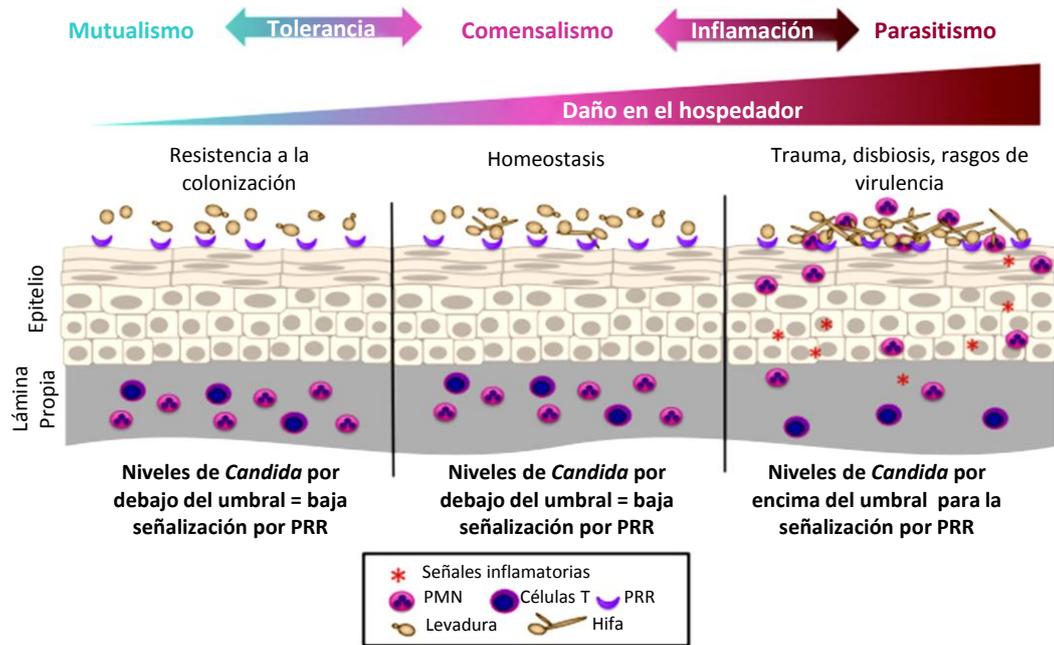
### 1. Introducción general.

Los hongos son organismos ubicuos en el medio ambiente, de los cuales tan sólo algunas especies se encuentran asociadas a los seres humanos. El conjunto de hongos que coloniza transitoria o persistentemente a los individuos forma el microbioma. Algunos de estos hongos se consideran verdaderos patógenos, provocando enfermedades en individuos sanos (*Histoplasma* y *Paracoccidioides*), mientras que la mayoría se clasifican como patógenos oportunistas, causando enfermedad en pacientes inmunodeprimidos (*Candida* y *Cryptococcus*). Las interacciones que existen entre los humanos y las diferentes especies de hongos pueden describirse como un espectro de relaciones simbióticas (comensal, parásito, mutualista, amensalista) (Hall and Noverr, 2017) en las que el ratio daño/beneficio que recibe el hospedador define la virulencia del microorganismo (Casadevall and Pirofski, 2003). Durante esta interacción hongo-humano, aparece enfermedad sólo cuando el daño perjudica a la función normal del hospedador. Además, el daño en el hospedador también puede variar a lo largo del tiempo, por ejemplo, puede darse un incremento en la cantidad de daño a medida que transcurre el tiempo hasta que se sobrepasa un umbral y aparece la enfermedad. Los patógenos fúngicos también pueden provocar un daño limitado en el huésped, sin producir enfermedad, resultando en otro tipo de relaciones como latencia o comensalismo. El hongo oportunista *Candida albicans* reside de manera comensal en la microbiota habitual de las mucosas gastrointestinales y genitourinarias de los seres humanos y otros animales de sangre caliente y puede causar infección cuando la respuesta inmune del hospedador está debilitada o cuando se produce un desequilibrio en el microbioma (Hall and Noverr, 2017). Este microorganismo tiene una gran capacidad de ajustar su relación daño/beneficio con el hospedador en función de las condiciones ambientales, por lo que se ha convertido en el comensal fúngico más estudiado, utilizándose además como modelo en la transición de comensal a patógeno (Figura 1). (Hall and Noverr, 2017).

La infección producida por *Candida* se denomina candidiasis y puede aparecer en individuos sanos en determinadas situaciones como el tratamiento con antibióticos, desequilibrio hormonal y estrés. Las candidiasis son tratables y no suelen conllevar riesgos excesivos para la salud. Sin embargo, en pacientes inmunodeprimidos como

## Introducción

aquellos que reciben quimioterapia o enfermos de VIH, este hongo es capaz de colonizar otros tejidos y órganos del hospedador, llegando a producir una infección sistémica (candidemias) comportándose como un verdadero patógeno muy agresivo. La mortalidad en la candidemias está alrededor del 20-30% (Sudbery et al., 2004) siendo en el 65% de los casos *C. albicans* la especie aislada.



**Figura 1. Transición comensal-parásito de *C. albicans*.** Durante el desarrollo como comensal, *C. albicans* crece predominantemente como levadura, es tolerada por el hospedador y no activa la respuesta inmune. Los periodos de disbiosis (desequilibrio de la microbiota normal) o inmunosupresión permiten a *C. albicans* proliferar, induciendo la formación hifal y activando respuestas inmunes innatas. En la mucosa vaginal, las células epiteliales son sensibilizadas lo que provoca la hiperactivación de la respuesta inmune innata y la afluencia de neutrófilos. Esta hiperactivación de los neutrófilos tiene como resultado el daño en la mucosa y una candidiasis vaginal sintomática. Tomado de (Hall and Noverr, 2017).

La importancia del uso de *C. albicans* como organismo modelo en investigación radica en que este hongo comparte muchos de sus procesos biológicos con los seres humanos, por lo que se deben tener en cuenta los efectos colaterales que podría causar el tratamiento con drogas. Por este motivo, se requiere identificar las dianas apropiadas para el desarrollo de nuevas terapias antifúngicas (Berman and Sudbery, 2002).

## Introducción

### 1.1. El genoma de *C. albicans* y sus modificaciones genéticas.

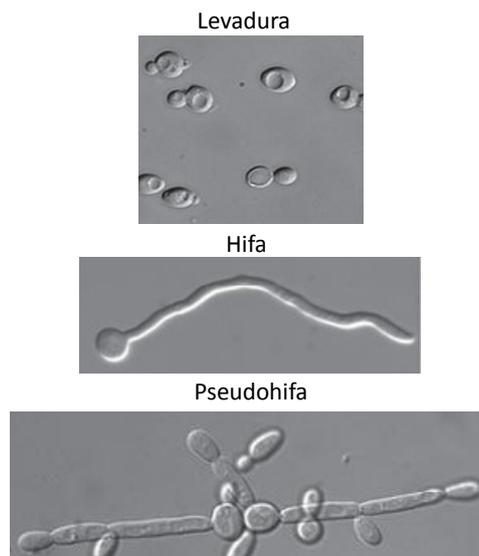
*C. albicans* es un hongo diploide (Wilson et al., 2000) que contiene 15,845 Mb de DNA organizados en 8 cromosomas (Hoyer, 2001; van het Hoog et al., 2007) y que comprenden aproximadamente 6000 genes de los cuales, la mitad presentan homólogos en *Saccharomyces cerevisiae* (van het Hoog et al., 2007). En la actualidad, la mayor parte del conocimiento que se tiene sobre el ciclo celular y su control proviene de estudios en los que las levaduras han sido utilizadas como organismos modelo para describir conexiones entre genes y proteínas, así como su función en la célula. Muchos de los estudios desarrollados sobre *C. albicans* están fundamentados en el conocimiento que se tiene sobre *S. cerevisiae*; sin embargo, aunque gran cantidad de procesos biológicos en *S. cerevisiae* se conservan en *C. albicans*, estas levaduras divergieron de un antecesor común hace 200 millones de años, lo que dio lugar a la aparición de diferencias significativas entre ellas. En este sentido, el estudio de *C. albicans* es mucho más complejo; mientras que *S. cerevisiae* vive en ambientes con alta concentración de azúcares, *C. albicans* ha adquirido nuevas habilidades que le han permitido colonizar gran variedad de nichos eficientemente, ayudando tanto su supervivencia y resistencia como a su crecimiento y diseminación en los tejidos del hospedador (Berman and Sudbery, 2002). La capacidad de adaptarse a condiciones desfavorables reside en la ambigüedad del uso del codón CUG, que en *C. albicans* y otras especies de *Candida* codifica para serina y no para leucina como en el resto de organismos. Este cambio en el código genético le permite inducir satisfactoriamente la respuesta a estrés incrementando la tolerancia a la temperatura, metales pesados y drogas y además está relacionado con la carencia de ciclo sexual aparente en este diploide obligado (Santos et al., 1999). Por otra parte se ha propuesto que esta ambigüedad en el uso del codón CUG sea el factor responsable de la variedad morfológica de *C. albicans*, una característica esencial que contribuye a la virulencia de este hongo (Santos and Tuite, 1995; Sarkany et al., 2014). Nuestro interés radica especialmente en estudiar los mecanismos moleculares que controlan el desarrollo de la hifa ya que este fenómeno es esencial para su patogénesis facilitando la penetración en los tejidos del hospedador.

## Introducción

El hecho de que *C. albicans* sea un diploide obligado debido a la carencia de ciclo sexual aparente hace su estudio genético más laborioso (Berman and Sudbery, 2002). Puesto que cada gen de *C. albicans* contiene dos alelos (Wilson et al., 2000) se requieren dos transformaciones secuenciales para disrumpir un gen (Berman and Sudbery, 2002).

### 1.2. Morfologías de *C. albicans*.

*C. albicans* es considerado como un organismo pleomórfico ya que incluye tres variedades celulares diferentes y reversibles: célula levaduriforme, pseudohifa filamentosa e hifas verdaderas (Figura 2) (Sudbery et al., 2004), desarrolladas en función de los distintos estímulos extracelulares. Durante el crecimiento levaduriforme, las células son redondeadas debido a que presentan un crecimiento isotrópico, es decir, la secreción de materiales se realiza por toda la superficie de la nueva célula la mayor parte del tiempo. El crecimiento apical en levaduras está restringido únicamente a la transición G1/S del ciclo celular, para el nacimiento de la yema. Sin embargo, la formación de la hifa requiere un mantenimiento del crecimiento polarizado independientemente de la etapa del ciclo celular; durante este proceso, la



**Figura 2.** Morfologías desarrolladas por *C. albicans*. Microscopía de contraste diferencial de interferencia (DIC). Tomado de (Sudbery et al., 2004)

## Introducción

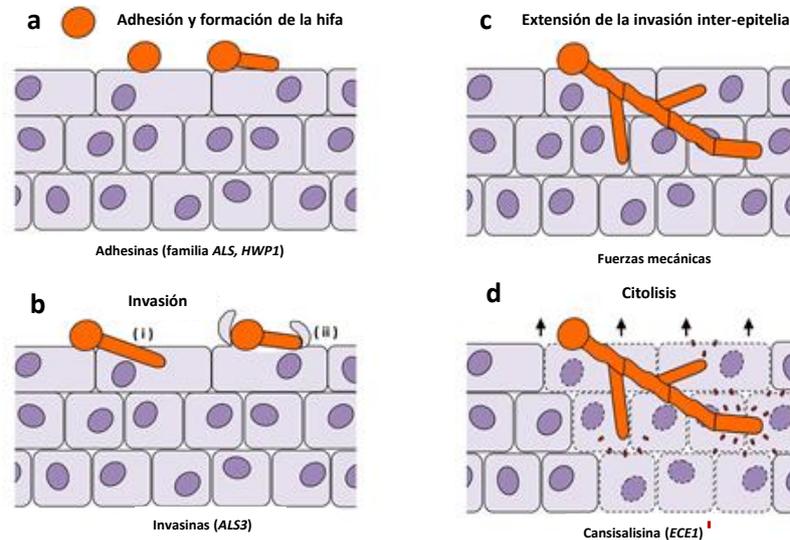
secreción se concentra en una pequeña superficie del ápice de la célula. Esta secreción focalizada da lugar a la producción de tubos germinativos y por tanto a un crecimiento filamentoso. Este tipo morfológico juega un papel fundamental en los procesos de infección ya que desencadena una respuesta inmune específica y además le confiere la capacidad de adherencia a los tejidos mediada por proteínas (adhesinas) expresadas únicamente en hifa. Mientras que la morfología hifal en *C. albicans* facilita la invasión de tejidos y participa en los mecanismos de escape de los macrófagos, el resto de los fenotipos son necesarios para la infección de otros nichos del hospedador. Por ejemplo, las células levaduriformes son fundamentales para la dispersión a través del torrente sanguíneo. Por otro lado, las pseudohifas se distinguen morfológicamente de las hifas verdaderas por la formación de constricciones en los sitios de septación, son más anchas que las hifas y además cuentan con diferencias fundamentales en la organización del ciclo celular y los mecanismos de crecimiento polarizado (Sudbery et al., 2004).

### 1.2.1. La morfología hifal y el daño al hospedador.

La morfología hifal es la más común observada durante las infecciones experimentales y en las biopsias de pacientes. Como se ha comentado, las hifas se adhieren más eficaz y robustamente a las células del hospedador que las levaduras debido a dos adhesinas asociadas, Als3 y Hwp1 (Mayer et al., 2013). Recientemente se ha descubierto que el daño celular se produce debido a la secreción de una toxina citolítica llamada Candidalisina, un péptido de 31 aminoácidos (Moyes et al., 2016; Tang et al., 2016; Wilson et al., 2016). La candidalisina se genera a partir de la proteína parental Ece1, codificada por el gen *ECE1*, cuya expresión es inducida durante la formación de la hifa (Birse et al., 1993). El análisis bioinformático de esta proteína sugiere que Ece1 es un polipéptido procesado secuencialmente por proteasas que genera entre otros el péptido de la Candidalisina. Este péptido adopta una estructura  $\alpha$ -helice que cuando es secretado en cantidades suficientes, se intercala y permeabiliza las membranas del hospedador induciendo la lisis celular (Figura 3). En este sentido, la delección de la región de Ece1 que codifica para la Candidalisina disminuye significativamente el daño epitelial (Moyes et al., 2016)

## Introducción

En resumen, el pleomorfismo exhibido por *C. albicans* le permite mejorar su supervivencia, crecimiento y diseminación en el hospedador, siendo un factor de virulencia clave en la biología de este hongo.



**Figura 3. Diferentes estados de la infección epitelial de *C. albicans*.** a) En infecciones experimentales, las levaduras forman hifas cuando contactan con el epitelio y se adhieren estrechamente a las células del hospedador. Esto es mediado por adhesinas de la familia Als y Hwp1. b) la invasión epitelial sigue dos rutas: i) penetración activa del hongo; ii) endocitosis mediada por el hospedador. c) Elongación y ramificación de las hifas que resulta en invasión inter-epitelial pero no causa daño al epitelio. d) secreción del péptido tóxico fúngico Candidalísina (rectángulos rojos), lisa el epitelio del hospedador y causa destrucción de los tejidos. Tomado de (Wilson et al., 2016).

### 1.3. El citoesqueleto.

La actina, tubulina y septina son proteínas del citoesqueleto que participan en la polarización del crecimiento. La actina se encuentra en tres componentes del citoesqueleto: cables de actina, parches en el córtex y anillo contráctil de actomiosina. Los cables de actina están dirigidos hacia el sitio de crecimiento polarizado para formar los carriles que transportan vesículas secretoras y orgánulos subcelulares (Golgi, mitocondrias, peroxisomas y vacuolas) (Court and Sudbery, 2007). También están implicados en la localización asimétrica de ciertas moléculas de mRNA, por ejemplo *ASH1* en la célula hija (Elson et al., 2009). Los parches corticales están compuestos además por proteínas asociadas a la actina agregadas alrededor del sitio de crecimiento celular donde se promueve la polarización, estos parches también se

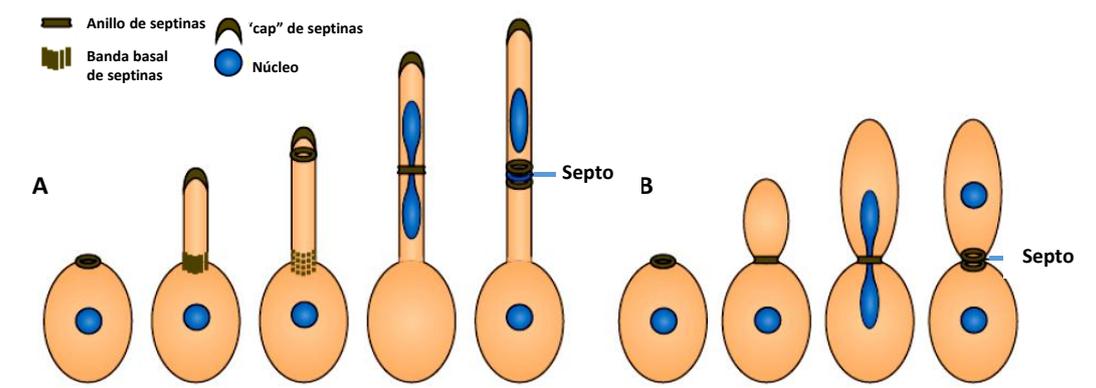
## Introducción

localizan en los sitios donde se requiere reciclar los componentes de la membrana por endocitosis (Court and Sudbery, 2007). Por último, el anillo de actomiosina se forma en el lugar marcado para la formación del septo primario, el cual está compuesto por quitina, sintetizada por la quitina sintasa Chs2 que se encuentra anclada en el anillo (Court and Sudbery, 2007).

Las septinas son una familia de proteínas que exhiben un alto grado de homología entre ellas y se denominan así por su papel en la formación del septo entre la célula madre y la hija. En *S cerevisiae*, la familia de la septinas está compuesta por Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12, Spr3, Spr28 y Shs1. La formación del anillo de septinas requiere de la interacción de estas subunidades (Warenda and Konopka, 2002). Además estas proteínas se asocian a membranas, sugiriendo que regulan múltiples procesos celulares, incluido el crecimiento polarizado (Warenda and Konopka, 2002).

### 1.3.1. Las septinas se localizan de manera diferente según la morfología adoptada por *C.albicans*.

En *C. albicans*, las septinas incluyen las proteínas esenciales Cdc3 y Cdc12 y las no esenciales Cdc10, Cdc11 y Sep7. Estas proteínas participan tanto en citoquinesis como en la formación del septo donde sirven de guía para el crecimiento hifal (Warenda and Konopka, 2002).



**Figura 4.A.** Esquema del primer ciclo celular durante el desarrollo de la hifa. **B.** Esquema del ciclo celular de la pseudohifa. Modificado de (Sudbery, 2011).

Debido a que la plasticidad morfológica de *C. albicans* contribuye a su virulencia, se han estudiado las septinas para averiguar su participación en estos cambios morfológicos. Se ha demostrado que la localización de las septinas es

## Introducción

específica del crecimiento en levaduras, pseudohifas o hifas (Sudbery, 2007). Las septinas se localizan en un estrecho anillo en las yemas tempranas de la levadura y a medida que va creciendo, justo antes de la división del núcleo, el anillo se hace doble. En pseudohifas la localización de las septinas sigue un patrón similar. Sin embargo, en hifas, un anillo de septinas marca un sitio específico del córtex celular del que surge un único tubo germinativo. Posteriormente estas septinas se reorganizan en la base del tubo germinativo temprano formando una malla débil y en una única estructura compacta (“cap”) en el ápice durante la elongación, más tarde, a medida que crecen, aparece un anillo denso en el tubo germinal para marcar la futuro plano de división entre la célula apical y subapical. Finalmente, antes de la división nuclear, el anillo se duplica, a la vez que el septo se hace visible (Figura 4) (Sudbery, 2007; Sudbery, 2001; Warena and Konopka, 2002).

Por otra parte, la inducción de la miceliación provoca que el anillo de septinas adopte una conformación específica de hifas, caracterizado por un cuerpo estable (compuesto por Sep7, Cdc3 y Cdc12) y un alto intercambio de Cdc10 entre el anillo y el citoplasma. Esta dinámica del anillo de septinas es la responsable de la inhibición de la separación celular en las hifas (González-Novo et al., 2008).

### **1.4. Rutas de transducción de señales ambientales implicadas en la formación de la hifa.**

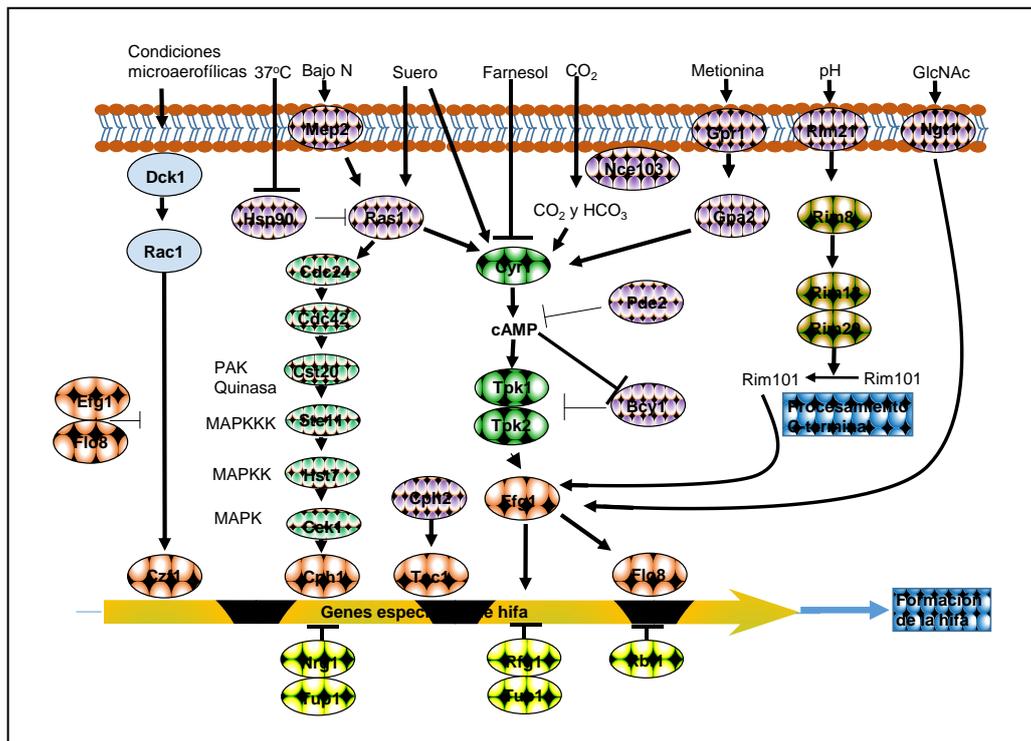
El proceso morfogénico de *C. albicans* es un fenómeno complejo y reversible que se desencadena como respuesta a estímulos ambientales como la presencia de suero, N-acetilglucosamina, bajo pH, alta temperatura, CO<sub>2</sub>. La transición levadura-hifa está también regulada por la interacción con la microbiota presente en los diferentes nichos, así *C. albicans* a través de un mecanismo de *quorum sensing* basado en la secreción de la molécula química farnesol por otros microorganismos al ambiente, inhibe la filamentación (Hornby et al., 2001). En contraste, el alcohol aromático tyrosol secretado en la fase estacionaria de un cultivo promueve la formación del tubo germinativo y de la hifa en *biofilms* (Chen et al., 2004). Estas señales son transmitidas al núcleo celular a través de una cascada de fosforilaciones sucesivas que dan lugar a la activación de factores de transcripción específicos (Biswas et al., 2007).

## Introducción

El crecimiento hifal implica la activación transcripcional de decenas de genes específicos de hifas (*Hypha Specific Genes*, HSGs). Este programa morfogénico implica modificaciones en citoesqueleto, ciclo celular, composición de pared celular y modulación de distintos factores de virulencia (Biswas et al., 2007; Sudbery, 2011). La expresión de los genes específicos de hifas presenta una regulación tanto positiva como negativa (Figura 5).

La regulación positiva está mediada por factores de transcripción como Efg1, Cph1, Cph2, Flo8, Czf1, Tec1, Rim101 y Ndt80. La activación de Cph1 depende de la activación de la ruta de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), esta cascada de señalización se inicia con la GTPasa Cdc42, que se une a Cts20 e incluye las quinasas Hst7 (MAPKK) y Cek1 (MAPK). Mutantes nulos en estos genes, *cts20Δ*, *hst7Δ*, *cek1Δ* y *cph1Δ* presentan defectos de miceliación en medio sólido pero no en respuesta a suero. El mutante *cek1Δ* presenta menor crecimiento hifal y defectos en virulencia, sugiriendo que esta MAPK participa en más de una ruta (Biswas et al., 2007). Por otra parte, la ruta de señalización por cAMP-PKA juega un papel muy importante en la filamentación ya que activa a Efg1, el máximo regulador de la formación de la hifa, y está basada en la activación mediante AMP cíclico procedente de la ruta iniciada por la adenilato ciclasa codificada por *CYR1*. El cAMP activa las subunidades catalíticas de la PKA, que en *C. albicans* presenta dos isoformas Tpk1 y Tpk2; éstas actúan positivamente sobre el factor transcripcional Efg1 que promueve la expresión de los genes específicos de hifa (HSGs), como los que codifican para las proteínas involucradas en adherencia y penetración en los tejidos, Hwp1, Als3 y Ece1. Los mutantes *tpk1ΔΔ* desarrollan hifas anormales en medio sólido que son menos evidentes en medio líquido; mientras, el mutante *tpk2ΔΔ* muestra hifas parcialmente anormales en medio sólido pero en medio líquido bloquean completamente el crecimiento hifal (Sonneborn et al., 2000).

La regulación negativa se lleva a cabo a través del correpresor transcripcional Tup1 unido a las proteínas Nrg1 o Rfg1 para mantener el crecimiento levaduriforme en presencia de glucosa y otras condiciones no inductoras. La transcripción de *TUP1* está inducida por farnesol y la unión de esta proteína a los promotores de los genes específicos de hifa inhibe la filamentación.

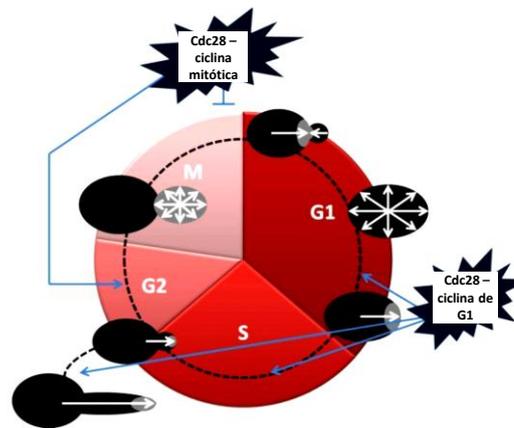


**Figura 5.** Rutas de transducción de señales implicadas que regulan la formación de hifas en *C. albicans*. Tomado de (Sudbery, 2011).

### 1.5. La quinasa dependiente de ciclinas Cdc28 controla la progresión del ciclo celular y morfogénesis

Las proteínas quinasa dependientes de ciclina (Cdks) controlan la progresión del ciclo celular de las células eucariotas (Lew and Reed, 1993; Mendenhall and Hodge, 1998). Éstas son proteínas quinasa que tienen preferencia por fosforilar sustratos con la secuencia consenso S/T-P-X-K/R (donde X es cualquier aminoácido). De manera general, podemos decir, que la actividad quinasa total asociada a las Cdks se mantiene baja en la fase G1, alcanzando su máximo nivel en mitosis y decayendo de forma brusca durante la salida de mitosis.

El papel de las quinasa dependientes del ciclo celular ha sido primeramente estudiado y desarrollado en la formación de la yema en *S. cerevisiae*. La asociación de estas Cdks con diferentes ciclinas promueve en G1 el crecimiento polarizado para la formación de la yema, mientras que en G2 promueve la expansión isotrópica de la célula (Mendenhall and Hodge, 1998).



**Figura 6.** La quinasa dependiente de ciclinas Cdc28 controla el ciclo celular y la morfogénesis en *C. albicans*.

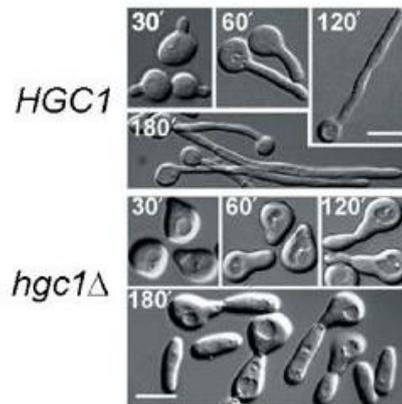
En *C. albicans*, la progresión del ciclo celular es dirigida por una sola Cdk, Cdc28. La asociación de Cdc28 con diferentes ciclinas de G1 o G2 genera complejos con afinidad por distintos sustratos específicos que regulan las diferentes transiciones del ciclo celular (Bloom and Cross, 2007; Loog and Morgan, 2005) (Figura 6). Los complejos Cdc28/G1 estimulan la actividad de la GTPasa Cdc42 activando el crecimiento polarizado (McCusker et al., 2007); por el contrario se desconocen dianas de Cdc28/G2 para la distribución isotrópica de la maquinaria de secreción.

### 1.5.1. La ciclina de G1 Hgc1 promueve el desarrollo hifal en *C. albicans*

En *C. albicans*, las Cdk desempeñan también un papel importante en morfogénesis durante el crecimiento hifal. Como se ha comentado anteriormente la actividad de Cdc28 cambia a lo largo del ciclo celular mediante su unión a las subunidades reguladoras llamadas ciclinas. *C. albicans* ha conseguido el desacoplamiento entre crecimiento y ciclo celular gracias a la expresión de una ciclina de G1, Hgc1, utilizada específicamente para promover el crecimiento hifal. La expresión de *HGC1* depende del factor de transcripción Efg1 (Zheng and Wang, 2004), por tanto, se mantendrá el crecimiento polarizado siempre que permanezcan las señales ambientales de inducción. Las dianas de fosforilación de Cdc28<sup>Hgc1</sup> incluyen activadores o inhibidores de proteínas implicadas tanto en el establecimiento y

## Introducción

mantenimiento del crecimiento apical como en la separación celular (Figura 8). Las células *hgc1Δ* dan lugar a un tubo germinativo corto que se ensancha en el ápice y que tras poner el primer septo se separa (Figura 7). Por tanto, la biología del desarrollo de la hifa está basada en el crecimiento polarizado en la punta de la hifa y en el control de la separación celular.



**Figura 7. *hgc1Δ* es deficiente en el crecimiento hifal en medio líquido.** Las células procedentes de cultivos estacionarios se inocularon en medio inductor (YPD+10% suero) y se examinaron en intervalos de tiempo. Barra de escala 5µm. Tomado de (Zheng and Wang, 2004).

### 1.5.2. Dianas de Cdc28 durante el crecimiento polarizado

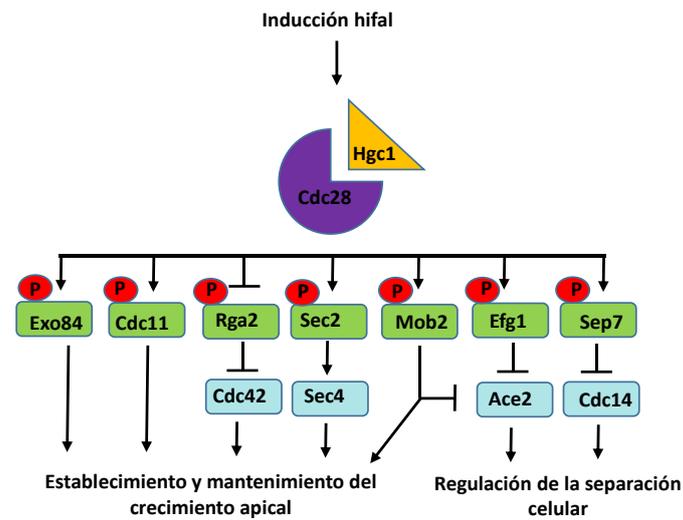
Existen múltiples proteínas implicadas en el crecimiento polarizado de *C. albicans* y que son reguladas por Cdc28 (Figura 8). Dos de las septinas mencionadas anteriormente se fosforilan por Cdc28; Cdc11 es primeramente fosforilada de forma directa por Cdc28<sup>Ccn1</sup> y de una forma indirecta por Cdc28<sup>Hgc1</sup> durante la fase de mantenimiento del crecimiento polarizado (Sinha et al., 2007). Los mutantes deficientes en Ccn1 generan hifas capaces de formar el tubo germinativo inicial pero desarrollan un crecimiento isotrópico tras la colocación del primer septo (Sinha et al., 2007). Sep7 también es diana de Cdc28<sup>Hgc1</sup> y su fosforilación es esencial en la regulación del anillo de septinas durante el crecimiento hifal ya que controla la separación celular después de la citoquinesis cambiando las propiedades del anillo e inhibiendo la separación (González-Novo et al., 2008; Sudbery, 2011).

Otra diana de Cdc28 es Efg1, factor de transcripción activado por la ruta del cAMP; que cuando es fosforilado en hifas por Cdc28<sup>Hgc1</sup> inhibe la expresión de enzimas

## Introducción

de degradación del septo (SDEs) y controla la separación después de la citoquinesis (Sudbery, 2011).

Cdc28<sup>Hgc1</sup> también fosforila a Rga2, la GAP del regulador morfológico Cdc42. Rga es un regulador negativo del crecimiento polarizado y su fosforilación es necesaria para inactivar esta proteína (Sudbery, 2011; Zheng et al., 2007).



**Figura 8.** Dianas de Cdc28/Hgc1 en *C. albicans* durante la inducción hifal.

Sec2, una de las proteínas asociadas al Spitzenkörper, un complejo subapical encargado de dirigir el crecimiento hiperpolarizado en las hifas, también es fosforilada por Cdc28-Hgc1 durante el crecimiento hifal y su fosforilación es necesaria para su correcta localización en el complejo y el desarrollo hifal (Bishop et al., 2010).

Mob2, el coactivador de Cbk1 en la ruta RAM, también se fosforila por esta CDK y es esencial para su correcta co-localización con Cbk1 durante el crecimiento polarizado en *C. albicans* (Gutierrez-Escribano et al., 2011).

La última de las dianas descritas se trata de la proteína del exocisto, Exo84. La fosforilación de esta proteína por Cdc28-Hgc1 es necesaria para excluir a Exo84 del plano de división una vez que se ha formado la pared secundaria del septo. Esta fosforilación reduce su afinidad por la fosfatidilserina de la pared durante el mantenimiento del crecimiento polarizado en hifas (Caballero-Lima and Sudbery, 2014).

## Introducción

### 1.6. Determinantes de polaridad en *C. albicans*

Durante el crecimiento hiperpolarizado en *C. albicans*, la expansión de la pared celular está restringida a un región activa de la punta de la hifa. En cambio, en las células levaduriformes existe una alternancia entre crecimiento polarizado e isotrópico. Durante la gemación temprana el crecimiento se localiza en un área pequeña polarizada, pero cuando la yema alcanza un tamaño crítico el crecimiento se vuelve isotrópico, de manera que la célula se expande en todas direcciones.

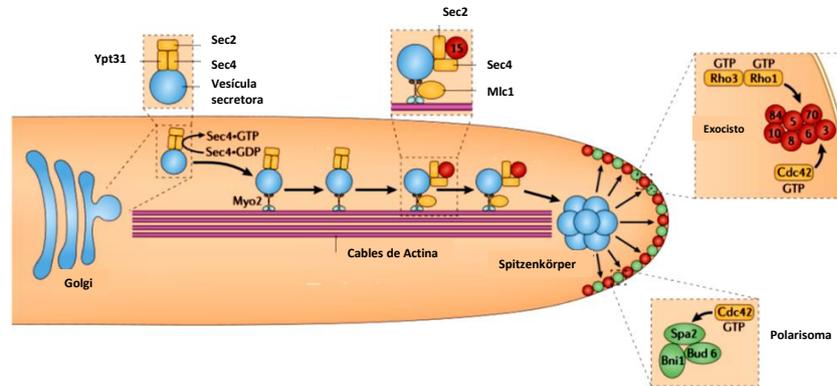
La hifa es el resultado de un crecimiento apical sostenido en el tiempo, para esto es necesario la activación de la GTPasa Cdc42 en la punta. Las GTPasas como Cdc42 actúan como interruptores moleculares puesto que ciclan entre dos formas, una activa (unida a GTP) y otra inactiva (unida a GDP). La función de esta GTPasa es la de reorganizar el citoesqueleto de actina hacia la región del córtex marcado por el anillo de septinas. Una de las GAPs de Cdc42 está codificada por el gen *RGA2*, cuya función es inhibir a la GTPasa, y es una de las dianas más importantes de Cdc28/Hgc1 en el crecimiento polarizado. De esta forma, ante factores que estimulan el crecimiento hifal, Cdc28/Hgc1 fosforila a Rga2 previniendo su localización en la punta de la hifa (Zheng and Wang, 2004), permitiendo de esta forma la configuración activa de Cdc42 y por tanto el mantenimiento del crecimiento apical.

Por otra parte, durante el crecimiento polarizado las vesículas de secreción se unen a la membrana plasmática y aportan tanto los materiales requeridos para la expansión de la misma, como las enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular. Estas vesículas se desplazan a lo largo de los cables de actina hasta el sitio en crecimiento donde se acoplan a la pared celular y permiten la expansión de la misma.

Cuando la vesícula secretora abandona el aparato de Golgi, la GTPasa Ypt31 recluta a Sec2, el factor intercambiador de guanina (GEF), que activa la Rab GTPasa Sec4 en la superficie de las mismas (Medkova et al., 2006). Además, después de salir de Golgi, Sec15 interactúa con Sec4 (Guo et al., 1999; Wu, 2008). Varias de las proteínas de anclaje de vesículas como Sec4 y Sec2, y la cadena ligera de miosina Mlc1 se localizan en un punto en el ápice de la hifa, el Spitzenkörper, que dirige el crecimiento en la punta de hongos filamentosos (Sudbery, 2011). Por otra parte, Myo2 es un tipo de

## Introducción

miosina V que forma un complejo con la cadena ligera de Mlc1 para transportar las vesículas a lo largo de los cables de actina (Figura 9) (Sudbery, 2011; Woo et al., 2003).



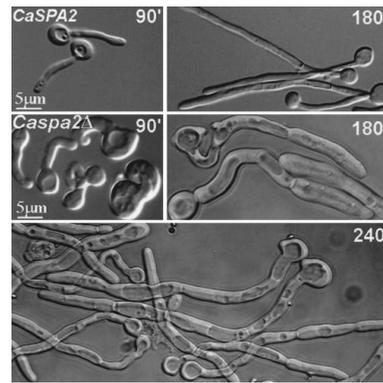
**Figura 9. Modelo de liberación de vesículas secretoras en la punta de la hifa basados en el crecimiento polarizado de *S. cerevisiae*.** Desde el *trans*-Golgi network (TGN), la GTPasa Ypt31 recluta a Sec2 en la superficie de las vesículas nacientes. Sec2 activa la Rab GTPasa Sec4, y la vesícula puede dejar el TGN. El componente del exocisto Ypt31 es sustituido por Sec15, el cual físicamente interactúa con Sec2 y Sec4. Las vesículas son transportadas juntas hacia la punta a través de los cables de actina. Estos cables están formados por la formina Bni1 ayudada por el polarísoma, el cual se localiza en la superficie celular y está formado por Spa2 y Bud6. La miosina Myo2, forma un complejo con la cadena ligera de la miosina (Mlc1), proporcionando la fuerza para el transporte de vesículas. Las vesículas se acumulan en una región subapical llamada *Spitzenkörper* antes de la unión con el exocisto, el cual está compuesto por Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 y Exo84. Modificado de (Sudbery, 2011)

### 1.6.1. Polarísoma, Spitzenkörper y Exocisto.

En *C. albicans*, la polarización de los cables de actina también está mediada por un complejo multiproteico, que cubre la punta de la yema en crecimiento, denominado polarísoma. Una vez que comienza el crecimiento isotrópico, el polarísoma se dispersa para localizarse en el cuello entre la madre y la yema hija en citocinesis. Las hifas de mutantes carentes de alguno de sus componentes: *bud6Δ*, *spa2Δ* y *bni1Δ* generan fenotipos defectivos en polaridad (Figura 10) (Bidlingmaier and Snyder, 2004; Crampin et al., 2005; Zheng et al., 2003). Durante el crecimiento levaduriforme, estos mutantes presentan una deslocalización en las superficies de crecimiento y en la aparición de las yemas, formando células redondeadas con largos cuellos; en condiciones de crecimiento hifal, generan hifas anormalmente gruesas (Figura 10). Recientemente se ha descubierto que la CDK, Cdc28 fosforila a Spa2 tanto durante el crecimiento levaduriforme como en hifas (Wang et al., 2016). En levaduras,

## Introducción

Cdc28-ciclina mitótica fosforila a Spa2 y controla la sincronización para la translocación del polarisoma desde la yema hasta el cuello entre la madre y la hija. Durante el desarrollo hifal Cdc28-ciclina mitótica y Cdc28-Hgc1 cooperan para mantener el polarisoma en la punta de la hifa. El bloqueo de la fosforilación por CDKs provoca una translocación prematura de la punta al cuello en levaduras y una localización inapropiada



**Figura 10. El mutante *spa2Δ* muestra defectos en crecimiento hifal.** Fotografías tomadas en los intervalos de tiempo indicados en una cepa silvestre y *spa2Δ*. Tomado de Zheng 2003 (Zheng et al., 2003).

en el septo en hifas, así como una morfología anormal en algunas condiciones (Wang et al., 2016).

Como se ha comentado, el crecimiento filamentoso es resultado de una polarización extrema; por ello, además, *C. albicans* utiliza una estructura especial llamada Spitzenkörper. Esta estructura se localiza como un punto subapical en la hifa y además de dirigir el crecimiento hacia la punta, actúa como reservorio de vesículas secretoras, asegurando la llegada de una cantidad adecuada de vesículas a las zonas de crecimiento a través de los cables de actina (Martinez et al., 1989; Sudbery, 2011). Al contrario que el polarisoma, este centro está presente únicamente en hifas pero no es levaduras ni pseudohifas (Crampin et al., 2005).

Por otra parte, el exocisto es el complejo multiproteico encargado de anclar las vesículas secretoras a la membrana plásmatica. Una de las subunidades proteicas de este complejo es la proteína Exo84. En *S. cerevisiae* se ha descrito que la fosforilación por la Cdk1-Clb2 en los sitios diana, reduce el crecimiento justo antes de la transición metafase-anafase (Luo et al., 2013); esta fosforilación provoca que el complejo se desensamble, bloqueando la expansión de la superficie. En *C. albicans*, el crecimiento en la hifa, al contrario que en levaduras, debe mantenerse durante la mitosis y la citoquinesis, en este sentido, existe además un sitio de fosforilación por CDKs en el PH domain (S384) de Exo84 que no aparece en *S. cerevisiae* y que es fosforilado específicamente en hifas por la Cdk1<sup>Hgc1</sup>. La fosforilación de este residuo no afecta a la

## Introducción

localización de Exo84 pero reduce su afinidad por los fosfolípidos de las membranas en el lugar del septo, permitiendo el crecimiento en la punta de la hifa; así, mutantes fosfodeficientes en el residuo S384 provoca anomalías en la morfología hifal similares a las del mutante *hgc1Δ* en la que las células pueden iniciar un tubo germinativo normal pero pierden la capacidad de mantener el crecimiento polarizado, ensanchándose en la punta (Caballero-Lima and Sudbery, 2014). Por otra parte Sec3 es un componente del exocisto que actúa de manera independiente a las otras subunidades del complejo, esta proteína se localiza además en los sitios de crecimiento, actuando como punto de referencia para dirigir el exocisto; durante la miceliación la fosforilación de Cdc11 por Gin4 y Cdc28<sup>Ccn1</sup> debilita la afinidad de Sec3 por la septina, asegurando su localización en la punta de la hifa (Sinha et al., 2007; Sudbery, 2007). La delección de *SEC3* es responsable de la acumulación de vesículas cerca de las zonas de crecimiento de las células; además genera células levaduriformes redondeadas e hifas que son incapaces de mantener el crecimiento hiperpolarizado tras la colocación del primer septo, resultando en una expansión isotrópica de la célula apical (Figura 11). Se ha descrito que el doble mutante *cdc11Δ sec3Δ* rescata este fenotipo, desarrollando hifas silvestres. El déficit de esta proteína también provoca la deslocalización de Spa2 y Bni1, componentes del polarisoma (Wang et al., 2007).

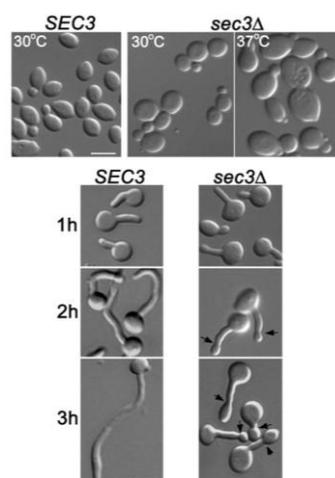
## 2. Las NDR quinasas

Las NRD quinasas (nuclear Dbf2-related kinases) representan una subclase de proteínas quinasas A, PKG y PKC-like (AGC) quinasas. Éstas son componentes esenciales en las rutas de señalización implicadas en la morfogénesis, proliferación celular, desarrollo, salida de mitosis, citoquinesis y apoptosis y están conservadas en el genoma desde levaduras hasta humanos (Hergovich et al., 2006). Además, estas proteínas quinasas requieren la interacción con las proteínas reguladoras Mob para su actividad y función (Hergovich et al., 2005; Hou et al., 2003; Weiss et al., 2002).

## Introducción

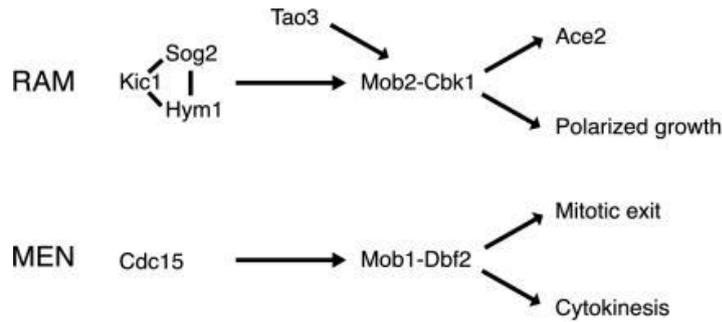
### 2.1. NDR quinasas en hongos

Una característica conservada en las rutas de señalización por NDR quinasas es la existencia de un grupo de proteínas que interaccionan física y funcionalmente formando un complejo multiproteico que constituye el módulo central de la ruta. Este complejo está formado por una proteína “andamio” (*Scaffolding*), una quinasa de la familia STE20, una NRD quinasa y su coactivador Mob. En metazoos, las NRD quinasas son miembros de la ruta “Hippo” la cual posee una función supresora de tumores que determina el tamaño de los órganos (Harvey and Tapon, 2007; Tapon et al., 2002). En hongos, están implicadas en el control del crecimiento polarizado y la salida de mitosis (Maerz and Seiler, 2010). En el genoma de los hongos se han descrito dos grupos funcionales de NDR quinasas. Uno de los grupos es crucial para coordinar la salida de mitosis (mediante la formación del septo y la separación celular) y actúan como enzimas finales del SIN (*Septation Initiation Network*) y de la ruta MEN (*Mitotic Exit Network*). El otro grupo de quinasas son los principales efectores finales de la ruta RAM (*Regulation of Ace2 and Morphogenesis*) y la ruta MOR (*Morphogenesis related NRD kinase*) que controlan la morfología celular. En el primer grupo, el complejo Dbf2/Mob1 regula la salida de mitosis y citoquinesis, mientras que la ruta RAM controla la morfogénesis mediante el complejo Cbk1/Mob2 que fosforila componentes necesarios para la síntesis de la pared celular (Figura 12).



**Figura 11. Defectos morfológicos de las células *sec3Δ*.** *SEC3* y *sec3Δ* crecidas en medio YPD a 30° o 37° (arriba) o en YPD con el 10% de suero a 37° para la inducción hifal (abajo). Imágenes tomadas mediante microscopía de fase interferencial (DIC). Las flechas indican la unión entre el tubo germinativo y la célula hija hinchada. Barra de escala 5 μm.

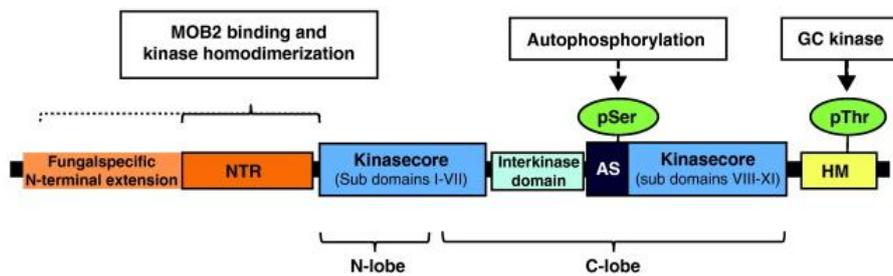
## Introducción



**Figura 12 nbcvx. Modelos conservados de las rutas de regulación RAM y MEN en levadura.** El complejo quinasa Mob2p–Cbk1p, funciona al final de la ruta de morfogénesis y su actividad quinasa y localización en el núcleo de la célula hija requiere del resto de proteínas RAM. En la ruta MEN, la proteína Cdc15p activa el complejo Mob1p-Dbf2p. Tomado de (Nelson et al., 2003).

### 2.1.1. Características estructurales y regulación de las NDR quinastas

La estructura primaria de las proteínas NDR está altamente conservada desde levaduras hasta humanos (Figura 13). Las NDR quinastas se han clasificado como un subgrupo de la familia de AGC proteínas quinastas (proteína quinasa A, PKG y PKC-like) basándose en la secuencia del dominio catalítico, que contiene 12 subdominios. El segmento de activación (AS), localizado en el subdominio VII, y el motivo hidrofóbico (HM), localizado en el extremo C-terminal, presentan sitios de fosforilación que son esenciales para la actividad catalítica en humanos, moscas y levaduras chan (Chan et al., 2005; Emoto et al., 2004; Millward et al., 1999; Stegert et al., 2005; Tamaskovic et al., 2003).

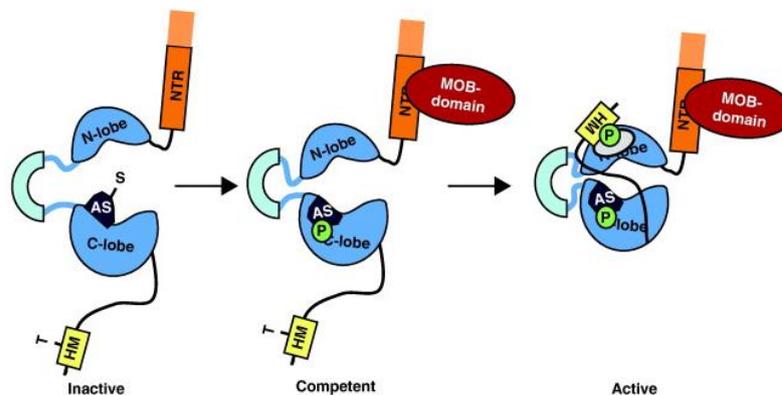


**Figura 13. Estructura de las NDR quinastas** El dominio NDR quinasa consiste en 12 subdominios que forman el núcleo bilobulado de la quinasa (N-Lóbulo: subdominios I-IV; C-Lóbulo: subdominios V-XI). El núcleo catalítico está interrumpido por una inserción de 30-60 aminoácidos (azul claro). El segmento de activación (AS, azul oscuro) contiene un residuo de serina autofosforilable (pSer, verde). Una región N-terminal (NTR, naranja) con propiedades básicas que permiten la homodimerización y unión de la proteína co-activadora, Mob. Además contiene una extensión en el N-terminal específica de hongos, rica en glutamina y arginina que refuerza esta interacción (naranja claro). Otro elemento regulador, el motivo hidrofóbico (HM, amarillo) se localiza en el C-terminal y es fosforilado por quinastas tipo GC. Tomado de (Maerz and Seiler, 2010).

## Introducción

Además, las NRD quinasas contienen un dominio regulador en el N-terminal (NTR, *Fungalspecific N-terminal extension*) que contiene un número conservado de residuos básicos hidrofóbicos necesarios para su interacción con los co-activadores Mob (Hergovich et al., 2006; Maerz and Seiler, 2010). Adicionalmente contienen un inserto de 30-60 residuos (*Interkinase domain*) al lado del segmento de activación (AS) que presenta una función inhibitoria de la actividad quinasa (Bichsel et al., 2004; Gogl et al., 2015).

La activación de las NDR quinasas requiere de múltiples pasos; inicialmente la proteína Mob se une al dominio NTR de la quinasa que promueve su autofosforilación en la serina conservada en el segmento de activación (AS), adquiriendo una actividad quinasa basal. Posteriormente, para conseguir la máxima actividad quinasa, se necesita la fosforilación del residuo conservado treonina en el motivo hidrofóbico (HM) por una quinasa del tipo GC. Esta modificación resulta en una reconfiguración conformacional donde el motivo HM fosforilado se pliega e interacciona con un bolsillo hidrofóbico en el N-lóbulo de la quinasa (Figura 14) (Maerz and Seiler, 2010).



**Figura 14.** Modelo de activación de NDR quinasas, basado en la unión de Mob y dos eventos de regulación por fosforilación. Tomado de (Maerz and Seiler, 2010)

## 2.2. Salida de mitosis en levaduras

En *S. cerevisiae*, después de la separación de los cromosomas, la ruta MEN controla la salida de mitosis. Esta ruta dirige la actividad de la quinasa dependiente de la ciclina mitótica para permitir la salida de mitosis y el inicio del programa de transcripción de genes de G1 (Bardin and Amon, 2001).

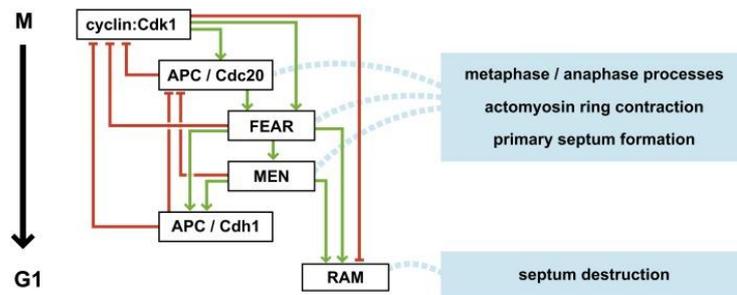
## Introducción

Los eventos mecánicos de la división celular tardía y la separación de la madre y la hija ocurren en una sucesión rápida y un orden preciso, reflejando una extrema coordinación entre diversos procesos en el tiempo y el espacio. En la transición M/G1 los efectos de la Cdk mitótica son invertidos, y las vías de regulación que promueven los eventos del ciclo celular tardío son activados. En *S. cerevisiae*, el control de la entrada en mitosis implica la destrucción proteolítica mediada por ubiquitinación de las ciclinas mitóticas en la progresión metafase-anafase (Enserink and Kolodner, 2010; Sullivan and Morgan, 2007), además se requiere que los efectos de fosforilación de la Cdk mitótica sean eliminados. Como se ha introducido, las Cdks mitóticas son S/T quinasas que fosforilan preferiblemente la secuencia S/T-P-X-K/R. En levaduras, la eliminación de estos fosfatos es llevada a cabo por la fosfatasa Cdc14 (Amon, 2008; Stegmeier and Amon, 2004);

La salida de mitosis puede dividirse en cuatro eventos (Figura 15) En primer lugar la ciclina mitótica promueve el ensamblaje del complejo APC/Cdc20 (*Anaphase Promoting Complex/cyclosome*), una E3 ubiquitina ligasa que reconoce proteínas mitóticas y las marca para su destrucción por el proteasoma, es decir, inicia la degradación de las ciclinas mitóticas. El segundo y tercer mecanismo incluyen la liberación en la anafase temprana de Cdc14 (FEAR) y la activación de la ruta de salida de mitosis (MEN) (de Bettignies and Johnston, 2003; Dumitrescu and Saunders, 2002; Queralt and Uhlmann, 2008; Stegmeier and Amon, 2004; Sullivan and Morgan, 2007; Weiss, 2012). Mientras que la ruta FEAR no es esencial, la ruta MEN es estrictamente requerida para salir de mitosis. Estudios recientes han demostrado de las funciones de Cdc14 mediada por FEAR son distintas que las mediadas por MEN. Mientras que las funciones dependientes de la ruta FEAR desempeñan un papel secundario, los mutantes en esta ruta sólo muestran retraso en la salida de mitosis, los mutantes MEN quedan bloqueados en anafase. En este sentido, se ha descrito que la proteína Cdc14 dependiente de la ruta MEN tiene como funciones la inactivación de la Cdk mitótica, imprescindible para salir de mitosis y la activación de la citoquinesis (Stegmeier and Amon, 2004).

## Introducción

El último proceso se basa en dirigir la localización y activación del factor de transcripción Ace2, que enciende la expresión de los genes de separación y otros mecanismos para la destrucción del septo a través de la ruta RAM (*Regulation of Ace2 and Morphogenesis*). Este sistema también funciona en el control de la morfogénesis celular (Maerz and Seiler, 2010; Nelson et al., 2003).



**Figura 15. Esquema general de la organización del control de la salida de mitosis.** La salida de mitosis está controlada por una serie de sistemas que activan (líneas verdes) e inhiben (líneas rojas) el paso de M a G1. La secuencia temporal está ordenada de arriba abajo. (Weiss, 2012).

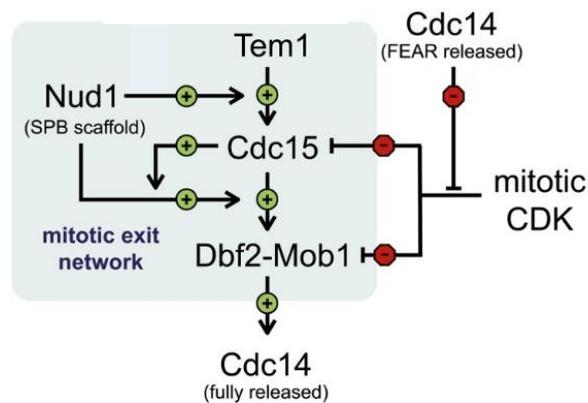
### 2.2.1. Cdc14 es un regulador central de la salida de mitosis

Cdc14 es esencial para la inactivación de los factores mitóticos. Las células deficientes en la actividad Cdc14 no pueden salir de mitosis, quedándose bloqueadas en anafase con alta actividad Cdk mitótica. Esta proteína pertenece a la familia de S/T fosfatasas, conservada en células eucariotas, que tienen afinidad por defosforilar residuos de fosfoserina o fosfotreonina adyacentes a un residuo de prolina (Gray et al., 2003).

En *S. cerevisiae* la actividad de Cdc14 está regulada a lo largo del ciclo celular. Durante toda la interfase hasta metafase, Cdc14 se encuentra inactiva en el nucléolo, retenida por el complejo RENT (*Regulator of Nucleolar Silencing and Telophase*), a través de su interacción con la proteína Net1 (Shou et al., 1999; Traverso et al., 2001). Al inicio de la anafase se produce una primera liberación de Cdc14 al citoplasma a través de la ruta FEAR (*Cdc Fourteen early anaphase release*) (Stegmeier et al., 2002) inactivando la CDK-mitótica; seguidamente se produce una segunda oleada de liberación, al final de la anafase, dependiente de la ruta MEN (*Mitotic Exit Network*) (Jaspersen et al., 1998). En la ruta MEN, al inicio de la cascada, Tem1-GTP activa a Cdc15 (similar a las Ste20 quinasas) que fosforila a Dbf2 que junto a la subunidad

## Introducción

reguladora Mob1 que activa a la fosfatasa Cdc14 (Figura 16) durante la anafase tardía para incrementar su liberación de Net1 (Bardin and Amon, 2001; Geymonat et al., 2002). La liberación de grandes cantidades de Cdc14 permite revertir los efectos de la Cdc28-ciclina mitótica (Clb2) y además controla la entrada en el núcleo de los factores de transcripción Swi5 y Ace2 para iniciar el programa de transcripción de genes de G1 y la separación celular respectivamente.



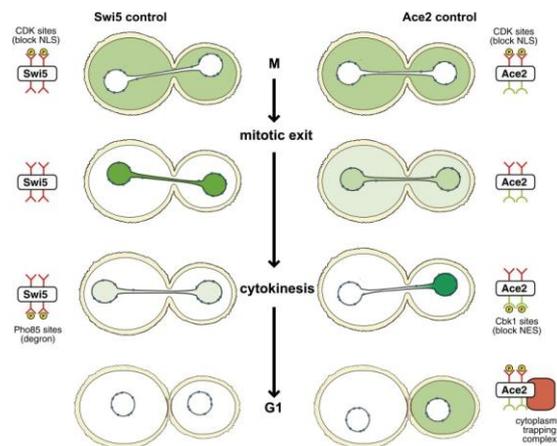
**Figura 16. La ruta MEN.** El núcleo de MEN (Tem1-Cdc15-Dbf2 junto con la proteína de andamiaje Nud1) está regulado negativamente por la CDK mitótica cuyos efectos son revertidos por la fosfatasa Cdc14 procedente de una primera liberación a través de la ruta FEAR. Tomado de (Weiss, 2012).

### 2.2.2. Control de la separación celular y entrada en G1

Tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans*, la separación celular termina por la degradación del septo existente entre la madre y la hija al final de cada división celular. El septo es rápidamente destruido minutos después de ser construido, el control de este proceso en el tiempo y el espacio llevado a cabo por la ruta RAM regulando la transcripción y traducción de genes implicados. El factor de transcripción Ace2 controla la expresión de genes específicos de la hija (DSG), que incluyen a *CTS1*, *SCW11*, *DSE2*, *DSE* y *DSE4*, que codifican para enzimas que degradan el septo desde el lado de la hija durante G1 a través de la ruta RAM (*Regulation of Ace2 and Morphogenesis*) (Nelson, 2009). Por otro lado, el factor de transcripción Swi5 activa la expresión de Sic1, un potente inhibidor de la CDK (Toyn et al., 1997). Su expresión y activación durante M/G1 provoca que la salida de mitosis sea un proceso irreversible.

## Introducción

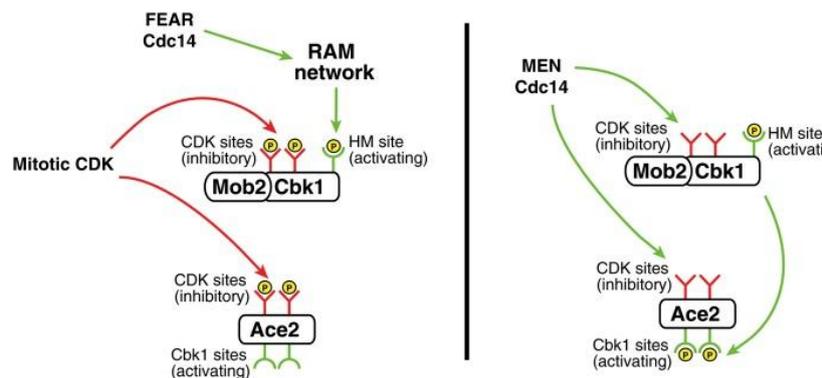
Ambos factores de transcripción son producidos en mitosis pero secuestrados en el citoplasma debido a la fosforilación por la ciclina mitótica en sitios CDKs que inactiva sus secuencias de localización nuclear (NLS). La liberación de Cdc14 del nucléolo tras la activación de la red de salida de mitosis (MEN) elimina esta inhibición de Swi5 revirtiendo las fosforilaciones de la CDK y permitiéndole la entrada en el núcleo para la expresión de genes específicos de G1. De la misma manera, Ace2 es defosforilado por Cdc14 pero este hecho no es suficiente para la acumulación de Ace2 en el núcleo. En *S. cerevisiae*, este factor de transcripción contiene además dos secuencias de exportación nuclear (NES) que son inactivadas en el núcleo de la célula hija mediante su fosforilación por Cbk1/Mob2, permitiendo la expresión de los genes específicos para la degradación del septo (Figura 17).



**Figura 17. Comparación de la localización de Ace2 y Swi5.** Swi5 y Ace2 se representan en color verde en ambos diagramas de las células. Los dibujos de las proteínas contienen las modificaciones relevantes. En anafase y telofase temprana, ninguna de las proteínas entra en el núcleo, ambas, ambas secuencias NLS están inactivas debido a la fosforilación por la CDK mitótica. Más tarde, en telofase, ambas proteínas se defosforilan por Cdc14 y entran las dos en el núcleo de la célula madre e hija. Este hecho es suficiente para la acumulación de Swi5 que carece de secuencias NES de exportación nuclear, al contrario de Ace2 que no se acumula significativamente en el núcleo. Antes de la contracción del anillo de actomiosina, las secuencias NES de Ace2 son fosforiladas por Cbk1 en el núcleo de la célula hija, inhibiendo su exportación nuclear, lo que provoca su acumulación específica en este núcleo y es eliminado del citoplasma de ambas células. A mitad de G1, las secuencias NES de Ace2 se defosforilan y la proteína es exportada del núcleo y queda retenida en un complejo de atrapamiento citoplásmico. Ace2 no puede volver a entrar en el núcleo de la nueva célula una vez que ha salido de mitosis. Tomado de (Weiss, 2012).

## Introducción

Por otro lado la activación de Cbk1 también depende de la liberación de la fosfatasa Cdc14 del nucleolo en la activación de la red de salida de mitosis (MEN). De esta manera, Cdc14 se transloca al anillo de septinas después de la mitosis, activando a Cbk1 mediante la defosforilación de los sitios CDKs de esta quinasa. La activación de Cbk1 permite su acción sobre el factor de transcripción Ace2 dirigiéndolo al núcleo de la célula hija y promoviendo la expresión de enzimas hidrolasas que degradan el septo (Figura 18).



**Figura 18. MEN y FEAR controlan la ruta RAM.** La ruta FEAR activa a Cbk1 mediante la fosforilación en el motivo hidrofóbico (HM), en anafase temprana, mientras la fosforilación de los sitios CDK inhibe la entrada de Ace2 en el núcleo, impidiendo la función de la ruta RAM. La activación de MEN libera grandes cantidades de Cdc14, que elimina las fosforilaciones inhibitorias de la CDK en Cbk1, demás componentes de la ruta RAM y de Ace2 y probablemente es la responsable de que Cbk1 se mantenga fosforilada en el sitio HM. Tomado de (Weiss, 2012).

### 2.2.3. Cdc14 en *C. albicans*.

A diferencia de *S. cerevisiae*, donde *CDC14* es esencial, las células de *C. albicans* deficientes en *CDC14* son viables. Durante el crecimiento levaduriforme, su fenotipo más característico es la incapacidad de separarse después de finalizar la citoquinesis, lo que da lugar a la formación de grumos, y una pérdida del crecimiento invasivo en el agar. En condiciones de crecimiento hifal, los mutantes generan hifas muy cortas indicando la importancia de esta fosfatasa en el desarrollo hifal (Clemente-Blanco et al., 2006). Esta proteína se encuentra regulada tanto espacial como temporalmente a lo largo del ciclo celular.

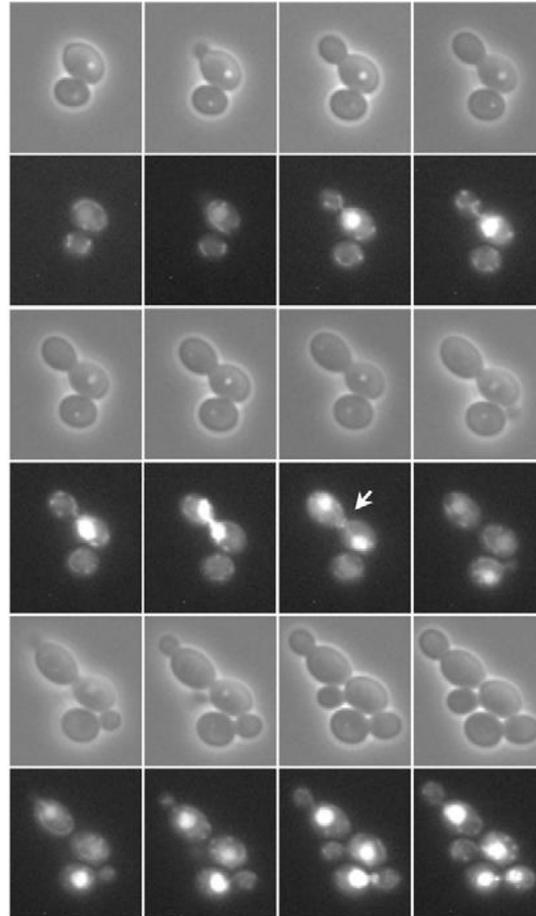
## Introducción

Respecto a su regulación temporal, tanto en levaduras como en hifas, sus niveles varían a lo largo del ciclo celular. A diferencia de *S. cerevisiae*, donde los niveles de proteína son constantes, en *C. albicans* sus niveles son indetectables en G1, alcanzando sus niveles máximos en G2/M donde es fosforilada a la salida de mitosis (Clemente-Blanco et al., 2006).

Respecto a su regulación espacial, es diferente en levaduras e hifas. Durante el crecimiento levaduriforme, Cdc14 se distribuye por todo el núcleo en la transición G1-S; en la mitosis temprana se localiza en los *spindle pole body* (SPB; centro organizador de microtúbulos en levaduras); finalmente, durante la citoquinesis esta señal se atenúa localizándose preferentemente en la región del septo (Figura 19). Durante el crecimiento hifal, Cdc14 se localiza únicamente en el núcleo apical del micelio y al contrario de lo que ocurre en las formas levaduriformes, nunca se observa en el septo tras la citoquinesis (Clemente-Blanco et al., 2006).

Esta inhibición de la localización de Cdc14 en el septo de las células hifales es importante para inhibir

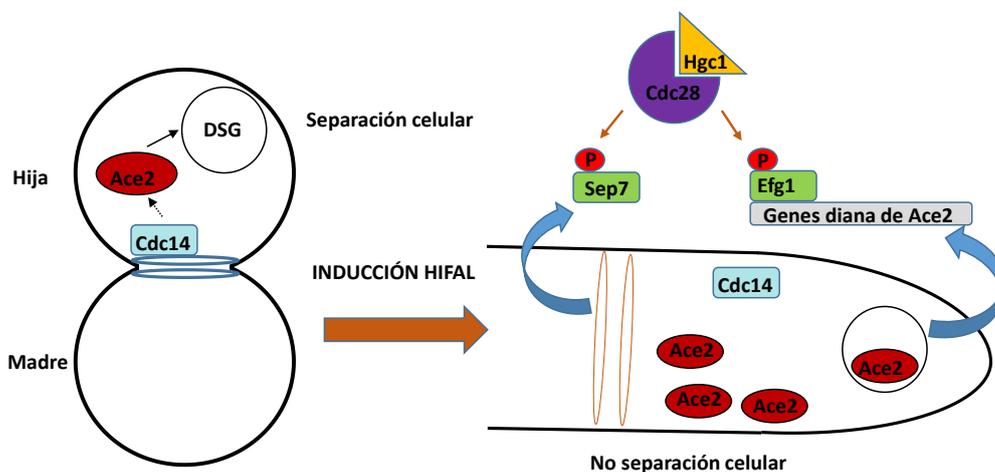
la separación celular. Mientras que en levaduras, las células se separan tras la citoquinesis, en hifas dicha separación se encuentra inhibida lo que permite generar las estructuras multicelulares características de las hifas.



**Figura 19. Localización de Cdc14p durante el crecimiento levaduriforme.** *Time-lapse* en microscopio de fluorescencia. Las filas 1, 3 y 5 corresponden a imágenes con contraste diferencial de interferencia (DIC), en las filas 2, 4 y 6 se observa la proteína Cdc14 marcada con GFP; las fotografías fueron tomadas cada 15 minutos. Tomado y modificado de (Clemente-Blanco et al., 2006).

## Introducción

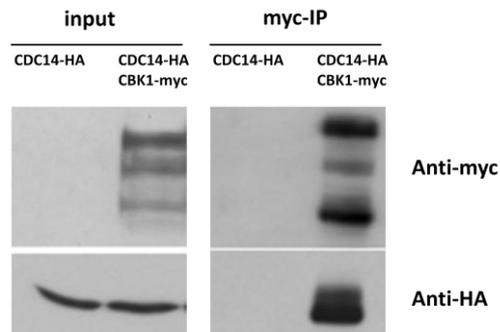
Como se ha comentado, en *C. albicans* durante el crecimiento levaduriforme Cdc14 se acumula en el septo al finalizar la mitosis, una vez allí, activaría al complejo Cbk1/Mob2 para que éste a su vez active al factor de transcripción Ace2 necesario para la transcripción de los genes que codifican las hidrolasas que degradan la pared celular del septo. En el crecimiento miceliar se inhibe la separación celular después de la citoquinesis, resultando en una hifa madura formada por una cadena linear de células alargadas. Esta inhibición se debe a un cambio en la dinámica del anillo de septinas y de la acción de la ciclina específica de hifas, Hgc1 (González-Novo et al., 2008; Wang et al., 2009). Sep7 es la septina responsable de modificar la dinámica del anillo. Se ha propuesto que la fosforilación de Sep7 a través de Cdc28<sup>Hgc1</sup> podría inhibir la separación celular durante el crecimiento hifal (González-Novo et al., 2008) excluyendo a Cdc14 del septo que no podría por tanto defosforilar a Cbk1, evitando la presencia de Ace2 en el núcleo. Además, la fosforilación de Efg1 por Cdc28<sup>Hgc1</sup> durante el crecimiento hifal promueve su asociación a los promotores de los genes diana de Ace2, actuando como supresor de la transcripción de los genes implicados en la hidrólisis de la pared celular (Figura 20) (Wang et al., 2009).



**Figura 20. Modelo de regulación de la separación celular en *C. albicans*.** El anillo de septinas sirve como andamio para Cdc14 requerida para que el factor de transcripción Ace2 se dirija al núcleo de la célula hija. Como consecuencia, el programa de separación celular es activado y el septo degradado. Cuando se induce el crecimiento hifal, la dinámica del anillo de septinas cambia en un proceso dependiente de la fosforilación de Sep7 por Cdc28/Hgc1. Esta modificación previene la localización de Cdc14 en el cuello de la yema (Wang et al., 2009). Además, la fosforilación de Efg1 por Cdc28<sup>Hgc1</sup> promueve su asociación con los genes diana de Ace2, actuando como represor. Tomado de Wang (Wang et al., 2009).

## Introducción

Por tanto, este modelo implica que debe de existir una interacción física y funcional entre Cbk1/Mob2 y Cdc14. Recientemente, mediante experimentos de co-inmunoprecipitación en nuestro grupo de investigación hemos puesto de manifiesto una interacción física *in vivo* entre el complejo NDR quinasa y la fosfatasa Cdc14 (Figura 21). Esta interacción podría sugerir una relación funcional entre ambas actividades enzimáticas en las que pudieran existir interacciones recíprocas.

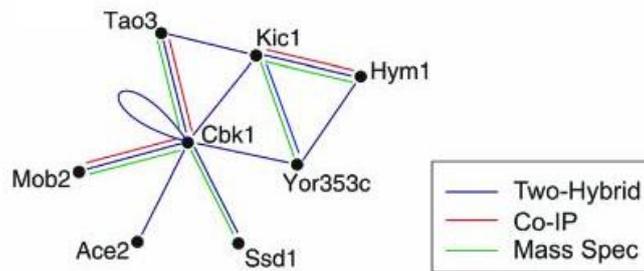


**Figura 21. Cdc14 interacta *in vivo* con la NDR quinasa Cbk1.** WBs de inmunoprecipitados de myc de las cepas indicadas. A la izquierda, se encuentra el resultado de los extractos totales de las mismas cepas (input). (Tesis Pilar Gutiérrez).

### 2.3. Morfología celular y ruta RAM en levaduras

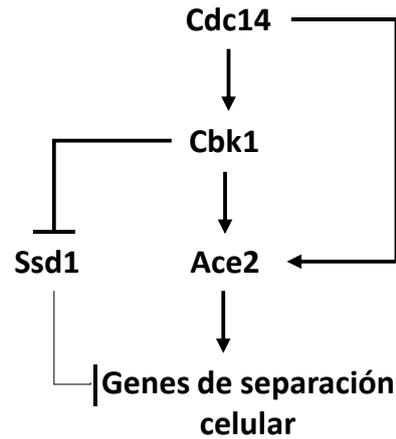
Como ya se ha comentado, *S. cerevisiae* la ruta de señalización denominada RAM (*Regulation of Ace2 and Morphogenesis*) está implicada en regular el crecimiento polarizado a través de la selección del lugar de nacimiento de la yema y su desarrollo y en la separación celular regulando la secreción de enzimas hidrolasas para degradar el septo tras la mitosis (Nelson et al., 2003). Esta ruta de transducción de señales se compone de dos módulos funcionales que interactúan gracias a una proteína de andamiaje, Tao3. El módulo efector de esta ruta está formado por la NRD quinasa Cbk1 y su co-activador Mob2. El segundo módulo regula la actividad de Cbk1 y está formado por la STE20 quinasa Kic1 y su coactivador Hym1; además, la proteína Sog2 interactúa con Hym1 y Cbk1 y es necesaria para el correcto desarrollo de la señalización de la ruta (Figura 22) (Nelson et al., 2003).

## Introducción



**Figura 22.** Resumen de las interacciones de proteínas en la ruta RAM. *YOR353c = SOG2*. Tomado de (Nelson et al., 2003).

Este complejo multiproteico se localiza en las zonas de crecimiento de la levadura, es decir, en el cuello de la yema y en el córtex de la célula hija. Además, el complejo Cbk1/Mob2 también se localiza en el núcleo de la célula hija en la transición M/G1 (Colman-Lerner et al., 2001; Weiss et al., 2002). Las células deficientes en alguna de estas proteínas presentan dos fenotipos independientes: separación celular deficiente y defectos en el mantenimiento del crecimiento polarizado. Se han descrito únicamente dos sustratos de Cbk1 relacionados con la remodelación de la pared celular (Figura 23); uno de ellos es el factor de transcripción Ace2, cuya fosforilación por Cbk1 provoca que éste se acumule específicamente en el núcleo de la hija en la mitosis tardía-G1, bloqueando su exportación (Mazanka et al., 2008) donde dirige la expresión de genes específicos de la hija. El fallo en la separación celular es debido a la pérdida de la transcripción de genes dependientes de Ace2, tales como la enzima quitinasa Cts1 y la glucanasa Scw11 (Colman-Lerner et al., 2001). El segundo sustrato se trata de la proteína de unión a mRNAs, Ssd1, que juega un papel muy importante en la remodelación y organización de la pared celular en los sitios de crecimiento ya que, entre otros, se asocia con mRNAs que codifican para manoproteínas de pared. La fosforilación de Ssd1 por Cbk1 permite la localización cortical de Ssd1-mRNA en las zonas de crecimiento, mientras que la inhibición de la NDR quinasa, lo asocia a cuerpos de procesamiento (*P-bodies*) y gránulos de estrés, reprimiendo la traducción de los RNA asociados (Jansen et al., 2009; Weiss, 2012).



**Figura 23. Modelo de control de destrucción del septo.** La regulación de la expresión de genes de separación celular es llevada a cabo por Cdc14 mediante la activación de Ace2 y a la ruta RAM y además por la fosforilación de Ace2 y Ssd1 a través de Cbk1. Modificado de (Weiss, 2012).

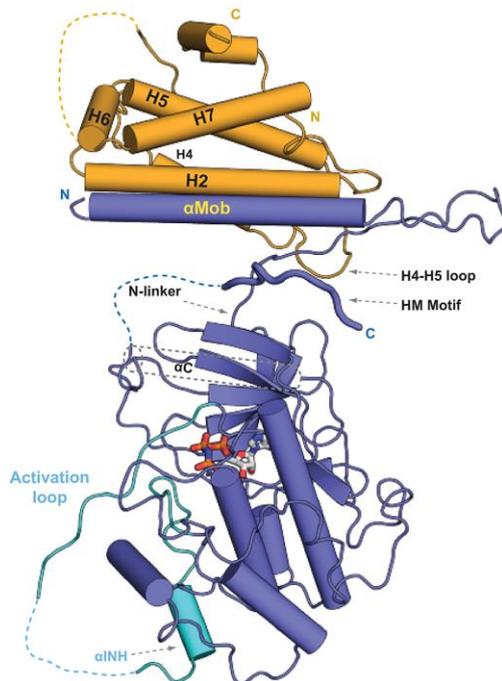
En *C. albicans* la ruta RAM también regula el crecimiento polarizado y la separación celular, pero a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae* que responde únicamente a señales internas, aquí responde tanto a señales internas, durante el crecimiento de la levadura, como a señales externas, en la inducción de la miceliación. En este sentido, se ha descrito una relación entre las Cdks y el crecimiento polarizado en respuesta a señales ambientales dependientes de la ruta RAM a través de la fosforilación directa de Mob2 en cuatro sitios consenso en las fases tempranas del desarrollo hifal por Cdc28<sup>Hgc1</sup> (Gutierrez-Escribano et al., 2011).

### 2.3.1. Estructura y fosforregulación de Cbk1-Mob2

Recientemente, la cristalización del complejo Cbk1-Mob2 de *S. cerevisiae* ha permitido estudiar detalladamente cómo se produce la unión con Mob2, la activación de la quinasa y la fosforilación de sustratos (Figura 24). Mob2 se une a la extensión conservada del extremo N-terminal de Cbk1, región previamente identificada en la que las NDR quinasa se unía a las proteínas Mob. Una parte de la extensión del N-terminal forma una larga hélice ( $\alpha$ -Mob), que corresponde al mayor sitio de contacto con Mob2. La hélice  $\alpha$ -Mob2 está seguida de un giro brusco y la región *N-linker*, un segmento corto de la proteína que conecta con el núcleo catalítico del dominio quinasa, con el que también interacciona el co-activador. En el extremo C-terminal, el

## Introducción

motivo hidrofóbico HM contiene una treonina altamente conservada en la posición 743 que es fosforilada por la Ste20 quinasa Kic1. La fosforilación de este residuo comprime un bolsillo formado en por el *N-linker* y  $\alpha$ -Mob2 mediante interacción por puentes salinos entre las regiones  $\alpha$ C y  $\alpha$ -Mob2 de la quinasa, lo que facilita la entrada de los sustratos al centro catalítico (D475) (Gogl et al., 2015). Cbk1 además presenta un largo segmento de activación formando un *loop* que adopta dos conformaciones; en una de ellas esta región ocupa el bolsillo de unión a sustratos, bloqueando el sitio catalítico; en la otra, cuando la T743 está fosforilada el *loop* de activación no está presente en la zona de unión a sustratos. Estas observaciones sugieren que el cambio en la disposición de este *loop* es una forma de autoinhibición de la quinasa. Además de esta fosforilación, para pasar de estado inhibido a abierto es necesaria la autofosforilación del sitio S570 en el segmento de activación, aliviando la inhibición basada en un pseudo-sustrato ejercida por la hélice inhibitoria ( $\alpha$ INH) localizada en el *loop*. La fosforilación en S570 es necesaria para la entrada de los sustratos al sitio catalítico mientras que la fosforilación en la T743 incrementa la afinidad por ellos (Figura 24) (Gogl et al., 2015).



**Figura 24. Estructura tridimensional del complejo Cbk1-Mob2.** Mob2 (narajna) se une a la región N-terminal de Cbk1 (azul) a través de las Hélices H2-H7 y el *loop* H4-H5. “N” y “C” se refieren a los extremos N- y C- terminales de las proteínas. Las regiones flexibles se muestran con líneas discontinuas. HM es el motivo hidrofóbico de las AGC quinasa, y “ $\alpha$ INH” es la hélice alfa inhibitoria que es parte del loop de activación (mostrado en cian). Tomado de (Gogl et al., 2015).

## Introducción

En *S. cerevisiae*, tanto la fosforilación de T743 en el HM del C-terminal como la de S570 en el segmento de activación son necesarias para la función de Cbk1 *in vivo*. De manera que el mutante fosfodeficiente en la S570 apenas tiene actividad catalítica pero presenta un efecto moderado en el fenotipo; en cambio en alelo fosfodeficiente en la T743 presenta una actividad quinasa relativamente normal pero con defectos importantes en el crecimiento polarizado y separación celular. En ambos mutantes, Cbk1 se localiza en la corteza celular e interaccionan normalmente con Mob2. Sin embargo, la fosforilación del motivo hidrofóbico C-terminal es necesaria para la localización asimétrica tanto de la quinasa como del factor de transcripción Ace2 en el núcleo de la célula hija al final de la mitosis (Jansen et al., 2006). En este sentido, la generación de un alelo fosfomimético *cbk1-T743E* suprime los fenotipos de los mutantes RAM, excepto *mob2Δ* (Panozzo et al., 2010). Además recientemente se ha descrito en el hongo patógeno de plantas, *Colletotrium orbiculare*, que el mutante fosfomimético en la T649 de CoCbk1 correspondiente a la T743 de Cbk1 en *S. cerevisiae*, reestablece parcialmente la patogenicidad en un fondo *Copag1Δ/Cokel2Δ* (homólogos de *TAO3* y *KEL2* en *S. cerevisiae*). Además, se ha descubierto que la fosfomimetización en este residuo en un fondo *copag1Δ* causa modificaciones transcripcionales de los genes implicados en la morfogénesis del hongo (Kodama et al., 2017). Por otra parte, en *C. albicans* se ha descrito que la fosforilación de Mob2 por la CDK Cdc28 es necesaria para el mantenimiento del crecimiento polarizado y previene la separación celular durante la formación de la hifa. Esta fosforilación de Mob2 por CDKs tiene lugar en cuatro sitios consenso en el extremo N-terminal (Gutierrez-Escribano et al., 2011). Acorde con esta observación, Cbk1 también presenta seis sitios de fosforilación por CDKs, sin embargo, aún se desconocen las consecuencias de las modificaciones post-traduccionales de estos residuos.

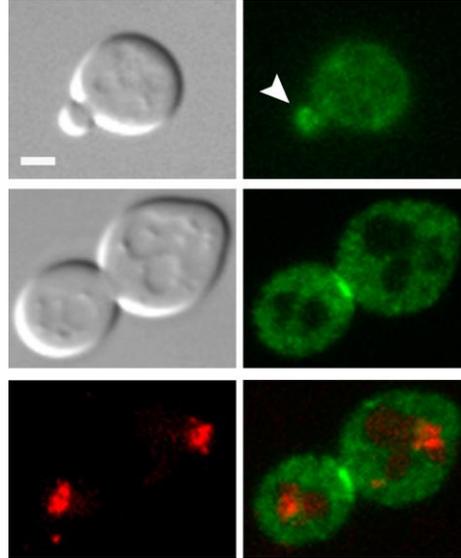
### 2.3.2. La proteína de unión a mRNA, Ssd1

La unión de mRNAs a diferentes proteínas es un mecanismo de regulación post-transcripcional que actúa sobre el procesamiento, localización, traducción y degradación mRNAs en la célula. Estas proteínas de unión a mRNA (RPBs) se unen

## Introducción

directamente a secuencias específicas situadas preferentemente en las regiones codificantes, 3'-UTR y 5'-UTR de los RNA mensajeros a los que se asocian (Hogan et al., 2008).

Como se ha comentado anteriormente, la proteína de unión a mRNA Ssd1 es sustrato de la NRD quinasa Cbk1 (Jansen et al., 2009), que la fosforila en residuos de serina o treonina dentro de una secuencia consenso conservada HX(K/R)(K/R)X(S/T), con una Histidina en posición -5 y una lisina o arginina en posición -3 y/o -2 (Mazanka et al., 2008), y juega un papel muy importante en la remodelación y organización de la pared celular en los sitios de crecimiento. Esta proteína regula la localización y traducción de los mRNAs a los que se encuentra asociada, entre los que existen mRNAs que codifican proteínas relacionadas con pared (Wanless et al., 2014). La proteína Ssd1 se localiza en citoplasma y también se acumula en los



**Figura 25.** Localización de Ssd1 en los sitios de crecimiento polarizado en *S.cerevisiae*. Cultivos en crecimiento exponencial expresando Ssd1-GFP y Pap1-RFP (marcador nuclear). Ssd1 se localiza en las yemas pequeñas y en el cuello de las yemas de mayor tamaño (Kurischko et al., 2011).

lugares de crecimiento polarizado como el córtex de la yema y el plano de división madre-hija (Figura 25). La fosforilación de Ssd1 por Cbk1 permite la acumulación asimétrica y traducción de estos mRNAs en el córtex celular, mientras que la inhibición de Cbk1 o el estrés celular produce la defosforilación de Ssd1 y su asociación con *P-bodies* y gránulos de estrés, reprimiendo la traducción de los mRNAs asociados (Jansen et al., 2009; Kurischko et al., 2011). Por tanto, en los mutantes *cbk1Δ* no se traducen los mRNAs asociados a Ssd1, presentando defectos en la polaridad y en la separación celular; en este último proceso, Ssd1 participa asociándose con mRNAs que codifican para enzimas relacionadas con la degradación del septo como la quitinasa Cts1 (Jansen et al., 2009). La expresión de estos mensajeros específicos de la hija está dirigida por el factor de transcripción Ace2 que también es activado por Cbk1. De esta manera, la quinasa coordina la transcripción de ciertos genes en la hija y la inhibición de su

## Introducción

traducción para generar la asimetría entre madres e hijas. En *S. cerevisiae*, muchos de los defectos del mutante *cbk1Δ* se suprimen al eliminar el gen *SSD1*, lo que sugiere que la principal función de Cbk1 es fosforilar a Ssd1 para permitir la traducción de los mRNAs asociados a esta RBP (Jansen et al., 2009; Jorgensen et al., 2002; Kurischko et al., 2005; Nelson et al., 2003). En *C. albicans*, la delección de *SSD1* también rescata los fenotipos deficientes en polaridad y separación celular de los mutantes RAM durante el crecimiento levaduriforme; sin embargo, las cepas *ssd1Δ* son más sensibles al calcoflúor, lo que indica que Ssd1 es necesario para mantener la integridad de la pared celular (Song et al., 2008). Durante el crecimiento hifal, *ssd1Δ* genera hifas normales y su delección en un fondo *cbk1Δ* rescata parcialmente el fenotipo de polaridad; en este doble mutante *cbk1Δ ssd1Δ* las hifas son más cortas y su anchura es irregular, indicando que existen otros efectores de Cbk1 necesarios para conseguir el mantenimiento de una longitud normal de la hifa (Lee et al., 2015).

## ***OBJETIVOS***

---

## Objetivos

Dada la importancia e impacto de las enfermedades y trastornos causados por *C.albicans*, la búsqueda de las claves que regulan su morfogénesis y el desarrollo de su crecimiento hifal son fundamentales para establecer nuevas estrategias de actuación con dianas específicas que permitan tanto la prevención como el tratamiento de la candidiasis.

El objetivo de este trabajo ha consistido en estudiar la regulación y función de la NDR quinasa de la ruta RAM Cbk1 en la transición levadura-micelio de *C. albicans*, así como la integración de la señalización llevada a cabo por esta quinasa, la fosfatasa Cdc14, las CDKs y la PKA Tpk2, en este proceso fisiológico. Concretamente nos hemos centrado en identificar la importancia de la fosforregulación entre Cbk1 y Cdc14, y por las CDKs y Tpk2, en los procesos implicados en morfogénesis y desarrollo de la hifa.

***RESULTADOS***

---

# **CAPÍTULO 1**

*Regulación y función de la NDR quinasa Cbk1 en la transición levadura-hifa*

## Resultados

### 1. Regulación de Cbk1

#### 1.1. Cbk1 modifica su estado de fosforilación en respuesta al crecimiento hifal.

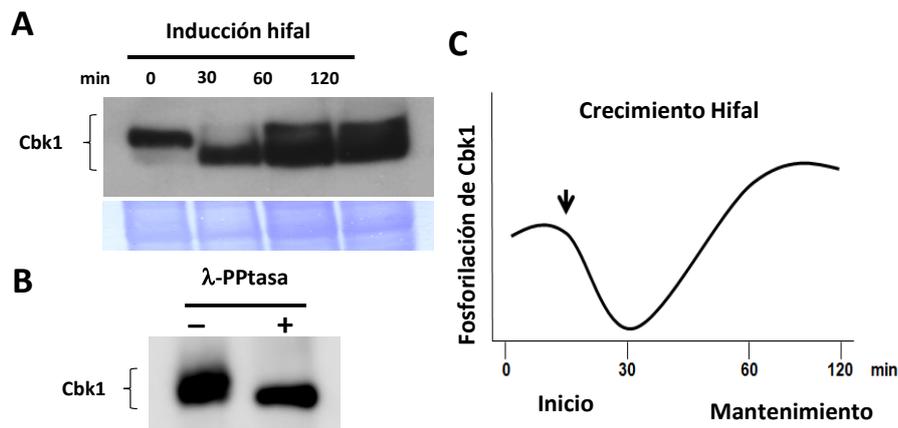
Con el fin de estudiar posibles modificaciones postraduccionales de Cbk1 en la transición levadura-micelio, se construyó la cepa *3xmyc-CBK1/cbk1Δ* (JC1780) como se especifica en Materiales y Métodos.

Una vez obtenida, se analizó el patrón electroforético de Cbk1 en respuesta a señales inductoras de miceliación. Para ello, células de la cepa *3xmyc-CBK1/cbk1Δ* crecidas toda la noche en YPD a 28°C (levaduras) se incubaron en YPD suplementado con 10% de suero bovino (SB) a 37°C para activar el crecimiento hifal, y se recogieron muestras a diferentes tiempos para analizar los extractos proteicos mediante *Western Blot*. Como puede observarse en la figura 26, este análisis puso de manifiesto que la NDR quinasa sufrió modificaciones en su migración electroforética cuando cambió su patrón de crecimiento. Al inicio de la respuesta a suero (30 min), Cbk1 se acumuló en isoformas de menor peso molecular para luego volver a mostrarse como una banda con menor movilidad electroforética durante el mantenimiento del crecimiento hifal, más alta que la obtenida a partir de los extractos del cultivo levaduriforme. Como control de carga se realizó una tinción con azul de Coomassie de la membrana una vez realizada la inmunodetección (Figura 26A).

Para comprobar si estas diferencias en la migración podrían deberse a cambios en el estado de fosforilación de la proteína, se comparó la movilidad electroforética de Cbk1 presente en un cultivo levaduriforme en presencia o ausencia de  $\lambda$ -Fosfatasa ( $\lambda$ -PPTasa). Como puede observarse en la figura 26B, este tratamiento dio lugar a una forma de menor movilidad, indicando que Cbk1 es una fosfoproteína.

En resumen, estos resultados sugieren que Cbk1 es una fosfoproteína que se defosforila al inicio del crecimiento hifal para luego volver a fosforilarse de forma diferencial durante el mantenimiento del crecimiento hiperpolarizado que da lugar a la hifa (Figura 26C).

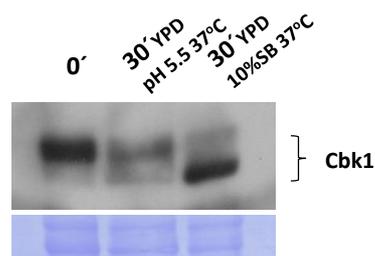
## Resultados



**Figura 26. Cbk1 se regula por fosforilación durante el crecimiento hifal.** (A) Extractos proteicos de la cepa *3xmyc-CBK1/cbk1Δ* (JC1780) crecida en YPD+10% de suero a 37°C, analizados por *Western Blot* usando anticuerpos anti-myc. Muestras recogidas en fase estacionaria y tras 30, 60 y 120 minutos de inducción de la miceliación. La tinción de Coomasie se utilizó como control de carga. (B) Inmunoprecipitados de la misma cepa pre-tratados con λ-Fosfatasa (λ-PPTasa). (C) Esquema de los niveles de fosforilación de Cbk1 en respuesta a suero.

Para demostrar que la modificación en el patrón de fosforilación era específica del programa de desarrollo hifal y no una respuesta al cambio de temperatura experimentado por las células al pasar de 28°C a 37°C, se compararon los *Western Blots* de los extractos proteicos obtenidos a partir de un cultivo crecido a 37°C en forma de levadura (YPD a pH 5.5) o hifa (YPD+10% SB). *C. albicans* es incapaz de activar el crecimiento hifal a 37°C a pH ácido.

Como puede observarse en la figura 27, mientras que el patrón electroforético de Cbk1 de los extractos obtenidos en YPD a pH ácido fue similar al control levaduriforme crecido a 28°C, en los extractos del cultivo en YPD+10% SB se observó una desfosforilación de Cbk1. Por tanto, podemos concluir que la modificación en la migración



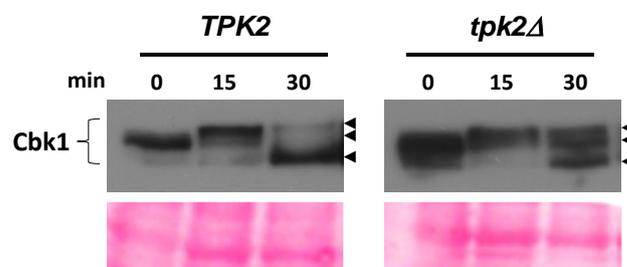
**Figura 27. El patrón de fosforilación de Cbk1 es consecuencia de la activación del programa de desarrollo hifal.** Extractos proteicos de la cepa *3xmyc-CBK1* (JC1780) crecida en medio inductor (YPD+10% suero) y no inductor del crecimiento hifal (YPD pH 5.5) a 37°C. Muestras recogidas a tiempos 0 y 30 minutos, analizadas por *Western Blot* utilizando anticuerpos anti-myc. La tinción de Coomasie se utilizó como control de carga.

## Resultados

de bandas de Cbk1 es consecuencia de la activación específica del programa de desarrollo hifal y no de una respuesta al cambio de temperatura.

En *C. albicans*, la ruta de señalización por PKA/cAMP juega un papel esencial en el inicio del crecimiento hifal y la virulencia (Cao et al., 2017; Hogan and Sundstrom, 2009; Lin and Chen, 2018; Mayer et al., 2013; Noble et al., 2017; Saputo et al., 2014). En esta levadura existen dos subunidades catalíticas de PKA, Tpk1 y Tpk2, la primera es importante para activar el crecimiento filamentoso en medios sólidos y la segunda en medios líquidos (Sonneborn et al., 2000). Esta ruta tiene un pico de activación en los primeros 10-15 minutos, tras los cuales otras rutas de señalización toman el relevo.

Dado que nuestros resultados sugerían que la defosforilación de Cbk1 es un proceso que ocurre en los primeros momentos de la incubación en suero, nos preguntamos si la ruta de PKA estaría implicada en su regulación. Para estudiar esta posibilidad, se construyó la cepa *tpk2Δ 3xmyc-CBK1* (JC1920) y se analizó su patrón de fosforilación tras 15 y 30 minutos en presencia de 10% de SB. En los extractos control *TPK2*, a los 15 minutos de inducción, se detectó una banda de Cbk1 ligeramente superior a la presente en los extractos levaduriformes, que rápidamente se modificó a otra de mayor movilidad electroforética 15 minutos después. Sin embargo, la defosforilación de Cbk1 se vio afectada en un mutante *tpk2Δ* ya que, tras 30 minutos, la forma mayoritaria seguía siendo la forma fosforilada (Figura 28). Por tanto, la señalización dependiente de la PKA Tpk2 es necesaria para una rápida modificación del estado de fosforilación de la NDR quinasa Cbk1 al inicio del programa de desarrollo



**Figura 28. La defosforilación inicial de Cbk1 en respuesta a suero depende de Tpk2.** Western Blot de las cepas *TPK2 3xmyc-CBK1* (JC1780), *tpk2Δ 3xmyc-CBK1* (JC1920), crecidas en YPD+10% de suero a 37°C, analizado usando anticuerpos anti-myc. Muestras recogidas en fase estacionaria y a los 15 y 30 minutos de inducción hifal. La tinción con rojo Ponceau se utilizó como control de carga.

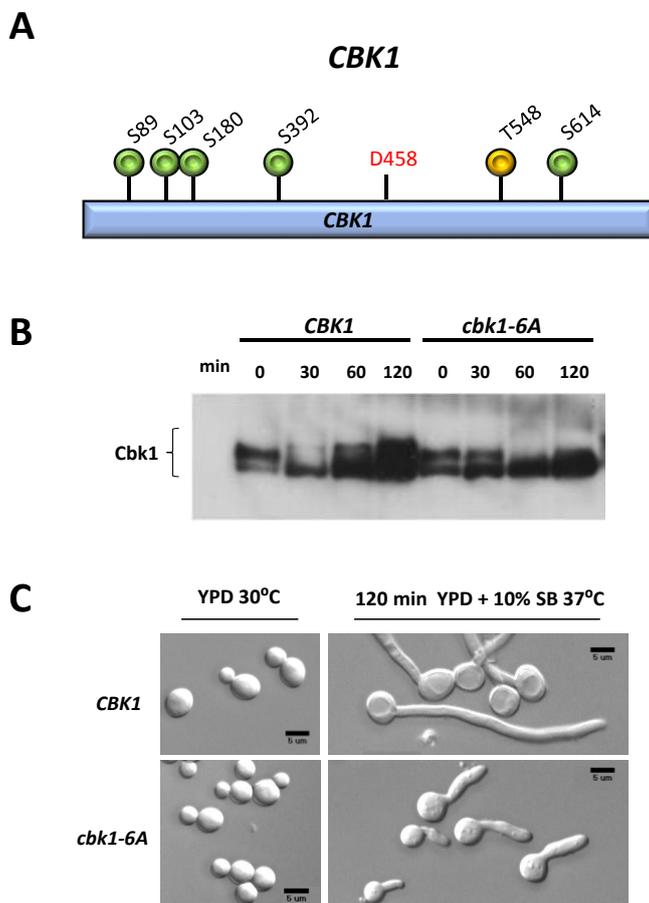
## Resultados

hifal.

### 1.2. Mutaciones fosfodeficientes en sitios Cdk afectan a la función de Cbk1 en hifas.

Una vez demostrado que Cbk1 es una fosfoproteína que modifica su estado de fosforilación en respuesta a la activación del crecimiento hifal, se procedió a identificar posibles residuos fosfoaceptores en la secuencia de la proteína.

Dado que la Cdk Cdc28 fosforila directamente a Mob2, subunidad reguladora de Cbk1, en respuesta a las señales que inducen la miceliación (Gutierrez-Escribano et al., 2011), se procedió a la búsqueda de posibles sitios de fosforilación por Cdk. El análisis de la secuencia de Cbk1 mostró que posee seis posibles sitios de fosforilación por Cdk en los residuos S<sub>89</sub>, S<sub>103</sub>, S<sub>180</sub>, S<sub>392</sub>, T<sub>548</sub> y S<sub>614</sub> (Figura 29A). Con el fin de averiguar si estos residuos eran importantes en la fosforilación de Cbk1, se generó un mutante fosfodeficiente *cbk1-6A* (Cepa JC1826: *3myc-cbk1-6A/cbk1Δ*) en el que todos los posibles sitios fosfoaceptores se sustituyeron por el residuo no fosforilable alanina.



**Figura 29. La regulación de Cbk1 depende de la fosforilación en los sitios CDKs. (A)** Representación esquemática de Cbk1 (Verde/amarillo: posibles sitios de fosforilación por CDKs (S/T-P); Rojo: dominio catalítico de la quinasa (D458) **(B)** Western Blot para estudio de la fosforilación de Cbk1 en respuesta a suero de los mutantes fosfodeficientes en los sitios S/T-P (*cbk1-6A*). Las cepas se crecieron en YPD + 10% de suero a 37°C. Muestras recogidas en fase estacionaria y tras 30, 60 y 120 minutos de inducción de la filamentación. **(C)** Observación de los fenotipos del mutante fosfodeficiente en los sitios S/T-P (*cbk1-6A*), fotografías realizadas a partir de cultivos crecidos a 30°C en YPD y tras 2 horas de inducción del crecimiento hifal a 37°C en YPD + 10% suero. Barra de escala, 5µm.

## Resultados

Estas mutaciones no modificaron el patrón electroforético de Cbk1 durante el crecimiento levaduriforme (Comparar T0 del control *CBK1* frente al alelo *cbk1-6A*, Figura 29B) ni su desfosforilación al inicio de la respuesta a suero (T 30 min). Sin embargo, la proteína Cbk1-6A no mostró el cambio de movilidad que se produce durante el mantenimiento del crecimiento hifal. Esta incapacidad de volver a fosforilar Cbk1 se correlacionó con defectos durante el crecimiento hifal ya que las hifas eran mucho más cortas que las de la cepa silvestre (Figura 29C). A pesar de mostrar defectos durante el crecimiento hifal, el mutante *cbk1-6A* no mostró aparentemente ningún fenotipo relevante durante el crecimiento levaduriforme a 28°C. Por tanto, todos estos resultados sugieren que los posibles sitios Cdk son importantes, principalmente, en la regulación de Cbk1 durante el desarrollo hifal.

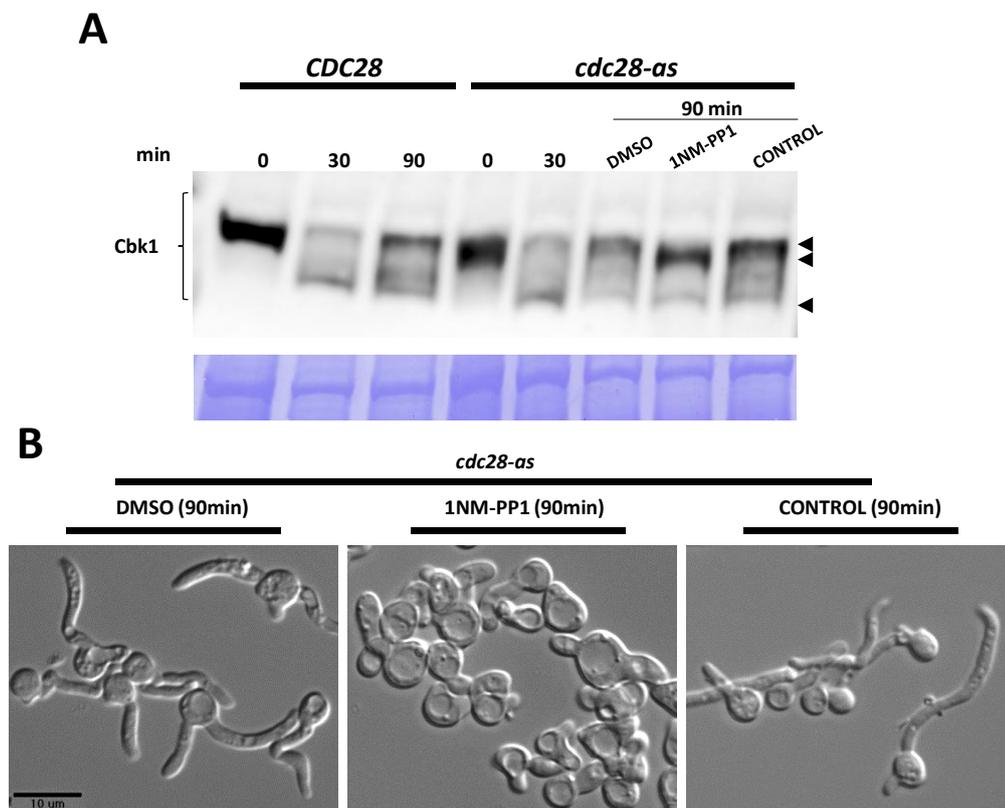
### **1.3. La actividad de la Cdk Cdc28 es necesaria para la fosforilación de Cbk1 en respuesta a suero.**

En levaduras, las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) desempeñan un papel muy importante en la regulación de la morfogénesis celular. En *C. albicans* existe una ciclina específica de hifas, denominada Hgc1, que forma un complejo con la Cdk Cdc28 (Cdc28<sup>Hgc1</sup>). Dicho complejo Cdc28<sup>Hgc1</sup> promueve el crecimiento hifal mediante la fosforilación directa de varias proteínas esenciales en el crecimiento polarizado (Caballero-Lima and Sudbery, 2014; Sinha et al., 2007). Entre estos sustratos se encuentra Mob2, la subunidad reguladora de Cbk1 (Gutierrez-Escribano et al., 2011).

Con el fin de seguir estudiando la fosforilación de Cbk1 en respuesta a suero, nos preguntamos si la actividad de Cdc28 era necesaria para generar las isoformas de Cbk1 específicas de miceliación, aquellas que migran más lentamente en un gel de acrilamida. Para responder a esta pregunta se introdujo el alelo *3xmyc-CBK1* en una cepa *cdc28-as* sensible al análogo del ATP 1NM-PP1 (Bishop et al., 2000; Sinha et al., 2007), cedida por el profesor Yue Wang. Esta cepa (JC1909: *pMET3-cdc28-as/cdc28Δ 3xmyc-CBK1*) nos permite inactivar a Cdc28 en un momento concreto del desarrollo hifal mediante la adición de 1NM-PP1 y estudiar su efecto sobre el estado de fosforilación de Cbk1.

## Resultados

Una vez construida la cepa JC1909, se diseñó un experimento para inactivar a Cdc28 tras la desfosforilación de Cbk1 que tiene lugar en respuesta a suero (30 min) y analizar, 60 minutos después, el efecto de la inactivación de Cdc28 sobre la re-fosforilación de Cbk1. Por tanto, un cultivo de la cepa JC1909 crecida toda la noche en MM a 28°C se inoculó en condiciones de miceliación (MM + 10% SB, 37°C) y se tomaron muestras a tiempo 0 y 30 minutos. Posteriormente, el cultivo se dividió en tres alícuotas que se incubaron en presencia de 25µM del análogo 1NM-PP1, 2% DMSO, solvente donde se disuelve el análogo, y una tercera sin ningún aditivo. Transcurridos 90 minutos desde el inicio de la miceliación (30+60), se recogieron las células crecidas en las tres condiciones y se procedió a su análisis mediante *Western Blot*.



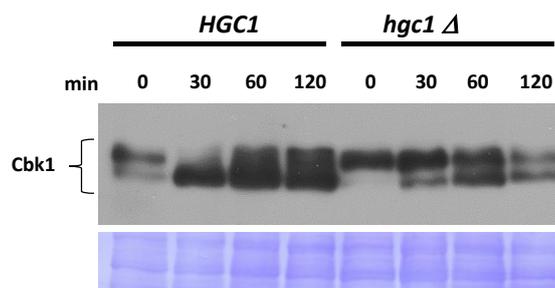
**Figura 30. La hiperfosforilación de Cbk1 durante el mantenimiento del crecimiento hifal depende de la CDK Cdc28. (A)** Extractos proteicos de las cepas *3xmyc-CBK1* (JC1780) y *cdc28-as 3xmyc-CBK1* (JC1909) crecidas en MM+10% de suero a 37°C, analizados por *Western Blot* usando anticuerpos anti-myc. Muestras recogidas en fase estacionaria, a los 30 y 90 minutos del inicio de la inducción de la miceliación en las condiciones descritas. Tinción de azul de Coomassie como control de carga. **(B)** Imágenes de microscopía DIC de la cepa *cdc28-as* tras 90 minutos de inducción de la miceliación en las condiciones indicadas. Barra de escala, 10µm.

## Resultados

Como puede observarse en la figura 30A, la cinética de defosforilación de Cbk1 (30 min) en un fondo *cdc28-as* en ausencia del análogo fue similar a la de la cepa control *CDC28*. Sin embargo, la adición de 25 $\mu$ M de 1NM-PP1 dio lugar a un cambio en la migración de Cbk1 en las muestras recogidas 60 min después, ya que Cbk1 migró más rápidamente que las muestras control con/sin 2% de DMSO. Por tanto, estos resultados sugieren que las formas hiperfosforiladas de Cbk1 específicas del crecimiento hifal dependen de la actividad de Cdc28.

### 1.4. La fosforilación de Cbk1 específica de miceliación depende de la ciclina Hgc1.

Como se acaba de comentar en la sección anterior, el complejo formado por la Cdk Cdc28 y la ciclina Hgc1 (Cdc28<sup>Hgc1</sup>) juega un papel fundamental en el desarrollo hifal a través de la fosforilación directa de sustratos. Dado que los resultados obtenidos sugerían que la hiperfosforilación de Cbk1 en hifas dependía de la actividad de Cdc28, nos planteamos analizar la función de la ciclina Hgc1. Para ello, se construyó la cepa *hgc1 $\Delta$  3xmyc-CBK1* (JC1910) y se analizaron los niveles de Cbk1 en extractos proteicos a diferentes tiempos en condiciones de crecimiento hifal (Figura 31).



**Figura 31. El estado de fosforilación de Cbk1 depende de Hgc1.** Extractos proteicos de las cepas *3xmyc-CBK1* (JC1780) y *hgc1 $\Delta$  3xmyc-CBK1* (JC1910) crecidas en YPD+10% de suero a 37°C, analizados por *Western Blot* usando anticuerpos anti-myc. Muestras recogidas a tiempos 0, 30, 60 y 120 minutos desde el inicio de la inducción de la miceliación. La tinción de Coomassie se utilizó como control de carga.

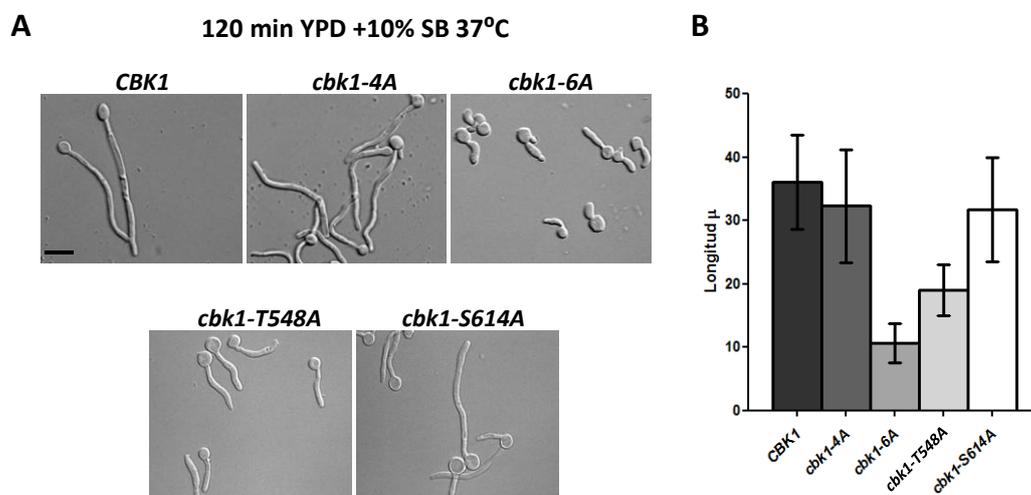
La comparación de los extractos del mutante *hgc1 $\Delta$*  con respecto a la cepa control puso de manifiesto que la actividad Cdc28 asociada a la ciclina Hgc1 era necesaria tanto para activar la defosforilación de Cbk1 al inicio de la respuesta, como para su

## Resultados

posterior hiperfosforilación durante el mantenimiento del crecimiento hifal. Por tanto, estos resultados sugieren que tanto la desfosforilación inicial como la aparición de las formas específicas de miceliación posteriores de Cbk1 dependen de la actividad Cdk asociada a Hgc1.

### 1.5. Importancia relativa de los sitios Cdk en la función de Cbk1 en hifas.

Una vez que se puso de manifiesto la importancia de los sitios Cdk de Cbk1 en la función de esta NDR quinasa, se procedió a la identificación de aquellos residuos más relevantes. Para ello, se construyó un alelo fosfodeficiente en las cuatro serinas más cercanas al extremo N-terminal (*cbk1-4A*: JC1824) y los alelos fosfodeficientes individuales en la T548 (*cbk1-T548A*: JC1905) y *cbk1-S614A*: JC1906). Con el fin de analizar el fenotipo de estos alelos de *CBK1* se comparó la longitud de sus hifas respecto a los controles silvestre *CBK1* y el mutante *cbk1-6A*.



**Figura 32. Importancia relativa de los sitios Cdk en la función de Cbk1 en hifas. (A)** Imágenes de microscopía interferencial (DIC) de los fenotipos desarrollados tras 120 minutos de respuesta a suero de las cepas fosfodeficientes indicadas. Barra de escala, 5µm. **(B)** Gráfica de la longitud de las hifas a las 2 horas de crecimiento en medio inductor. Las medias provienen de 100 células por 3 experimentos diferentes.

Tras dos horas en condiciones de miceliación, los mutantes *cbk1-4A* y *cbk1-S614A* se comportaron de forma similar a las células silvestres, mientras que la mutación *cbk1-T548A* dio lugar a hifas un 50% más cortas (Figura. 32). Por tanto, estos

## Resultados

resultados sugieren que la T548 es el residuo más importante de los seis analizados. Sin embargo, el hecho de que el mutante *cbk1-6A* de lugar a hifas más cortas que el *cbk1-T548A* sugiere que la fosforilación de los demás residuos podría contribuir a la actividad de Cbk1 durante el crecimiento hifal.

### 1.6. El alelo *cbk1-T548D* activa la separación celular en hifas.

Con el fin de profundizar en la función de la modificación postraduccional de la T548 de Cbk1 en hifas, se procedió a estudiar el fenotipo de un mutante que mimetizara una fosforilación constitutiva de la T548. Para ello, se construyó la cepa *cbk1-T548D/cbk1Δ* (JC2035) y se analizó su respuesta a suero respecto a una cepa control y un mutante *cbk1-T548A*. Como puede observarse en la figura 34, la expresión del alelo *cbk1-T548D* dio lugar a hifas de tamaño similar al mutante *cbk1-T548A* ( $19.33\mu\text{m} \pm 4,9\mu\text{m}$  y  $19,03\mu\text{m} \pm 4,08\mu\text{m}$ , respectivamente) que eran significativamente más cortas que las células control ( $36,08\mu\text{m} \pm 7,5\mu\text{m}$ ). El hecho de que ambos mutantes generen hifas similares podría sugerir una regulación muy dinámica de la fosforilación/desfosforilación de este residuo para mantener un crecimiento polarizado apropiado durante el desarrollo hifal.

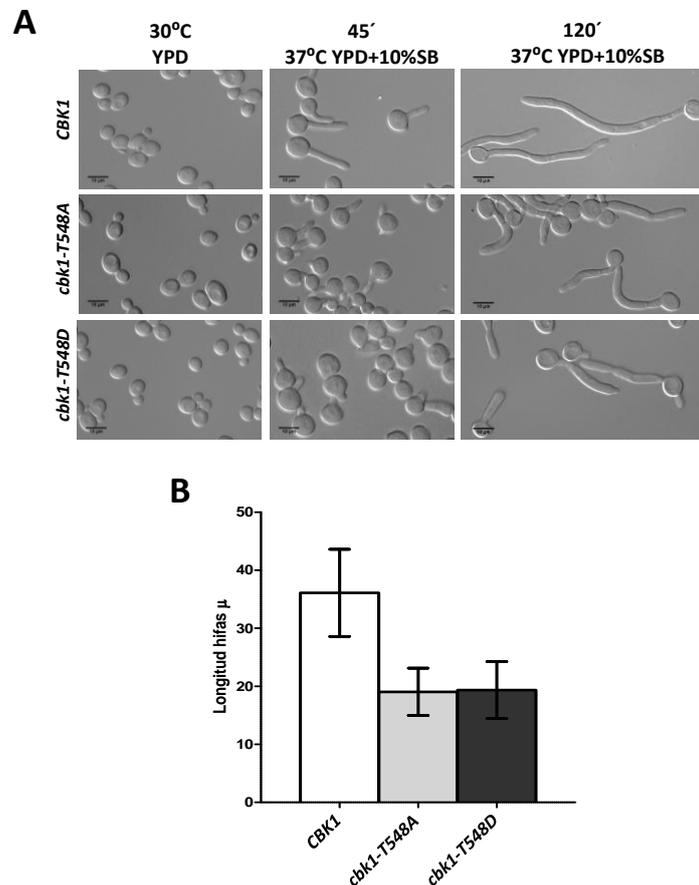
Sin embargo, a pesar de generar hifas de similar longitud, observamos que el alelo *cbk1-T548D* activaba la separación celular de los compartimentos hifales (Figura 34A).

Una característica diferencial de las hifas respecto a las levaduras es que en las primeras se produce una inhibición de la separación celular tras finalizar la citoquinesis, mientras que en las levaduras se activa la expresión de genes de hidrolasas de la pared celular necesarias para separar las células madre e hija. Por tanto, esta regulación diferencial de la separación celular es la responsable de que las hifas sean estructuras tubulares multicelulares.

Tras dos horas en presencia de suero, las hifas del mutante *cbk1-T548D* mostraron un 25% de cuerpos celulares separados frente al 8% del control silvestre y el mutante *cbk1-T548A*. Estas diferencias fueron mucho más acusadas a las 4h ya que el porcentaje subió al 85% en el mutante fosfomimético frente al 10 % de las otras dos

## Resultados

cepas (Figura 34B). Por tanto, estos resultados sugieren que una fosforilación constitutiva de la T548 durante el crecimiento hifal activa el programa transcripcional requerido para separar las células.

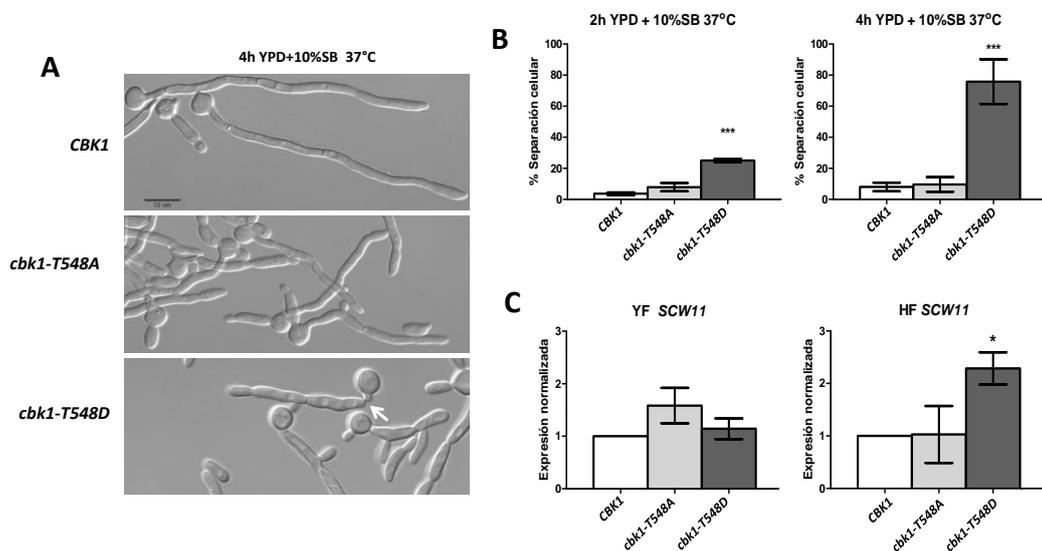


**Figura 33. Estudio de los fenotipos fosfodeficiente y fosfomiméticos de Cbk1 en la Treonina 549. (A)** Imágenes de microscopía DIC de las cepas *CBK1/cbk1Δ* (JC1780), *cbk1-T548A/cbk1Δ* (JC1905) y *cbk1-T548D/cbk1Δ* (JC2035) tomadas durante el crecimiento en YPD a 30°C y los 45 y 120 minutos de inducción hifal. Barra de escala, 10μm. **(B)** Gráfica correspondiente a la longitud de las hifas de los mutantes descritos previamente.

En *S. cerevisiae*, la fosforilación del factor de transcripción Ace2 por la NDR quinasa Cbk1 es necesaria para que dicho factor se acumule en el núcleo de la célula hija y active la transcripción de genes de hidrolasas como *SCW11* y/o *CTS1*, responsables de la separación celular (Bidlingmaier et al., 2001). Con el fin de determinar si la mutación *cbk1-T548D* dio lugar a un incremento inapropiado de la actividad transcripcional de Ace2 en las hifas, se determinó los niveles de mRNA del gen *SCW11* a partir de los RNA totales extraídos de cultivos en condiciones de crecimiento levaduriforme y miceliar.

## Resultados

Como controles en estos experimentos se utilizaron la cepa silvestre y el mutante *cbk1-T548A*. Este análisis puso de manifiesto que mientras los niveles de mRNA de *SCW11* eran similares en los cultivos levaduriformes del mutante *cbk1-T548D* y el control silvestre, las hifas del mutante fosfomimético duplicaban los niveles presentes en hifas silvestres (Figura 34B). En su conjunto, estos resultados sugieren que durante el crecimiento hifal la T548 de Cbk1 debería estar desfosforilada tras finalizar la mitosis para no activar la separación celular, de lo contrario produciría una activación inapropiada de Ace2 que produciría la de la hifa.



**Figura 34. Las células del mutante fosfomimético en la T548 se separan durante la inducción hifal. (A)** Imágenes de microscopía de contraste interferencial (DIC) de las cepas indicadas, tomadas tras 4 horas de inducción hifal. La flecha marca el punto de separación de la hifa. Barra de escala, 10µm. **(B)** Gráficas en tanto por ciento de separación celular de las cepas descritas, medidas a las 2 y 4 horas de inducción hifal. **(C)** Gráficas de expresión normalizada del gen *SCW11* en levaduras e hifas después de dos horas en condiciones de miceliación, medida por RT-PCR cuantitativa en las mismas cepas. Los valores se normalizaron con el gen de actina. Los asteriscos indican nivel de significación en *T-test*. (\*\*\*:  $P$ -value < 0,0001; \*:  $P$ -value < 0,001).

### 1.6.1. Importancia de la T548 durante crecimiento levaduriforme.

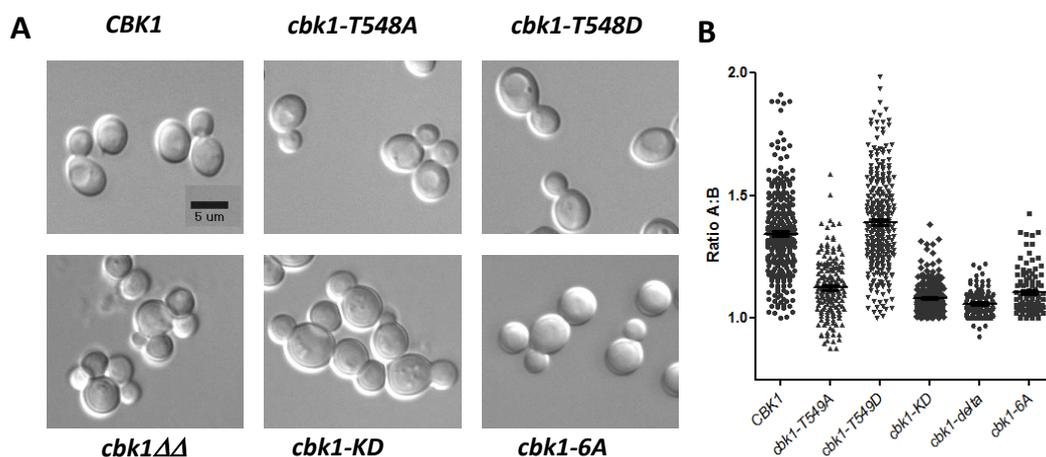
En levaduras existen dos tipos de crecimiento: polarizado e isodiamétrico. El primero se caracteriza por focalizar la secreción en un punto concreto del córtex celular, mientras que el segundo distribuye los productos de secreción en una superficie mayor. El balance entre estos dos tipos de crecimiento determina la

## Resultados

morfología celular. Así, células en las que domine el crecimiento polarizado darán lugar a estructuras de aspecto tubular mientras que aquellas en las que prevalezca el crecimiento isodiamétrico darán lugar a células de aspecto redondeado.

Las células levaduriformes son de aspecto elipsoidal ya que crecen de forma polarizada durante una pequeña ventana del ciclo celular al inicio de la gemación (G1) y luego activan el crecimiento isodiamétrico en la transición G2/M. Aquellos mutantes que tengan defectos en la activación del crecimiento polarizado se manifiestan como células redondeadas en lugar de elipsoidales.

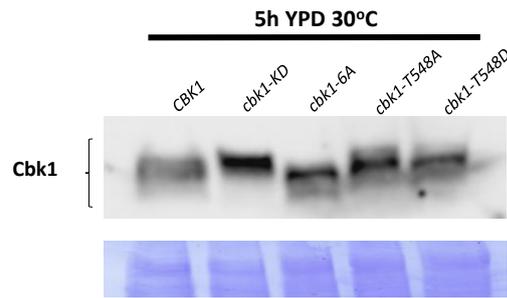
Como ya se comentó en la introducción, la actividad de Cbk1 es necesaria para activar el crecimiento polarizado en levaduras (Maerz and Seiler, 2010), por lo que las células deficientes en la actividad Cbk1 son redondas. Con el fin de determinar la importancia de la T548 durante el crecimiento levaduriforme, cuantificamos el grado de redondez de las células de los mutantes *cbk1-T548A* y *cbk1-T548D* y lo comparamos con el control silvestre *CBK1* y los mutantes *cbk1-6A*, *cbk1 $\Delta\Delta$*  y *cbk1-KD* (*Kinase-Dead*. Alelo de *CBK1* que genera una proteína catalíticamente inactiva que se ha generado sustituyendo un aspártico del sitio catalítico de Cbk1 por prolina, D548P; JC1791). Para ello, se midió la longitud del eje mayor (A) y menor (B) de 100 células en crecimiento



**Figura 35. Estudio de los fenotipos fosfodeficientes y fosfomiméticos en la Treonina 549 durante el crecimiento levaduriforme. (A).** Imágenes al microscopio de contraste interferencial (DIC) durante el crecimiento levaduriforme de las cepas silvestre, (JC1780), fosfodeficiente (JC1905) y fosfomimética (JC2035) en la Treonina 549, *cbk1 $\Delta\Delta$* , (JC1049), catalíticamente inactiva (JC1791) y fosfodeficiente en todos los sitios consenso de fosforilación por CDKs (*cbk1-6A*, JC1826). Barra de escala, 5  $\mu\text{m}$  **(B).** Medida del ratio A/B de levadura de los mutantes descritos previamente.

## Resultados

exponencial de cada cepa y en tres replicas biológicas independientes. Posteriormente, se determinó la ratio A/B de cada una de las cepas para obtener un valor indicativo de su redondez. Si las células son elipsoidales la ratio A/B tiene que ser >1 y si son redondas la ratio igual a 1. Como puede observarse en la figura 35, mientras que el mutante *cbk1-T548D* mostró una ratio A/B de 1.3, similar a la cepa



**Figura 36. Estabilidad de las mutaciones de Cbk1.** *Western Blot* de los extractos de proteína de las cepas indicadas en fase de crecimiento exponencial en medio YPD a 30°C revelado con anticuerpos anti-myc.

silvestre, el mutante *cbk1-T548A* y *cbk1-6A* tenían una ratio A/B muy próxima a 1, característica de los controles sin actividad quinasa (*cbk1Δ* y *cbk1-KD*). Estos fenotipos no eran consecuencia de una disminución en los niveles de las proteínas mutadas ya que la concentración de Cbk1 era similar en todas las cepas ensayadas (Figura 36).

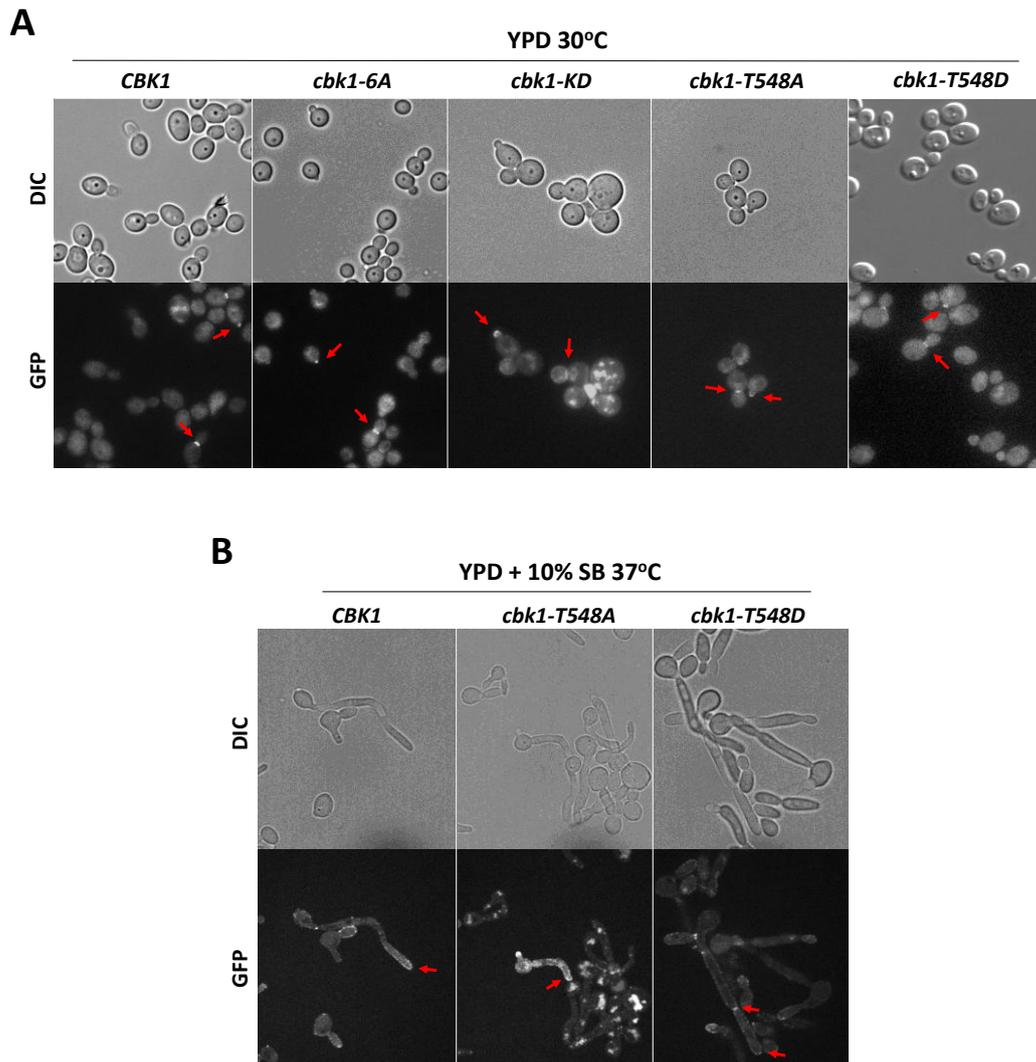
En resumen, estas ratios demuestran que mientras que la mutación T548D no afecta el crecimiento polarizado en levaduras, la mutación T548A genera una quinasa cuya actividad no es suficiente para activar el crecimiento polarizado de la yema. Sin embargo, dado que los mutantes fosfodeficientes no presentaron los grumos característicos de las células deficientes en actividad Cbk1 (*cbk1ΔΔ* o *cbk1-KD*), estos resultados sugieren que dichos mutantes fosfodeficientes son hipomorfos y mantienen cierta actividad quinasa durante el crecimiento levaduriforme.

### 1.6.2. La localización de Cbk1 no se encuentra afectada en los mutantes

Como se ha comentado en la introducción, Cbk1 se localiza en el córtex de las yemas en crecimiento y en el cuello entre la madre y la hija de las células levaduriformes de *C. albicans* (Lee et al., 2015). Por tanto, los defectos en el crecimiento polarizado observados en los mutantes fosfodeficientes de Cbk1 podrían deberse a que dichas proteínas fueran incapaces de localizarse en el córtex de la célula al inicio de la gemación.

## Resultados

Con el fin de analizar esta posibilidad, se estudió la localización de Cbk1 mediante la fusión de la proteína fluorescente GFP al extremo carboxi-terminal de los alelos descritos previamente. Las cepas *CBK1-GFP* (JC1900), *cbk1-6A-GFP* (JC1902), *cbk1-KD-GFP* (JC1939), *cbk1-T548A-GFP* (JC2049), *cbk1-T548D-GFP* (JC2051) se crecieron en YPD a 30°C y en YPD+10% suero a 37°C para su observación al microscopio de fluorescencia.



**Figura 37. Localización de Cbk1-GFP.** Imágenes de microscopía de contraste interferencial (DIC) y fluorescencia (Cbk1-GFP) de las cepas indicadas. **(A)** Durante el crecimiento en forma de levadura. **(B)** Después de dos horas creciendo en condiciones de inducción hifal.

Como puede observarse en la figura 37, la distribución de Cbk1 en todas las cepas mutantes fue similar a la cepa control ya que se detectó tanto en el córtex del nacimiento de una nueva yema (flechas en la figura) como en el plano de división de

## Resultados

células con yema grande. Además, los mutantes *cbk1-T548A* y *cbk1-T548D* mostraron también una localización silvestre en condiciones de miceliación.

En su conjunto, estos resultados sugieren que los sitios Cdk de Cbk1 son importantes para la regulación de la función biológica de la NDR quinasa pero no afecta ni a los niveles ni a la localización de la proteína.

### 1.7. Importancia de la proteína de unión a mRNA Ssd1 en la regulación de Cbk1.

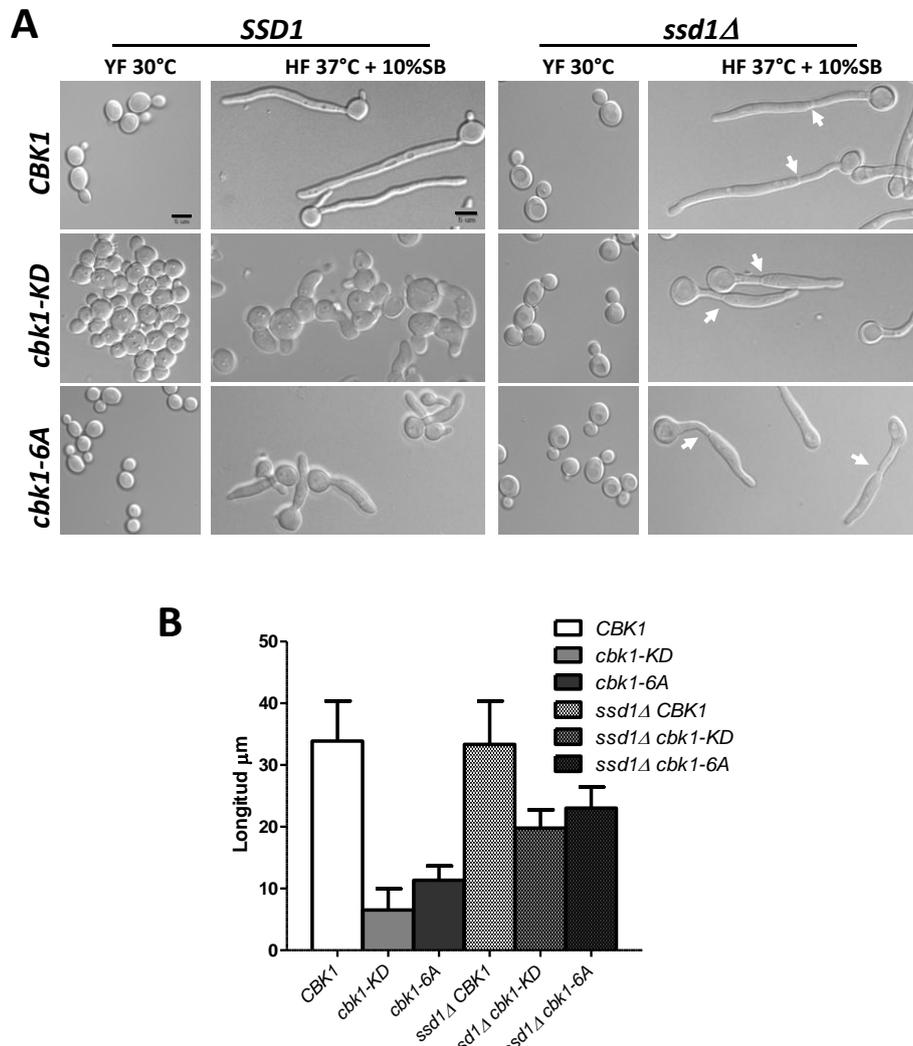
#### 1.7.1. Función dual de Cbk1 durante la respuesta a suero.

En *S. cerevisiae*, la eliminación del gen *SSD1* suprime la mayoría de los fenotipos del mutante *cbk1ΔΔ* (Kurischko et al., 2005). Por este motivo, se analizó si la función de Cbk1 durante el desarrollo hifal dependía de *SSD1*. Para ello, se introdujeron los alelos *cbk1-KD* y *cbk1-6A* en un fondo *ssd1Δ cbk1Δ /CBK1* (JC1577) y se comparó su respuesta a suero respecto a un fondo silvestre *SSD1*. Como puede observarse en las imágenes de la figura 38A, la pérdida del gen *SSD1* restauró la capacidad del mutante *cbk1-KD* de polarizar el crecimiento en respuesta a suero, aunque las hifas generadas no eran similares a los controles ya que eran un 30% más cortas y la célula apical de la hifa se ensanchaba una vez sintetizado el primer septo (flechas en la figura). Sin embargo, la morfología del tubo germinativo del doble mutante, que comprende desde el cuerpo basal levaduriforme hasta el primer septo, era igual que el control silvestre. Por tanto, estos resultados indican que Cbk1 posee una doble función en el desarrollo hifal ya que es necesaria para la formación del tubo germinativo, proceso que depende de la inactivación de Ssd1, y para garantizar un crecimiento polarizado de la célula apical una vez formado el primer septo durante el mantenimiento del crecimiento hifal, proceso independiente de la función de Ssd1.

El análisis del doble mutante *cbk1-6A/cbk1Δ ssd1ΔΔ* (JC1824) puso de manifiesto que se comportó de forma similar al doble *cbk1-KD/cbk1Δ ssd1Δ* (Figura 38), tanto en la morfología como en la longitud de las hifas. Dado que la proteína Cbk1-KD carece de actividad catalítica, esta observación sugiere que la proteína Cbk1-6A no tiene

## Resultados

suficiente actividad quinasa para realizar las funciones de Cbk1 durante el mantenimiento del crecimiento hifal.



**Figura 38. Las mutaciones KD y 6A de Cbk1 generan el mismo fenotipo en un fondo *ssd1Δ*.**

**(A)** Imágenes de microscopía interferencial (DIC) de las cepas indicadas durante el crecimiento levaduriforme a 30°C y tras dos horas de inducción hifal. Barra de escala, 5μm.

**(B)** Gráfica que representa la media de la longitud en micrómetros de las hifas de los

En resumen, estos experimentos de interacciones génicas sugieren que la función principal de Cbk1 al inicio de la transición levadura-micelio consiste en inactivar a Ssd1, mientras que la actividad de Cbk1 dependiente de los sitios Cdk se requiere posteriormente para mantener la secreción polarizada en el ápice de la hifa durante el mantenimiento del crecimiento hifal.

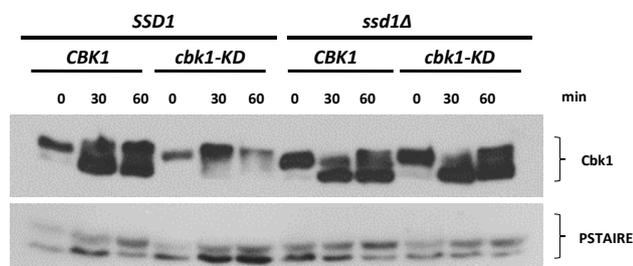
## Resultados

### 1.7.2. La defosforilación de Cbk1 depende de Ssd1

Posteriormente, con el fin de profundizar en los mecanismos de regulación de Cbk1, se intentó determinar los elementos implicados en su defosforilación durante la transición levadura-micelio.

En una primera aproximación, nos preguntamos si la propia NDR quinasa era responsable de la activación de su propia defosforilación. Para ello, analizamos la movilidad electroforética de Cbk1 en extractos de la cepa *3xmyc-cbk1-KD/cbk1Δ* (JC1791) a 0, 30 min y 60 min en condiciones de miceliación y la comparamos con el control silvestre *3xmyc-CBK1/cbk1Δ* (JC1780). Como puede observarse en la parte izquierda de la figura 39, la defosforilación de Cbk1 al inicio de la respuesta dependía de su propia actividad quinasa ya que en los extractos del mutante *cbk1-KD*, la proteína no mostró la forma de mayor movilidad electroforética a los 30 min.

Ya que nuestros resultados sugerían que la función de Cbk1 durante la formación del tubo germinativo dependía de la inactivación de Ssd1 (figura 38), nos preguntamos si la defosforilación de Cbk1 se realizaba a través de Ssd1. Para ello, se construyeron las cepas *3xmyc-CBK1/cbk1Δ ssd1ΔΔ* (JC1794) y *3xmyc-cbk1-KD/cbk1Δ ssd1ΔΔ* (JC1795) y se analizaron los extractos de células en condiciones de miceliación (Figura 39). Estos análisis pusieron de manifiesto que, a diferencia de lo que ocurría en un fondo silvestre *SSD1*, Cbk1 podía defosforilarse en un mutante *ssd1Δ* que expresaba el alelo *cbk1-KD*. Por tanto, dado que Ssd1 es sustrato de Cbk1 (Kurischko et al., 2005; Lee et al., 2015), estos resultados indican que Cbk1 activa su propia defosforilación a través de la inactivación de Ssd1.



**Figura 39. La fosforilación de Cbk1 depende de Ssd1.** Extractos proteicos de las cepas *CBK1* (JC1780), *cbk1-KD* (JC1791), *ssd1Δ* (JC1794) y *ssd1Δ cbk1-KD* (JC1795) crecidas en YPD+10% de suero a 37°C, analizados por *Western Blot* usando anticuerpos anti-myc. Muestras recogidas en fase estacionaria, a los 30 y 60 minutos del inicio de la inducción de la miceliación. El anticuerpo anti-PSTAIRE se utilizó como control de carga.

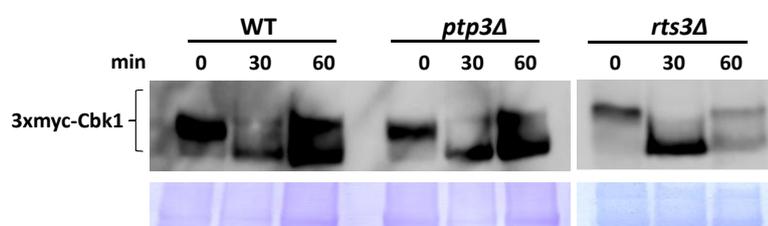
## Resultados

### 1.7.3. Las fosfatasa Ptp3 y Rts3 no son necesarias en la regulación de Cbk1.

Dado que Ssd1 es una proteína que se une a mRNAs específicos regulando su estabilidad y traducción (Hogan et al., 2008), la desfosforilación de Cbk1 dependiente de la inactivación de Ssd1 podría ser consecuencia de la traducción de alguna fosfatasa cuyo mRNA se encontrara regulado por esta ribonucleoproteína .

Con el fin de explorar esta hipótesis, identificamos potenciales dianas cuyos mRNAs podrían estar regulados por Ssd1 mediante un análisis bioinformático de aquellos genes cuyos inicios de la transcripción habían sido mapeados (Bruno et al., 2010) y presentaban sitios de unión de Ssd1 (MDHCATTCHWW,(Hogan et al., 2008) en la región 5' no traducida de los mRNAs (5'-UTR). Entre los 300 genes identificados, encontramos 8 que codificaban para fosfatasas, de los que dos (*PTP3*, una tirosin-fosfatasa, y *RTS3*, un componente del complejo la fosfatasa PP2A) se inducían en respuesta a suero o formación de *biofilms*. Por tanto, dado que la desfosforilación de Cbk1 era dependiente de Ssd1 y que estas dos fosfatasas se inducían en respuesta a suero y eran potenciales dianas de Ssd1, decidimos estudiar si estaban implicadas en la regulación de la NDR quinasa al inicio de la respuesta.

Para estudiar esta posibilidad, se construyeron los mutantes *rts3Δ* y *ptp3Δ* a los que posteriormente se les introdujo el alelo *3xmyc-Cbk1*. En contra de lo esperado, ninguna de las dos cepas presentó defectos fenotípicos en la respuesta a suero (resultado no mostrado) ni mostró un patrón de bandas de myc-Cbk1 diferente al control silvestre (Figura 40). Por tanto, estos resultados muestran que las fosfatasas Ptp3 y Rts3 no son esenciales en la fosforegulación de Cbk1.



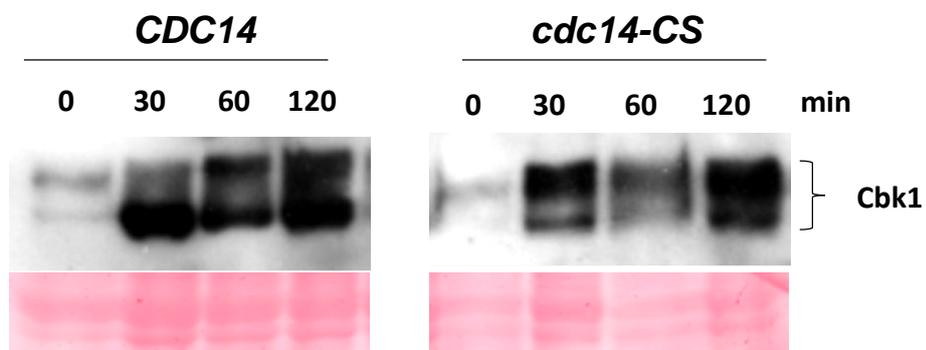
**Figura 40. Las tirosin fosfatasas Ptp3 y Rts3 no participan en la fosforegulación de Cbk1.** Western Blot de los extractos de proteínas de las cepas silvestre (JC1780), *rts3Δ* (JC2239) y *ptp3Δ* (JC2238) crecidas en YPD+10% de suero a 37°C, revelados usando anticuerpos anti-myc. Muestras recogidas en fase estacionaria, a los 30 y 60 minutos del inicio de la inducción de la miceliación. La tinción de Coomassie se utilizó como control de carga

## Resultados

### 1.8. La actividad fosfatasa de Cdc14 es necesaria en la regulación de Cbk1 al inicio del crecimiento hifal.

Tras el fracaso de la búsqueda entre las fosfatasas que podrían estar reguladas por Ssd1, pensamos que si la desfosforilación de Cbk1 fuera una condición previa para poder generar las fosfo-isoformas específicas de miceliación de Cbk1, entonces las células deficientes en la fosfatasa de interés deberían generar defectos en miceliación similares al *cbk1-6A*.

La fosfatasa Cdc14 se encontraría dentro de este marco teórico ya que el mutante *cdc14 $\Delta\Delta$*  presentaba defectos en el crecimiento hifal similares al mutante *cbk1-6A* (Clemente-Blanco et al., 2006) Además, las proteínas Cdc14 y Cbk1 interaccionan *in vivo* (Figura 21) (Tesis Pilar Gutiérrez), lo que podría sugerir una interacción de la fosfatasa con su sustrato. Por tanto, analizamos el patrón electroforético de 3xmyc-Cbk1 en células deficientes en actividad Cdc14 (*cdc14-CS*, catalíticamente inactiva por la sustitución de la cisteína 275 por serina) en condiciones de miceliación. Este experimento puso de manifiesto que Cbk1 se encuentra mayoritariamente desfosforilado a los 30 min en el control silvestre *CDC14* mientras que en las células sin actividad catalítica de Cdc14 (*cdc14-CS*) Cbk1 se manifiesta como una proteína de mayor peso molecular (Figura 41). En resumen, estos resultados indican que la fosfatasa Cdc14, directa o indirectamente, es necesaria para la desfosforilación de Cbk1 al inicio de la respuesta hifal.



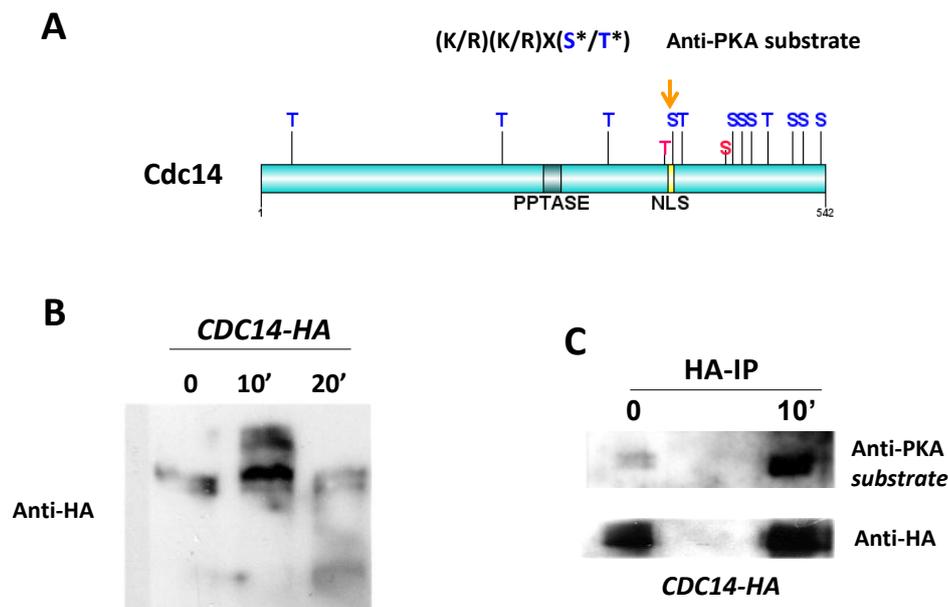
**Figura 41. La defosforilación de Cbk1 al inicio de la respuesta a suero depende de Cdc14.** Extractos proteicos de las cepas silvestre (JC1780), *cdc14-CS* (1918), crecidas en YPD+10% de suero a 37°C, analizados por *Western Blot* usando anticuerpos anti-myc. Muestras recogidas en fase estacionaria, a los 30', 1h y 2h del inicio de la inducción de la miceliación. Como control de carga se utilizó la tinción con rojo Ponceau.

## Resultados

### 1.9. La fosfatasa Cdc14: posible diana de PKA en el inicio del crecimiento hifal.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la desfosforilación de Cbk1 depende de la PKA Tpk2 (Figura 28) y de la fosfatasa Cdc14 (Figura 41). Teniendo en cuenta que la PKA es una S/T quinasa basofílica que tiende a fosforilar residuos de serina o treonina precedidos por un aminoácido básico en posición -2 y -3 (K/R-K/R-X/S\*/T\*) y que Cdc14 posee 9 sitios potenciales de fosforilación por PKA en su extremo carboxi-terminal (Figura 42A), nos planteamos la hipótesis de que PKA fosforilara a Cdc14 en los primeros minutos de la respuesta a suero para activar la desfosforilación de Cbk1.

Cuando analizamos la fosforilación de Cdc14 a tiempos cortos en respuesta a suero observamos que sufría una hiperfosforilación a los 10 minutos en presencia de medio inductor y volvía a su estado de fosforilación inicial a los 20 minutos (Figura 42B).



**Figura 42. Cdc14 es diana de la PKA Tpk2.** (A) Representación esquemática de la proteína Cdc14 donde se indican las posibles Treoninas y Serinas susceptibles de ser fosforilables. La flecha indica la localización de la secuencia consenso de fosforilación por PKA. (B) Gel de acrilamida *Phos-Tag* de extractos de proteínas obtenidos a tiempo 0, 10' y 20' de la cepa que contiene el alelo silvestre de Cdc14 etiquetado con el epítipo HA de síntesis génica (JC1421). (C) *SDS-PAGE* de extractos de proteínas de la cepa Cdc14-HA obtenidos a tiempo 0' y 10', inmunoprecipitados con bolas magnéticas anti-HA y revelados con el anticuerpo fosfoespecífico anti-PKA. Como control de carga se utilizó el mismo gel revelado con anti-HA.

## Resultados

Para identificar si la hiperfosforilación observada era debida a esta quinasa se inmunoprecipitaron extractos proteicos a tiempo 0 y 10 minutos de la cepa Cdc14-HA siguiendo el protocolo de Milteny® descrito en el apartado 8.2 de materiales y métodos. Estos extractos se analizaron mediante *SDS-PAGE* y se revelaron inicialmente con anticuerpo anti-PKA *substrate* (Cell signaling). Que une específicamente a secuencias consenso fosforiladas por PKA (K/R)(K/R)X(S\*/T\*). Como puede observarse en la figura 42C, apareció una banda en la calle correspondiente a la muestra tomada a los 10 minutos desde el inicio de la respuesta, mucho más intensa que la que aparece a tiempo 0', indicando que esta fosforilación inicial a los 10 minutos de inducción hifal, se debe a la PKA.

## 2. Estudio de la función de Cbk1

### 2.1. Construcción de un mutante *cbk1-as*.

Con el fin de profundizar en la función de Cbk1 durante el mantenimiento del crecimiento hifal, se construyó un mutante condicional *cbk1* sensible al análogo 1NM-PP1 (Blethrow et al., 2004; Gregan et al., 2007).

En una primera aproximación, se sustituyó la metionina 412 del bolsillo de unión a ATP por prolina (M412P) en una cepa *CBK1/cbk1Δ* para dar lugar a la cepa *cbk1-M412P/cbk1Δ*. Sin embargo, este cambio dio lugar a una quinasa inactiva ya que las células mostraron el fenotipo del mutante *cbk1ΔΔ* en ausencia de análogo por lo que fue desechada (datos no mostrados).

En un segundo intento, se volvió a modificar el bolsillo sustituyendo la metionina por alanina (M412A). Dado que esta nueva cepa *cbk1-M412A/cbk1Δ* (JC2247) se comportó como una cepa silvestre en ausencia del análogo, se procedió a estudiar su comportamiento en presencia de diferentes concentraciones de 1NM-PP1.

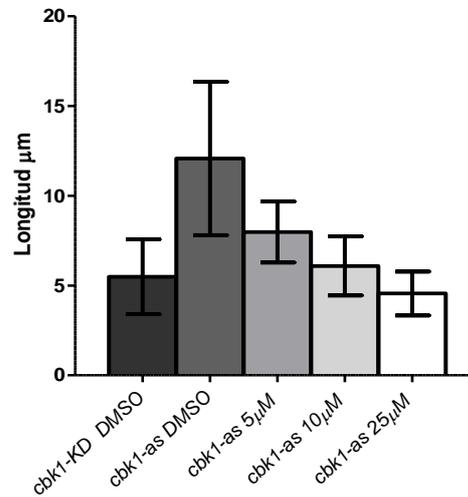
Como ya se ha comentado, las células carentes de actividad Cbk1 son incapaces de polarizar el crecimiento en respuesta a suero y de separarse durante el crecimiento

## Resultados

levaduriforme. Por tanto, se determinó si la adición de 1NM-PP1 a células *cbk1-M412A* era capaz de fenocopiar a la cepa *cbk1 $\Delta\Delta$* .

En primer lugar, con el fin de determinar la concentración apropiada del análogo, se estudió su capacidad de responder a suero en presencia de 5, 10 y 25  $\mu\text{M}$  de 1NM-PP1. Transcurridas dos horas, las células se fijaron y se determinó la longitud de los tubos germinativos. Como controles del experimento se utilizó la misma cepa *cbk1-M412A* en presencia de 2% DMSO, solvente en el que se disuelve el análogo, y la cepa *cbk1-KD* (*kinase-dead*) (JC1791) como control de células carentes de actividad quinasa Cbk1. Como puede observarse en la figura 43, la longitud del tubo germinativo de la cepa *cbk1-M412A* disminuyó a medida que aumentaba la concentración de análogo, indicando que la mutación M412A dio lugar a una quinasa cuya actividad era sensible a la concentración del análogo por lo que se le denominó *cbk1-as* (*analogue-sensitive*). Además, se consideró la concentración de 25 $\mu\text{M}$  como la óptima para inhibir totalmente a la quinasa ya que las células con esta concentración se comportaron como la cepa *cbk1-KD*.

Tras determinar la cantidad de análogo necesaria para inhibir a Cbk1 en los experimentos de miceliación, analizamos si el análogo también era capaz de inhibir la separación celular durante el crecimiento levaduriforme. Para ello, células en crecimiento exponencial de la cepa *cbk1-M412A* se incubaron en presencia de 2% DMSO o 25 $\mu\text{M}$  de 1NM-PP1 durante 5 horas en YPD a 30°C. Transcurrido ese tiempo, se cuantificó el porcentaje de células con grumos generados por la inhibición de la separación celular. Como puede verse en la figura 44, la adición del análogo dio lugar a

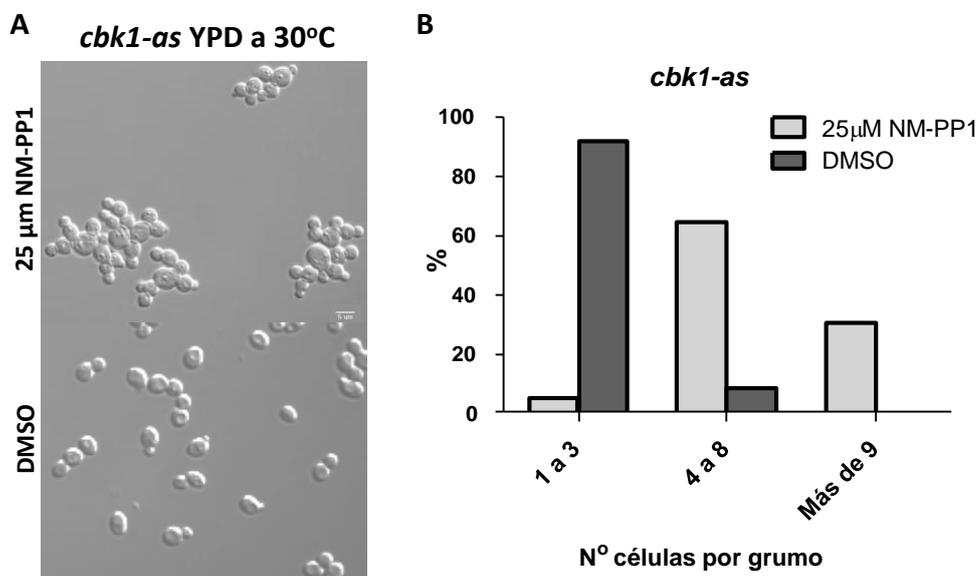


**Figura 43. Medida de la longitud de los tubos germinativos con diferentes concentraciones de 1NM-PP1.** La gráfica representa el tamaño en  $\mu\text{m}$  de la longitud de las hifas de las cepas *cbk1-KD* (JC1791) y *cbk1-as* (JC2247) tras 2 horas de inducción hifal en las condiciones indicadas. *cbk1-KD* corresponde al mutante catalíticamente inactivo de la quinasa mientras que *cbk1-as* es el mutante sensible al análogo del ATP 1NM-PP1.

## Resultados

un bloqueo de la separación celular. Mientras que la gran mayoría de las células control (DMSO) se encontraban en grupos de 1 a 3 células, la adición de 1NM-PP1 dio lugar a un 90 % de las células en agrupaciones de 4 a 8 o mayores.

En conclusión, estos resultados pusieron de manifiesto que la mutación M412A dio lugar a un alelo de *CBK1* sensible al análogo de ATP 1NM-PP1. Además, todos estos resultados demuestran que la actividad quinasa de Cbk1 es necesaria para la separación celular y el crecimiento polarizado que da lugar al tubo germinativo.



**Figura 44 Inhibición de Cbk1 en levaduras.** (A) Imágenes de microscopía de contraste interferencial (DIC) de la cepa *cbk1-as* durante la fase de crecimiento exponencial en YPD a 30°C tras 5 horas de la adición de 25µM de 1NM-PP1 o DMSO. Barra d escala, 5µm (B) Representación gráfica de la aparición de agrupaciones celulares en *cbk1-as* en las condiciones descritas.

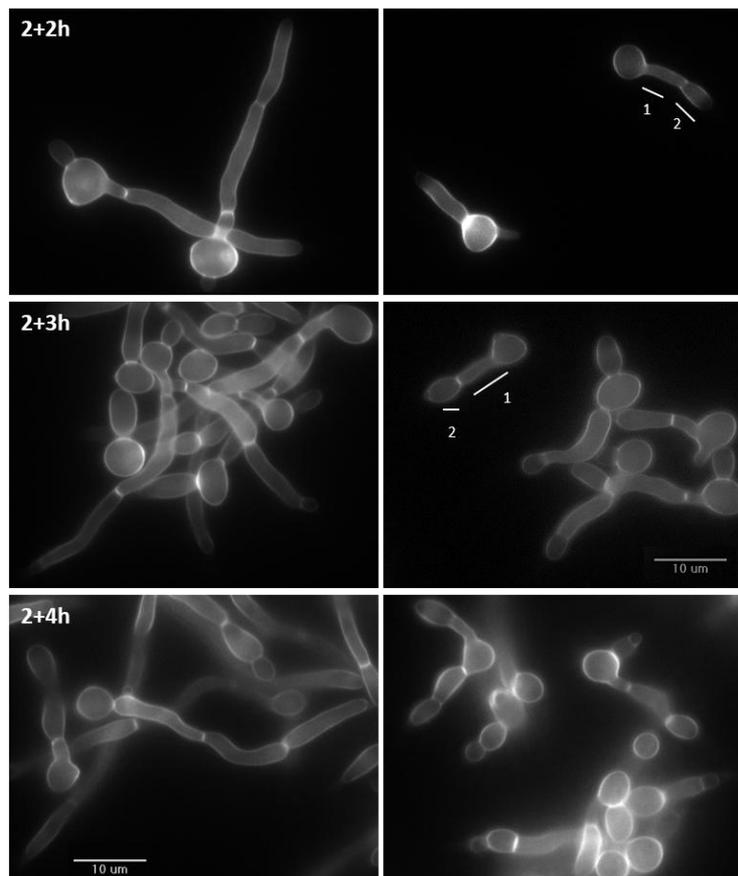
### 2.2. Estudio del mutante *cbk1-as* durante el crecimiento hifal.

Los resultados presentados en el apartado 1.7.1 sugerían que Cbk1 realizaba una función durante el mantenimiento del crecimiento hifal que era independiente de Ssd1. Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares que regula durante esta etapa. El hecho de que hayamos conseguido construir un alelo condicional de

## Resultados

*CBK1* nos permitía iniciar el estudio de dichos mecanismos con más detalle al poder inactivar la quinasa en diferentes momentos del crecimiento hifal.

En una primera aproximación, se estudió el efecto de añadir 1NM-PP1 a células *cbk1-as* que ya estaban creciendo como hifas. Para ello, un cultivo de la cepa *cbk1-as* se incubó durante 2 horas en un medio inductor del crecimiento hifal (YPD suplementado con 10% de suero a 37°C). Posteriormente, el cultivo se dividió en dos alícuotas, una suplementada con 2% de DMSO y la otra con 25  $\mu$ M de 1NM-PP1 y se tomaron muestras para su análisis morfológico tras 2, 3, 4 y 7h en presencia del análogo. Para una mejor visualización del septo, las células se tiñeron con CW (*Calcofluor White*).



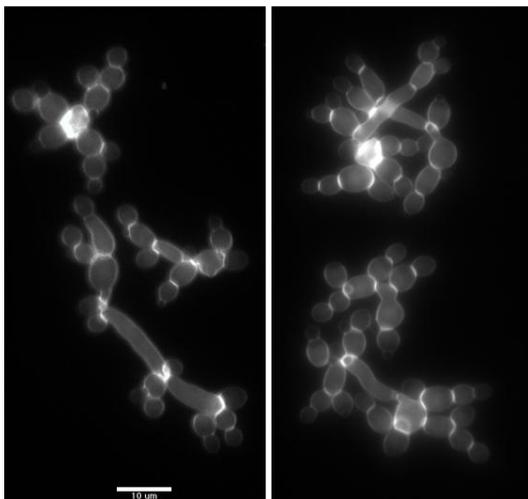
**Figura 45. Inhibición de Cbk1 durante el crecimiento hifal.** Las imágenes muestran la tinción con calcoflúor de la cepa *cbk1-as* tomadas con el microscopio de fluorescencia tras 2, 3 y 4 horas de tratamiento. Barra de escala, 10 $\mu$ m. 1: tubo germinativo. 2: célula apica. La columna de la izquierda, células en DMSO. La columna de la derecha: células con 25  $\mu$ M de 1NM-PP1.

## Resultados

Como puede observarse en la figura 45, la inhibición de la actividad de Cbk1 tuvo dos efectos importantes en el desarrollo hifal. En primer lugar, se observó una pérdida de la polaridad en la célula apical (marcada como 2) que dio lugar a un ensanchamiento del ápice de la hifa. Sin embargo, esta despolarización del ápice no se produjo cuando la célula todavía no había puesto el primer septo ya que los tubos germinativos (marcado como 1) eran similares a los de las células control (el tubo formado entre la base de la levadura y el primer septo dentro de la hifa). Esta observación sugiere que la actividad de Cbk1 durante el mantenimiento del crecimiento hifal se requiere una vez se ha formado el primer septo. Estos resultados también indican que Cbk1 es necesario para el crecimiento celular ya que las hifas en presencia del análogo eran mucho más cortas, lo que sugiere que la actividad de Cbk1 podría ser necesaria para la fusión de las vesículas secretoras, portadoras de nuevos materiales, al ápice de la hifa.

La observación de las células incubadas a tiempos más largos (7h) puso de manifiesto que la pérdida de la actividad Cbk1 dio lugar a una activación de la gemación lateral a partir del filamento inicial (Figura 46). Las hifas de *C. albicans* son estructuras tubulares multicelulares en las que las células subapicales se encuentran bloqueadas en la fase G1 del ciclo celular (Sudbery, 2011). Como consecuencia de este bloqueo no se activa la gemación lateral. Sin embargo, la inhibición de la actividad de

2h SB + 7h 25 $\mu$ M 1NM-PP1



**Figura 46. La inhibición de la actividad de Cbk1 durante el crecimiento hifal da lugar a la activación de la gemación lateral.** Morfología de las células *cbk1-as* (JC2247) tras 7h creciendo en condiciones de miceliación en presencia de 25  $\mu$ M 1NM-PP1 teñidas con calcofluor. Barra de escala 10 $\mu$ m.

## Resultados

Cbk1 durante 7 h en hifas dio lugar a un incremento de la gemación lateral. La tinción con DAPI de estas células puso de manifiesto que las yemas laterales contenían un núcleo (no mostrado), lo que sugeriría que ha habido una reactivación del ciclo en las células subapicales. En resumen, estos resultados indican que Cbk1 es necesario tanto para garantizar la morfología de la hifa como de mantener bloqueado la progresión del ciclo celular en las células subapicales.

### 2.2.1. Implicación de Cbk1 en la regulación de Spa2

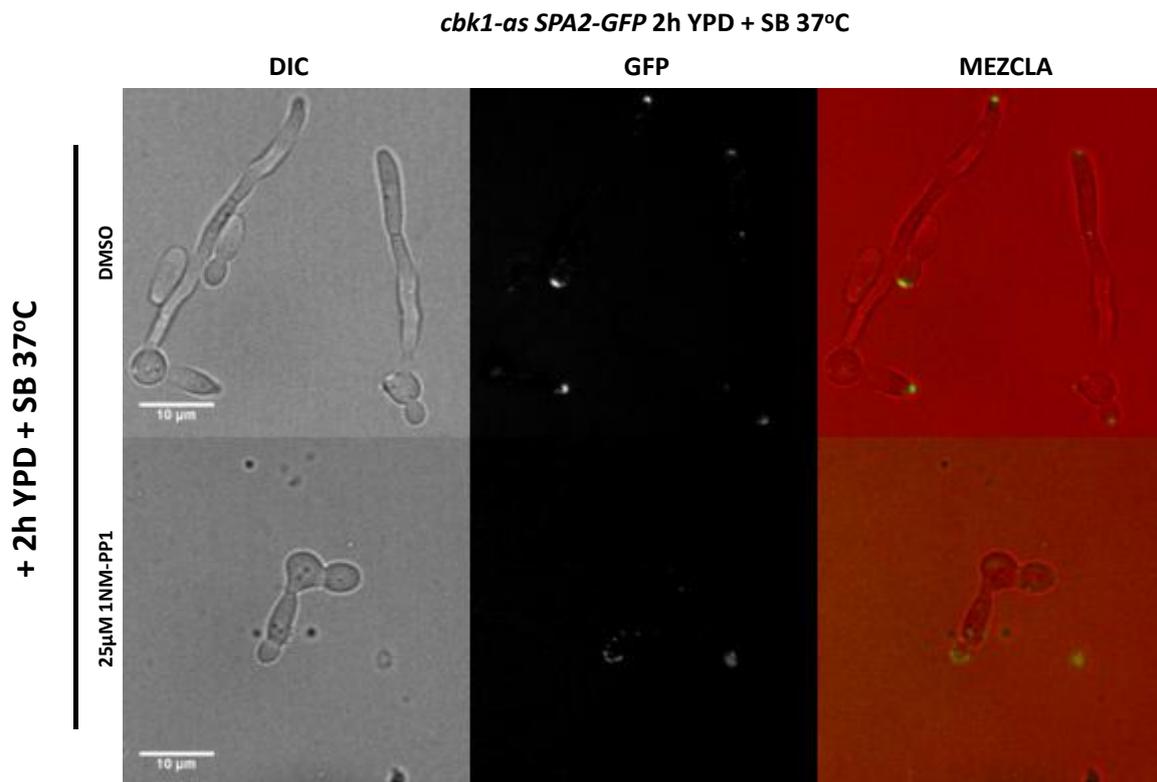
El polarisoma es un complejo multiproteico que desempeña un papel importante en el crecimiento polarizado ya que permite el ensamblaje de los cables de actina en el sitio de crecimiento (Evangelista et al., 1997; Fujiwara et al., 1998). La proteína Spa2 forma parte del polarisoma y actúa como una plataforma donde interaccionan otras proteínas necesarias para mantener la secreción de nuevos materiales a un punto concreto de la superficie celular ((Sheu et al., 2000; Zheng et al., 2003).

En levaduras, la localización de Spa2 varía a lo largo del ciclo celular. Durante el inicio de la gemación (G1/S), Spa2 se concentra en una pequeña superficie de la yema. Posteriormente, cuando se activa el crecimiento isodiamétrico (G2), Spa2 se extiende por toda la superficie de esta. Finalmente, durante la citocinesis, la proteína Spa2 se transloca al plano de división para concentrar la maquinaria de secreción en la formación del septo que separe a la célula madre de la célula hija. Sin embargo, durante el crecimiento hifal, la regulación espacial de Spa2 es diferente ya que su localización en el ápice de la hifa se mantiene de forma independiente del ciclo celular (Wang et al., 2016).

Dado que la inhibición de la actividad de Cbk1 daba lugar a la despolarización del crecimiento en la célula apical de la hifa (Figura 45, célula 2), procedimos a analizar si la función de Cbk1 era importante para regular el polarisoma en el ápice de la hifa. Para responder a esta pregunta se construyó la cepa *cbk1-as/cbk1Δ SPA2-GFP* (JC2284) en la que la proteína Spa2 fusionada a la GFP se utilizó como marcador del polarisoma. Posteriormente, dicha cepa se incubó en condiciones de miceliación durante 2h. Transcurrido ese tiempo, el cultivo se separó en dos alícuotas a las que se añadieron

## Resultados

2% DMSO y 25  $\mu$ M de 1NM-PP1 respectivamente, se incubaron otras 2h en condiciones de miceliación y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Mientras que Spa2 se observó como un punto brillante centrado en el ápice la hifa en la muestra control, la adición del análogo dio lugar a una distribución anormal de la proteína ya que se localizaba esparcida por todo el córtex de la célula despolarizada (Figura 47). Por tanto, este resultado sugeriría que la actividad de Cbk1 es necesaria para mantener el polarisoma focalizado en el ápice de la hifa.



**Figura 47. Distribución de Spa2 en la punta de la hifa.** Imágenes de microscopía de contraste interferencial (DIC) y fluorescencia (SPA2-GFP). Mezcla: rojo: DIC, verde: GFP. Las imágenes de fluorescencia son la proyección máxima de 7 planos adquiridos cada 0,5 $\mu$ m. Barra de escala, 10 $\mu$ m. Tras 2 horas de tratamiento con 1NM-PP1, Spa2 se encuentra deslocalizada en la punta de la hifa.

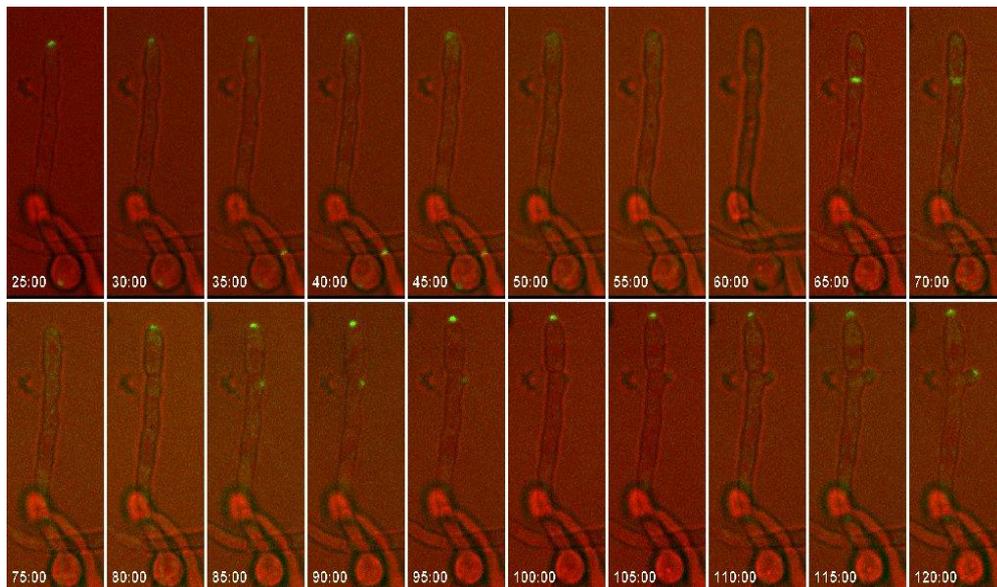
Sin embargo, este tipo de experimento no nos permite establecer una relación causal directa entre la inhibición de la actividad quinasa y la deslocalización de Spa2 ya que no podemos saber si la distribución anormal de Spa2 es la causa o consecuencia de la pérdida de la polaridad producida por la inhibición de Cbk1.

## Resultados

Para profundizar más en la relación entre Cbk1 y Spa2 se realizaron experimentos de microscopía *time-lapse*. Esta técnica consiste en obtener fotos a lo largo del tiempo de una misma célula, lo que permite estudiar como varía su morfología y la distribución subcelular de proteínas que hayan sido marcadas con GFP. En nuestro caso, se realizó un seguimiento de la localización subcelular de Spa2 en una hifa de *cbk1-as* a la que se le añadió 25 $\mu$ M del análogo del ATP. Posteriormente, se tomaron fotografías cada 5 minutos en el microscopio de fluorescencia, siendo el tiempo 0 el momento en el que se añadió 1NM-PP1.

Como puede observarse en la figura 48, la proteína Spa2-GFP fue perdiendo intensidad en la punta de la hifa y dispersándose por los laterales a lo largo del tiempo hasta casi su completa desaparición (t 55 min) para translocarse a la región del plano de división 10 min después. Tras permanecer en dicha región unos 5-10 min, volvió a desaparecer una vez formado el septo para volver a localizarse en el ápice en el momento donde la punta empieza a ensancharse para dar lugar a una yema. En hifas silvestres, Spa2 se localiza siempre en el ápice de forma independiente del ciclo celular

*cbk1-as SPA2-GFP 2h 37°C + Time-Lapse 25 $\mu$ M 1NM-PP1*



**Figura 48. Localización de Spa2 en la punta de la hifa durante la inhibición de Cbk1.** *Time-Lapse* de distribución de Spa2 en la punta de la hifa durante la inhibición de *cbk1-as*. Las fotografías se tomaron cada 5 minutos durante dos horas de tratamiento con 1NM-PP1. Mezcla de imágenes DIC (rojo) y Spa2-GFP (verde). Las imágenes de fluorescencia son la proyección máxima de 5 planos adquiridos cada 0,5 $\mu$ m.

## Resultados

(Wang et al., 2016).

El hecho de que Spa2 volviera a concentrarse en la punta de la hifa tras finalizar la citoquinesis indica que la actividad de Cbk1 no es necesaria para la recolocación del polarisoma sino para retenerlo en el ápice de la hifa de forma independiente del ciclo celular.

También observamos un comportamiento anormal de Spa2 en los compartimentos subapicales ya que, tras finalizar la citoquinesis en la célula apical (80 min), el polarisoma se ensambló en el lateral de la célula subapical lo que dio lugar a la activación de la gemación (intervalo 85-120 min). Aunque en estos experimentos de time-lapse no se pudo visualizar el núcleo, experimentos con cultivos líquidos teñidos con DAPI pusieron de manifiesto que estas yemas laterales contenían DNA (no mostrados), lo que indicaba que el ciclo celular se había reactivado en la célula subapical.

El hecho de que la mitosis de la célula apical genere una célula que continúa creciendo y dividiéndose y otra que bloquea su crecimiento y progresión del ciclo celular significa que es una mitosis asimétrica que genera dos células con programas diferentes. Nuestros resultados sugieren que la actividad de Cbk1 es necesaria para generar dicha asimetría ya que la inhibición de la NDR-quinasa dio lugar a dos células que activaron el mismo patrón de gemación tras finalizar la citoquinesis.

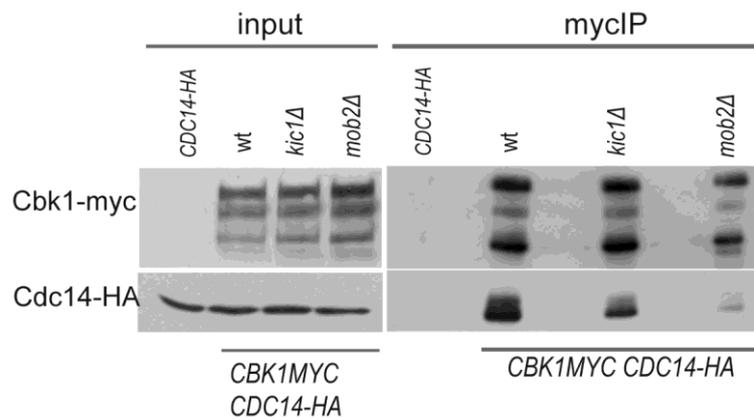
## **CAPÍTULO 2**

***Relación funcional de la fosfatasa Cdc14 y la NDR  
quinasa Cbk1.***

## Resultados

### 1. La fosfatasa Cdc14 es una fosfoproteína.

Existen numerosas observaciones derivadas de los trabajos de nuestro grupo que sugieren la existencia de una interacción funcional entre la fosfatasa Cdc14 y la quinasa Cbk1. En primer lugar, los mutantes *cdc14ΔΔ* y *cbk1ΔΔ* comparten fenotipos similares como la formación de grumos o defectos en la transición levadura-micelio. Segundo, la actividad de Cdc14 es necesaria en la regulación de Cbk1 al inicio del crecimiento hifal (Figura 41). Tercero, estudios de co-inmunoprecipitación han puesto de manifiesto que Cbk1 interacciona físicamente con Cdc14 de una forma dependiente de la subunidad reguladora Mob2 (Figura 49, datos no publicados).

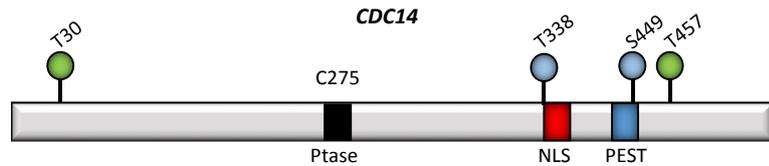


**Figura 49. La interacción Cbk1/Cdc14 requiere a Mob2 y Kic1.** Extractos de proteínas de cultivos de levadura de las cepas, silvestre *CBK1-MYC CDC14-HA* (JC308), *kic1Δ* (JC1147) y *mob2Δ* (JC785) inmunoprecipitados con anticuerpos anti-Myc. Muestras separadas por SDS-PAGE, analizadas con anticuerpos anti-HA y/o anti-PSTAIRE. La cepa expresando *CDC14-HA* (JC599) se utilizó como control negativo de la inmunoprecipitación. Tesis Pilar Gutiérrez (Resultado no publicado).

Un análisis de la secuencia de aminoácidos de Cdc14 puso de manifiesto, como ya se comentó anteriormente, nueve sitios potenciales de fosforilación por S/T quinastas basófilas, entre las que se encuentra la NDR quinasa Cbk1. Además, este análisis puso de manifiesto la existencia de dos sitios consenso completos adicionales (*full-size*) para Cbk1, la T<sub>30</sub> y T<sub>457</sub> (Figura 50), en la que existía una histidina en posición -5 respecto al residuo fosfoaceptor (H-X-K/R-K/R-X-S/T, (Mazanka et al., 2008)). También se detectaron dos sitios consenso completos de fosforilación por quinastas dependientes de ciclinas (Cdk), S/T-P-X-R/K, uno de ellos (T<sub>388</sub>) al inicio de una secuencia de localización nuclear (NLS) y otro en una región PEST (S<sub>449</sub>), secuencia presente en

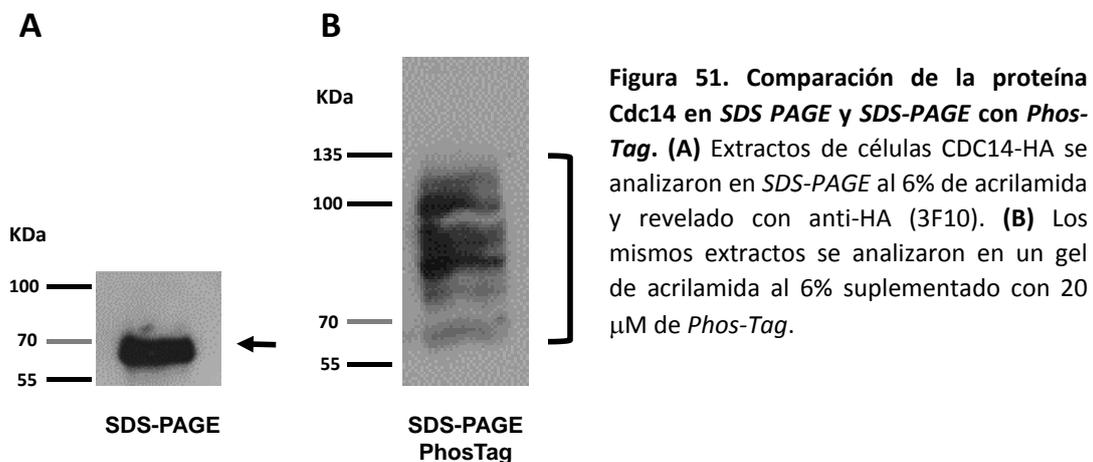
## Resultados

proteínas inestables (Rogers et al., 1986);. Por tanto, la existencia de estos posibles sitios de fosforilación por Cbk1/Mob2 y Cdks en la secuencia de Cdc14 podría sugerir que la función de esta fosfatasa pudiera estar regulada mediante fosforilación por estas quinasas.



**Figura 50. Secuencia de Cdc14.** Sitios de fosforilación por Cbk1 correspondientes a los aminoácidos T30 y T457 (verde). Sitios de fosforilación por Cdks en los aminoácidos T388 y S449 (azul). La C275 se encuentra dentro del dominio fosfatasa (Ptase) y es esencial para la actividad catalítica de Cdc14. Secuencias de localización nuclear (NLS) y secuencia PEST.

Como paso previo al estudio de la regulación de Cdc14, se procedió a analizar el estado de fosforilación de Cdc14-HA mediante *SDS-PAGE* con *Phos-tag*<sup>TM</sup>. Como ya se ha comentado, la unión de las moléculas de *Phos-tag*<sup>TM</sup> a los grupos fosfato de las proteínas provoca un retraso en la migración de estas dependiendo del número de fosfatos que contengan, lo que permite un aumento en la resolución de las fosfoisoformas. El estudio de los extractos de cultivos asincrónicos levaduriformes de *C. albicans* pusieron de manifiesto que Cdc14 se detectaba como una sola banda en torno a los 70 kDa en geles convencionales *SDS-PAGE*. Sin embargo, la adición de 20  $\mu$ M de *Phos-tag*<sup>TM</sup> al gel de acrilamida permitió la separación de Cdc14 en numerosas bandas con pesos moleculares entre 70 y 120 kDa (Figura 51B). Por tanto, estos resultados sugieren que Cdc14 es una proteína altamente fosforilada.



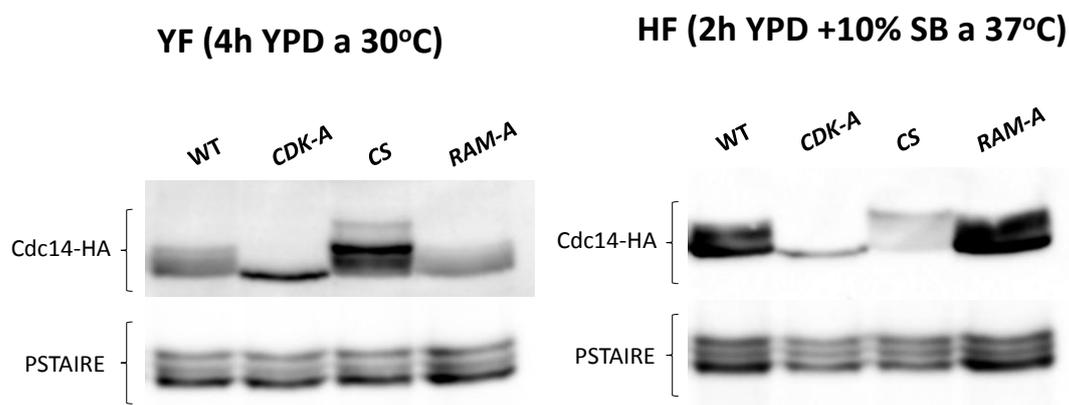
**Figura 51. Comparación de la proteína Cdc14 en SDS PAGE y SDS-PAGE con Phos-Tag.** (A) Extractos de células CDC14-HA se analizaron en *SDS-PAGE* al 6% de acrilamida y revelado con anti-HA (3F10). (B) Los mismos extractos se analizaron en un gel de acrilamida al 6% suplementado con 20  $\mu$ M de *Phos-Tag*.

## Resultados

### 2. Construcción de mutantes fosfodeficientes de *CDC14*.

Como primera aproximación al estudio de la función de la fosforilación de Cdc14, se procedió a construir, mediante síntesis génica, alelos de *CDC14* deficientes en los sitios de fosforilación de Cbk1 y Cdk anteriormente mencionados. En paralelo, se construyó un alelo de *CDC14* catalíticamente inactivo al sustituir la cisteína 275 por serina (C275S). Una vez obtenidos los alelos mutantes, se utilizaron para sustituir el alelo silvestre *CDC14* de la cepa heterocigótica *CDC14/cdc14Δ* (JC1564), de manera que se la única fuente de expresión de *CDC14* provendría del alelo mutante. Las cepas construidas mediante esta estrategia fueron: JC1421 (*sgCDC14-HA/cdc14Δ*), JC1224 (*cdc14-T30A-T457A-HA/cdc14Δ*, denominada *cdc14-RAM-A*), JC1427 (*cdc14-T388A-S449A-HA/cdc14Δ*, denominada *cdc14-CDK-A*) y JC1428 (*cdc14-C275S-HA/cdc14Δ*, denominada *cdc14-CS*).

Una vez verificadas las cepas mediante secuenciación, se procedió a comprobar si dichas mutaciones afectaban la estabilidad de Cdc14 en levaduras o hifas. Como puede observarse en la figura 52, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de Cdc14 en ninguna de las dos condiciones de crecimiento ensayadas.

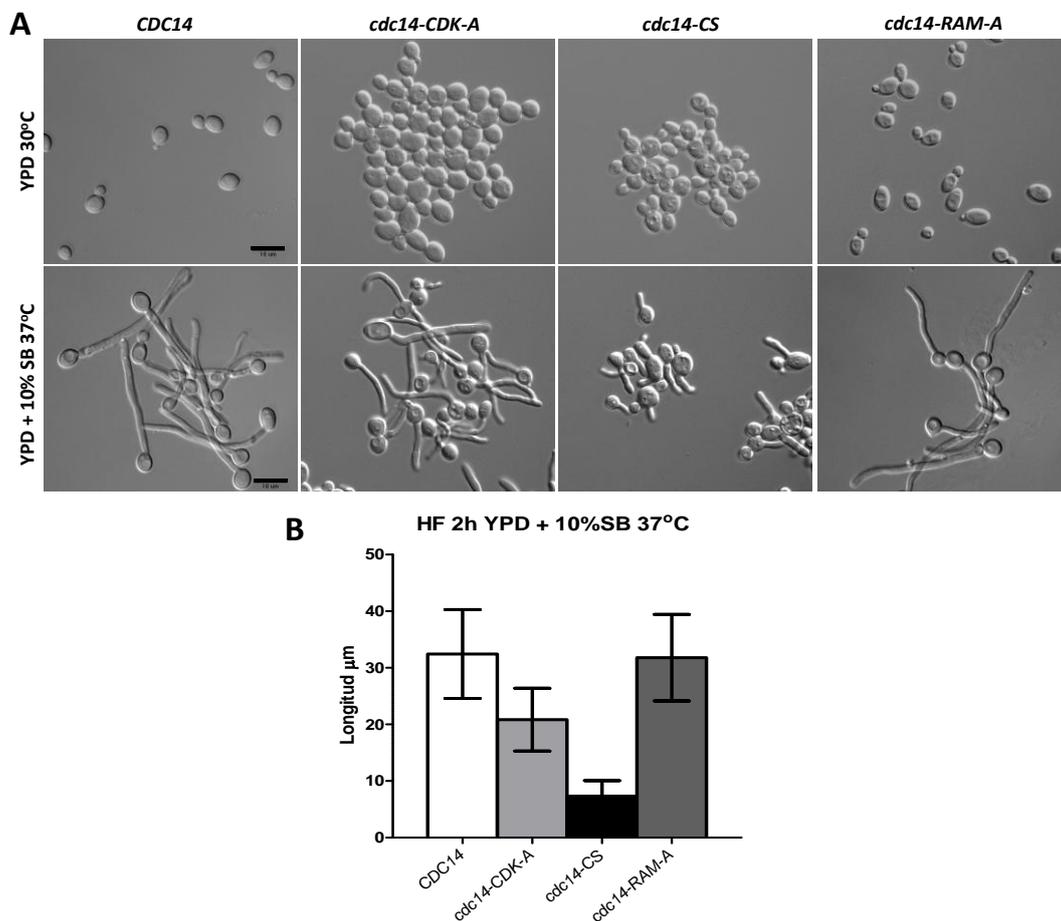


**Figura 52. La expresión de alelos mutantes de Cdc14 es estable.** Comprobación por *Western Blot* de la estabilidad de las proteínas de Cdc14 producidas por los diferentes alelos generados mediante síntesis génica. **(A)** Extractos obtenidos a partir de cultivos de levadura en fase exponencial. **(B)** Extractos obtenidos a partir de cultivos hifales. Revelados con anticuerpos anti-HA; como control de carga se utilizaron anticuerpos anti-PSTAIRE. WTsg es el alelo silvestre *CDC14-HA* generado por síntesis génica. RAM-A corresponde a la forma fosfodeficiente en los sitios de fosforilación por Cbk1 mientras que CDK-A a la de los sitios de fosforilación por Cdk. CS corresponde al alelo catalíticamente inactivo de *CDC14*.

## Resultados

### 2.1. Estudio de los fenotipos mutantes de Cdc14 en los sitios de fosforilación por Cbk1 y por CDKs.

En *C. albicans*, la proteína Cdc14 desempeña funciones importantes durante el crecimiento levaduriforme y micelial (Clemente-Blanco et al., 2006). Con el fin de caracterizar el fenotipo de los mutantes fosfodeficientes que habíamos construidos, se comparó su morfología respecto a las cepas control silvestre (JC1421, *CDC14-HA*) y mutante catalíticamente inactivo (JC1428, *cdc14-CS*) en medios para el crecimiento levaduriforme (YPD, 30°C) e inductor de la miceliación (YPD+10% suero 37°C).



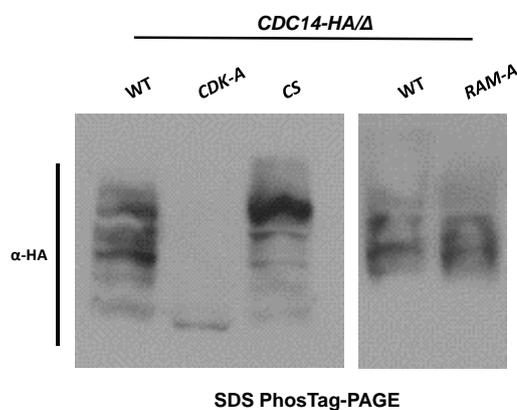
**Figura 53. Estudio de los fenotipos de los mutantes de Cdc14. (A)** Imágenes de microscopía de fase interferencial (DIC) de las cepas transformadas con los alelos de síntesis génica, *CDC14* (JC1421), *cdc14-CDK-A* (JC1427), *cdc14-CS* (JC1428), *cdc14-RAM-A* (JC1424), en cultivos de levadura y tras dos horas de inducción hifal. Barra de escala, 10 $\mu\text{m}$ . **(B)** Gráfica de la longitud de las hifas de las cepas descritas anteriormente.

## Resultados

Este análisis puso de manifiesto que la fosforilación de los sitios consenso de Cbk1 no eran importantes para regular la función de Cdc14 ya que el mutante *cdc14-RAM-A* (JC1224) se comportó como el control silvestre, tanto en levaduras como en hifas. Sin embargo, las células *cdc14-CDK-A* (JC1427) presentaron defectos en la separación celular a 30°C, similares al mutante *cdc14-CS*, mientras que fueron capaces de responder a suero a 37°C como el control silvestre, aunque las hifas eran algo más cortas (Figura 53). Por tanto, estos resultados sugieren que la fosforilación por Cdk de la T388 y/o la S449 de Cdc14 es importante para regular la función de Cdc14, principalmente durante el crecimiento levaduriforme.

El hecho de que el mutante *cdc14-CDK-A* tuviera fenotipo sugería que estos sitios podían estar fosforilados *in vivo*. Por tanto, se estudió el estado de fosforilación de las proteínas generadas por los alelos *cdc14-RAM-A* y *cdc14-CDK-A* en geles de Phos-tag™, a partir de extractos de cultivos de células crecidas en YPD a 30°C. Como controles se incluyeron células silvestres y el mutante *cdc14-CS* catalíticamente inactivo. Mientras que el patrón de migración de Cdc14 en extractos de la cepa *cdc14-RAM-A* fue similar al del control silvestre, la mutación *cdc14-CDK-A* tuvo un gran impacto en el comportamiento electroforético de la proteína ya que se detectó una única banda que migraba a la altura de las formas menos fosforiladas en el control silvestre (Figura 54).

En resumen, estos resultados sugieren que la T388 y/o la S449 estarían fosforiladas *in vivo* y que son esenciales para determinar el estado general de fosforilación de



**Figura 54. Análisis en geles de acrilamida Phos-tag de las cepas que incluyen el alelo de síntesis génica de CDC14.** WT se refiere a la cepa que contiene el alelo silvestre de síntesis génica de *CDC14*, *CDK-A* corresponde a la cepa deficiente en los sitios de fosforilación por CDKs, *CS* es la cepa con la copia catalíticamente inactiva de *CDC14*, *RAM-A* presenta el alelo mutado de *CDC14* en los sitios de fosforilación por Cbk1.

## Resultados

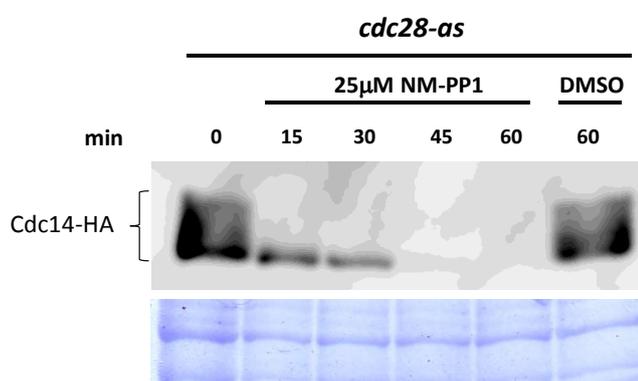
Cdc14.

### 3. La Cdk Cdc28 regula el estado de fosforilación de Cdc14.

Por otra parte, para conocer si la quinasa responsable de la fosforilación de los residuos T388 y/o la S449 era la Cdk Cdc28, se construyó la cepa *cdc28-as CDC14-HA* (JC2355). Si Cdc28 fuera la quinasa implicada en la fosforilación de estos sitios, su inhibición por 1NM-PP1 daría lugar a un patrón de fosforilación de Cdc14 similar al de la cepa *cdc14-CDK-A*.

Para llevar a cabo el experimento, células de un cultivo en fase exponencial de la cepa *cdc28-as CDC14-HA* se dividió en dos alícuotas que se incubaron con 25 $\mu$ M de 1NM-PP1 o 2% DMSO (control) en YPD a 28°C. Posteriormente, se recogieron muestras de las células tratadas con el análogo cada 15 minutos durante una hora. Como control de las isoformas de Cdc14 presentes en dicha cepa al final del experimento sin que se hubiera inhibido Cdc28, se recogieron células a los 60 minutos en presencia de 2 % DMSO. Posteriormente, se analizó el patrón de fosforilación de Cdc14 de las diferentes muestras mediante *Western Blot*.

Mientras que Cdc14 migró como una banda difusa a t0 que sugiere la existencia de formas fosforiladas, la inhibición de Cdc28 tras la adición del análogo dio lugar a una rápida modificación de la migración de Cdc14 (t15) ya que se detectó como una banda nítida coincidente con las formas menos fosforiladas del control silvestre (Figura 55). Además, la pérdida de actividad Cdc28 dio



**Figura 55. Cdc14 se fosforila por Cdc28.** Extractos proteicos de las cepas *cdc28-as CDC14-HA* (JC2355) crecidas en MM a 28°C, analizados por *Western Blot* usando anticuerpos anti-HA. Muestras recogidas a tiempos 0',15',30',45' y 60' tras la adición del análogo durante el crecimiento exponencial. Como control de la fosforilación se utilizó la misma cepa crecida en presencia de DMSO a los 60 minutos. Tinción de azul de Coomassie como control de carga.

lugar a la desaparición de Cdc14 en los extractos a los 60 min en presencia de 1NM-PP1, a diferencia de las células incubadas con DMSO durante el mismo tiempo.

## Resultados

En conjunto, todos estos resultados indican que la fosforilación de la T388 y/o la S449 por la Cdk Cdc28 es importante para la actividad de la fosfatasa Cdc14 durante el crecimiento levaduriforme.

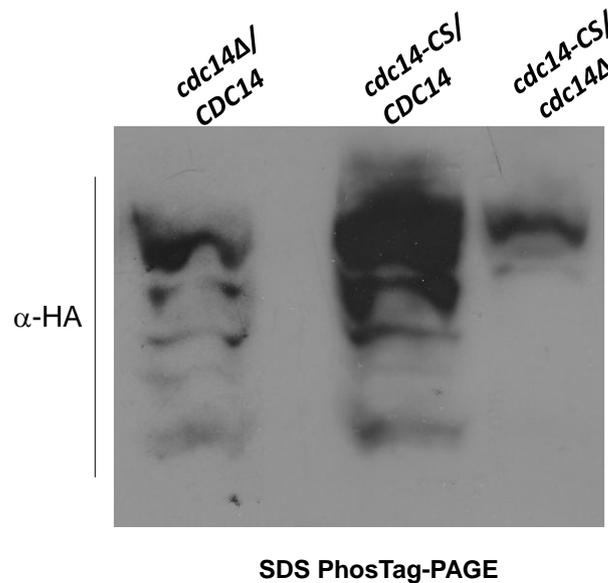
### 4. La desfosforilación de Cdc14 depende de su propia actividad fosfatasa

Cuando analizamos el estado de fosforilación de los mutantes de Cdc14 que habíamos construido, obtuvimos un resultado inesperado ya que la proteína Cdc14 se encontraba altamente fosforilada en células que expresaban únicamente la fosfatasa catalíticamente inactiva (Cdc14-CS) (Figura 53). La aparición de estas formas más fosforiladas podría deberse a que la mutación introducida (CS) afectase al plegamiento de la proteína, lo que podría alterar de forma inespecífica su estado de fosforilación. Otra posible explicación sería que la propia fosfatasa Cdc14 catalizara su propia desfosforilación y, por tanto, la ausencia de su actividad fosfatasa diera lugar a un incremento de las formas fosforiladas.

Para poder distinguir entre estas dos posibilidades, aprovechamos el carácter diploide de *C. albicans*. Se construyó la cepa *cdc14-CS-HA/CDC14* (JC1643) que co-expresaba tanto a la fosfatasa silvestre sin etiquetar como a la fosfatasa inactiva marcada con HA. Posteriormente, se analizaron los extractos de dicha cepa en geles de Phos-tag<sup>TM</sup> y se compararon con los extractos de las cepas control *CDC14-HA/cdc14Δ* y *cdc14-CS-HA/cdc14Δ* en los que la única fuente de Cdc14 era el alelo etiquetado. En el primer caso (mal plegamiento), la fosforilación observada de Cdc14-CS-HA no debería verse afectada por la presencia de una fosfatasa Cdc14 activa, por lo que el patrón de migración en geles de *Phos-tag*<sup>TM</sup> debería ser idéntico en los extractos de las cepas *cdc14-CS-HA/CDC14* y *cdc14-CS-HA/cdc14Δ*. Sin embargo, si la proteína Cdc14-CS se pliega normalmente y Cdc14 fuera sustrato de otras moléculas de Cdc14, el patrón de fosforilación de la proteína Cdc14-CS-HA presente en los extractos de la cepa *cdc14-CS-HA/CDC14* (JC1643) debería ser similar al control silvestre *CDC14-HA/cdc14Δ* ya que las moléculas de Cdc14 no etiquetadas actuarían sobre las moléculas inactivas de Cdc14-CS-HA.

## Resultados

Como puede observarse en la figura 56, la co-expresión de moléculas activas e inactivas de Cdc14 generó un patrón electroforético de Cdc14-CS-HA similar al del control silvestre. Por tanto, estos resultados sugieren que la desfosforilación de Cdc14 depende de su propia actividad fosfatasa.



**Figura. 56. La desfosforilación de Cdc14 depende de su propia actividad fosfatasa.** La figura representa el análisis de los extractos de las cepas indicadas en gels con Phos-tag y revelados con anticuerpos anti-HA (3F10). Las cepas *cdc14Δ/CDC14-HA* y *cdc14Δ/cdc14-CS-HA* tienen deleccionada una copia de *CDC14*, por lo que la única fuente de Cdc14 corresponde al alelo etiquetado. La cepa *CDC14/cdc14-CS-HA* co-expresa moléculas de Cdc14 funcionales sin etiquetar y moléculas de Cdc14 inactivas (CS) marcadas con HA.

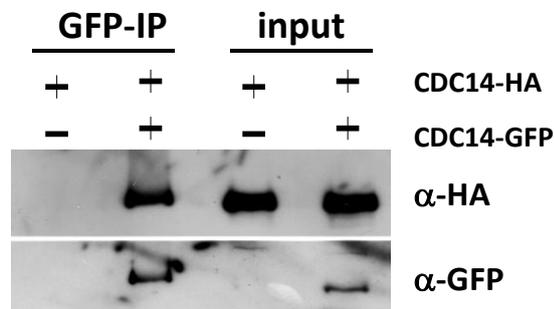
### 5. Interacciones intermoleculares de Cdc14 *in vivo*.

El hecho que la desfosforilación de Cdc14 dependa de su propia actividad fosfatasa podría ser consecuencia de un proceso de auto-desfosforilación mediante la acción directa de la fosfatasa sobre otras moléculas de Cdc14, lo que implicaría interacciones entre diferentes polipéptidos de Cdc14 *in vivo*.

Para estudiar esta idea, se construyó una cepa en la que los dos alelos de *CDC14* se encontraban marcados con diferentes etiquetas (JC1940: *CDC14-GFP/CDC14-HA*) para realizar experimentos de co-inmunoprecipitación (co-IP) a partir de cultivos levaduriformes en crecimiento exponencial. Como control para detectar interacciones

## Resultados

inespecíficas se utilizó la cepa *CDC14-HA* (JC1669). Para ello, extractos proteicos de las cepas *Cdc14-HA* (JC1669) y *Cdc14-HA/CDC14-GFP* (JC1940) se incubaron con anticuerpos anti-GFP (GFP-Trap). Posteriormente, se analizaron los inmunoprecipitados (IP) para detectar la presencia de Cdc14-HA mediante el uso de anticuerpos anti-HA (3F10). Como puede observarse en la figura 57, estos experimentos pusieron de manifiesto la existencia de interacciones entre diferentes moléculas de Cdc14 ya que se detectó Cdc14-HA únicamente en el IP anti-GFP de la cepa *CDC14-GFP CDC14-HA* pero no en el IP de la cepa control *CDC14-HA*.



**Figura 57. Interacciones intermoleculares de Cdc14.** Extractos proteicos de las cepas indicadas se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-GFP. Posteriormente, dichos IPs se analizaron mediante Western-blot con anticuerpos anti-GFP y anti-HA. Los carriles de la izquierda representan los IPs y los carriles de la derecha (Input) los extractos totales antes de la IP.

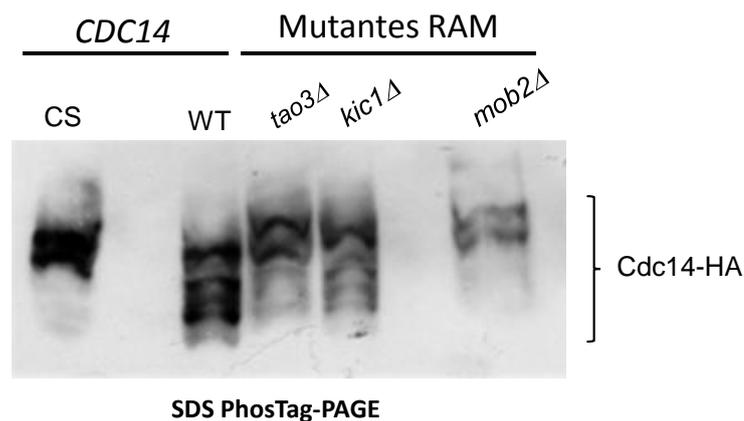
En su conjunto, todas estas evidencias presentadas en los apartados 4 y 5 del capítulo 2, sugieren que Cdc14 cataliza su propia desfosforilación a través de interacciones intermoleculares. Por tanto, el nivel de fosforilación de Cdc14 detectado en geles de Phos-tag podría ser utilizado como un indicador (*readout*) de la actividad enzimática de Cdc14 en la célula. En otras palabras, si en una determinada cepa Cdc14 presentara un patrón de fosforilación similar al mutante *cdc14-cs* podría ser indicativo que en dicha cepa la actividad de Cdc14 se encontraría inhibida.

## Resultados

### 6. La señalización dependiente de Cbk1 es necesaria para regular el estado de fosforilación de la fosfatasa Cdc14.

Como ya se ha comentado al inicio de este capítulo, la fosfatasa Cdc14 interacciona físicamente con Cbk1 en una forma dependiente de componentes de la ruta RAM como Mob2 o Kic1 (Figura 49). Dado que observamos que dicha interacción se reducía en los mutantes de la ruta RAM, nos preguntamos qué impacto podría tener esta disminución en la interacción entre Cbk1 y Cdc14 sobre la actividad de la fosfatasa, utilizando el patrón de fosforilación de Cdc14 como indicador de su actividad catalítica.

Por tanto, se realizó un análisis de la fosforilación de Cdc14-HA en distintos mutantes de la ruta RAM, a partir de cultivos levaduriformes, y se compararon sus perfiles electroforéticos con los controles de formas hiperfosforiladas (*cdc14-CS-HA*; JC1428), desfosforiladas (*cdc14-CDK-A-HA*; JC1427) y silvestre (*CDC14-HA*; JC1421). Como puede observarse en la figura 58, Cdc14 apareció hiperfosforilado en todos los mutantes RAM analizados. Por tanto, estos resultados indican que la fosforilación de Cdc14 depende de la ruta RAM. Dado que los resultados de los apartados 4 y 5 sugerían que Cdc14 se auto-desfosforila, el hecho de que Cdc14 se encuentre hiperfosforilada en los mutantes RAM sugiere que el complejo Cbk1/Mob2 es necesario para activar a la fosfatasa Cdc14.



**Figura 58. Cdc14 se encuentra hiperfosforilado en mutantes de la ruta RAM.** Extractos de las cepas indicadas se corrieron en geles con 20  $\mu$ M de Phos-tag y las diferentes fosfo-isoformas de Cdc14 se detectaron mediante western blot con anticuerpos anti-HA (3F10). Cepas: JC1746: *tao3 $\Delta\Delta$  CDC14-HA*; JC1147: *kic1 $\Delta\Delta$  CDC14-HA*; JC1680: *mob2 $\Delta\Delta$  CDC14-HA*; JC1428: *cdc14-CS-HA/cdc14 $\Delta$* ; JC1421: *CDC14-HA/cdc14 $\Delta$* .

***DISCUSIÓN***

---

## Discusión

La polaridad celular establece dominios funcionales especializados en la célula mediante la distribución asimétrica de proteínas y mRNAs. Esta capacidad de generar dominios funcionales, que puede responder tanto a señales externas como internas, es fundamental en el desarrollo y función de células especializadas, tejidos y órganos (Biswas et al., 2007; Harvey and Tapon, 2007; Tapon et al., 2002). En hongos patógenos, la virulencia se encuentra relacionada con su capacidad de generar, a través de rutas de señalización mediadas por proteín-quinasas, estructuras especializadas de infección en respuesta a señales presentes en el hospedador (Biswas et al., 2007; Moyes et al., 2010).

Tanto en hongos como en células animales, miembros de las NDR (Nuclear Dbf2-Related) /LATS (Large Tumour Suppressor) quinazas son las moléculas efectoras de rutas que regulan la polaridad celular y ciclo celular (Hergovich et al., 2006). En esta memoria nos hemos centrado en la regulación de la NDR quinasa Cbk1 de *C. albicans*, componente central de la ruta RAM, también conocida como ruta MOR (Morphogenesis-related NDR kinase network), que es necesaria el crecimiento hifal y formación de biofilms (Maerz and Seiler, 2010; Song et al., 2008).

En levaduras modelo, como *S. cerevisiae* y *S. pombe*, las NDR quinazas reciben señales intracelulares que les permiten coordinar los eventos finales del ciclo celular y morfogénesis (Racki et al., 2000; Verde et al., 1998), cosa que también ocurre en las células levaduriformes de *C. albicans*, ya que Cbk1 es necesaria para coordinar la separación celular con el final de la mitosis (Brace et al., 2011; Weiss, 2012). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el efector de la ruta RAM también es capaz de integrar señales extracelulares ya que modifica su estado de fosforilación en respuesta a señales que activan el crecimiento hifal, modificaciones que tienen relevancia funcional ya que son necesarias para mantener un crecimiento hiperpolarizado continuo e inhibir la separación celular en las formas hifales.

Esta capacidad de integrar señales extracelulares de la ruta mediada por NDR quinazas también se ha puesto de manifiesto recientemente en el fitopatógeno *Colletotrichum orbiculare*, donde la ruta MOR es necesaria para la formación del apresorio, en respuesta a señales generadas por la planta, estructura especializada

## Discusión

fúngica que inicia la infección en el tejido vegetal (Kodama et al., 2017). En el hongo patógeno *Pneumocystis*, importante agente causal de neumonías graves en pacientes inmunocomprometidos, su exposición a células epiteliales pulmonares induce fuertemente la expresión del gen *CBK1*, lo que sugiere que los niveles de esta NDR quinasa podría estar regulada por condiciones ambientales específicas del hospedador (Kottom et al., 2003).

Tal vez, la función primigenia de la ruta RAM/MOR en levaduras haya sido la de responder a señales intracelulares que les permitiera coordinar los eventos finales del ciclo celular con la morfogénesis. Sin embargo, en aquellos linajes que evolucionaron para mantener un ciclo de vida ligado a un hospedador se haya seleccionado una nueva capa de regulación en las rutas mediadas por NDR quinasas que les permitiera modificar la arquitectura celular fúngica en respuesta a los nichos colonizados en el hospedador.

Nuestros resultados muestran que Cbk1 se desfosforila rápidamente en el inicio de la respuesta a suero para luego volver a fosforilarse durante el mantenimiento del crecimiento hifal. En correlación con esta dinámica dual de modificaciones post-traduccionales, hemos encontrado que Cbk1 se requiere al inicio del crecimiento hifal para inactivar a la proteína de unión a mRNAs Ssd1, lo que permite la formación del tubo germinativo, y, posteriormente, para mantener un crecimiento hiperpolarizado del ápice de la hifa, función que es independiente de su acción sobre Ssd1.

### **Regulación de Cbk1 durante la transición levadura-micelio.**

La familia de las NDR/LATS quinasas posee una arquitectura de dominios característica que se encuentra conservada entre sus miembros: una región N-terminal de unión al coactivador MOB (MBD: Mob Binding Domain), un dominio quinasa central con un segmento de activación de longitud variable (*T-loop* de 60 a 90 residuos), y finalmente un motivo hidrofóbico C-terminal (HM o *CT-loop*). Basándose en estudios *in vitro*, la actividad catalítica de estas enzimas está controlada por dos eventos de fosforilación (Hergovich et al., 2006): uno en el T-loop (Chan et al., 2005; Jansen et al., 2006; Stegert et al., 2004; Tamaskovic et al., 2003), mediante un proceso de auto-

## Discusión

fosforilación, y otro en el dominio CT (Thr743 en ScCbk1) por una STE20-like quinasa (Chan et al., 2005; Jansen et al., 2006; Stegert et al., 2004; Tamaskovic et al., 2003) del módulo central de señalización de la ruta. El modelo derivado de todos estos estudios *in vitro* sugeriría que las modificaciones de estos residuos incrementarían la actividad catalítica de la quinasa, potenciando así la señalización de las rutas. Los estudios cristalográficos de Cbk1 y NDR1 humana sugieren que estas modificaciones, junto a su interacción con la subunidad reguladora MOB, darían lugar a cambios conformacionales en el segmento de activación, impidiendo que éste ejerciera su función auto-inhibidora sobre el dominio catalítico de la quinasa, de forma análoga a como se regulan las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) (Gogl et al., 2015; Xiong et al., 2018). Sin embargo, los resultados obtenidos *in vivo* en *S. cerevisiae* con Cbk1 apuntan a una visión incompleta, ya que no existía correlación entre actividad quinasa *in vitro* y la función *in vivo* en los mutantes analizados (Jansen et al., 2006).

Jansen y col observaron que el alelo fosfodeficiente en el *T-loop* (*cbk1-S570A*) mostraba un fenotipo leve de pérdida de función a pesar de tener una actividad quinasa *in vitro* muy reducida. Por el contrario, el alelo fosfodeficiente en el sitio del *CT-loop* (*cbk1-T743A*) fenocopiaba al mutante *cbk1Δ* aunque tenía una actividad quinasa *in vitro* normal. Por tanto, estos resultados sugieren que, al menos en Cbk1, la fosforilación del dominio CT debe de desempeñar alguna otra función adicional a la de promover cambios conformacionales del dominio quinasa de Cbk1, función adicional que tiene que ser importante *in vivo*. Dado que no se ha descrito la caracterización *in vivo* de los mutantes equivalentes en los *T-* y *CT-loops* en células animales, no se puede concluir si los datos obtenidos en *S. cerevisiae* son extrapolables a metazoos.

¿Cuál podría ser esta función adicional? El hecho de que la proteína mutante Cbk1-T743A se encuentre altamente fosforilada *in vivo* sugiere que la fosforilación del dominio CT podría ser necesaria para reclutar a alguna fosfatasa que eliminara otros residuos fosforilados presentes en la quinasa que pudieran impedir su interacción con los sustratos (Jansen et al., 2006).

En esta memoria nos hemos centrado en la búsqueda de estos residuos fosfoaceptores en la quinasa Cbk1 de *C. albicans* y su posible función reguladora en la transición levadura-micelio. En concreto, nos hemos centrado en la caracterización de

## Discusión

seis posibles sitios de fosforilación por Cdks presentes en la secuencia de Cbk1, ya que trabajos previos del grupo habían puesto de manifiesto la importancia de la Cdk Cdc28 en la regulación de la subunidad reguladora Mob2 durante el crecimiento hifal (Gutierrez-Escribano et al., 2011).

Nuestros resultados apoyan un modelo en el que el estado de fosforilación de Cbk1 característico del crecimiento levaduriforme se modifica en respuesta a la activación del programa de diferenciación hifal en una forma dependiente de estos sitios S/T-P, ya que el mutante *cbk1-6A* fue incapaz de refosforilarse durante el mantenimiento del crecimiento hifal (Figura 29B). Dado que este mutante se comportó como un alelo hipomorfo que generaba hifas significativamente más cortas que el control (Figura 29C), la fosforilación de Cbk1 dependiente de estos sitios debe ser importante para regular la función de Cbk1 en hifas. Aunque no hemos realizado ensayos quinasa *in vitro* asociados a Cbk1-6A; los datos genéticos presentados en esta memoria sugieren que la proteína mutante Cbk1-6A no tiene actividad quinasa suficiente para realizar sus funciones *in vivo* en la hifa, ya que el doble mutante *cbk1-6A ssd1Δ* fenocopió al doble mutante sin actividad catalítica *cbk1-KD ssd1* (Figura 38A). Curiosamente, *cbk1-6A ssd1Δ* se comportó como el control silvestre durante el crecimiento levaduriforme, lo que sugiere que la regulación de estos sitios no es esencial para la actividad de Cbk1 en levaduras. En su conjunto, estos resultados sugerirían que la fosforilación dependiente de los sitios S/TP ayudaría a regular diferencialmente la interacción de la quinasa con sus sustratos principalmente durante el crecimiento hifal.

Los resultados obtenidos del análisis de los mutantes *cdc28-as* y *hgc1Δ* sugieren que las formas más fosforiladas de Cbk1 que se observan durante el mantenimiento del crecimiento hifal dependen de la actividad quinasa del complejo Cdk específico de miceliación Cdc28<sup>Hgc1</sup> (Figuras 30 y 31). Este resultado es consistente con la observación de que Cdc28 fosforila a Mob2, el coactivador de Cbk1, en respuesta a las señales inductoras del crecimiento hifal (Gutierrez-Escribano et al., 2011). De forma similar a lo observado con el mutante *cbk1-6A*, la generación de un mutante fosfodeficiente en los 4 sitios consenso de fosforilación por Cdk en Mob2 (*mob2-4A*) afectó al crecimiento polarizado en hifas.

## Discusión

En levaduras, las Cdk's son reguladores esenciales del ciclo celular y morfogénesis (Lew and Reed, 1993; Mendenhall and Hodge, 1998). En *C. albicans*, la ciclina específica de miceliación Hgc1, en complejo con la subunidad catalítica Cdc28, es esencial para mantener el crecimiento hiperpolarizado necesario para generar una hifa (Wang et al., 2016; Wang, 2009; Zheng and Wang, 2004). En los últimos años se ha puesto de manifiesto que esta Cdk<sup>Hgc1</sup> ejerce su función mediante la fosforilación directa de componentes importantes de diferentes complejos implicados en polaridad y secreción como Rga2 (Zheng et al., 2007), las septinas Cdc11 (Sinha et al., 2007) y Sep7 (González-Novo et al., 2008; Li et al., 2012), la subunidad del polarisoma Spa2 (Wang et al., 2016) y componentes de la maquinaria de secreción y exocisto como Sec2 (Bishop et al., 2010) y Exo84 (Caballero-Lima et al., 2014). Nuestros resultados incrementan esta lista añadiendo al efector final de la ruta RAM/MOR, el complejo Cbk1/Mob2, como una nueva diana de esta Cdk<sup>Hgc1</sup>, conectando así estas dos importantes quinasas que regulan el crecimiento polarizado.

¿Cuál es el efecto de la fosforilación por Cdk<sup>Hgc1</sup> sobre la señalización mediada por la ruta RAM/MOR? Dado que, aparentemente, las mutaciones fosfodeficientes no afectaron a los niveles de proteína ni a la localización de la quinasa (Figuras 36 y 37), la fosforilación de estos residuos debería afectar a su actividad catalítica y/o a su interacción con sus sustratos. Los resultados discutidos anteriormente nos sugieren que la Cdk<sup>Hgc1</sup> ejerce una regulación positiva sobre la función de Cbk1 en el crecimiento hifal ya que el mutante *cbk1-6A* daba lugar a hifas más cortas (Figura 29C). Esta idea nos indujo a preguntar si un mutante fosfomimético de *CBK1* (*cbk1-6E*) era capaz de suprimir, al menos en parte, el fenotipo del mutante *hgc1Δ*. Para ello, construimos el mutante *cbk1-6E hgc1ΔΔ*, así como el control *cbk1-6E* (datos no mostrados). Inesperadamente, la mutación *cbk1-6E* generó un mutante de pérdida de función, tanto en levadura como en hifas, lo que sugería que la fosforilación constitutiva de estos sitios podría inactivar la función de la NDR quinasa. Este resultado está en consonancia con los obtenidos por Brace y col. que observaron una regulación negativa de Cbk1 por Cdk en *S. cerevisiae* ya que un mutante *cbk1-6E* dio lugar a la formación de grumos (Brace et al., 2011). Sin embargo, estos autores observaron que el tratamiento de un inmunoprecipitado de scCbk1 con la fosfatasa Cdc14, que revierte

## Discusión

específicamente la fosforilación mediada por Cdks, no modificó actividad quinasa *in vitro* de Cbk1, lo que les llevó a sugerir que la fosforilación de estos residuos podría interferir en las interacciones quinasa-sustrato *in vivo*. En nuestro caso, el hecho de que el mutante fosfodeficiente y fosfomimético tengan comprometida la función de Cbk1 en hifas sugeriría que lo que realmente es importante es la dinámica de fosforilación/desfosforilación de Cbk1 para mantener una apropiada interacción con sus sustratos durante el crecimiento hifal.

### **Función de Cbk1 en la transición levadura-micelio.**

A pesar de la importancia de *CBK1* en el crecimiento hifal de *C. albicans* (McNemar and Fonzi, 2002; Song et al., 2008) se desconocen los mecanismos moleculares por los que esta quinasa desempeña su función (Sudbery, 2011).

Los resultados obtenidos en este trabajo nos han permitido definir dos funciones de Cbk1 en el desarrollo hifal: Una función dependiente de *SSD1* que es necesaria al inicio de la respuesta a suero para generar el tubo germinativo y otra función independiente de *SSD1* que se requiere para mantener el crecimiento hiperpolarizado del ápice tras la formación del primer septo dentro de la hifa (Figura 38).

### *Función de Cbk1 en el inicio de la respuesta a suero.*

El inicio del crecimiento hifal en respuesta a suero requiere la degradación del represor Nrg1, responsable de inhibir la transcripción de los genes específicos de hifas (HSGs, Hypha-Specific-Genes) en células levaduriformes (Braun et al., 2001; Lu et al., 2011; Murad et al., 2001). Nuestros resultados genéticos apuntan a que Cbk1 regula negativamente a Ssd1 al inicio del crecimiento hifal ya que la eliminación de *SSD1* permitió a las células deficientes en actividad Cbk1 formar tubos germinativos (Figura 38). Durante el desarrollo de este trabajo, Lee et al pusieron de manifiesto que Cbk1 es necesaria para inactivar a la proteína Ssd1 y permitir la degradación de Nrg1 en respuesta a suero (Lee et al., 2015). Dado que Ssd1 es una proteína que regula la traducción de los mRNAs a los que se une de forma dependiente de la fosforilación por Cbk1 (Jansen et al., 2009; Kurischko et al., 2011), se ha postulado que alguno de los

## Discusión

mRNAs que se unen específicamente a Ssd1 sea necesario para la degradación de Nrg1.

¿Cuál podría ser la función de Cbk1 al inicio de la transición levadura-micelio? En nuestro grupo hemos identificado el mRNA de *SOK1* en inmunoprecipitados de Ssd1 (Toni Ciudad, comunicación personal). Recientemente se ha demostrado que Sok1 es necesaria para la degradación de Nrg1 al inicio de la respuesta hifal (Lu et al., 2014). Con el fin de reunir evidencias genéticas que determinaran la importancia de esta interacción, hemos construido un triple mutante *cbk1ΔΔ ssd1ΔΔ sok1ΔΔ* (Tesis de Antonio Esperilla, comunicación personal). Si Cbk1 fuera necesaria para permitir la traducción de *SOK1* reprimida por Ssd1, la delección de *SOK1* en el doble mutante *cbk1ΔΔ ssd1ΔΔ* volvería a mimetizar el fenotipo del mutante *cbk1ΔΔ* respecto a su incapacidad de formar tubos germinativos, extremo que se confirmó al analizar la respuesta del triple mutante en presencia de señales inductoras del crecimiento hifal. Por tanto, nuestros resultados preliminares, junto a los de Lee et al, son consistentes con un modelo en el que la función de Cbk1 al inicio de la respuesta a suero sería la de fosforilar a Ssd1 para permitir la traducción del mRNA de *SOK1* necesaria para activar la degradación del represor Nrg1 y permitir así la expresión de los HGS.

### *Función de Cbk1 durante el mantenimiento del crecimiento hifal.*

En *C. albicans*, el crecimiento polarizado se encuentra regulado de forma diferente en las levaduras e hifas. Mientras en las primeras este crecimiento se encuentra restringido a una pequeña ventana del ciclo celular (G1/S) para dar lugar al nacimiento de la yema; en la fase hifal, las células mantienen un crecimiento hiperpolarizado constante independiente del ciclo celular (Hazan et al., 2002), por lo que la tasa de extensión del ápice de la hifa es mucho mayor que el crecimiento de las formas levaduriformes ( $0.25 \mu\text{m min}^{-1}$  vs  $0.0625 \mu\text{m min}^{-1}$ ) (Jones and Sudbery, 2010). A pesar de presentar modos de crecimiento tan diferentes, los estudios realizados hasta el momento sugieren que esta levadura polimórfica utiliza la misma maquinaria de secreción y polaridad que *S. cerevisiae* para generar estas morfologías tan diferentes (Sudbery, 2011). Por tanto, dicha maquinaria tiene que haber evolucionado

## Discusión

de forma que le haya permitido integrar señales extracelulares que modifiquen su regulación espacial y temporal para poder ser un sistema más flexible que le permita modificar la morfología celular en respuesta a señales ambientales.

En hongos, el crecimiento polarizado tiene lugar como consecuencia de la fusión de vesículas secretoras a una región concreta de la superficie celular. Estas vesículas son portadoras de nuevos materiales, como membranas y enzimas necesarias para síntesis de pared celular, que son necesarios para la expansión de la superficie celular (Sudbery, 2011). En este proceso de exocitosis polarizada intervienen numerosos complejos multiproteicos (Park and Bi, 2007; Sudbery, 2011). En primer lugar, se ensambla un complejo denominado **polarisoma**, formado por Spa2, Bud6, Pea2 y la formina Bni1, en la superficie celular elegida. Esta formina es la responsable de nuclear los cables de actina sobre los que se desplazan las vesículas secretoras movidas por proteínas motoras hacia el polarisoma. En segundo lugar, existe un complejo multiproteico denominado **exocisto**, formado por 8 subunidades entre las que se encuentran Sec3 y Exo84, cuya función es retener a las vesículas que llegan a la membrana plasmática. Por último, **el complejo SNARE** es el responsable último de la fusión de la membrana de la vesícula con la membrana plasmática. Parte de este complejo se encuentra en la cara externa de las vesículas (v-SNAREs) y la otra en la cara interna de la membrana plasmática (t-SNAREs). Cuando las v-SNAREs interaccionan con las t-SNAREs finaliza el proceso de exocitosis ya que las membranas se fusionan, liberando la carga en el sitio adecuado. En los procesos de exocitosis, las t-SNAREs incluyen a los homólogos de las syntaxinas y SNAP-23 (Yue et al., 2017).

Dado que la NDR quinasa Cbk1 es necesaria para el crecimiento polarizado en hongos (Bidlemaier et al., 2001; Das et al., 2009; Maerz and Seiler, 2010; Maerz et al., 2008; McNemar and Fonzi, 2002; Racki et al., 2000; Weiss et al., 2002) parece lógico pensar que regulara la función de alguno de estos complejos mediante la fosforilación directa de algún componente. ¿Podría ayudarnos los resultados obtenidos en este trabajo a identificar a que nivel actúa Cbk1 sobre la maquinaria de secreción y polaridad celular?

## Discusión

### *Cbk1 y la syntaxina Sso2*

Los datos presentados en esta memoria demuestran que la pérdida de Cbk1 no bloquea el crecimiento de la hifa. Sin embargo, la tasa de extensión es significativamente menor que en los controles (entre el 30-50 % dependiendo de los fondos genéticos), lo que significa que el proceso de exocitosis está teniendo lugar de forma claramente ineficiente.

El análisis de los fenotipos observados en el mutante *cbk1-as* en presencia del análogo 1NM-PP1 ha puesto de manifiesto que dichas células eran capaces de generar tubos germinativos normales que posteriormente perdían la capacidad de mantener el crecimiento focalizado en el ápice tras la aparición del primer septo en la hifa (Figura 45). Por tanto, este resultado indica que el crecimiento hiperpolarizado de la hifa tiene dos fases: una inicial independiente de Cbk1 y otra posterior dependiente de la quinasa que se activa tras finalizar la primera mitosis dentro de la hifa. La existencia de estas dos fases con requerimientos diferentes está de acuerdo con las observaciones de Li et al 2007 en la que caracterizaron el fenotipo de un mutante deficiente en la subunidad Sec3 del exocisto (Li et al., 2007) y definieron una fase inicial independiente de Sec3 y otra Sec3-dependiente ya que las células *sec3ΔΔ* eran incapaces de mantener el crecimiento polarizado después de formar el primer septo. La vinculación de la aparición del fenotipo con la formación del primer septo se desconoce, pero tiene que estar relacionada con las septinas ya que la eliminación de gen *CDC11*, que codifica para una de las 5 subunidades de septinas, vuelve a polarizar el crecimiento del ápice en el mutante *sec3ΔΔ*.

El hecho de que el crecimiento polarizado que tiene lugar en el ápice de la hifa, tras la aparición del primer septo, dependa de Sec3 y Cbk1 podría sugerir que esta quinasa regulara la función del exocisto. Dado que Sec3 no tiene sitios de fosforilación por Cbk1, la quinasa debería regular el exocisto a través de algún otro componente.

Recientemente se ha puesto de manifiesto que Sec3, además de su función conocida de retener las vesículas secretoras en la membrana plasmática, juega un

## Discusión

papel importante en los primeros pasos de la formación del complejo SNARE necesario para la fusión de las vesículas con la membrana (Yue et al., 2017).

En levaduras, Sso2 es una t-SNAREs (sintaxina) esencial que se encuentra repartida por toda la superficie de la membrana celular y que contiene una región N-terminal auto-inhibitoria que bloquea su dominio SNARE impidiendo la interacción con otras proteínas SNAREs (Fernandez et al., 1998). Recientemente, se ha demostrado que la activación de Sso2 se produce a través de un cambio conformacional como consecuencia de su interacción con la proteína del exocisto Sec3 (Yue et al., 2017). Esta modificación en la conformación de la sintaxina permite su asociación con otra t-SNARE, Sec9, formando un complejo binario en la membrana necesario para la unión con las v-SNAREs presentes en la superficie externa de las membranas de las vesículas secretoras. En concordancia con esta relación funcional entre Sec3 y Sso2 en *S. cerevisiae*, la represión de la expresión de la sintaxina *SSO2* durante el crecimiento hifal de *C. albicans* genera un fenotipo similar al del mutante *sec3Δ* (Bernardo et al., 2014).

En resumen, todas estas observaciones junto a que CaSso2 tiene un posible sitio de fosforilación por Cbk1 en su extremo N-terminal auto-inhibitorio (HSRDQT<sup>117</sup>) podría sugerir que esta NDR quinasa regulara la sintaxina Sso2 para que su interacción con Sec3 sea más eficiente. Por tanto, sería interesante en el futuro estudiar el fenotipo del mutante fosfodecificante *sso2-T117A* en condiciones de miceliación.

### *Cbk1 y la subunidad del polarisoma Spa2.*

Como ya se ha comentado, el polarisoma es responsable de nuclear los cables de actina para que las vesículas secretoras sean transportadas al sitio de crecimiento. Por tanto, su correcta regulación espacio-temporal es importante para la morfogénesis celular.

*C. albicans* regula la localización del polarisoma de forma distinta en función del tipo de crecimiento. En levaduras, el polarisoma se distribuye de forma difusa por la superficie de la yema durante la mayor parte del ciclo celular para luego translocarse a

## Discusión

la región del plano de división durante la citocinesis, de forma similar a la descrita en *S.cerevisiae*. Por tanto, en esta fase de crecimiento, la regulación del polarisoma se encuentra coordinada con la progresión del ciclo celular. Sin embargo, cuando las levaduras se incuban en presencia de señales inductoras del crecimiento hifal, el polarisoma sufre una rápida reorganización espacial y se concentra en un punto del cortex celular, presumiblemente donde se producirá la evaginación del tubo germinativo, y persiste en esa localización de forma independiente del ciclo celular durante todo el crecimiento hifal (Zheng et al., 2003).

En este estudio hemos puesto de manifiesto que la actividad de Cbk1 es necesaria para la persistencia de Spa2 en el ápice de la hifa, ya que la adición de 1NM-PP1 a células *cbk1-as* dio lugar a la pérdida de la señal Spa2-GFP. Este resultado es consistente con observaciones previas de nuestro grupo en las que la fosforilación dependiente de Cdk de Mob2, el coactivador de Cbk1, es necesaria para mantener al polarisoma en hifas (Gutierrez-Escribano et al., 2011). Además, la pérdida de la actividad Cbk1 dio lugar a que el polarisoma alternara entre el ápice de la hifa y el plano de división a lo largo del ciclo celular, comportamiento aberrante en hifas pero normal en levaduras. El hecho de que Spa2 volviera a concentrarse en la punta de la hifa tras finalizar la citoquinesis indica que la actividad de Cbk1 no es necesaria para la recolocación del polarisoma en el cortex celular sino para retenerlo de forma independiente del ciclo celular.

CaSpa2 es una proteína de 1416 aminoácidos que tiene un grupo de 4 sitios de fosforilación por Cbk1 en su extremo N-terminal (S121, S143, S153, and S163) ausentes en el homólogo de *S. cerevisiae*, (Gutierrez-Escribano et al., 2011; Zheng et al., 2003). Dado que Cbk1 se localiza en el ápice de la hifa y fosforila estos sitios *in vitro* (Gutierrez-Escribano et al., 2011), es probable que la fosforilación constante de estos sitios sea necesaria para garantizar su correcta localización durante el crecimiento hifal, aunque es necesario generar el alelo *spa2-4A* para profundizar en esta hipótesis. Recientemente, también se ha puesto de manifiesto que la fosforilación de Spa2 por la Cdk Cdc28, asociada inicialmente a la ciclina Clb2 y posteriormente a la ciclina Hgc1, es necesaria para mantener el polarisoma en el ápice de la hifa (Wang et al., 2016). En

## Discusión

conjunto, todas estas observaciones indican que Spa2 integra señales mediadas por estas dos importantes quinasas implicadas en polaridad, Cdc28 y Cbk1, para garantizar una rápida y robusta organización del polarisoma en el ápice que sea independiente del ciclo celular, lo que garantizaría mantener el crecimiento constante característico de la hifa.

Otro fenotipo interesante observado en los experimentos de time-lapse con 1NM-PP1 consistió en observar que la inhibición de Cbk1 durante el mantenimiento del crecimiento hifal dio lugar a un cambio brusco del patrón de crecimiento, tanto en las células apicales como subapicales ya que empezaron a crecer en forma de levaduras, a pesar de encontrarse en un medio con señales inductoras de crecimiento hifal. Este comportamiento aberrante podría ser una consecuencia indirecta de la pérdida de la regulación del polarisoma. Sin embargo, parece poco probable porque las hifas del mutante *spa2-15A*, que ha perdido la regulación por la Cdk antes mencionada y mantiene una alternancia del polarisoma entre el ápice y la región del septo como las células *cbk1-as*, sólo son más anchas que las hifas control y no activan el crecimiento levaduriforme (Wang et al., 2016). Por tanto, ¿por qué se reactiva el crecimiento en las células subapicales?

La mitosis asimétrica desempeña una función esencial en el desarrollo celular (Lengefeld and Barral, 2018; Vertii et al., 2018). El hecho de que la mitosis de la célula apical genere una célula que continúa creciendo y dividiéndose y otra que bloquea su crecimiento y progresión del ciclo celular significa que es una mitosis asimétrica que da lugar a dos células con programas diferentes. Por tanto, si la inhibición de Cbk1-as produjo dos células que activaron el mismo patrón de gemación tras finalizar la mitosis significa que han perdido alguna propiedad que les permitía tener destinos diferentes. Por tanto, una posible explicación del fenotipo de la aparición de yemas laterales en las células subapicales podría deberse a que la actividad de Cbk1 fuera necesaria para generar esta mitosis asimétrica requerida para generar dos células (apical y subapical) con características diferentes. En el futuro queremos profundizar en esta hipótesis. Una predicción de esta idea, siempre y cuando no se requiera una acción continuada de la quinasa, sería que la inhibición de Cbk1 en hifas con varios compartimentos

## Discusión

subapicales daría lugar únicamente a la aparición de yemas laterales en el último compartimento subapical ya que éste se habría generado de una célula apical que ha hecho mitosis en presencia de la NDR quinasa inhibida.

En *S.cerevisiae*, Cbk1 es necesaria para generar asimetría al final de la mitosis ya que activa el programa transcripcional de Ace2 en el núcleo de la célula hija (Colman-Lerner et al., 2001; Mazanka et al., 2008; Mazanka and Weiss, 2010; Nelson et al., 2003; Weiss et al., 2002). En *C. albicans* es probable que este mecanismo dependiente de Cbk1 esté conservado ya que Ace2 se acumula en el núcleo de la célula hija (Clemente-Blanco et al., 2006; Kelly et al., 2004), la transcripción de los genes regulados por Ace2 dependen de Cbk1 (McNemar and Fonzi, 2002; Song et al., 2008) y los sitios de fosforilación por los que Cbk1 controla la función de Ace2 se encuentran conservados en el ortólogo de Ace2 en *C. albicans* (no mostrado). Tal vez, a lo largo de la evolución de *C. albicans*, la aparición de nuevos sitios de fosforilación en diferentes proteínas implicadas en polaridad y ciclo celular haya permitido a esta NDR quinasa adquirir nuevas funciones durante la generación de asimetría en la mitosis que le hayan permitido contribuir a generar, en interacción con otras rutas de señalización, un sistema robusto que permita a las células de este patógeno oportunista modificar su morfología rápidamente en respuesta a las señales ambientales presentes en el hospedador.

***CONCLUSIONES***

---

## Conclusiones

- 1) El estado de fosforilación de la NDR quinasa Cbk1 se regula de forma diferencial en respuesta a las señales ambientales que inducen la miceliación. Se defosforila a los 30 minutos en presencia de medio inductor y vuelve a fosforilarse durante la fase de mantenimiento del crecimiento hiperpolarizado.
- 2) La defosforilación a los 30 minutos de inducción hifal depende de la función de Cbk1 sobre Ssd1, de la actividad fosfatasa de Cdc14 y de la presencia de Hgc1 y Tpk2. Tpk2 fosforila a Cdc14 al inicio de la respuesta sugiriendo que esta fosforilación es necesaria para activar la fosfatasa.
- 3) La hiperfosforilación de Cbk1 durante la fase de mantenimiento del crecimiento polarizado depende de los seis sitios S/T-P localizados en la quinasa, de la CDK Cdc28 y su ciclina asociada Hgc1, y son importantes para la regulación del crecimiento de la hifa.
- 4) La fosforregulación del residuo T548 de Cbk1 es fundamental para la correcta morfogénesis de *C. albicans*. La defosforilación constitutiva genera levaduras redondas mientras que la fosforilación constante provoca la separación de las células hifales.
- 5) Cbk1 es necesaria para activar el crecimiento hifal de forma dependiente de Ssd1 al inicio del proceso e independiente en etapas más tardías, siendo la segunda función necesaria para mantener el crecimiento polarizado en el ápice de la hifa.
- 6) Cbk1 es necesaria para bloquear el ciclo celular en las células subapicales y para garantizar morfología de la hifa, reteniendo a Spa2 en la punta de la hifa de forma independiente del ciclo celular.

## Conclusiones

- 7) En *C. albicans* los sitios de fosforilación por Cbk1 en Cdc14 no son importantes para la regulación de la fosfatasa durante los procesos de invasión y separación celular. En cambio la señalización por la ruta RAM es necesaria para regular el estado de fosforilación de la fosfatasa, sugiriendo que la función de Cbk1 se necesita para la activación de Cdc14.
- 8) En Cdc14 la fosforilación de los sitios diana de las Cdks son importantes para la separación celular durante el crecimiento levaduriforme pero no en los procesos fundamentales de la miceliación.
- 9) La aparición de múltiples fosfoisoformas de Cdc14 podrían ser consecuencia de la fosforilación previa de la T388 y/o S449 por Cdks. La Cdk Cdc28 es la responsable de esta fosforilación, además, la inhibición de su actividad provoca un descenso en la expresión de la fosfatasa.
- 10) La función de Cdc14 radica en su actividad fosfatasa y es importante para su regulación a través de su propia defosforilación.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

---

## **Materiales y Métodos**

### **1. Microorganismos utilizados**

Se utilizó *Candida albicans* como modelo para estudiar los procesos de morfogénesis, crecimiento y división celular. Las cepas construidas en este trabajo derivan de los fondos genéticos BWP17 (Wilson et al., 1999) y CA14 (Fonzi and Irwin, 1993). Su procedencia y las características genéticas de las mismas se detallan en la Tabla 3.

Las células de *Escherichia coli* utilizadas para la clonación molecular de los plásmidos proceden de la cepa comercial XL1-Blue Competent Cells (*Agilent Technologies*). Para la obtención de plásmidos construidos por mutagénesis se utilizó la cepa comercial de *E. coli* XL-Gold extracompetent cells (*Agilent Technologies*).

### **2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento**

Los medios de levadura utilizados fueron YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa) y medio mínimo sintético MM (0,7% nitrógeno base, 2% glucosa) suplementados con los aminoácidos necesarios a una concentración final de 40mg/l de histidina y arginina, y 80mg/l para uridina. Las concentraciones del antibiótico en la selección de transformantes fueron de 150µg/ml para los nourseotricina resistentes y 20µg/ml para los nourseotricina sensibles (en la técnica de “flip out” descrita más adelante). Los medios sólidos se elaboraron añadiendo el 2% de agar.

El crecimiento hifal se indujo en medio líquido YPD o MM con el 10% de suero fetal bovino en agitación a 37°C, inoculando cultivos estacionarios a una D.O.<sub>600</sub> 0,4.

Para de inhibición de *cdc28-as* y *cbk1-as* se preparó un stock de 2,5mM de 1NM-PP1 (*Calbiochem*) disuelto en DMSO y se añadió a los cultivos a una concentración de 5-25µM según las condiciones requeridas en el experimento.

Para los cultivos de *E.coli* se utilizó medio Luria Bertani (1% bactotripton, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl). La selección de clones se realizó mediante siembra en placas de LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina o con 34 µg/ml de cloranfenicol en el caso de clones derivados del plásmido p-SFS-2A.

## **Materiales y Métodos**

Todos los medios se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 121°C.

Para el mantenimiento y conservación de las cepas de *E. coli* y levadura, las células fueron congeladas en criotubos a -80°C en una solución al 20% de glicerol.

### **3. Procedimientos generales de clonación molecular**

#### **3.1. Obtención de DNA plasmídico mediante el kit comercial iNtRON Biotechnology.**

Para obtener gran cantidad de DNA plasmídico de *E.coli*, se crecieron las bacterias transformadas en LB-Amp a 37°C durante toda la noche. Para la extracción se empleó el kit comercial de lisis alcalina *DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit (iNtRON Biotechnology)* purificando los extractos mediante unas columnas con membranas especializadas de gel de silica provistas en el kit.

#### **3.2. Extracción de DNA genómico de *Candida albicans***

##### **3.2.1. Extracción mediante el kit *MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit***

La extracción del DNA genómico de las levaduras se realizó mediante el protocolo del kit comercial *MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit* (Epicentre), basado en el uso de un buffer de lisis para reblandecer la pared celular combinado con una precipitación rápida para eliminar macromoléculas contaminantes.

##### **3.2.2. Extracción mediante lisis de colonias con Acetato de Litio y SDS**

El análisis rápido de transformantes a partir de placas de agar se llevó a cabo utilizando el método de extracción de DNA genómico con Acetato de Litio-SDS (Marko Looke, 2011); para ello, las colonias individuales se resuspendieron en 100µl de 200mM LiOAc 1% SDS e incubaron a 70°C durante 15 minutos. Se añadieron 300µl de etanol al 96% para precipitar el DNA y se mezclaron los tubos por inversión. Se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 3 minutos y se disolvió el DNA en 100µl de TE (10mM Tris, 1mM EDTA). Los restos celulares se eliminaron centrifugando 1 minuto a 13.000 r.p.m. Finalmente se utilizaron 2µl del sobrenadante para la PCR.

### 3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA se hizo mediante la reacción en cadena de la polimerasa en un termociclador, usando dos tipos de polimerasas, *KAPA HiFi* (*KAPA Biosystems*) o *Dream Taq* (*Thermo Scientific*) según la fidelidad requerida. Las reacciones se realizaron siguiendo las indicaciones de la casa comercial. En general, el DNA fue desnaturalizado durante 5 minutos a 95°C seguido de 25 ciclos que incluían los siguientes pasos: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura de anillamiento específico de los oligonucleótidos empleados, 1 minuto de extensión por cada kilobase de DNA a amplificar a 72°C y una etapa de extensión final de 10 minutos a 72°C.

### 3.4. Manipulación del DNA

#### 3.4.1. Obervación de los fragmentos de DNA

Los fragmentos de DNA obtenidos por PCR o por digestiones con enzimas de restricción se analizaron en geles del 0,7-1,5% de agarosa teñidos con *Midori Green Advance DNA Stain* (*Nippon Genetics*) preparados en tampón TAE (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA, pH 7,5-7,8).

#### 3.4.2. Digestiones enzimáticas

Las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo corresponden a la línea *Fast Digest<sup>TM</sup>* de Thermo Scientific. En todos los casos el DNA se digirió con las enzimas correspondientes siguiendo el protocolo del kit y durante al menos 15 minutos a 37°C.

#### 3.4.3. Ligación de los fragmentos de DNA a los vectores de clonación

Se siguió el protocolo de ligación del kit comercial *Rapid DNA Ligation Kit*, (*Thermo scientific*). Previa digestión de los insertos y vectores con las enzimas correspondientes, se incubó la reacción en el buffer con la ligasa durante 15 minutos a 16°C.

## **Materiales y Métodos**

### **4. Construcción de cepas**

La delección de genes en *C. albicans* y el marcaje con la proteína fluorescente GFP y los epítomos myc o HA, se realizó mediante PCR utilizando los módulos pFA (Gola et al., 2003; Reijntjes et al., 2011; Schaub et al., 2006). La selección inicial de los transformantes se realizó en placas de MM suplementados con los aminoácidos necesarios en función de los marcadores auxotróficos empleados o en YPD con 150 µg/ml de nourseotricina (Werner BioAgents Jena, Germany) para seleccionar las cepas *SAT1*. Las cepas de delección se confirmaron por PCR usando oligonucleótidos recogidos en la Tabla 1 procedentes de la casa comercial *Biomers.net* (*ULM, Germany*). La fusión de los diferentes epítomos o de la GFP se comprobó mediante *Western-Blot* o por microscopía respectivamente.

Para la construcción del mutante *ssd1:frt/ssd1:frt* se utilizó el plásmido p-*SFS-2A* (Sasse and Morschhauser, 2012) que contiene un único marcador reciclable (*caSAT1*). La selección de estos transformantes se explica en el punto 4.4 de este apartado.

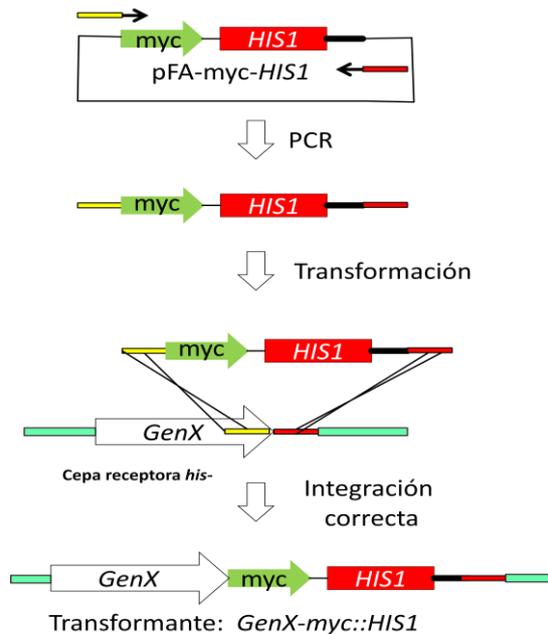
A la hora de introducir alelos con mutaciones puntuales obtenidas por mutagénesis dirigida o mediante síntesis génica, las cepas se transformaron con fragmentos de DNA linearizados con enzimas de restricción, a partir de plásmidos en los que el marcador de selección se encontraba flanqueado por el alelo mutado y una región 3'UTR del locus al que se quería dirigir la integración.

#### **4.1. Construcción de cepas mediante PCR con plásmidos pFA.**

En los últimos años se han desarrollado numerosos plásmidos portadores de secuencias que codifican para marcadores de selección, además de secuencias de interés como las codificantes para los epítomos myc y HA, así como las proteínas fluorescentes GFP, YFP y CFP (Schaub et al., 2006) que se usan como DNA molde en reacciones de PCR. Estas reacciones se llevan a cabo con cebadores de 120 nucleótidos de longitud diseñados especialmente para la construcción de la cepa deseada, formados por una región de 20 nucleótidos que hibridan en los plásmidos pFA (flechas en la figura X) precedida de 100 pb homólogas al sitio donde se quiere dirigir la integración del fragmento (fragmentos rojos y amarillos, figura 59). La utilización de

## Materiales y Métodos

estos cebadores junto al plásmido pFA deseado da lugar un fragmento lineal de DNA portador del marcador de selección y el epítipo o la proteína fluorescente deseada (en la figura x se representa con el plásmido pFA-myc-HIS1) flanqueados por las regiones homólogas del GEN X de interés. En *C. albicans*, existen 4 marcadores de selección: *HIS1*, *URA3*, *ARG4* y *SAT1*, de manera que la cepa receptora debe ser auxótrofa para el



**Figura 59. Estrategia para la construcción de cepas portadoras de un epítipo en la región 3' codificante de un gen.** Ver texto para explicación. Región amarilla representa los últimos 100 nucleótidos codificantes del GEN X (no se incluye en codón de parada).

correcta integración del producto de PCR obtenido, denominado cassette de delección, dará lugar, mediante recombinación homóloga, a la sustitución de una de las copias del gen por el marcador auxotrófico.

marcador elegido. Tras la transformación, los extremos del producto de PCR dirigen la integración al locus deseado, dando lugar a un gen modificado que generará una proteína de fusión del Gen X con el epítipo elegido.

Para la construcción de mutantes en los que se eliminó el gen de interés, se utilizaron plásmidos pFA portadores únicamente del marcador de selección; los cebadores diseñados contenían una zona de homología de 20pb flanqueantes a los marcadores más una zona de 100pb que hibridan con secuencias 5' y 3' de las regiones no traducidas (UTRs) del gen de interés. La

### 4.2. Construcción del plásmido pFA 3xmyc-CBK1:URA3

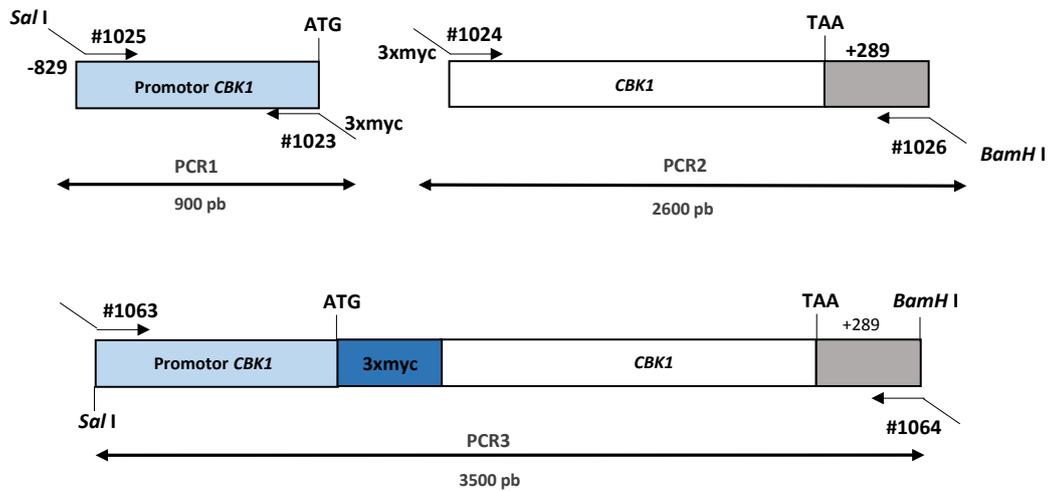
Dado que la adición de un epítipo al extremo C-terminal de Cbk1 afecta parcialmente a su función, se diseñó un alelo 3xmyc-CBK1 en el que el epítipo está fusionado en el N-terminal y que se expresase bajo las órdenes de su propio promotor. Para ello se amplificó la región promotora de *CBK1* (aprox. 900pb) a partir de DNA

## Materiales y Métodos

genómico de una cepa silvestre de *C. albicans* utilizando un oligonucleótido que contuviera una secuencia de corte para *Sal* I en el extremo 5' (#1025) y otro con la secuencia complementaria de tres epítomos myc colocados en fase después del ATG inicial de *CBK1* en el extremo 3' (#1023). Paralelamente se obtuvo un fragmento correspondiente a la secuencia completa del gen *CBK1*, más 289 pb después del codón de parada pertenecientes a la región no traducida (3'UTR); para ello se utilizó un oligonucleótido que contenía la secuencia codificante para tres epítomos myc, colocados justo antes del segundo codón codificante de *CBK1* (#1024) y un oligonucleótido que contenía la secuencia de corte para *Bam*H I e hibridaba en la región 3'UTR (*Untranslated Region*) (#1026). Estos dos productos de PCR se mezclaron y se emplearon como DNA molde en una tercera reacción en la que se utilizaron *primers* que hibridaban en los extremos pero de mayor longitud que los empleados anteriormente (#1063 y #1064); de manera que las secuencias complementarias de los epítomos myc hibridarían entre sí y el producto final de la PCR generaría un fragmento de 3500 pb flanqueado por los sitios de restricción *Sal* I/ *Bam*H I correspondientes al promotor de *CBK1*, las tres copias del myc, la secuencia codificante de *CBK1* y un fragmento de la región 3'UTR (Figura 60).

Una vez purificado y digerido este fragmento con las enzimas *Sal* I y *Bam*H I se clonó por ligación, según el protocolo descrito en un plásmido pFA-*URA3* digerido con las mismas enzimas, denominado pFA-3xmyc-*CBK1:URA3*. Posteriormente se introdujo detrás del gen *URA3* del plásmido un fragmento de 647pb de la región 3'UTR de *CBK1*, para dirigir correctamente la integración al locus del gen. Para ello se realizó una PCR utilizando DNA genómico como molde con los oligonucleótidos #1031 y #1069 que contienen las secuencias de restricción para *Sac* I y *Sac* II respectivamente y se clonaron el pFA-3xmyc-*CBK1:URA3*. Las reacciones de ligación se transformaron en las cepas de *E. coli* XL-Blue Competent Cells (*Agilent Technologies*). Una vez obtenido este plásmido, pFA-3xmyc-*CBK1-URA3-3'UTR* con la copia silvestre de *CBK1* se utilizó como molde para las sucesivas reacciones de mutagénesis.

## Materiales y Métodos



**Figura 60.** Estrategia de fusión del epítopo 3xmyc en el extremo N-terminal de *CBK1*. Ver texto para explicación. El producto de PCR3 se utilizó como inserto en la ligación con un plásmido pFA-*URA3*

### 4.2.1. Mutagénesis dirigida de los alelos de *CBK1*

Para introducir mutaciones puntuales en *CBK1* se diseñó un conjunto de oligonucleótidos que incluían una mutación única en el triplete de interés, donde se sustituyó la Serina y/o Treonina correspondientes por Alanina y/o Aspártico con el fin de generar los alelos fosfodeficientes o fosfomiméticos en los residuos identificados. Dado que Cbk1 tiene 6 posibles sitios de fosforilación por Cdks ( $S_{89}$ ,  $S_{103}$ ,  $S_{180}$ ,  $S_{392}$ ,  $T_{548}$  y  $S_{614}$ ), se diseñaron diferentes combinaciones de alelos fosfodeficientes que incluían  $cbk1^{S89A/S103A/S180A/S392A}$  (*cbk1-4A*),  $cbk1^{S89A/S103A/S180A/S392A/T548A/S614A}$  (*cbk1-6A*),  $cbk1^{T548A}$  (*cbk1-T548A*),  $cbk1^{S614A}$  (*cbk1-S614A*) y fosfomiméticos  $cbk1^{S89D/S103D/S180D/S392D/T548D/S614D}$  (*cbk1-6D*),  $cbk1^{T548D}$  (*cbk1-T548D*). Además como control se diseñó el alelo inactivo de la quinasa, sustituyendo el Aspártico en la posición 458 por Prolina (*cbk1-KD*) y un alelo sensible al análogo del ATP 1NM-PP1 mediante la sustitución de la Metionina 412 por Alanina

## Materiales y Métodos

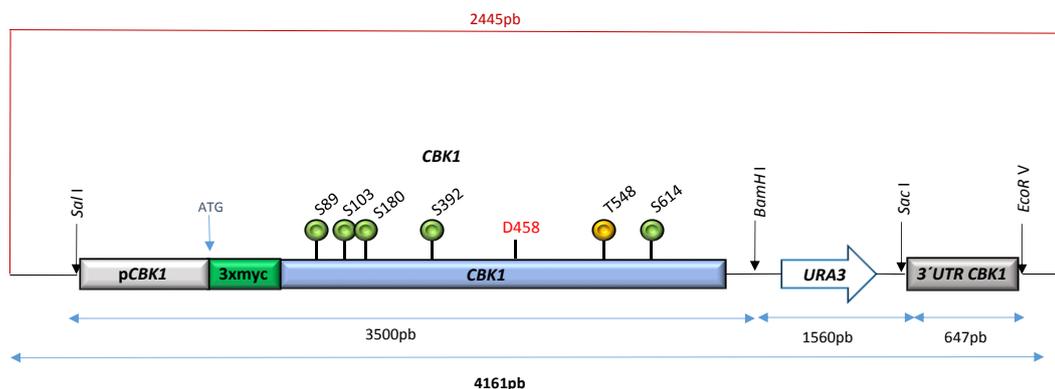


Figura 61. Esquema del plásmido pFA-3xmyc-CBK1::URA3-3'UTR

Las reacciones de mutagénesis se llevaron a cabo siguiendo el protocolo *del kit Quik Change Lightning Multi Site (Agilent Technologies)*, utilizando como DNA molde el plásmido descrito anteriormente, pFA-3xmyc-CBK1-URA3-3'UTR (Figura 61) y los oligonucleótidos diseñados, y se transformaron en la cepa de *E.coli* XL-Gold Ultracompetent Cells (Agilent Technologies). Los plásmidos de los transformantes obtenidos se secuenciaron para corroborar la presencia de las mutaciones introducidas y se nombraron pFA-3xmyc-CBK1-URA3-3'UTR (para el alelo silvestre, ), pFA-3xmyc-cbk1-4A-URA3-3'UTR (para el alelo fosfodeficiente en las 4 Serinas más cercanas al extremo N-terminal), pFA-3xmyc-cbk1-6A-URA3-3'UTR y pFA-3xmyc-cbk1-6D-URA3-3'UTR (para los alelos fosfodeficiente y fosfomimético en los 6 sitios consenso de fosforilación por Cdk's ), pFA-3xmyc-cbk1-T548A-URA3-3'UTR y pFA-3xmyc-cbk1-T548D-URA3-3'UTR (para los alelos fosfodeficiente y fosfomimético en la Treonina 549), pFA-3xmyc-cbk1-S614A-URA3-3'UTR (para fosfodeficiente en la Serina 614), pFA-3xmyc-cbk1-KD-URA3-3'UTR (para el alelo catalíticamente inactivo) y pFA-3xmyc-cbk1-as-URA3-3'UTR (para el alelo sensible al análogo del ATP)

Con el fin de sustituir el alelo silvestre de *CBK1* por los alelos mutagenizados, los plásmidos construidos se digirieron con las enzimas *Sal I* y *Hind III* y se transformaron en la cepa heterocigótica *CBK1/cbk1Δ* (JC1779).

Los transformantes se confirmaron por PCR utilizando los oligonucleótidos (#1096 y #1097) de manera que los alelos de mutagénesis que se habían integrado

## Materiales y Métodos

correctamente generaban un fragmento 182pb mayor que el alelo silvestre, equivalente al tamaño de la secuencia 3xmyc. Los positivos en estas reacciones de PCR se comprobaron también por *Western-Blot* y fueron secuenciados para asegurarnos de la presencia de las mutaciones.

### 4.3. Síntesis génica de alelos mutantes de *CDC14*

Con el fin de facilitar el proceso de mutagénesis, se diseñaron los alelos mutantes de interés de *CDC14-HA* y se procedió a su síntesis génica (*Eurofins, mwg/operon*). Se desarrollaron seis alelos diferentes para el gen *CDC14*; uno correspondiente al alelo silvestre del gen, dos fosfodeficientes y dos fosfomiméticos para los sitios de fosforilación dependientes de la ruta RAM (T<sup>30</sup> y T<sup>457</sup>) y de las CDKs (T<sup>388</sup> y S<sup>449</sup>), en los que la Serina y/o Treonina fueron sustituidos por Alanina o Glutámico respectivamente. Por último, como control negativo se diseñó un alelo inactivo en el que se sustituyó la Cisteína 275 del sitio catalítico por Serina. En cada una de estas construcciones se eliminó un intrón que aparece en la copia original del gen de *CDC14*.

Con el fin de asegurarnos una expresión fisiológica de las construcciones, se añadió a la secuencia del alelo a sintetizar 339 nucleótidos de su región promotora así como una región 3'-UTR (*UnTranslated Region*) de 275pb después del codón de parada para no modificar la estabilidad del mRNA. Con el fin de facilitar el clonaje de estos alelos en los vectores apropiados, se introdujeron las secuencias de corte para las enzimas de restricción *Sal I* y *BamH I*, en las regiones 5' y 3' respectivamente.

Para posibilitar la detección de las proteínas codificadas por estos alelos sintéticos, se añadió a la secuencia codificante correspondiente tres copias del epítipo HA en el extremo 3' de *CDC14*.

Además, para facilitar la discriminación de los transformantes que pudieran integrar la copia de *CDC14* originada mediante síntesis génica se eliminaron dos sitios de restricción por la enzima *Nsi I* en la construcción, cambiando un nucleótido de las zonas de reconocimiento de manera conservativa, no modificando el aminoácido traducido por el triplete. Estas regiones de corte por *Nsi I* se encuentran a 6 y 140 nucleótidos después del ATG respectivamente.

## Materiales y Métodos

### 4.3.1. Construcción de los plásmidos con los alelos mutantes de *CDC14*.

Una vez obtenidos los alelos mutantes de *CDC14*, se procedió a construir los plásmidos que permitieran la integración de dichos alelos en el locus de *CDC14* en una cepa heterocigótica *CDC14/cdc14Δ* (JC1564).

Como primer paso, se amplificó mediante PCR un fragmento de 282pb de la región 3'-UTR de *CDC14* que se encuentra a 276pb del codón de parada. Para ello, se utilizó DNA genómico de *C. albicans* como molde y los cebadores *CDC14-3UTR 5'* (#926) y *CDC14-3UTR 3'* (#927). Con el fin de facilitar el clonaje del producto de PCR en el plásmido pFA-URA3, se incluyó en el oligonucleótido #926 un sitio de corte para la enzima de restricción *Sac I* y en el #927 un sitio de corte para *EcoR V*.

Una vez obtenido este fragmento de PCR, se clonó en el plásmido pFA-URA3, utilizando las enzimas de restricción *Sac I* y *EcoR V* siguiendo el protocolo de ligación descrito. Se utilizó como cepa receptora XL1-Blue Competent Cells de *E.coli* (Agilent Technologies) y se obtuvo un nuevo plásmido denominado pFA-URA3--UTR. Por último se clonaron los alelos sintéticos de *CDC14* en los sitios *Sal I* y *BamH I* del pFA-URA3-3UTR (Figura 62). Estas ligaciones se transformaron de nuevo en *E.coli* y los plásmidos obtenidos se comprobaron por secuenciación.

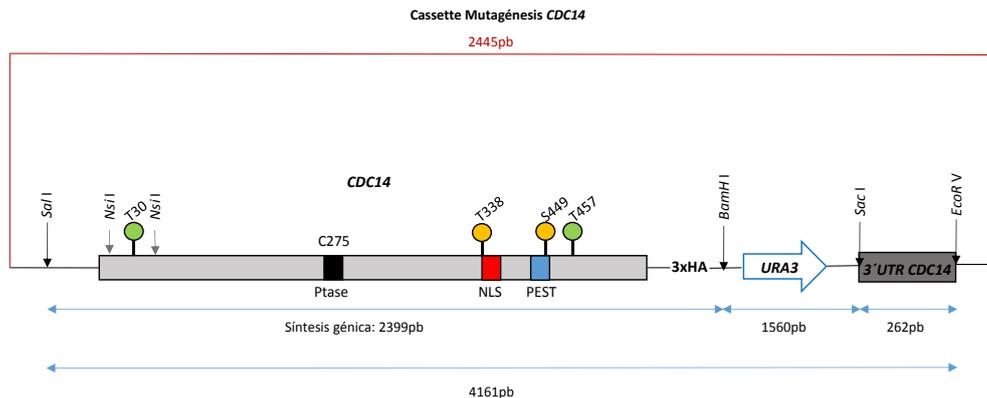
Los plásmidos así obtenidos se denominaron de la siguiente forma: pFA-*CDC14-HA (WT)-URA3-3'UTR* (alelo silvestre de síntesis génica), pFA-*CDC14-HA (CDK-A)-URA3-3'UTR*, (alelos fosfodeficiente en sitios de fosforilación por Cdk), pFA-*CDC14-HA (RAM-A)-URA3-3'UTR* (alelos fosfodeficiente en sitios de fosforilación por Cbk1), pFA-*CDC14-HA (CS)-URA3-3'UTR* (alelo catalíticamente inactivo).

Con el fin de sustituir el alelo silvestre de *CDC14* por los alelos de síntesis génica, los plásmidos construidos se digirieron con las enzimas *Sal I* y *EcoR V* y se transformaron en la cepa heterocigótica *CDC14/cdc14Δ* (JC1564)

Dado que el sitio T30 se encuentra muy próximo del extremo *Sal I*, cabía la posibilidad de que la recombinación tuviera lugar después de este residuo impidiendo la generación de un alelo T30A. Puesto que en los alelos sintéticos eliminamos dos sitios de corte de la enzima *Nsi I*; para asegurarnos que el evento tuvo lugar

## Materiales y Métodos

correctamente, se amplificó mediante PCR una secuencia de 1088pb, que incluyese la zona conflictiva, utilizando los oligonucleótidos #929 y #991, y se digirió con *Nsi* I. De esta manera, si la copia perteneciese al alelo silvestre, la digestión con la enzima *Nsi* I daría lugar a tres fragmentos de 746, 133 y 206 pb; en cambio, si se tratase del alelo de síntesis génica de CDC14, no se generarán fragmentos.



**Figura 62. Plásmido mutagénesis CDC14.** Para los sitios de fosforilación por Cbk1 se sustituyó T30 y T457 por alanina. Para los sitios de fosforilación por CDKs se sustituyó T338 y S449 por alanina. En la construcción para el mutante catalíticamente inactivo se cambió la cisteína 275 por serina.

### 4.4. Eliminación de genes mediante el plásmido pSFS2-A

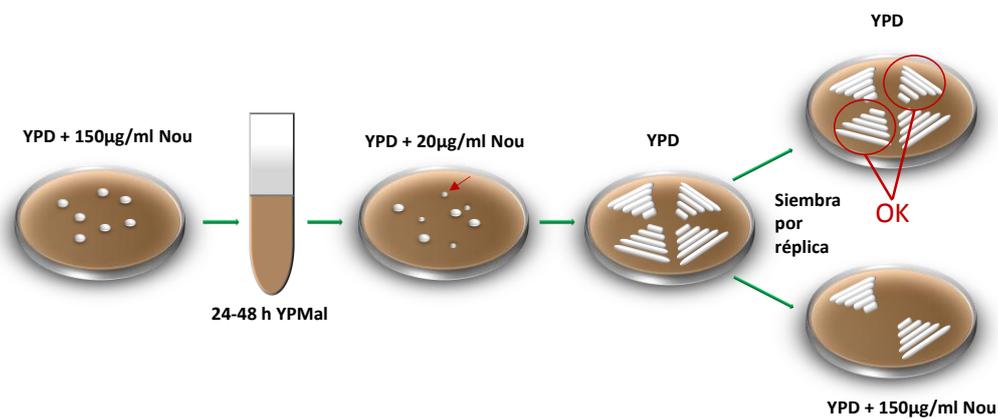
Con el fin de solventar el problema del número limitado de marcadores auxotróficos se desarrolló el plásmido pSFS2-A (Sasse and Morschhauser, 2012) que permite generar mutantes utilizando un único marcador reciclable (*SAT1*), que se elimina tras la primera transformación mediante la activación de una recombinasa específica (ver más adelante).

El plásmido pSFS2-A contiene el cassette *FLIPASA (FLP)-SAT1* (Figura 64) que posee el marcador de selección *caSAT1*, que confiere resistencia al antibiótico noursotricina y el gen *caFLP*, que codifica para la recombinasa Flp de sitio específico bajo el control del promotor inducible *MAL2* (se activa en presencia de maltosa). Este cassette está flanqueado por repeticiones directas del sitio mínimo de reconocimiento de la recombinasa Flp (FRT: **F**LP **R**ecombination **T**arget sequence). Por último, externos a las FRTs existen sitios de restricción únicos (*KpnI*, *Apal*, *XhoI* y *NotI*, *SacII* y *SacI*) que

## Materiales y Métodos

permiten clonar las secuencias flanqueantes del gen diana que se quiere eliminar. La adición de estas secuencias permite la integración del cassette *SAT1*-flipper en el genoma de la levadura por recombinación homóloga y la selección de transformantes nourseotricina resistentes.

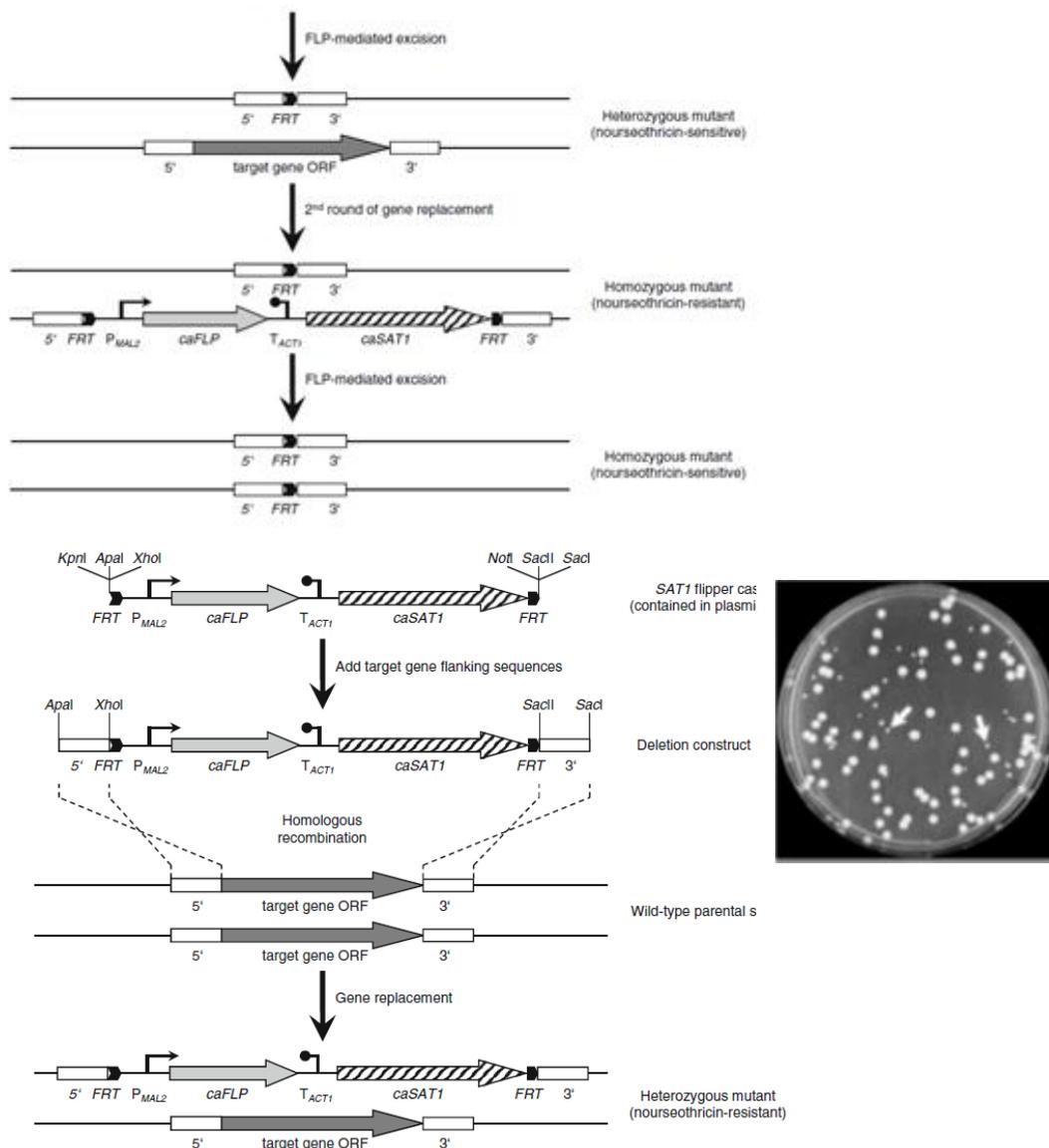
Tras comprobar la correcta integración mediante PCR del cassette, con el fin de reciclar el marcador *SAT1* para una segunda ronda de transformación, se induce la expresión de la recombinasa FLP en los transformantes nourseotricina resistentes ( $\text{Nou}^R$ ). Para ello, los transformantes elegidos se crecen en un medio con maltosa sin el antibiótico durante 24 horas con el fin de garantizar altos niveles de la flipasa en las células. En aquellos transformantes en los que la recombinasa se haya expresado lo suficiente dará lugar a la escisión del cassette, “*flip-out*”, al estar flanqueado por las repeticiones directas de la secuencia de reconocimiento de esta enzima, FRT. Los transformantes que hayan realizado correctamente el “*flip-out*” vuelven a ser sensibles a nourseotricina ( $\text{Nou}^S$ ). Con el fin de diferenciar los  $\text{Nou}^S$  de los  $\text{Nou}^R$ , las células se siembran en placas con concentraciones subletales del antibiótico (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). En estas condiciones, las células  $\text{Nou}^S$  darán lugar a colonias pequeñas (flecha en figura 63) mientras que las  $\text{Nou}^R$  formarán colonias grandes. Por tanto, las colonias  $\text{Nou}^S$  serían



**Figura 63.** Esquema del proceso de inducción y selección de levaduras que han realizado el *flip out* del cassette de transformación. Una vez obtenidos los transformantes en medio YPD con 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de nourseotricina, se induce la expresión de la recombinasa FLP creciendo las colonias en un medio con maltosa. Posteriormente se seleccionan y reestrian en YPD aquellas de menor tamaño crecidas en YPD con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$  del antibiótico. Por último se realiza una réplica con la concentración de nourseotricina inicial y se conservan las sensibles a dicha concentración y que por tanto han escindido el producto de transformación

## Materiales y Métodos

heterocigóticas (+/-) para el gen de interés y habrán eliminado el marcador de selección *SAT1* por lo que podrían ser utilizadas en una segunda ronda de transformación con el plásmido inicial para obtener nuevos transformantes *Nou<sup>R</sup>* que fueran mutantes homocigóticos (-/-) para el gen de interés (Ver figura 63).



**Figura 64. Técnica de la flipasa.** El cassette *SAT1-flipper* que contiene el gen de resistencia a nourseotricina (*caSAT1*) y el gen de la flipasa (*caFLP*) sustituye al gen diana mediante recombinación homóloga gracias a la incorporación en el cassette de secuencias flanqueantes al ORF de interés, convirtiendo a la cepa en resistente para nourseotricina. La inducción de la expresión de la flipasa en un medio con maltosa provoca la escisión del cassette y la reconversión de la cepa en nourseotricina sensible. Tras dos rondas de inserción y reciclaje del cassette se obtendrá un mutante de delección homocigótico para el gen diana. Tomado de (Sasse and Morschhauser, 2012).

## Materiales y Métodos

### 4.4.1. Construcción del Cassette *SAT1-flipper-SSD1*

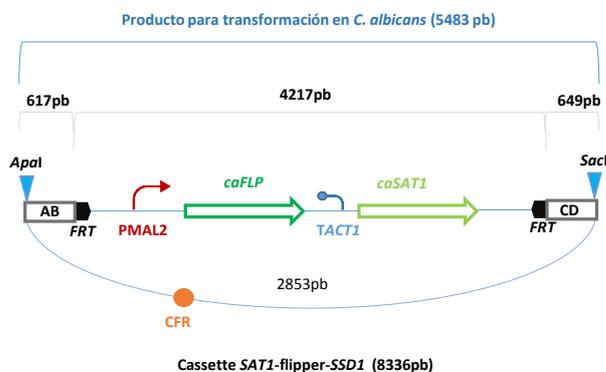
Con el fin de obtener un mutante *ssd1Δ/ssd1Δ* se construyó un cassette de delección de *SSD1* basado en el pSFS2-A. Inicialmente se amplificaron los extremos flanqueantes del gen *SSD1* a partir de un DNA genómico de *C. albicans* mediante PCR. Para posibilitar la clonación de ambos productos de PCR en el vector pSFS2-A se incluyeron secuencias de corte de enzimas de restricción en las parejas de cebadores diseñados para amplificar estas regiones. De la región 5' de *SSD1* se amplificaron mediante PCR las 617pb anteriores al codón de iniciación y se incluyeron las secuencias de restricción de *Apa* I y *Xho* I, utilizando los oligonucleótidos S1-AB-*SSD1-Apa* I (#985) y S2-AB-*SSD1-Xho* I (#986). Del extremo 3' de *SSD1* se amplificó un fragmento de 649pb posteriores al codón de parada, que contenía los sitios de reconocimiento para *Sac* II y *Sac* I. En este caso, los oligonucleótidos empleados fueron S1-CD-*SSD1-Sac* II (#987) y S2-CD-*SSD1-Sac* I (#988). Al fragmento correspondiente a la región 5' se le denominó AB y al de la región 3', CD. (Figura 65).

El cassette de delección de *SSD1* se realizó en dos pasos. En primer lugar se amplificó el fragmento CD a partir del genoma de *C. albicans* con el par de cebadores #987/#988. Posteriormente, el pSFS2-A y el producto de PCR CD (649 bp) se digirieron con las enzimas de restricción *Sac*II y *Sac*I y se ligaron utilizando el kit comercial de *Rapid DNA Ligation Kit*, (*Thermo scientific*). El producto de la ligación se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* XL1-Blue (*Agilent Technologies*) y se seleccionaron los transformantes en placas de LB suplementado con cloranfenicol. Los transformantes obtenidos se analizaron para confirmar la clonación del fragmento CD mediante la digestión de los plásmidos recuperados de las colonias resistentes a cloranfenicol con las enzimas *Sac* I y *Sac* II. Una vez clonado el fragmento CD en el pSFS2-A se procedió al segundo paso que consistió en la clonación del fragmento AB en este plásmido *SAT1-flipper-psFS2A-CD*.

Para la inserción del fragmento AB se digirieron el plásmido obtenido de la anterior ligación y el fragmento de 617pb del extremo 5' de *SSD1* con las enzimas *Apa* I /*Xho* I y se siguió la misma estrategia explicada anteriormente. La comprobación de esta segunda ligación se llevó a cabo utilizando las enzimas *Apa* I y *Xho* I. A este plásmido obtenido

## Materiales y Métodos

finalmente se le denominó cassette-*SAT1*-flipper-*SSD1* y fue el utilizado para transformar la cepa de *C. albicans*. (Figura 65).



**Figura 65.** Construcción final del cassette *SAT1*-flipper-*SSD1*. Gen de resistencia a nourseotricina (*caSAT1*), gen de la recombinasa (*caFLP*) bajo las órdenes del promotor inducible de maltosa (*PMAL2*), secuencias de reconocimiento de la recombinasa (*FRT*) y gen de resistencia a cloranfenicol (*CFR*) para su clonación en *E.coli*. AB y CD se refieren a las regiones flanqueantes 5' y 3' de *SSD1* para su transformación en *C. albicans*.

## 5. Transformación de *Escherichia coli*

### 5.1. Transformación de XL1-Blue Competent Cells

Se transformaron las células competentes XL1-Blue de *E.coli* con los plásmidos o mezclas de ligación. El método de transformación se realizó por choque térmico a 42°C durante 40 segundos, recuperando las células 1 hora a 37°C en medio líquido SOC (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 0,05% NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM glucosa) y se sembraron en placas de LB-Ampicilina o LB-Cloranfenicol según los requerimientos del plásmido. Se extrajeron los plásmidos de las colonias obtenidas por ligación y se analizaron mediante PCR y secuenciación.

### 5.2. Transformación de XL-Gold Ultracompetent Cells.

Los plásmidos obtenidos de las reacciones de mutagénesis se transformaron en las células competentes XL-Gold Ultracompetent Cells de *E.coli*. La transformación se realizó por choque térmico a 42°C durante 30 segundos, se recuperaron las células 1 hora a 37°C en medio líquido SOC (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 0,05% NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM glucosa) y se sembraron diferentes diluciones en

## **Materiales y Métodos**

placas de LB-Ampicilina. Las colonias que crecieron se analizaron mediante secuenciación de los plásmidos obtenidos.

### **6. Transformación de *Candida albicans*.**

#### **6.1. Transformación con Acetato de litio**

Se utilizó el protocolo de transformación mediante acetato de litio (Walther and Wendland, 2003). Tras crecer las células durante toda la noche, se diluyeron en medio fresco a  $DO_{600nm}$  de 0.3 hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  de 1,4-1,8 (aproximadamente 4 horas) e incubadas en agitación a 28°C con el fin de obtener un cultivo en fase exponencial. Se centrifugaron las células, se lavaron con agua y se resuspendieron en 1.5ml de solución 2X de acetato de litio (200mM acetato de litio, 20mM Tris HCl pH7.5, 2mM EDTA). De esta mezcla se tomaron 100µl para transformar, a los cuales se les añadió 100µg de DNA de esperma de salmón desnaturalizado ("carrier", 10mg/ml), 1-5µg del DNA de interés y 600µl de PEG/AcLi-Sol (50% PEG 4000 en 2XAcLi-Sol). Esta mezcla de transformación se incubó toda la noche a 28°C y posteriormente se sometieron a un choque térmico a 44°C durante 15 minutos. Las células se lavaron y recuperaron en MM durante 5 minutos y finalmente se sembraron en los medios selectivos.

Para las transformaciones con el marcador *SAT1*, tras el choque térmico, las células se incubaron en 2 ml de YPD a 28°C en agitación durante 4-8 horas para permitir la síntesis del antibiótico y se sembraron en placas de YPD + 150µg/ml de nourseotricina.

#### **6.2. Transformación por electroporación**

Para las transformaciones mediante electroporación se utilizó el protocolo descrito por Reuss et al 2004. Se recogieron por centrifugación 50ml de células de *C. albicans* crecidas hasta una  $DO_{600nm}$  1,7-3,5 y se incubaron durante 1 hora a 28°C en agitación en 10 mililitros de una solución 1X AcLi Sol (100mM acetato de litio, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA). Posteriormente se añadió DTT a una concentración final de 10mM y

## **Materiales y Métodos**

se dejaron 30 minutos más. Se lavaron las células 2 veces con 25 mililitros de agua fría estéril y una vez con 10 mililitros de sorbitol 1 M. Finalmente las células fueron resuspendidas en 200µl de sorbitol 1M de los que se tomaron 40 µl que se incubaron con 1-5 µg de DNA durante 5 minutos en hielo y se electroporaron en un aparato Gene Pulser (*Bio Rad*) en cubetas de 0,2cm a 1,8mA. Las células se lavaron con 1 ml de sorbitol y se sembraron en los medios selectivos.

Para las transformaciones con el marcador *SAT1*, tras el pulso eléctrico, las células se incubaron en 2 ml de YPD a 28°C en agitación durante 3-4horas y se sembraron en placas de YPD con nourseotricina.

### **7. Extracción de RNA para RT-PCR.**

La extracción de RNA total se llevó a cabo utilizando el protocolo de lisis mecánica del kit comercial PureLink RNA Mini Kit (*Life Technologies*). Se recogieron  $5 \times 10^7$  células en fase logarítmica o tras 2,5 horas de inducción hifal y se añadieron 0,5 ml de buffer de lisis con 1% de β-mercaptoetanol, se añadieron 0,5ml de bolas de vidrio (425-600µm; *Sigma-Aldrich*) y se rompió en un equipo Ribolyser en 3 pulsos de 15 segundos y fuerza de 5.5. Se transfirió el lisado a un tubo de microcentrífuga RNasa-free y se continuó con el protocolo siguiendo las instrucciones del kit. Finalmente el RNA se eluyó en 30 µl de agua RNasa-free y se envió para su análisis por RT-PCR. La cuantificación de la expresión se realizó utilizando el método de la curva estándar.

### **8. Extracción, detección y análisis de proteínas**

#### **8.1. Obtención de extractos proteicos con TCA**

Para la extracción de proteínas se utilizó el protocolo de precipitación con Ácido Tricloracético (TCA). Las levaduras se crecieron durante toda la noche en YPD o MM líquido, se centrifugaron y lavaron con 1ml de TCA al 20%. Una vez determinada la masa del pellet de células se resuspendió en 100µl de TCA al 20% y se congeló en tubos *Eppendorf* a -80°C al menos durante 1 hora. Tras la descongelación de las

## **Materiales y Métodos**

muestras en hielo, se añadieron 0,3ml de bolitas de vidrio (425-600 $\mu$ m; *Sigma-Aldrich*) y se rompieron las células mediante 3 pulsos de 15 segundos a una potencia de 5,0 en un equipo *Ribolyser* (Hybaid inc). Los extractos proteicos se recuperaron agujereando la base del tubo y centrifugando a 2000 r.p.m. sobre otro tubo *Eppendorf* limpio; posteriormente se añadieron 200 $\mu$ l de TCA al 5% y se volvió a centrifugar a 3000rpm durante 5 minutos a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendió según la masa de las células inicial, en un volumen determinado de 2X *Sample Buffer* (100mM Tris HCl, 4%SDS, 200mM DTT, 20% Glicerol, trazas de Azul de Bromofenol), después se añadió la mitad de este volumen de Tris 2M con el fin de neutralizar las muestras. Finalmente se homogeneizaron las muestras con un vórtex y se hirvieron a 95°C durante 5 minutos. Tras una centrifugación a máximas revoluciones durante 5 minutos, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se congelaron los extractos a -80°C hasta su análisis por *Western-Blot*.

### **8.2. Obtención de extractos proteicos para IP**

Los extractos proteicos para la inmunoprecipitación y posterior análisis de fosforilación mediante el uso de anticuerpos fosfoespecíficos o el tratamiento con fosfatasa, se obtuvieron a partir de cultivos de células en fase exponencial, diluyendo los cultivos estacionarios y creciéndolos según las condiciones que exigiera el experimento. Las células se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en 100 $\mu$ l del buffer del kit comercial (*Milteny*) o el Co-IP Buffer (150mM NaCl, 50mM Tris pH 7.4, 15mM EGTA, 1% Triton 100X, 10% glicerol, 1mM PMSF) con inhibidores de proteasas (cOmplete Tables, Mini EDTA-free, Roche) y/o fosfatasas (*Pierce*). Las células se rompieron con bolas de vidrio en un equipo *Ribolyser* a una fuerza de 5,5 durante 25" por tres pulsos. El extracto crudo se recuperó lavando los cristales con 900 $\mu$ l del tampón de lisis. Las proteínas solubles fueron recuperadas tras 30 minutos de centrifugación a máximas r.p.m. a 4°C. Para la determinación de la concentración de proteínas se utilizó el reactivo comercial BCA protein Assay, *Pierce*, utilizando BSA para la elaboración de la recta patrón. Los extractos de proteínas totales se pasaron por las columnas provistas, se lavaron según el protocolo y finalmente se eluyeron en el *Sample Buffer* provisto en el kit.

## Materiales y Métodos

### 8.3. Obtención de extractos proteicos para Co-iP con GFP-Trap.

Los extractos proteicos para la Co-inmunoprecipitación con GFP-Trap se obtuvieron a partir de cultivos en fase exponencial, diluyendo cultivos estacionarios a una D.O.<sub>600nm</sub> de 0,7 y creciéndolos durante 4 horas a 28°C en YPD. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 200µl del Buffer de Lisis (10mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5mM EDTA, 0.5% NP-40) con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Las células se rompieron utilizando bolas de vidrio, en 2 pulsos de 25 segundos a una fuerza de 5.0 en un equipo *Ribolyser (Hybaid Inc.)*. El extracto crudo se recuperó lavando los cristales con 900µl de Buffer de lisis. Las proteínas solubles se recuperaron centrifugando 20 minutos a máximas r.p.m. a 4°C y se determinó la concentración de proteínas mediante el protocolo BCA Protein Assay (Pierce). Los extractos de proteínas totales se resuspendieron en *2X Sample Buffer*. (100mM Tris pH 7.5, 4% SDS, 200mM DTT, 20% Glicerol, 0,1% Azul de Bromofenol)

### 8.4. Separación electroforética e inmunodetección de proteínas en SDS-PAGE

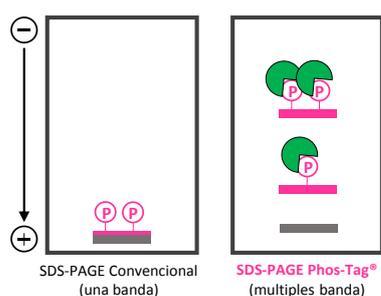
Para el análisis mediante *Western Blot*, las proteínas fueron separadas en geles de SDS-poliacrilamida al 8 o 10%. Se cargaron entre 40 y 50 µg de cada extracto proteico y se corrieron a 100V utilizando el sistema de electroforesis "*Mini Protean II*" (*Bio Rad*). El tampón de carrera utilizado fue Tris-Glicina (Tris-base 3g/l, Glicina 18,8g/l, SDS 1g/l). La electrotransferencia se realizó utilizando el sistema iBlot2.0 (programa 20V-1', 23V-4', 25V-2) o en húmedo utilizando una membrana de 0,45µm de PVDF *Hybond* (GE Healthcare Life science) y el sistema *Mini-Trans-Blot (BioRad)*, en tampón CAPS-Metanol (0.01M CAPS, 10% Metanol) durante 60 minutos a 50V/membrana. Posteriormente se bloqueó la membrana durante media hora con el 10% de leche desnatada en polvo disuelta en PBS-Tween (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% Tween®20) , 5% leche en TBS-Tween (50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0,1% Tween®20) o 3% de solución bloqueante (*Tropix I-Block, appliedbiosystems*), pasado el tiempo de bloqueo se añadió anticuerpo primario a la concentración deseada diluido en 10% leche PBS-Tween o 5%BSA TBS-Tween en los anticuerpos fosfoespecíficos y se incubó toda la noche a 4°C en agitación. Al día

## Materiales y Métodos

siguiente se hicieron 6 lavados de 5 minutos de la membrana a temperatura ambiente con PBS-Tween o TBS-Tween y se incubó durante 1h con el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano diluido en 10% de leche en PBS-Tween, 5%BSA-TBS-Tween o 3% de la solución de bloqueo. Posteriormente se repitió el mismo ciclo de lavados y 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).

### 8.5. Separación electroforética específica de proteínas fosforiladas en geles de Acrilamida Phos-tag™

Phos-tag™ es una molécula que se une específicamente a las formas fosforiladas de los aminoácidos Ser/Thr/Tyr, permitiendo la separación de cada una de las formas fosforiladas de una proteína según el número de fosfatos que contenga (Figura 66). El procedimiento es similar a una SDS-PAGE convencional, las diferencias se basan en la adición al gel del compuesto Phos-tag™ a una determinada concentración, establecida tras varios ensayos.



**Figura 66.** Comparación de la separación de bandas de una misma proteína entre geles SDS Page y geles Phos-Tag.

Para el análisis de la proteína Cdc14 por este método, la concentración de Phos-tag™ empleada fue de 20μM que se añadió a la mezcla del gel del 10% de acrilamida. La cantidad de proteínas totales cargadas en estos

geles fue de 10μl del extracto obtenido a partir del protocolo con Ácido Tricloracético. El tampón de carrera utilizado en estas electroforesis fue Tris-Glicina-SDS a pH 8.3 (25mM Tris, 192mM Glicina, 0,1% SDS). Después de la electroforesis, el gel se incubó en tampón de transferencia (25mM Tris, 192mM Glicina, 20% Metanol) con 1mM EDTA durante 10 minutos y 10 minutos más en tampón de transferencia sin EDTA. Para

## **Materiales y Métodos**

la transferencia se utilizó una membrana de 0,45µm de PVDF *Hybond* (GE Healthcare Life science) en el sistema *Mini-Trans-Blot* (BioRad) o el sistema iBlot2.0 (programa 20V-1', 23V-4', 25V-2). La inmunodetección se llevó a cabo igual que en el protocolo de SDS-PAGE.

### **8.6. Inmunoprecipitaciones y co-Inmunoprecipitaciones de proteínas**

La preparación de extractos proteicos para la IP se llevó a cabo siguiendo el protocolo de extracción descrito en los apartados 7.3 y 7.4 de materiales y métodos. Una vez obtenidas las proteínas solubles, los lisados se incubaron con bolas magnéticas unidas al anticuerpo correspondiente (uMACS-HA o uMACS-cs-myc) durante 45 minutos en hielo. Esta mezcla se cargó en las columnas *MACS Separation Columns, Milteny Biotec*. Y se siguió el protocolo del Kit comercial hasta la elución de los inmunoprecipitados. Una vez obtenidos se cargaron en geles SDS-Page y se realizó el protocolo normal de *Western Blot*. Los lavados y la solución de bloqueo se realizaron en tampón TBS-Tween. Como anticuerpo primario se utilizó anti-P-PKA (cell signalling) a una concentración 1:1000 y en TBS-Tween + 5% BSA (Sigma).

Las proteínas solubles para la Co-Inmunoprecipitación con GFP-Trap se obtuvieron como se indica en el apartado correspondiente. En este caso, se inmunoprecipitaron 3mg de proteína total con 25µl de bolas GFP-Trap pre-lavadas con tampón de lisis (10mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5mM EDTA, 0.5% NP-40), incubando 45 minutos a 4°C en agitación. Las bolas se lavaron 2 veces con 500µl de tampón de lavado (10mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5mM EDTA) y se eluyeron las proteínas añadiendo 2X *Sample Buffer* (100mM Tris pH 7.5, 4% SDS, 200mM DTT, 20% Glicerol, 0,1% Azul de Bromofenol) hirviendo durante 5 minutos a 95°C. Los inmunoprecipitados se cargaron en geles SDS-Page y se siguió el protocolo de *Western Blot* descrito.

#### **8.6.1. Concentraciones de anticuerpos utilizadas**

Para la detección de proteínas marcadas con los epítomos HA o myc los anticuerpos primarios utilizados fueron Rat anti-HA 3F10 (Roche) a una concentración 1:10000 o 1:1000 de mouse anti-myc 9E10 (Santa Cruz). La detección de la proteínas GFP se llevó a cabo utilizando una dilución 1:1000 del anticuerpo Mouse anti-GFP (Roche). El anticuerpo anti PSTAIRE se utilizó a una concentración 1:5000

## **Materiales y Métodos**

Para el anticuerpo fosfoespecífico Rabbit anti-P-PKA substrate (Cell Signaling) concentración utilizada fue de 1:1000.

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

### **8.7. Tratamiento con Lambda Fosfatasa ( $\lambda$ -PPTasa)**

El tratamiento con fosfatasa se realizó con  $\lambda$ -PP (*New England Biolabs, Ipswich, MA*) y llevó a cabo en las columnas de inmunoprecipitación de *MyIteni*. Una vez obtenidos los extractos proteicos, como se explica en el punto 7.3 de este apartado, se cargaron las muestras en las columnas, se lavaron 4 veces con 200 $\mu$ l de tampón de lisis y una vez más con el buffer de fosfatasa provisto en el kit. Posteriormente se incubaron con 50 $\mu$ l del buffer con y sin la fosfatasa durante 30 minutos a 30°C. Transcurrido este tiempo se lavaron las columnas con 100  $\mu$ l de buffer de fosfatasa y se eluyeron las proteínas en 70 $\mu$ l del buffer de la muestra precalentado a 95°C. Las muestras obtenidas se procesaron mediante el protocolo de *Western Blot* convencional.

## **9. Técnicas de microscopía**

### **9.1. Preparación de las muestras**

Para la visualización microscópica de las muestras se fijaron las células con formaldehído al 5% para preservar su morfología y se trataron con proteinasa K (1mg/ml) con el fin de degradar adhesinas de pared que inducen la aglomeración de las hifas. Este tratamiento favorece la separación de las células para la correcta caracterización de su fenotipo. Tras la centrifugación de los cultivos y retirada del medio, el pellet se lavó con una solución de PBS estéril; posteriormente se añadió una disolución 1:20 de formaldehído en PBS y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos en agitación. Para eliminar el formaldehído se centrifugaron las células y se lavaron de nuevo con PBS. Por último, se resuspendieron en un volumen adecuado de PBS, se les añadió la proteinasa K y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo se conservaron a 4°C hasta su posterior visualización.

## **Materiales y Métodos**

### **9.2. Tinción con calcoflúor**

La tinción con calcoflúor se realizó con el fin de mejorar la visualización de las morfologías celulares, este fluorocromo tiñe las zonas de la pared celular ricas en quitina en *C.albicans*; y se excita a una longitud de onda de 372nm emitiendo una fluorescencia azul. Para la tinción se mezcló calcoflúor a 10 mg/ml en una proporción 1:1 con el volumen de la muestra.

### **9.3. Microscopía óptica**

Se observaron las células y se tomaron las fotografías utilizando un microscopio Leica DM-6000B, equipado con lentes para óptica Nomarski y una cámara de alta resolución acoplada, CoolSNAP HQ2 (*Photometrics*). Las imágenes fueron procesadas con el programa MetaMorph (*MDS Analytical Technologies*), ImageJ 1.52b (*Wayne Rasband National Institutes of Health*) y Adobe Photoshop Elements 7.0. (*Adobe System, Inc*).

### **9.4. Microscopía de fluorescencia**

La observación se realizó con los microscopios Leica DM-6000B utilizando los filtros específicos para la GFP y A4 (Calcoflúor) y la cámara de alta resolución acoplada, CoolSNAP HQ2 (*Photometrics*) y *Olympus IX81* equipado con un sistema confocal *Yokogawa Spinning Disk*.

### **9.5. Microscopía confocal: *Time-lapse***

Los ensayos de *Time-lapse* se realizaron con el fin de visualizar la deslocalización de Spa2 en el polarisoma y Exo84 en el exocisto tras la inhibición de Cbk1 a lo largo del tiempo; ambas proteínas marcadas con GFP. Para ello se utilizaron cámaras de ocho pocillos (*iBIDI u-slide*) a las que se le añadió 10µl por pocillo de lectina 5mg/ml y se dejaron secar durante 20 minutos. Después se inoculó el pocillo con 300µl del cultivo, se dejó fijar durante 5 minutos y se lavó 2 veces con el medio requerido. Por último, se

## **Materiales y Métodos**

añadieron 300µl de medio nuevo con 25µM de 1NM-PP1 o el volumen correspondiente de DMSO y se tomaron fotografías con el *microscopio Olympus IX81 Spinning Disk* cada 5 minutos utilizando el filtro de contraste de fase interferencial (DIC) y el láser para la GFP en el mismo campo, de 5 imágenes transversales (serie Z) con una separación de 0,5µm entre ellas.

***ANEXOS***

---

TABLA 1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

DELECIÓN DE GENES		
NOMBRE	SECUENCIA	NÚMERO
S1-CBK1	TTGAAAATAAAAAGAACTGAAAAGTAATAGCCACCAAGAGACTTT AATAACTGATTTTCTCGAGATACCTTAAAAGATCAAATAGAGTTTT ATAGATCTTGAAGCTTCGTACGCTGCAGGTC	#1014
S2-CBK1	GTAAAATAATAACTATGTATAGTTGTTTCGTCCCAACAACACTCTCT ATATTTAATGATTGTTTTTTCATGTTTTATAATGAAGGTTCTACTCG TACCACACTATCTGATATCATCGATGAATTCGAG	#1013
S1-CDC14	CAGATAGAATATACCTTGCGCTTATGATCATCACAAAAGGGATA CAGAAGATTTGGCATATTTACAGTTGAAGACGCATTACCATATAA TGCATTTTACGAAGCTTCGTACGCTGCAGGTC	#191
S2-CDC14	GTATACATTGATTTAATGAAGGTGAAGCAAAAAAGAAAGAATAAC AAATAACAAATAAAAACAGGTTATCAAAGAAATGAACTTAACAT ACATGTACAATCTGATATCATCGATGAATTCGAG	#192
S1-PTP3	AGTGGAAGGTTGAAACGAAACGAGAAAATTAACAAAAACACACA ACAAAAGTTCAGTCCACACCAGTAATAGTTTGATTGGATTAGGTT TAATTATTCAGAAGCTTCGTACGCTGCAGGTC	#1280
S2-PTP3	AAAAAACTAAAAATCTAATTTTATATAATTTTATCAACTTGTATTG TTTTGTTCTCTTTTGATTCTTACCCATTTCCATTTTTTAAAATTCTC ACCTTCTGATATCATCGATGAATTCGAG	#1281
S1-19.7504 (RTS3)	GTTTATACATTCTTTTTTTTTGCCAAATTATCTATACAACCTTGAACAA CTTTTTACCTTAGTTGTCTTCATAACATTTATTAATAGAGCTCGTTA AAATAAAGAGAAGCTTCGTACGCTGCAGGT	#1285
S2-19.7504 (RTS3)	ATATATATTGAAAAGATATAAAAGATAAAATATGTGACCGACTCC CCAAAAAATATTCAACCCAAATATATGTATATAAACTAATAATAT AAACTGATTCTGATATCATCGATGAATTCGAG	#1286

MARCAJE DE GENES		
NOMBRE	SECUENCIA	NÚMERO
S1Cbk1XFP	TGCTAAGAATGGAGGCGGCAGAAAGAATCCAAAGGAAGATTTAC CATTTATTGGATACACTTATTCTAGATTTGATTATTTGACAAGAAAG AATGCGTTAGGTGCTGGCGCAGGTGCTTC	#273
S2Cbk1XFP	ATAATGCATAAACAATAACATCATCCGGCTGTAGTACCATTCCAAA TGACCACCTATTGTTGATACATGTATGATAAGAAAAGGTTGGCAT GCTTTGTTGTCTGATATCATCGATGAATTCGAG	#274
S1-sgCDC14- GFP	CGTGTCTAAAGCCAGATCCAAAAATAGGATCGCTTCTGGAACTC ACAAACATCAAGAGCACACTCTGGTGGTGTGAGAAAGTTAAGTGG AAAGAAACATGGTGTGGCGCAGGTGCTTC	#1015
S2-sgCDC14- GFP	ATGTGGATGAAATCAAGGAAGAAGTACAAGACGAGTCGGCCATA ACTAAGGTACTGGTAGATGATATACGAGTGGCCTATCCAAAAGAT TCAACTCAGCCTCTGATATCATCGATGAATTCGAG	#1016
S1-CDC14HA	GCGTGTCTAAAGCCAGATCCAAAAATAGGATCGCTTCTGGAACT	#619

Anexos

	CACAAACATCAAGAGCACACTCTGGTGGTGTGAGAAAGTTAAGTG GAAAGAAACATACGCGTTATCCATATGATGTTCC	
S2- SAT1CDC14H A	TGATATTGCTGAATTAAGTTTTAAAGGATTTTCGATATATTGGCTTTT GCATATGGTTCGGAAGAACAATTGAAATTGTTGAACCAGCTTAT GAAGAAAACCTCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG	#620
S1 SPA2 XFP	TATTGCCAAATGTACTAAAGAATTAGTCAAGACGGTGGGAAGAAGC TAGTCTTAAAGAAGATATTGCTTATCTTGATGCTAGAATAAGTCAA AATCTTGAAGGTGCTGGCGCAGGTGCTTC	#336
S2 SPA2 XFP	TAAATTCACAGCATCATCAAAAATTCATGTCCAATACATTGATA ATTCCTACAAATACAATTATAATATCAAAATAATAAAATTATTACAT ATATACTATATCATCGATGAATTCGAG	#337
S1-EXO84 XFP	GATAATTTCTTGAAGATTATGCAACCACAATTGGAAGAATTA AAC TGGTGGGATTAATGTTGATTATATATTTGAGTCTATATTAATCTT GAAGGTGCTGGCGCAGGTGCTTCTAAAGGTG	#1318
S2-EXO84 XFP	CCCTTTAAGATGTTTTAAGAATAAAGCTAAATGAAACCGATATTTG AATCCATTATTTATTTATTTGATTATTTATTTATATAGTTATA TATATGAGGGATCTGATATCATCGATGAATTCGAGCTCG	#1319

CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDOS		
NOMBRE	SECUENCIA	NÚMERO
N-3xmyc- CBK1-B	GAGGTCCTCCTCCGAGATTAGTTTCTGTTGCGCTAGATCCTCTTCTG AAATGAGCTTTTGTCTCTCCGAGGTCTTCTTCGGATATAAGtTTCTGT TCCCCGGGCATAAGATCTATAAACTCTATTTGATCTTTTAAGG	#1023
N-3xmyc- CBK1-C	ATGCCCCGGGAACAGAACTTATATCCGAAGAAGACCTCGGAGA GCAAAAGCTCATTTT CAGAAGAGGATCTAGGCCGAACAGAACTAAT CTCGGAGGAGGACCTCAATTTTCGATCAGCTTACAGACGAGCAGAA GCAAC	#1024
N-3xmyc- CBK1-A	GACTAGGTGCGACTCCTCAAAGAGAGCCATC	#1025
N-3xmyc- CBK1-D	GATGGGATCCGTTCTCACATTGCAAAGACTAATTGGCAAC	#1026
N-3xmyc- CBK1-A2 (Sall)	GACTAGGTGCGACTCCTCAAAGAGAGCCATCATCACTACTTTCCAT TAGAGGG	#1063
N-3xmyc- CBK1-D2 (BamHI)	GATGGGATCCGTTCTCACATTGCAAAGACTAATTGGCAACTATCA AAGATAATGC	#1064
SacI_CBK1- 3'UTR	AGCTGAGCTCGGAATTGCAACACAATAAAGCACAAACACAC	#1031
EcoRV- 3'CBK1 3'UTR	CCTAGGATATCCAATTGATGCTTTTGAATTGTGTTGCCAAT	#605
AB-SSD1- ApaI	TTGGGCCCTAGCCCTTGAACAAACCCACAATTC	#985
AB-SSD1-	GGCTCGAGGTGTGTGTATCAATCTATTA AAATTGTCGT	#986

Anexos

XhoI		
CD-SSD1-SacII	AGCCGCGGCTGTTCAACGTTTCAGTTCATGGAATTAAGCTC	#987
CD-SSD1-SacI	GCGAGCTCCAATGGAGATGCAGCACGTGTTTGCAATGGAG	#988
CDC14-3UTR5'SacI	GCTAGAGCTCCAGCAATATCATCTTCACTCAATTCAATCCAG	#926
CDC14-3UTR3'EcoRV	CGATTGAACCATCACACTCATTAGAGGATATC	#927

COMPROBACIÓN		
NOMBRE	SECUENCIA	NÚMERO
G1-SSD1	GATAGTTAGTGTACAATGGGCAGA	#989
G2-SSD1	GAGATGGCCATGATAATCCATCGC	#990
pMal2-3 Flipper	CGGTGACTCCATCACCCAGTTTAGTTGTACCC	#653
X3B-SAT1	CGCCTAACATATGTGAAGTGTGAAGGGGGAG	#654
I1-SSD1	GGCGCTGGGTCTAACGCGGCGG	#1011
I2-SSD1	TGGGAATCAATTGGTCTAAGTTGC	#1012
G1CBK1	CGGTAGTAAAAGTTAAGGACCAAGTCAACT	#415
G2B-CBK1	CATAACAATAACATCATCCGGCTGTACTACCA	#549
G1-3xmycCBK1	TTCGAATTGGGTGGTGACAA	#1096
G2-3xmycCBK1	CTGCTGTTGTTGTAGCTGC	#1097
X2-CaARG4	AATGGATCAGTGGCACCGGTG	#543
X3-CaARG4	GCTCTTGGTGGTACTGCTAAAAGTGCCG	#544
X2-SAT1	GCACACACTACTTAATATACACAGC	#519
X3B-SAT1	CGCCTAACATATGTGAAGTGTGAAGGGGGGA	#654
CDC14-S2	GACCCGATCCTTTAATTGGC	#998
X2-CaHIS1	CAACGAAATGGCCTCCCCTACCACAG	#547
Check CDC14 3'	GTTGCAAACTTGATGAGGAGCCC	#929
G1-sgCDC14	AGGAGAGGTGTCGGGTAATTCCTC	#991
R-CDC14	CGTCTAGACGAGTGGCCTATCCAAAAGAT	#95
G1-6HisCDC14	GGTCCGGTTAGTAAAGCGAAC	#529
X2-CaARG4	AATGGATCAGTGGCACCGGTG	#543
X3-CaARG4	GCTCTTGGTGGTACTGCTAAAAGTGCCG	#544
Check-CDC14 3'	GTTGCAAACTTGATGAGGAGCCC	#929
G1-PTP3	GGGATATCGTTTAGACTACAAACAC	#1282
G1-19.7504	CGACTGAAGACACAGCAACAACAAC	#1287
I1-PTP3	GGAATCAAGGTGATGGTAACAAGG	#1283
I1-PTP3	CCCTTGAGAATTGTCAAATTGGG	#1284

Anexos

I1-19.7504	CCCAACTAAGCAACTACGGGC	#1288
I2-19.7504	CGAGACGATAATGATGAAGATCGAC	#1289

MUTAGÉNESIS CBK1		
NOMBRE	SECUENCIA	NÚMERO
cbk1-DEAD	TATCGATTAAAATATTATCCGGTTTGATAGCACGATGAATAA ATCCTAATTTATGAATG	#1039
cbk1-S89A	CGGCTGTTGTCTAATAGGAGCTCCATGATCTAATTGAACTG	#1032
cbk1-S103A	TGAGCAAATCGAGGTGCTGGCATGAATGCCGAC	#1033
cbk1-S180A	ATGTTGTTGAACTGGAGGTGCTGTATCACTAGTTAATGCTG	#1034
cbk1-S392A	CAACAATCCAAGGGGCATCACTACCTGCCAAAACAT	#1035
cbk1-T548A	GAGCAATATAATCAGGAGCACCAACAGTGAATACGC	#1036
cbk1-S614A	CTTCAGCTTCTGGTGCTAAATGAACATCTTCAGGAATTTGGA AA	#1037
CBK1-S89D	ACCACCAGTTCAATTAGATCATGGAGATCCTATTAGACAACA GCC	#1113
CBK1-S103D	GCCGCAAATGTCGGCATTTCATGCCAGATCCTCGATTTGCTCA GC	#1114
CBK1-S180D	CAACTTGCCAACAGCATTAACTAGTGATACAGATCCTCCAGT TCAACAAC	#1115
CBK1-S392D	AGAAAGAGATGTTTTGGCAGGTAGTGATGATCCTTGGATTG TTGCATTATACTATT	#1116
CBK1-T548D	GTAGATTGATGGCGTATTCCACTGTTGGTGATCCTGATTATA TTGCTC	#1117
CBK1-S614D	GCAAGAAAGTTTTCAAATTCCTGAAGATGTTCAATTTAGATCC AGAAGCTGAAGATTTAA	#1118
cbk1-asM412A	TCAAATCACCACCAGGCCAAAATTCAGCTATCAAATACAAAT ATTGTGAATCTTGAAAGAATAGT	#1299

SECUENCIACIÓN		
NOMBRE	SECUENCIA	NÚMERO
G1-CDC14	CCAATTAACCTCAACGTCTATC	#167
CDC14-S1	CGATGATGGAACCTGTCCTAC	#997
CDC14-S2	GACCCGATCCTTTAATTGGC	#998
CDC14-S3	GGTACCTATCGAGTCTCCTGG	#999
CBK1-S6	GACAAGTGTGTCCTGAAAGGTG	#1027
CBK1-S7	GCACCAGTTACAACAGCAACAGC	#1028
CBK1-S8	CCAACCACCAGCATCGACTT	#1029
CBK1-S2	CGTAAGAATCGTCAATTACAAAATTTAGGG	#569
CBK1-S3	GAGTGATTTTGGATTATCTACTGGATTCC	#570
CBK1-S4	GGTTGGCCACCGTTTTGTTGAG	#571

OLIGOS RT-PCR		
NOMBRE	SECUENCIA	NÚMERO
F-ACT1-qPCR	TGGTGATGGTGTACTCACG	#968
R-ACT1-qPCR	GACAATTTCTCTTCAGCAC	#969
SCW11 F	CTTCTGAACCACCTGCCACT	#OL1524
SCW11R	TGGTTCAATATTGGCGTTGA	#OL1525

TABLA 2. Plásmidos utilizados en este trabajo

CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDOS		
NOMBRE	TIPO	REFERENCIA
pFA-ARG4	Disrupción génica	(Gola et al., 2003)
pFA-URA3	Disrupción génica	(Gola et al., 2003)
pFA-HIS1	Disrupción génica	(Gola et al., 2003)
pFA-HA-HIS1	Etiquetado con HA	(Lavoie et al., 2008)
pFA-CDC14-HA(WT)-URA3-3'UTR	Síntesis génica	Este trabajo
pFA-CDC14(RAM_A)-HA-URA33'UTR	Síntesis génica	Este trabajo
pFA-CDC14(CDKA_A)-HA-URA33'UTR	Síntesis génica	Este trabajo
pFA-CDC14(CS)-HA-URA3-3'UTR	Síntesis génica	Este trabajo
pSFS-2A	Disrupción génica	(Sasse and Morschhauser, 2012)
pF-SAT1-flipper-SSD1	Disrupción génica	En este trabajo
pFA-GFP-URA3	Marcaje de proteínas	(Schaub et al., 2006)
pFA-3xmyc-CBK1-URA3-3'UTR	Mutagénesis	Este trabajo
pFA-3xmyc-cbk1-as-URA3-3'UTR	Mutagénesis	Este trabajo
pFA-3xmyc-cbk1-4A-URA3-3'UTR	Mutagénesis	Este trabajo
pFA-3xmyc-cbk1-6A-URA3-3'UTR	Mutagénesis	Este trabajo
pFA-3xmyc-cbk1-6D-URA3-3'UTR	Mutagénesis	Este trabajo
pFA-3xmyc-cbk1-S614A-URA3-3'UTR	Mutagénesis	Este trabajo
pFA-3xmyc-cbk1-T548A-URA3-3'UTR	Mutagénesis	Este trabajo
pFA-3xmyc-cbk1-T548D-URA3-3'UTR	Mutagénesis	Este trabajo
pFA-3xmyc-cbk1-KD-URA3-3'UTR	Mutagénesis	Este trabajo

TABLA 3. Cepas de *C. albicans* construidas en este trabajo

ESTIRPE	GENOTIPO	PROCEDENCIA
BWP17	<i>URA3Δ::imm434/URA3Δ::434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG</i>	<i>Wilson et al</i>
JC490	<i>hgc1ΔΔ</i>	Yue Wang
JC810	<i>cdc28::ARG4/URA3::pMet3-cdc28-as</i>	<i>Yue Wang</i>
JC1049	<i>cbk1::ARG4/cbk1::HIS1</i>	Yue Wang
JC1147	<i>kic1::ARG4/kic1::URA3 CDC14-HA::SAT1</i>	Este trabajo
JC1421	<i>cdc14::ARG/CDC14sg(WT)-HA::URA3</i>	Este trabajo
JC1424	<i>cdc14::ARG/ cdc14 (T30A/T457A)-HA::URA3</i>	Este trabajo
JC1427	<i>cdc14::ARG/cdc14 (T388A y S449A)-HA::URA3</i>	Este trabajo
JC1428	<i>cdc14::ARG/cdc14 (C275S)-HA::URA3</i>	Este trabajo
JC1564	<i>cdc14::ARG/CDC14</i>	Este trabajo
JC1571	<i>ssd1::frt/ssd1::frt</i>	Este trabajo
JC1577	<i>ssd1::frt/ssd1::frt cbk1::ARG4/CBK1</i>	Este trabajo
JC1643	<i>CDC14sg(CS)-HA::URA3/CDC14</i>	Este trabajo
JC1669	<i>CDC14-HA::SAT1/CDC14</i>	Este trabajo
JC1680	<i>mob2::ARG4/mob2::URA3 CDC14-HA::SAT1</i>	Este trabajo
JC1704	<i>ssd1::frt/ssd1::frt cdc14::HIS1/cdc14-C275S-HA::URA3</i>	Este trabajo
JC1715	<i>cbk1::ARG4/cbk1::HIS1 CDC14-HA::SAT1</i>	Este trabajo
JC1746	<i>tao3::ARG4/tao3::HIS1 CDC14-HA::SAT1</i>	Este trabajo
JC1779	<i>cbk1::ARG4/CBK1</i>	Este trabajo
JC1780	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-CBK1::URA3</i>	Este trabajo
JC1791	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1 (D548P)::URA3</i>	Este trabajo
JC1794	<i>ssd1::frt/ssd1::frt cbk1::ARG4/3xmyc-CBK1::URA3</i>	Este trabajo
JC1795	<i>ssd1::frt/ssd1::frt cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1 (D548P)::URA3</i>	Este trabajo
JC1824	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1(S89A/S103A/S180A/S392A)::URA3</i>	Este trabajo
JC1826	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1 (S89A/S103A/S180A/S392A/T548A/S614A)::URA3</i>	Este trabajo
JC1840	<i>ssd1::frt/ssd1::frt cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1 (S89A/S103A/S180A/S392A/T548A/S614A)::URA3</i>	Este trabajo
JC1844	<i>ssd1::frt/ssd1::frt cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1(S89A/S103A/S180A/S392A)::URA3</i>	Este trabajo
JC1900	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-CBK1-GFP::HIS1</i>	Este trabajo
JC1902	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1 (S89A/S103A/S180A/S392A/T548A/S614A)-GFP::HIS1</i>	Este trabajo

Anexos

JC1905	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1-T548A::URA3</i>	Este trabajo
JC1909	<i>cdc28::ARG4/URA3::pMet3-cdc28-as myc-CBK1::HIS1</i>	Este trabajo
JC1910	<i>hgc1ΔΔ cbk1::SAT1/3xmyc-CBK1::HIS1</i>	Este trabajo
JC1918	<i>cdc14::ARG/cdc14(C275S)-HA::URA3 myc-CBK1::HIS1</i>	Este trabajo
JC1920	<i>CAI4 tpk2::HisG/tpk2::HisG 3xmyc-CBK1::URA3</i>	Este trabajo
JC1939	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1 (D548P)-GFP::HIS1</i>	Este trabajo
JC1940	<i>CDC14-HA::SAT1 CDC14-GFP::HIS1</i>	Este trabajo
JC1940	<i>CDC14-HA::SAT1 /CDC14-GFP::HIS1</i>	Este trabajo
JC1949	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1 (S89D/S103D/S180D/S392D/T548D/S614D)::URA3</i>	Este trabajo
JC1949	<i>cbk1::ARG4/myc-cbk1 (S89D/S103D/S180D/S392D/T548D/S614D)::URA3</i>	Este trabajo
JC1995	<i>hgc1ΔΔ cbk1::SAT11/myc-cbk1 (S89D/S103D/S180D/S392D/T548D/S614D)::URA3</i>	Este trabajo
JC2026	<i>hgc1ΔΔ cbk1::SAT1</i>	Este trabajo
JC2035	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1-T548D::URA3</i>	Este trabajo
JC2049	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1-T548A-GFP::HIS1</i>	Este trabajo
JC2051	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1-T548D-GFP::HIS1</i>	Este trabajo
JC2222	<i>cdc14::ARG/cdc14 (C275S)-HA::URA cbk1::SAT1/myc-cbk1 (S89A/S103A/S180A/S392A/T548A/S614A)::HIS1</i>	Este trabajo
JC2247	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1-as (M412A)::URA3</i>	Este trabajo
JC2249	<i>hgc1ΔΔ cbk1::SAT1/3xmyc-cbk1-T548D::URA3</i>	Este trabajo
JC2251	<i>ssd1::frt/ssd1::frt cbk1::ARG4/3xmyc-T548A::URA3</i>	Este trabajo
JC2254	<i>ssd1::frt/ssd1::frt cbk1::ARG4/3xmyc-T548D::URA3</i>	Este trabajo
JC2266	<i>hgc1ΔΔ cbk1::SAT1/3xmyc-cbk1-T548A::URA3</i>	Este trabajo
JC2284	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1-as (M412A)::URA3 SPA2-GFP::HIS1</i>	Este trabajo
JC2332	<i>cbk1::ARG4/3xmyc-cbk1-as (M412A)::URA3 EXO84-GFP::HIS1</i>	Este trabajo

## ***BIBLIOGRAFÍA***

---

## Bibliografía

Amon, A. (2008). A decade of Cdc14--a personal perspective. Delivered on 9 July 2007 at the 32nd FEBS Congress in Vienna, Austria. The FEBS journal 275, 5774-5784.

Bardin, A.J., and Amon, A. (2001). Men and sin: what's the difference? Nat Rev Mol Cell Biol 2, 815-826.

Berman, J., and Sudbery, P.E. (2002). *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. Nat Rev Genet 3, 918-930.

Bernardo, S.M., Rane, H.S., Chavez-Dozal, A., and Lee, S.A. (2014). Secretion and filamentation are mediated by the *Candida albicans* t-SNAREs Sso2p and Sec9p. FEMS yeast research 14, 762-775.

Bichsel, S.J., Tamaskovic, R., Stegert, M.R., and Hemmings, B.A. (2004). Mechanism of activation of NDR (nuclear Dbf2-related) protein kinase by the hMOB1 protein. The Journal of biological chemistry 279, 35228-35235.

Bidlingmaier, S., and Snyder, M. (2004). Regulation of polarized growth initiation and termination cycles by the polarisome and Cdc42 regulators. The Journal of cell biology 164, 207-218.

Bidlingmaier, S., Weiss, E.L., Seidel, C., Drubin, D.G., and Snyder, M. (2001). The Cbk1p pathway is important for polarized cell growth and cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol 21, 2449-2462.

Birse, C.E., Irwin, M.Y., Fonzi, W.A., and Sypherd, P.S. (1993). Cloning and characterization of ECE1, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans*. Infection and immunity 61, 3648-3655.

Bishop, A., Lane, R., Beniston, R., Chapa-y-Lazo, B., Smythe, C., and Sudbery, P. (2010). Hyphal growth in *Candida albicans* requires the phosphorylation of Sec2 by the Cdc28-Ccn1/Hgc1 kinase. The EMBO journal 29, 2930-2942.

Bishop, A.C., Ubersax, J.A., Petsch, D.T., Matheos, D.P., Gray, N.S., Blethrow, J., Shimizu, E., Tsien, J.Z., Schultz, P.G., Rose, M.D., *et al.* (2000). A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. Nature 407, 395-401.

Biswas, S., Van Dijck, P., and Datta, A. (2007). Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. Microbiol Mol Biol Rev 71, 348-376.

Blethrow, J., Zhang, C., Shokat, K.M., and Weiss, E.L. (2004). Design and use of analog-sensitive protein kinases. Current protocols in molecular biology Chapter 18, Unit 18 11.

Bloom, J., and Cross, F.R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. Nat Rev Mol Cell Biol 8, 149-160.

## Bibliografía

Brace, J., Hsu, J., and Weiss, E.L. (2011). Mitotic Exit Control of the *Saccharomyces cerevisiae* Ndr/LATS Kinase Cbk1 Regulates Daughter Cell Separation after Cytokinesis. *Mol Cell Biol* *31*, 721-735.

Braun, B.R., Kadosh, D., and Johnson, A.D. (2001). NRG1, a repressor of filamentous growth in *C.albicans*, is down-regulated during filament induction. *The EMBO journal* *20*, 4753-4761.

Bruno, V.M., Wang, Z., Marjani, S.L., Euskirchen, G.M., Martin, J., Sherlock, G., and Snyder, M. (2010). Comprehensive annotation of the transcriptome of the human fungal pathogen *Candida albicans* using RNA-seq. *Genome research* *20*, 1451-1458.

Caballero-Lima, D., Hautbergue, G.M., Wilson, S.A., and Sudbery, P.E. (2014). In *Candida albicans* hyphae, Sec2p is physically associated with SEC2 mRNA on secretory vesicles. *Molecular microbiology* *94*, 828-842.

Caballero-Lima, D., and Sudbery, P.E. (2014). In *Candida albicans*, phosphorylation of Exo84 by Cdk1-Hgc1 is necessary for efficient hyphal extension. *Molecular biology of the cell* *25*, 1097-1110.

Cao, C., Wu, M., Bing, J., Tao, L., Ding, X., Liu, X., and Huang, G. (2017). Global regulatory roles of the cAMP/PKA pathway revealed by phenotypic, transcriptomic and phosphoproteomic analyses in a null mutant of the PKA catalytic subunit in *Candida albicans*. *Molecular microbiology* *105*, 46-64.

Casadevall, A., and Pirofski, L.A. (2003). The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nature reviews* *1*, 17-24.

Clemente-Blanco, A., Gonzalez-Novo, A., Machin, F., Caballero-Lima, D., Aragon, L., Sanchez, M., de Aldana, C.R., Jimenez, J., and Correa-Bordes, J. (2006). The Cdc14p phosphatase affects late cell-cycle events and morphogenesis in *Candida albicans*. *Journal of cell science* *119*, 1130-1143.

Colman-Lerner, A., Chin, T.E., and Brent, R. (2001). Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell* *107*, 739-750.

Court, H., and Sudbery, P. (2007). Regulation of Cdc42 GTPase activity in the formation of hyphae in *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell* *18*, 265-281.

Crampin, H., Finley, K., Gerami-Nejad, M., Court, H., Gale, C., Berman, J., and Sudbery, P. (2005). *Candida albicans* hyphae have a Spitzenkorper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae. *Journal of cell science* *118*, 2935-2947.

Chan, E.H., Nousiainen, M., Chalamalasetty, R.B., Schafer, A., Nigg, E.A., and Sillje, H.H. (2005). The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene* *24*, 2076-2086.

Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J., and Fink, G.R. (2004). Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 5048-5052.

## Bibliografía

Das, M., Wiley, D.J., Chen, X., Shah, K., and Verde, F. (2009). The conserved NDR kinase Orb6 controls polarized cell growth by spatial regulation of the small GTPase Cdc42. *Curr Biol* 19, 1314-1319.

de Bettignies, G., and Johnston, L.H. (2003). The mitotic exit network. *Curr Biol* 13, R301.

Dumitrescu, T.P., and Saunders, W.S. (2002). The FEAR Before MEN: networks of mitotic exit. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 1, 304-307.

Elson, S.L., Noble, S.M., Solis, N.V., Filler, S.G., and Johnson, A.D. (2009). An RNA transport system in *Candida albicans* regulates hyphal morphology and invasive growth. *PLoS Genet* 5, e1000664.

Emoto, K., He, Y., Ye, B., Grueber, W.B., Adler, P.N., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2004). Control of dendritic branching and tiling by the Tricornered-kinase/Furry signaling pathway in *Drosophila* sensory neurons. *Cell* 119, 245-256.

Enserink, J.M., and Kolodner, R.D. An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell division* 5, 11.

Enserink, J.M., and Kolodner, R.D. (2010). An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell division* 5, 11.

Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M.S., Chow, C.J., Adames, N., Pringle, J.R., Peter, M., and Boone, C. (1997). Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science (New York, NY)* 276, 118-122.

Fernandez, I., Ubach, J., Dulubova, I., Zhang, X., Sudhof, T.C., and Rizo, J. (1998). Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin 1A. *Cell* 94, 841-849.

Fonzi, W.A., and Irwin, M.Y. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134, 717-728.

Fujiwara, T., Tanaka, K., Mino, A., Kikyo, M., Takahashi, K., Shimizu, K., and Takai, Y. (1998). Rho1p-Bni1p-Spa2p interactions: implication in localization of Bni1p at the bud site and regulation of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 9, 1221-1233.

Geymonat, M., Jensen, S., and Johnston, L.H. (2002). Mitotic exit: the Cdc14 double cross. *Curr Biol* 12, R482-484.

Gogl, G., Schneider, K.D., Yeh, B.J., Alam, N., Nguyen Ba, A.N., Moses, A.M., Hetenyi, C., Remenyi, A., and Weiss, E.L. (2015). The Structure of an NDR/LATS Kinase-Mob Complex Reveals a Novel Kinase-Coactivator System and Substrate Docking Mechanism. *PLoS biology* 13, e1002146.

## Bibliografía

Gola, S., Martin, R., Walther, A., Dunkler, A., and Wendland, J. (2003). New modules for PCR-based gene targeting in *Candida albicans*: rapid and efficient gene targeting using 100 bp of flanking homology region. *Yeast (Chichester, England)* 20, 1339-1347.

González-Novo, A., Correa-Bordes, J., Labrador, L., Sánchez, M., Vázquez de Aldana, C.R., and Jiménez, J. (2008). Sep7 is essential to modify septin ring dynamics and inhibit cell separation during *Candida albicans* hyphal growth. *Molecular biology of the cell* 19, 1509-1518.

Gray, C.H., Good, V.M., and Tonks, N.K. (2003). The structure of the cell cycle protein Cdc14 reveals a proline-directed protein phosphatase. *The EMBO journal* 22, 3524-3535.

Gregan, J., Zhang, C., Rumpf, C., Cipak, L., Li, Z., Uluocak, P., Nasmyth, K., and Shokat, K.M. (2007). Construction of conditional analog-sensitive kinase alleles in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature protocols* 2, 2996-3000.

Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C., and Novick, P. (1999). The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *The EMBO journal* 18, 1071-1080.

Gutierrez-Escribano, P., Gonzalez-Novo, A., Suarez, M.B., Li, C.R., Wang, Y., de Aldana, C.R., and Correa-Bordes, J. (2011). CDK-dependent phosphorylation of Mob2 is essential for hyphal development in *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell* 22, 2458-2469.

Hall, R.A., and Noverr, M.C. (2017). Fungal interactions with the human host: exploring the spectrum of symbiosis. *Current opinion in microbiology* 40, 58-64.

Harvey, K., and Tapon, N. (2007). The Salvador-Warts-Hippo pathway - an emerging tumour-suppressor network. *Nat Rev Cancer* 7, 182-191.

Hazan, I., Sepulveda-Becerra, M., and Liu, H. (2002). Hyphal elongation is regulated independently of cell cycle in *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell* 13, 134-145.

Hergovich, A., Bichsel, S.J., and Hemmings, B.A. (2005). Human NDR kinases are rapidly activated by MOB proteins through recruitment to the plasma membrane and phosphorylation. *Mol Cell Biol* 25, 8259-8272.

Hergovich, A., Stegert, M.R., Schmitz, D., and Hemmings, B.A. (2006). NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 253-264.

Hogan, D.A., and Sundstrom, P. (2009). The Ras/cAMP/PKA signaling pathway and virulence in *Candida albicans*. *Future microbiology* 4, 1263-1270.

## Bibliografía

Hogan, D.J., Riordan, D.P., Gerber, A.P., Herschlag, D., and Brown, P.O. (2008). Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS biology* 6, e255.

Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., and Nickerson, K.W. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol* 67, 2982-2992.

Hou, M.C., Wiley, D.J., Verde, F., and McCollum, D. (2003). Mob2p interacts with the protein kinase Orb6p to promote coordination of cell polarity with cell cycle progression. *Journal of cell science* 116, 125-135.

Hoyer, L.L. (2001). The *ALS* gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9, 176-180.

Jansen, J.M., Barry, M.F., Yoo, C.K., and Weiss, E.L. (2006). Phosphoregulation of Cbk1 is critical for RAM network control of transcription and morphogenesis. *The Journal of cell biology* 175, 755-766.

Jansen, J.M., Wanless, A.G., Seidel, C.W., and Weiss, E.L. (2009). Cbk1 regulation of the RNA-binding protein Ssd1 integrates cell fate with translational control. *Curr Biol* 19, 2114-2120.

Jaspersen, S.L., Charles, J.F., Tinker-Kulberg, R.L., and Morgan, D.O. (1998). A late mitotic regulatory network controlling cyclin destruction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 9, 2803-2817.

Jones, L.A., and Sudbery, P.E. (2010). Spitzenkorper, exocyst, and polarisome components in *Candida albicans* hyphae show different patterns of localization and have distinct dynamic properties. *Eukaryot Cell* 9, 1455-1465.

Jorgensen, P., Nelson, B., Robinson, M.D., Chen, Y., Andrews, B., Tyers, M., and Boone, C. (2002). High-resolution genetic mapping with ordered arrays of *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants. *Genetics* 162, 1091-1099.

Kelly, M.T., MacCallum, D.M., Clancy, S.D., Odds, F.C., Brown, A.J., and Butler, G. (2004). The *Candida albicans* *CaACE2* gene affects morphogenesis, adherence and virulence. *Molecular microbiology* 53, 969-983.

Kodama, S., Ishizuka, J., Miyashita, I., Ishii, T., Nishiuchi, T., Miyoshi, H., and Kubo, Y. (2017). The morphogenesis-related NDR kinase pathway of *Colletotrichum orbiculare* is required for translating plant surface signals into infection-related morphogenesis and pathogenesis. *PLoS pathogens* 13, e1006189.

Kottom, T.J., Kohler, J.R., Thomas, C.F., Jr., Fink, G.R., and Limper, A.H. (2003). Lung epithelial cells and extracellular matrix components induce expression of *Pneumocystis carinii* STE20, a gene complementing the mating and pseudohyphal growth defects of STE20 mutant yeast. *Infection and immunity* 71, 6463-6471.

## Bibliografía

Kurischko, C., Kim, H.K., Kuravi, V.K., Pratzka, J., and Luca, F.C. (2011). The yeast Cbk1 kinase regulates mRNA localization via the mRNA-binding protein Ssd1. *The Journal of cell biology* *192*, 583-598.

Kurischko, C., Weiss, G., Ottey, M., and Luca, F.C. (2005). A role for the *Saccharomyces cerevisiae* regulation of Ace2 and polarized morphogenesis signaling network in cell integrity. *Genetics* *171*, 443-455.

Lavoie, H., Sellam, A., Askew, C., Nantel, A., and Whiteway, M. (2008). A toolbox for epitope-tagging and genome-wide location analysis in *Candida albicans*. *BMC Genomics* *9*, 578.

Lee, H.J., Kim, J.M., Kang, W.K., Yang, H., and Kim, J.Y. (2015). The Ndr kinase Cbk1 down-regulates the transcriptional repressor Nrg1 through the mRNA-binding protein Ssd1 in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*.

Lengefeld, J., and Barral, Y. (2018). Asymmetric Segregation of Aged Spindle Pole Bodies During Cell Division: Mechanisms and Relevance Beyond Budding Yeast? *Bioessays* *40*, e1800038.

Lew, D.J., and Reed, S.I. (1993). Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *The Journal of cell biology* *120*, 1305-1320.

Li, C.R., Au Yong, J.Y., Wang, Y.M., and Wang, Y. (2012). CDK regulates septin organization through cell-cycle-dependent phosphorylation of the Nim1-related kinase Gin4. *Journal of cell science* *125*, 2533-2543.

Li, C.R., Lee, R.T., Wang, Y.M., Zheng, X.D., and Wang, Y. (2007). *Candida albicans* hyphal morphogenesis occurs in Sec3p-independent and Sec3p-dependent phases separated by septin ring formation. *Journal of cell science* *120*, 1898-1907.

Lin, C.J., and Chen, Y.L. (2018). Conserved and Divergent Functions of the cAMP/PKA Signaling Pathway in *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)* *4*.

Loog, M., and Morgan, D.O. (2005). Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. *Nature* *434*, 104-108.

Lu, Y., Su, C., Unoje, O., and Liu, H. (2014). Quorum sensing controls hyphal initiation in *Candida albicans* through Ubr1-mediated protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 1975-1980.

Lu, Y., Su, C., Wang, A., and Liu, H. (2011). Hyphal development in *Candida albicans* requires two temporally linked changes in promoter chromatin for initiation and maintenance. *PLoS biology* *9*, e1001105.

Luo, G., Zhang, J., Luca, F.C., and Guo, W. (2013). Mitotic phosphorylation of Exo84 disrupts exocyst assembly and arrests cell growth. *The Journal of cell biology* *202*, 97-111.

## Bibliografía

Maerz, S., and Seiler, S. (2010). Tales of RAM and MOR: NDR kinase signaling in fungal morphogenesis. *Current opinion in microbiology* 13, 663-671.

Maerz, S., Ziv, C., Vogt, N., Helmstaedt, K., Cohen, N., Gorovits, R., Yarden, O., and Seiler, S. (2008). The nuclear Dbf2-related kinase COT1 and the mitogen-activated protein kinases MAK1 and MAK2 genetically interact to regulate filamentous growth, hyphal fusion and sexual development in *Neurospora crassa*. *Genetics* 179, 1313-1325.

Martinez, J.P., Gimenez, G., Bracker, C.E., and Bartnicki-Garcia, S. (1989). Sedimentation properties of chitosomal chitin synthetase from the wild-type strain and the 'slime' variant of *Neurospora crassa*. *Biochimica et biophysica acta* 990, 45-52.

Mayer, F.L., Wilson, D., and Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4, 119-128.

Mazanka, E., Alexander, J., Yeh, B.J., Charoenpong, P., Lowery, D.M., Yaffe, M., and Weiss, E.L. (2008). The NDR/LATS family kinase Cbk1 directly controls transcriptional asymmetry. *PLoS biology* 6, e203.

Mazanka, E., and Weiss, E.L. (2010). Sequential counteracting kinases restrict an asymmetric gene expression program to early G1. *Molecular biology of the cell* 21, 2809-2820.

McCusker, D., Denison, C., Anderson, S., Egelhofer, T.A., Yates, J.R., 3rd, Gygi, S.P., and Kellogg, D.R. (2007). Cdk1 coordinates cell-surface growth with the cell cycle. *Nat Cell Biol* 9, 506-515.

McNemar, M.D., and Fonzi, W.A. (2002). 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* 184, 2058-2061.

Medkova, M., France, Y.E., Coleman, J., and Novick, P. (2006). The rab exchange factor Sec2p reversibly associates with the exocyst. *Molecular biology of the cell* 17, 2757-2769.

Mendenhall, M.D., and Hodge, A.E. (1998). Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1191-1243.

Millward, T.A., Hess, D., and Hemmings, B.A. (1999). Ndr protein kinase is regulated by phosphorylation on two conserved sequence motifs. *The Journal of biological chemistry* 274, 33847-33850.

Moyes, D.L., Runglall, M., Murciano, C., Shen, C., Nayar, D., Thavaraj, S., Kohli, A., Islam, A., Mora-Montes, H., Challacombe, S.J., *et al.* (2010). A biphasic innate immune MAPK response discriminates between the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* in epithelial cells. *Cell host & microbe* 8, 225-235.

## Bibliografia

Moyes, D.L., Wilson, D., Richardson, J.P., Mogavero, S., Tang, S.X., Wernecke, J., Hofs, S., Gratacap, R.L., Robbins, J., Runglall, M., *et al.* (2016). Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature* **532**, 64-68.

Murad, A.M., Leng, P., Straffon, M., Wishart, J., Macaskill, S., MacCallum, D., Schnell, N., Talibi, D., Marechal, D., Tekaia, F., *et al.* (2001). *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *The EMBO journal* **20**, 4742-4752.

Nelson, B., Kurischko, C., Horecka, J., Mody, M., Nair, P., Pratt, L., Zougman, A., McBroom, L.D., Hughes, T.R., Boone, C., *et al.* (2003). RAM: a conserved signaling network that regulates Ace2p transcriptional activity and polarized morphogenesis. *Molecular biology of the cell* **14**, 3782-3803.

Nelson, C.M. (2009). Geometric control of tissue morphogenesis. *Biochimica et biophysica acta* **1793**, 903-910.

Noble, S.M., Gianetti, B.A., and Witchley, J.N. (2017). *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nature reviews* **15**, 96-108.

Panozzo, C., Bourens, M., Nowacka, A., and Herbert, C.J. (2010). Mutations in the C-terminus of the conserved NDR kinase, Cbk1p of *Saccharomyces cerevisiae*, make the protein independent of upstream activators. *Mol Genet Genomics* **283**, 111-122.

Park, H.O., and Bi, E. (2007). Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 48-96.

Queralt, E., and Uhlmann, F. (2008). Cdk-counteracting phosphatases unlock mitotic exit. *Current opinion in cell biology* **20**, 661-668.

Racki, W.J., Becam, A.M., Nasr, F., and Herbert, C.J. (2000). Cbk1p, a protein similar to the human myotonic dystrophy kinase, is essential for normal morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* **19**, 4524-4532.

Reijntj, P., Walther, A., and Wendland, J. (2011). Dual-colour fluorescence microscopy using yEmCherry-/GFP-tagging of eisosome components Pil1 and Lsp1 in *Candida albicans*. *Yeast (Chichester, England)* **28**, 331-338.

Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science (New York, NY)* **234**, 364-368.

Santos, M.A., Cheesman, C., Costa, V., Moradas-Ferreira, P., and Tuite, M.F. (1999). Selective advantages created by codon ambiguity allowed for the evolution of an alternative genetic code in *Candida* spp. *Molecular microbiology* **31**, 937-947.

Santos, M.A., and Tuite, M.F. (1995). The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* **23**, 1481-1486.

## Bibliografía

Saputo, S., Kumar, A., and Krysan, D.J. (2014). Efg1 directly regulates ACE2 expression to mediate cross talk between the cAMP/PKA and RAM pathways during *Candida albicans* morphogenesis. *Eukaryotic cell* *13*, 1169-1180.

Sarkany, Z., Silva, A., Pereira, P.J., and Macedo-Ribeiro, S. (2014). Ser or Leu: structural snapshots of mistranslation in *Candida albicans*. *Front Mol Biosci* *1*, 27.

Sasse, C., and Morschhauser, J. (2012). Gene deletion in *Candida albicans* wild-type strains using the SAT1-flipping strategy. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ *845*, 3-17.

Schaub, Y., Dunkler, A., Walther, A., and Wendland, J. (2006). New pFA-cassettes for PCR-based gene manipulation in *Candida albicans*. *J Basic Microbiol* *46*, 416-429.

Sheu, Y.J., Barral, Y., and Snyder, M. (2000). Polarized growth controls cell shape and bipolar bud site selection in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* *20*, 5235-5247.

Shou, W., Seol, J.H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z.W., Jang, J., Shevchenko, A., Charbonneau, H., and Deshaies, R.J. (1999). Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* *97*, 233-244.

Sinha, I., Wang, Y.M., Philp, R., Li, C.R., Yap, W.H., and Wang, Y. (2007). Cyclin-dependent kinases control septin phosphorylation in *Candida albicans* hyphal development. *Developmental cell* *13*, 421-432.

Song, Y., Cheon, S.A., Lee, K.E., Lee, S.Y., Lee, B.K., Oh, D.B., Kang, H.A., and Kim, J.Y. (2008). Role of the RAM network in cell polarity and hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell* *19*, 5456-5477.

Sonneborn, A., Bockmuhl, D.P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D., and Ernst, J.F. (2000). Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Molecular microbiology* *35*, 386-396.

Stegert, M.R., Hergovich, A., Tamaskovic, R., Bichsel, S.J., and Hemmings, B.A. (2005). Regulation of NDR protein kinase by hydrophobic motif phosphorylation mediated by the mammalian Ste20-like kinase MST3. *Mol Cell Biol* *25*, 11019-11029.

Stegert, M.R., Tamaskovic, R., Bichsel, S.J., Hergovich, A., and Hemmings, B.A. (2004). Regulation of NDR2 protein kinase by multi-site phosphorylation and the S100B calcium-binding protein. *The Journal of biological chemistry* *279*, 23806-23812.

Stegmeier, F., and Amon, A. (2004). Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annual review of genetics* *38*, 203-232.

Stegmeier, F., Visintin, R., and Amon, A. (2002). Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase. *Cell* *108*, 207-220.

## Bibliografía

Sudbery, P. (2007). Morphogenesis of a human fungal pathogen requires septin phosphorylation. *Developmental cell* 13, 315-316.

Sudbery, P., Gow, N., and Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 12, 317-324.

Sudbery, P.E. (2001). The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Molecular microbiology* 41, 19-31.

Sudbery, P.E. (2011). Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature reviews* 9, 737-748.

Sullivan, M., and Morgan, D.O. (2007). A novel destruction sequence targets the meiotic regulator Spo13 for anaphase-promoting complex-dependent degradation in anaphase I. *The Journal of biological chemistry* 282, 19710-19715.

Tamaskovic, R., Bichsel, S.J., and Hemmings, B.A. (2003). NDR family of AGC kinases--essential regulators of the cell cycle and morphogenesis. *FEBS letters* 546, 73-80.

Tang, S.X., Moyes, D.L., Richardson, J.P., Blagojevic, M., and Naglik, J.R. (2016). Epithelial discrimination of commensal and pathogenic *Candida albicans*. *Oral diseases* 22 Suppl 1, 114-119.

Tapon, N., Harvey, K.F., Bell, D.W., Wahrer, D.C., Schiripo, T.A., Haber, D.A., and Hariharan, I.K. (2002). *salvador* Promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell* 110, 467-478.

Toyn, J.H., Johnson, A.L., Donovan, J.D., Toone, W.M., and Johnston, L.H. (1997). The Swi5 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* has a role in exit from mitosis through induction of the cdk-inhibitor Sic1 in telophase. *Genetics* 145, 85-96.

Traverso, E.E., Baskerville, C., Liu, Y., Shou, W., James, P., Deshaies, R.J., and Charbonneau, H. (2001). Characterization of the Net1 cell cycle-dependent regulator of the Cdc14 phosphatase from budding yeast. *The Journal of biological chemistry* 276, 21924-21931.

van het Hoog, M., Rast, T.J., Martchenko, M., Grindle, S., Dignard, D., Hogues, H., Cuomo, C., Berriman, M., Scherer, S., Magee, B.B., *et al.* (2007). Assembly of the *Candida albicans* genome into sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. *Genome biology* 8, R52.

Verde, F., Wiley, D.J., and Nurse, P. (1998). Fission yeast orb6, a ser/thr protein kinase related to mammalian rho kinase and myotonic dystrophy kinase, is required for maintenance of cell polarity and coordinates cell morphogenesis with the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7526-7531.

Vertii, A., Kaufman, P.D., Hehnlly, H., and Doxsey, S. (2018). New dimensions of asymmetric division in vertebrates. *Cytoskeleton* (Hoboken, NJ) 75, 87-102.

Walther, A., and Wendland, J. (2003). An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Curr Genet* 42, 339-343.

## Bibliografía

Wang, A., Lane, S., Tian, Z., Sharon, A., Hazan, I., and Liu, H. (2007). Temporal and spatial control of *HGC1* expression results in Hgc1 localization to the apical cells of hyphae in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* *6*, 253-261.

Wang, A., Raniga, P.P., Lane, S., Lu, Y., and Liu, H. (2009). Hyphal chain formation in *Candida albicans*: Cdc28-Hgc1 phosphorylation of Efg1 represses cell separation genes. *Mol Cell Biol* *29*, 4406-4416.

Wang, H., Huang, Z.X., Au Yong, J.Y., Zou, H., Zeng, G., Gao, J., Wang, Y., Wong, A.H., and Wang, Y. (2016). CDK phosphorylates the polarisome scaffold Spa2 to maintain its localization at the site of cell growth. *Molecular microbiology* *101*, 250-264.

Wang, Y. (2009). CDKs and the yeast-hyphal decision. *Current opinion in microbiology* *12*, 644-649.

Wanless, A.G., Lin, Y., and Weiss, E.L. (2014). Cell morphogenesis proteins are translationally controlled through UTRs by the Ndr/LATS target Ssd1. *PloS one* *9*, e85212.

Warenda, A.J., and Konopka, J.B. (2002). Septin function in *Candida albicans* morphogenesis. *Molecular biology of the cell* *13*, 2732-2746.

Weiss, E.L. (2012). Mitotic exit and separation of mother and daughter cells. *Genetics* *192*, 1165-1202.

Weiss, E.L., Kurischko, C., Zhang, C., Shokat, K., Drubin, D.G., and Luca, F.C. (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* Mob2p-Cbk1p kinase complex promotes polarized growth and acts with the mitotic exit network to facilitate daughter cell-specific localization of Ace2p transcription factor. *The Journal of cell biology* *158*, 885-900.

Wilson, D., Naglik, J.R., and Hube, B. (2016). The Missing Link between *Candida albicans* Hyphal Morphogenesis and Host Cell Damage. *PLoS pathogens* *12*, e1005867.

Wilson, R.B., Davis, D., Enloe, B.M., and Mitchell, A.P. (2000). A recyclable *Candida albicans* URA3 cassette for PCR product-directed gene disruptions. *Yeast* (Chichester, England) *16*, 65-70.

Wilson, R.B., Davis, D., and Mitchell, A.P. (1999). Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* *181*, 1868-1874.

Woo, M., Lee, K., and Song, K. (2003). MYO2 is not essential for viability, but is required for polarized growth and dimorphic switches in *Candida albicans*. *FEMS microbiology letters* *218*, 195-202.

Wu, G. (2008). Regulation of the trafficking and function of G protein-coupled receptors by Rab1 GTPase in cardiomyocytes. *Methods in enzymology* *438*, 227-238.

Xiong, S., Lorenzen, K., Couzens, A.L., Templeton, C.M., Rajendran, D., Mao, D.Y.L., Juang, Y.C., Chiovitti, D., Kurinov, I., Guettler, S., *et al.* (2018). Structural Basis for Auto-

## Bibliografía

Inhibition of the NDR1 Kinase Domain by an Atypically Long Activation Segment. *Structure* 26, 1101-1115 e1106.

Yue, P., Zhang, Y., Mei, K., Wang, S., Lesigang, J., Zhu, Y., Dong, G., and Guo, W. (2017). Sec3 promotes the initial binary t-SNARE complex assembly and membrane fusion. *Nature communications* 8, 14236.

Zheng, X., and Wang, Y. (2004). Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. *The EMBO journal* 23, 1845-1856.

Zheng, X.D., Lee, R.T., Wang, Y.M., Lin, Q.S., and Wang, Y. (2007). Phosphorylation of Rga2, a Cdc42 GAP, by CDK/Hgc1 is crucial for *Candida albicans* hyphal growth. *The EMBO journal* 26, 3760-3769.

Zheng, X.D., Wang, Y.M., and Wang, Y. (2003). *CaSPA2* is important for polarity establishment and maintenance in *Candida albicans*. *Molecular microbiology* 49, 1391-1405.

