

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE CIENCIAS

DPTO. ANATOMÍA, BIOLOGÍA CELULAR Y ZOOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

“Análisis del papel de *RAD52* en la estabilidad genómica de *C. albicans*”.

Jonathan Gómez Raja

Directores:

Germán Larriba Calle
Encarnación Andaluz López

Badajoz, Julio de 2007

***Edita: Universidad de Extremadura
Servicio de Publicaciones***

Caldereros 2. Planta 3^a
Cáceres 10071
Correo e.: publicac@unex.es
<http://www.unex.es/publicaciones>



Departamento de Ciencias Biomédicas
Área de Microbiología
Facultad de Ciencias
Universidad de Extremadura
Avda. de Elvas s/n
06006 Badajoz

Dr. Germán Larriba Calle, Catedrático de Microbiología y Dra. Encarnación Andaluz López, Profesora Titular del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Extremadura, CERTIFICAN que:

La Tesis Doctoral titulada: “*Análisis del papel de RAD52 en la estabilidad genómica de C. albicans*”. Presentada por **Don Jonathan Gómez Raja** para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Extremadura.

Y para que así conste, expedimos y firmamos la presente certificación en Badajoz, a 21 de Junio de 2007.

Fdo: Dr. Germán Larriba Calle
Catedrático de Microbiología
Dpto. de Ciencias Biomédicas

Fdo: Dra. Encarnación Andaluz López
Profesor Titular
Dpto. de Ciencias Biomédicas

A mi madre

"Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos."

Aristóteles

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas, que de alguna u otra forma, han ayudado a la realización de este trabajo.

En primer lugar, al Prof. Dr. Germán Larriba, Catedrático de Microbiología, y director de esta Tesis, por darme la oportunidad de trabajar y aprender junto a él. Le debo el grueso de mi instrucción científica. Su apoyo, confianza, experiencia y dedicación han sido fundamentales en la realización de este trabajo.

A la Dra. Encarnación Andaluz, Profesora Titular y co-directora, por haberme enseñado todo lo que soy dentro de un laboratorio y por su trato siempre cordial y entrañable. Su colaboración en un buen número de experimentos ha incrementado sensiblemente el rendimiento de mi trabajo.

A los miembros presentes y pasados de mi grupo de investigación:

A la Dra. Toni Ciudad, por su ayuda y enseñanza constante e incondicional, sobre todo, en el difícil comienzo. Es de agradecer que me haya aguantado tanto tiempo.

A la Dra. Rosario Cueva, por sus interesantes ideas y su trato amable y afectuoso.

A Dr. Raymundo Rosas, con el que compartí los inicios de este trabajo y de quien aprendí técnicas esenciales utilizadas en el mismo.

A la ya Dra. Guadalupe Pablo, por haberme ayudado a desenvolverme correctamente en el laboratorio, y sobre todo, por su enseñanza en el reconocimiento de la naturaleza y el grado de toxicidad de los reactivos más comunes. Al ya Dr. Raúl Conde, por sus charlas y demás encuentros, que han hecho que este trabajo haya sido más llevadero. A Lidia Chico por su vitalidad y habitual buen estado de ánimo del que, en ocasiones, me he contagiado. A Belén Naranjo por su gran ayuda y contribución a este trabajo. Y a Fátima García, por haber contribuido a que vaya aprendiendo a exponer mis resultados y conocimientos.

A Leocadia Franco por su diligente y esmerada asistencia en la preparación de medios, limpieza de material científico y cuidado de la cocina, y por estar siempre al servicio de todo el personal docente-investigador. Sin olvidar su trato siempre amable.

A Belén Hermosa que ha prestado una cuidadosa e inestimable ayuda técnica en temas específicos del presente trabajo.

A nuestros colaboradores de otras Universidades:

El Dr. Richard Calderone, de la Universidad de Georgetown, Washington DC, colega y amigo del Director del Trabajo, siempre atento a proporcionar su ayuda en los más diversos temas, y de manera especial en la redacción de las publicaciones.

A Anna Selmecki y Judith Berman de la Universidad Minnesota (Minneapolis, MN) por haber realizado los experimentos de hibridación genómica comparada.

A BB Magee de la Universidad de Minnesota (Minneapolis, MN) por sugerirnos la posible heterozigosidad del gen *HIS4* y por sus sabios consejos. A Anja Forche de la misma Universidad por haber informado de otras heterozigosidades utilizadas en el presente trabajo.

A Rosana Torremocha, Maribel García y Tomás Aparicio, del la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense (Madrid), por haber realizado la secuenciación tan eficientemente.

A otros miembros de la Universidad de Extremadura:

Al Dr. Jaime Correa, por sus extensas e interesantes charlas durante los cafés, y sus buenos y valiosos consejos. A los miembros de su equipo Andrés Clemente y David Caballero, por las amenas e instructivas conversaciones en los minutos de distensión.

De manera general a los miembros Dpto. de Bioquímica, Biología Molecular y Genética por haberme prestado su ayuda en todos los momentos que la he necesitado.

A los *National Institutes of Health* que proporcionaron la mayor parte de la financiación necesaria para llevar a cabo este trabajo a través del “grant” R01.AI51949 concedido a los Dres. Richard Calderone y Germán Larriba. De estos fondos derivó la beca que he disfrutado durante la realización de este trabajo.

Por último, quisiera darle las gracias a mi familia por haberme prestado su apoyo incondicional en la nueva etapa que iniciaba, especialmente a mi madre, que ha trabajado mucho para que consiguiera esto, y muy particularmente a Belén que además de aguantarme durante todo este tiempo, ha sabido complementar su colaboración científica ya mencionada con un inestimable soporte emocional.

Gracias,

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

▪	<u>INTRODUCCIÓN</u>	15-46
1.	<i>Candida albicans</i> como problema médico.	17
2.	<i>Candida albicans</i> : características biológicas.	18
2.1.	Diploidia.	18
2.2.	Polimorfismo.	19
2.3.	Reproducción clonal y conjugación en <i>C. albicans</i> .	20
2.4.	Adaptabilidad de <i>C. albicans</i> .	21
2.4.1.	Adaptabilidad mediada por cambios en la regulación y/o expresión génica	22
2.4.2.	Adaptabilidad mediada por cambios genómicos	24
2.5.	Estructura del genoma de <i>C. albicans</i> .	25
2.6.	Dinámica genómica.	29
2.6.1.	Aneuploidías	29
2.6.2.	Translocaciones cromosómicas	32
2.6.3.	Mutación y Recombinación mitótica	33
3.	LOH y Recombinación Homóloga.	40
3.1.	Mecanismos de reparación de la rotura de la doble cadena.	41
3.1.1.	DSBR	41
3.1.2.	SDSA	42
3.1.3.	BIR	42
3.1.4.	SSA	43
4.	<i>RAD52</i> en la Recombinación Homóloga.	44
▪	<u>OBJETIVOS</u>	47-50

▪	<u>CAPÍTULO I</u>	51-80
1.	RESULTADOS CAPÍTULO I	53
1.1.	Identificación de <i>HIS4</i> como marcador heterocigótico en la cepa CAI4.	53
1.2.	Análisis genético de estos auxótrofos identifican pérdida de cromosoma y recombinación mitótica como responsable de fenómenos de LOH.	55
1.3.	Análisis de los SNPs de la ORF <i>HIS4</i> distingue dos alelos en la cepa CAI4 y su parental SC5314.	58
1.4.	Análisis funcional de los alelos <i>HIS4</i> en el linaje de la cepa SC5314.	60
1.5.	Identificación del SNP responsable de la inactivación del alelo 1.	63
1.6.	Análisis de la heterocigosidad de <i>HIS4</i> en otras cepas de <i>C. albicans</i> .	63
1.7.	Estudio de la secuencia promotora del gen <i>HIS4</i> de <i>C. albicans</i> .	67
1.7.1.	Diferencias alélicas en el promotor de <i>HIS4</i>	69
	DISCUSIÓN CAPÍTULO I	75
▪	<u>CAPÍTULO II</u>	81-114
2.	RESULTADOS CAPÍTULO II	83
2.1.	Generación de auxótrofos His ⁻ en mutantes <i>rad52-ΔΔ</i> .	83
2.2.	Los dos alelos de <i>HIS4</i> presentes en la CAI4 se encuentran también en las cepas <i>rad52-ΔΔ</i> , pero las ORFs exhiben una alta frecuencia de mutación.	85
2.3.	Las cepas auxótrofas His ⁻ derivadas de <i>rad52-ΔΔ</i> han perdido el alelo activo de <i>HIS4</i> y retienen una alta frecuencia de mutación.	86
2.4.	Los auxótrofos <i>rad52</i> His ⁻ producen revertientes His ⁺ a través de mecanismos diferentes a la restauración G929 (Gly310).	88
2.5.	La mayoría, si no todos, los auxótrofos derivados de <i>rad52Δ</i> exhiben alteraciones en sus cariotipos electroforéticos.	90
2.6.	Análisis de los reordenamientos cromosómicos en los mutantes His ⁻ <i>rad52-ΔΔ</i> .	91

2.7. Análisis de los polimorfismos de los cromosomas 4 y 5 revela que la mayoría de las cepas <i>his*</i> han perdido una copia de cada cromosoma.	96
2.8. CGH ratifica las truncaciones observadas en PFGE y delimita las zonas de rotura.	98
2.9. Los cariotipos de las cepas <i>his*</i> son altamente inestables.	102
DISCUSIÓN CAPÍTULO II	107
▪ <u>CONCLUSIONES</u>	115-118
▪ <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	119-132
I. Cepas y condiciones de cultivo.	121
II. Transformación de <i>C. albicans</i> .	122
III. Test de fluctuación.	122
IV. Análisis de la estabilidad de cariotipos.	123
V. Extracción de ácidos nucleicos y análisis.	123
a. Análisis Southern	123
b. Análisis Northern	124
c. PCR alelo-específica y RT-PCR	125
VI. Electroforesis de campo pulsante (PFGE).	126
VII. Análisis de los polimorfismos en el Cr4 y Cr5.	127
VIII. Hibridación Genómica Comparada (CGH).	128
IX. Construcción del casete de interrupción del gen <i>CaHIS4</i> .	128
X. Mutagénesis Dirigida.	129
XI. Secuenciación del gen <i>CaHIS4</i> .	130
▪ <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	133-146

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. *Candida albicans* como problema médico.

Las infecciones por hongos oportunistas, principalmente especies de *Candida*, constituyen un importante problema médico. *Candida albicans* es un hongo comensal presente en el 50-70% de la población que bajo determinadas circunstancias, tal como bajada en las defensas, se convierte en un patógeno. De hecho, es el principal patógeno fúngico del hombre, responsable de hasta el 8% de las infecciones en sangre, principalmente en pacientes inmunocomprometidos (Calderone, 2002). Aproximadamente el 70% de las mujeres adultas sufren algún proceso de candidiasis vulvovaginal a lo largo de su vida y se ha estimado que un 85-90% de los pacientes de SIDA desarrollan candidiasis oral, esofágica, y/o vulvovaginitis, la mayoría causadas por *C. albicans* (Larriba *et al.*, 2000; Calderone, 2002).

La candidiasis puede presentarse como una infección superficial (piel o mucosas) o invasiva. La candidiasis superficial ocurre principalmente en pacientes con SIDA mientras que la invasiva es común en pacientes con trasplantes o individuos sometidos a inmunosupresión. En enfermos de SIDA, la frecuencia de lesiones orales y la posibilidad de candidiasis se incrementa con la progresión y la severidad de la enfermedad (Capoluongo *et al.*, 2000; Tsang y Samaranayake, 2000). La terapia de la candidiasis es problemática. El uso de polienos, como anfotericina B, conduce a disfunción renal y hepática, aparte de ser poco efectivos en el tratamiento de la candidiasis oroesofágica (Philpott-Howard *et al.*, 1993). Los polienos han sido sustituidos por azoles, que son menos tóxicos, pero su uso ha conducido a la aparición de cepas resistentes cuyo aislamiento se ha incrementado sustancialmente, especialmente en enfermos de SIDA adultos (Morschhauser, 2002; White *et al.*, 1998). En los últimos años se han desarrollado mejores y más potentes compuestos azólicos, apareciendo incluso nuevas familias de agentes antifúngicos; como las esquinocandinas. Entre estos compuestos, cabe destacar la caspofungina, que actualmente se utiliza para el tratamiento de aspergilosis y candidiasis invasiva. Parece ser tan eficaz como la Anfotericina B y poseer menos efectos secundarios; aunque también presenta toxicidad (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2001).

2. *Candida albicans*: características biológicas

C. albicans es un organismo interesante del que podemos destacar cuatro características: diploidía, polimorfismo, reproducción predominantemente clonal, y adaptabilidad.

2.1. *Diploidia*

C. albicans normalmente existe en estado diploide sin que se haya descrito fase haploide (Scherer and Magee, 1990). Las primeras evidencias de la diploidía de este hongo fueron aportadas por Olaiya y Sogin (1979) quienes, tras cuantificar el DNA en varias cepas utilizando microfluorometría, encontraron que contenían aproximadamente la misma cantidad de DNA que un diploide de *S. cerevisiae*. Poco después, las cinéticas de reasociación (que utilizan la hibridación DNA-DNA para determinar el contenido de DNA haploide) revelaron un valor de 18 pg, mientras que la cantidad de DNA por célula determinada químicamente fue aproximadamente el doble (37 pg) (Riggsby *et al.*, 1982; Riggsby, 1990). Estos resultados complementaron estudios genéticos previos realizados por Whelan y colaboradores (Whelan *et al.*, 1980; Whelan and Magee, 1981), quienes mostraron que cuando una población de células de *C. albicans* se trataba con moderadas dosis de luz UV originaba un limitado espectro de auxótrofos. Además, el patrón de auxotrofia fue específico de cada cepa; es decir, para una cepa particular, el tratamiento con luz UV resultó siempre en el mismo espectro auxotrófico (Whelan, 1987). La situación es por tanto diferente a la descrita para células haploides de *S. cerevisiae*, donde el mismo tipo de tratamiento genera un muy amplio espectro de auxótrofos. La explicación más probable es que *C. albicans* exhiba una heterozigosidad natural para algunos marcadores. En un diploide heterozigótico para un marcador particular, bajas dosis de luz UV resultan en un entrecruzamiento mitótico. Ambos alelos recesivos pueden segregarse juntos lo que resulta en una progenie con un fenotipo alterado (auxotrofia u otro fenotipo). Tras el suave tratamiento con luz UV, se encuentran frecuentemente colonias sectoreadas. Un sector está formado por células que expresan el nuevo fenotipo (-/-) y el otro por células homocigóticas para el alelo prototrófico (+/+) (“twin spots”). Células procedentes de los sectores que exhiben el nuevo fenotipo no revierten al fenotipo parental tras un nuevo tratamiento con luz UV,

lo que indica que son homocigóticas recesivas para un gen particular. Además, Whelan y Soll (1982) observaron que la homocigosis se extendía frecuentemente a varios marcadores distales al marcador auxotrófico bajo estudio, lo que sugiere que ha ocurrido un entrecruzamiento mitótico entre cromátidas no hermanas.

2.2. Polimorfismo

C. albicans es un organismo polimórfico que puede cambiar de una fase levaduriforme, formada por levaduras también conocidas como blastosporas, a una morfología filamentosa que puede estar formada por cadenas de células elongadas, conocidas como pseudohifas, o por verdaderas hifas.

Las células levaduriformes y las pseudohifas de *C. albicans* son similares en tamaño a las de *S. cerevisiae* (Berman, 2006). Las células levaduriformes crecen gemando asimétricamente, formando colonias lisas. Los anillos de septina aparecen antes de que emerja la yema (Warenda and Konopka, 2002), y el núcleo se divide a través del cuello de ésta (Sudbery, 2001). La emergencia de la yema coincide con el inicio de la replicación del DNA (START, transición entre la fase G1 y S del ciclo celular) y la duplicación del huso acromático (Hazan et al., 2002). Las células levaduriformes se separan después de la citocinesis, cuando las células hijas no tienen aún el tamaño de sus células madres (Berman, 2006).

Las pseudohifas de *C. albicans* geman con un patrón unipolar. Las células quedan adheridas después de la citocinesis, formando cadenas ramificadas de células elongadas y constricciones en los septos, originando colonias rugosas (Berman, 2006). Como en las células levaduriformes, el anillo de septina se forma antes de la emergencia de la yema, y el núcleo se divide a través del cuello de ésta (Sudbery, 2001). Al igual que ocurre en las pseudohifas de *S. cerevisiae*, las pseudohifas de *C. albicans* pasan más tiempo creciendo de manera polarizada, teniendo una fase G2 mucho más larga que las células levaduriformes (Berman, 2006).

Las hifas son más estrechas que las pseudohifas (cerca de 2µm), y tienen las paredes paralelas sin constricciones en los septos de unión entre células. La evaginación y elongación del tubo germinativo ocurre sin solución de continuidad, comenzando antes del inicio del ciclo y continuando durante la citocinesis (Sudbery et al., 2004). La formación del anillo de septina, que ocurre mientras la punta de la hifa pasa el “pre-

septo” (presunto septo), el sitio donde la separación tendrá lugar, se produce coordinadamente con otros eventos de START. El núcleo migra y se divide en el tubo germinativo, normalmente a través del pre-septo (Finley and Berman, 2005).

2.3. Reproducción clonal y conjugación en *C. albicans*.

Los primeros estudios de genética de poblaciones analizaron los haplotipos de 21 *loci* utilizando análisis de restricción y concluyeron ausencia total de recombinación, por lo que se atribuyó a *C. albicans* una reproducción exclusivamente clonal (Pujol *et al.*, 1993). Posteriormente, otros estudios usando métodos de genotipado basados en el análisis de marcadores bi-alélicos en aislados clínicos de *C. albicans* mediante RADP (DNA polimorfo amplificado aleatoriamente; Graser *et al.*, 1996), o MLST (Multi-Locus Sequence Typing; Tavanti *et al.*, 2004; Odds *et al.*, 2007) han encontrado trazas de recombinación entre alelos, y sugieren que la reproducción sexual u otras formas de intercambio genético ocurren en esta especie. Estos resultados indican que, aunque en la naturaleza las poblaciones de *C. albicans* son sobre todo clonales, puede existir una baja frecuencia de reproducción sexual. Sin embargo, no se ha encontrado evidencia de meiosis, por lo que posiblemente la recombinación observada ocurre vía recombinación mitótica. De hecho, hasta el año 1999 se pensaba que *C. albicans* carecía totalmente de sexualidad. Sin embargo, Hull y Johnson (1999) reportaron la presencia de un *locus* que codifica homólogos de los reguladores transcripcionales de *S. cerevisiae* $a1$, $\alpha1$ y $\alpha2$, asociados en dos *loci*, *MTLa* y *MTL α* . Más tarde se ha identificado también $a2$ asociado a *MTLa* (Bennett y Johnson, 2005). Subsecuentemente, Hull *et al.*, (2000) y Magee y Magge (2000) demostraron que células homocigóticas para *MTL α* podían conjugarse con células homocigóticas para *MTLa*, pero no conjugaban con células del mismo tipo sexual. Más recientemente, Miller y Johnson (2002) demostraron que el *locus MTL* controla tanto el *switching* blanco/opaco (véase más adelante) como el tipo sexual, puesto que el heterodímero $a1\alpha2$ reprime el *switching* y sólo las células opacas conjugan eficientemente. Puesto que las células homocigóticas para el *locus MTL* carecen del heterodímero, pueden realizar *switching* y conjugarse. Aunque la correlación entre *switching* y conjugación no es absoluta (Legrand *et al.*, 2004), en la mayoría de los casos el *switching* parece ser un requerimiento que precede a la conjugación (Soll,

2004). Las células homocigóticas para el *MTL* pueden surgir de tetraploides mediante pérdida de cromosomas o meiosis, pero también de diploides por pérdida de una copia del cromosoma 5, conversión génica o delección de un alelo. La conversión de tetraploides a diploides parece ocurrir a través de un ciclo parasexual, y la meiosis parece descartada, no solo porque aún no ha sido demostrada, sino porque *C. albicans* carece de los homólogos de varios genes esenciales para meiosis en *Saccharomyces cerevisiae* (Andaluz *et al.*, 1996; 2001; Tzung *et al.*, 2001). La parasexualidad puede resultar en nuevas combinaciones de cromosomas o fragmentos *SfiI* que podrían aportar alguna variabilidad genética a la especie. Sin embargo, un análisis de la distribución de dos marcadores localizados en el cromosoma 1 (*GALI* y *HOP1*) indicó que los cromosomas parentales siempre cosegregaban y no se encontraron indicios de recombinación (Bennet y Johnson, 2003). En estos estudios, se analizó la descendencia de cruces de homocigóticos *gal1/gal1 hop1/hop1* x *GALI/GALI HOP1/HOP1* o heterocigóticos recíprocos *gal1/gal1 HOP1/HOP1* x *GALI/GALI hop1/hop1*; encontrándose que todas las células Gal⁻ (*gal1/gal1*) seleccionadas por crecimiento en 2DOG (2-deoxi-D-galactosa; tóxico para las células Gal⁺) el alelo recesivo *gal1* estaba siempre asociado al alelo *hop1Δ* en el primer cruzamiento, y al alelo silvestre (*HOP1*) en el segundo. Por tanto, la aportación de la recombinación a la variabilidad genética del organismo durante el ciclo sexual es incierta. Además, se estima que la frecuencia de conjugación de *C. albicans* en el huésped es extremadamente baja (Magee y Magee, 2000).

2.4. Adaptabilidad de *C. albicans*.

Candida albicans es un organismo capaz de crecer y adaptarse a multitud de nichos en el cuerpo humano, así como a diferentes medios y condiciones de cultivo (Calderone, 2002). En el laboratorio, este hongo demuestra una impresionante capacidad para prosperar en condiciones de extremo pH y temperatura (Odds *et al.*, 1989; Rustchenko-Bulgac & Howard, 1993). *C. albicans* es capaz de utilizar diferentes fuentes de carbono generalmente no utilizables, como L-sorbose y D-arabinosa, así como adaptarse para crecer en el antifúngico fluconazol, o en el ácido 5-Fluoro-otico (5-FOA) en donde se seleccionan cepas que han adquirido resistencia a estos agentes (Rustchenko *et al.*, 1994; Janbon *et al.*, 1998; Perepnikhatka *et al.*, 1999; Wellington

and Rustchenko, 2005). Parte de esta adaptabilidad proviene de cambios, más o menos reversibles en la expresión génica; sin embargo, existen evidencias de que parte de la misma tiene su origen en cambios genéticos.

2.4.1. Adaptabilidad mediada por cambios en la regulación y/o expresión génica.

Una de las manifestaciones de cambios reversibles lo constituye la denominada transición dimórfica, es decir el paso de levadura a hifa o viceversa. Esta transición se produce como respuesta a cambios ambientales que al ser captados por sensores originan una señal que es transducida mediante un sistema de quinasas hasta llegar a los reguladores transcripcionales. Estos modulan la expresión de genes responsables del desarrollo del programa hifal, incluida la polarización del crecimiento (Chio, 2004). Se han identificado los factores ambientales que propician este cambio, así como gran parte de las proteínas que intervienen en las rutas de transducción de señales (Chio, 2004; Sudbery *et al.*, 2004). Ciertos mutantes en estas proteínas (ej., *efg1*) no sólo son incapaces de realizar la transición dimórfica, sino que son avirulentos (Lo *et al.*, 1997). Se cree que solo aquellas cepas que tienen la habilidad de crecer en un gran repertorio de formas morfológicas vegetativas, levadura, pseudohifa, e hifa verdadera, pueden ser virulentas (Gow *et al.*, 2002; Saville *et al.*, 2003). Existe evidencia de que la formación de hifas permite la evasión de las células fagocitadas, mientras que las células levaduriformes se diseminan a través del torrente sanguíneo (Gow *et al.*, 2002). En la Tabla 1 se resumen algunas de las condiciones que determinan cada una de las morfologías.

Levaduras	Hifas	Pseudohifas
<ul style="list-style-type: none"> • T^a de incubación ≤ 30°C, pH 4 • Densidad celular > 10⁷ células/ml • Elevada concentración de Glucosa (>200 mM) • Linfocitos: γ interferon 	<ul style="list-style-type: none"> • Medio Lee, 37° C, pH ≥ 6.8 • Presencia de suero, T^a>34° C • N-acetilglucosamina, T^o >34° C • Cambio de pH ácido a pH neutro • Glucosa (0.013-20 mM), pH 7-8, T^a >37°C • Concentraciones limitantes de Nitrógeno (medio SLADH) • Aminoácidos: Prolina y Metionina 	<ul style="list-style-type: none"> • pH 6, T^a ≈ 35° C • Concentraciones limitantes de Nitrógeno (medio SLADH) • Alta concentración de fosfatos (hasta 600 mM) • Carencia de aminoácidos

Tabla 1: Efecto de diferentes condiciones ambientales en la morfología celular de *C. albicans* (Chio, 2004; Sudbery *et al.*, 2004; Ernst, 2000).

Un segundo ejemplo de adaptación por cambios reversibles en la expresión génica lo constituye el *switching white/opaque* (Soll, 2002). El “switching white/opaque”, descrito por Soll y colaboradores (1987), es un cambio reversible entre dos estados heredables conocidos como blanco (white) y opaco (opaque). El fenómeno ha sido estudiado principalmente en la cepa WO-1, llamada así por su capacidad para producir el cambio blanco (White) a opaco (Opaque). Las colonias blancas y opacas son fácilmente distinguibles por sus morfologías: las colonias opacas y sectores opacos son aplastados, y con aspecto más oscuro que las típicas domas de las colonias blancas de *C. albicans* que crecen en el laboratorio. Cuando una colonia de células blancas WO-1 se resuspende y plaquea en un medio estándar de laboratorio, la mayoría de las colonias resultantes son blancas. Sin embargo, unas pocas colonias son opacas, y algunas colonias son blancas con sectores opacos. De igual manera, cuando una colonia opaca se resuspende y se plaquea, la mayoría de las colonias son opacas pero unas cuantas son completamente blancas. Las células opacas son por lo general mayores y más elongadas que las blancas, y su superficie aparece salpicada con estructuras conocidas como granos (“pimples”) cuando se observan al microscopio de barrido. El mecanismo que controla el *switching* no es conocido. Recientemente, se ha encontrado un *locus* maestro que se autorregula, *WORI*, y cuando se incrementa su expresión induce el cambio *white/opaque* (Huang *et al.*, 2006; Zordan *et al.*, 2006; Srikantha *et al.*, 2006). El cambio es heredable y dura unas pocas generaciones, por lo que se considera un fenómeno epigenético. Las células opacas son inestables y poco virulentas en infecciones sistémicas, pero más persistentes y virulentas en infecciones superficiales. Esta observación sugiere que están especializadas para ocupar diferentes nichos en el huésped. Sin embargo, una característica curiosa del *switching* es que sólo unos pocos aislados de *C. albicans* pueden sufrir la transición. La mayoría de los aislados clínicos no hacen *switching* y permanecen confinados a la fase blanca. La razón de esto se hizo aparente cuando se descubrió la relación entre el *switching*, el *locus MTL* y la conjugación gracias a una observación fortuita. La cepa común de laboratorio CAI4, que no sufre *switching*, se manipuló para crear células α y células α mediante deleciones de genes del *locus MTL*. A diferencia de sus progenitoras, estas cepas experimentaban *switching* similar al clásico de la cepa WO-1. Se encontró que dos reguladores transcripcionales codificados por el *locus MTL*, las proteínas homeodominio $\alpha 1$ y $\alpha 2$, trabajan juntas para reprimir el *switching*. Esta idea encajaba en el extenso cuerpo

doctrinal procedente del análisis genético y bioquímico en *S. cerevisiae*. Esta levadura forma un heterodímero $\alpha 1\alpha 2$ que reprime un conjunto de genes (Dranginis, 1990).

Dado que las células de la cepa CAI4 contienen ambos alelos *MTL*, son incapaces de experimentar el *switching* w/o y, a menos que se conviertan en α ó α , permanecen confinadas a la fase blanca. Sin embargo, sería de esperar que los aislados naturales de *C. albicans* que carezcan de *MTL* $\alpha 1$ o *MTL* $\alpha 2$ sufrieran el *switching* w/o. En concordancia con esta predicción la cepa WO-1 carecía de *MTL* $\alpha 1$ (Slutsky *et al.*, 1987). Esta observación se ha extendido a muchas cepas de *C. albicans*; dos estudios independientes han mostrado que aproximadamente un 6% de los aislados clínicos son homocigóticos a/a o α/α para el *locus MTL* y la mayoría de estos pueden experimentar el *switching* w/o (Miller and Johnson, 2002). Por el contrario, no se ha observado ningún heterocigótico estable a/α que forme colonias opacas. Estos estudios demuestran que existen cepas a y cepas α en la naturaleza, y que su conducta en el *switching* está controlada por el *locus MTL*. Además muchos de los a/a y α/α naturales son capaces de conjugarse (Bennett and Johnson, 2005).

Un punto importante es que esta variabilidad fenotípica, representada por la transición dimórfica y el *switching*, implica cambios en la expresión de una serie de genes, pero no reordenamientos extensivos de DNA.

2.4.2. Adaptabilidad mediada por cambios genómicos

Las primeras evidencias de cambios en el genoma *in vivo* provienen de estudios de polimorfismo de restricción con la sonda Ca3, que indicaban cambios en el tamaño de los fragmentos de una región altamente polimórfica en cepas aisladas sucesivamente en pacientes con vaginitis (Lockhart *et al.*, 1996). Posteriormente estas observaciones se extendieron a los cariotipos, observándose alta variabilidad entre los aislados clínicos mientras que en las cepas de laboratorio el cariotipo era bastante estable. Más recientemente, se han observado cambios más sutiles en forma de mutaciones puntuales, y pequeñas deleciones o inserciones durante el curso de la infección, acompañadas o no por cambios en los cariotipos. Para entender este tipo de cambios debemos analizar en detalle el genoma de *C. albicans*.

2.5. Estructura del genoma de *C. albicans*.

El genoma diploide de *C. albicans* contiene 8 pares de cromosomas homólogos, que varían en tamaño de 4.3 a 0.98 Mb, lo que resulta en un tamaño total de 32 Mb de genoma diploide. Los cromosomas son numerados del 1 al 7, siendo el 1 el mayor y el 7 el de menor tamaño. El cromosoma R, el cual contiene el rDNA (DNA ribosómico), es en algunas ocasiones el más largo, ya que el tamaño varía espontáneamente según la cantidad de repeticiones de genes rDNA existentes (Iwaguchi *et al.*, 1992). Además, estos cromosomas contienen algunas características especiales, como la naturaleza de las repeticiones subteloméricas conocidas como CARE-2 (Lasker *et al.*, 1992) y Rel-2 (Thrash-Bingham and Gorman, 1993). El telómero de *C. albicans* es único tanto por la secuencia de las repeticiones de este complejo telomérico como por la naturaleza de las repeticiones subteloméricas (McEachern and Hicks, 1993). Siete de los cromosomas tienen una o más copias de otro complejo de repeticiones llamado MRS (Major Sequences Repeat; Chu *et al.*, 1993), y todos al menos contienen una copia de una parte de esta secuencia. Además, *C. albicans* tiene más de 350 inserciones de retrotransposones LTR (Long Terminal Repeat), además de *non-LTR* (sin LTR) y transposones DNA (Goodwin y Poulter, 2000). La mayoría de las familias de retrotransposones están presentes en varias copias (desde 3 hasta más de 200; Goodwin and Poulter, 2000).

En el año 2004 se publicó la secuencia del genoma de la cepa SC5314 con un nivel de cobertura de 10.7x que fue el resultado del esfuerzo común de 43 investigadores (Jones *et al.*, 2004; Braun *et al.*, 2005). Esta secuencia reveló una sorprendente cantidad de heteroziguidad para un organismo con un método de reproducción predominantemente clonal. Por ello, se publicó un ensamblaje diploide, con regiones alélicas de alta heteroziguidad ensambladas como *contigs* homólogos. Este ensamblaje contenía 412 supercontigs, de los cuales 292 estaban representados por 146 pares de homólogos con alto nivel de heteroziguidad y 120 carecían de heteroziguidad significativa. Aunque la fracción del genoma que muestra una heteroziguidad significativa es difícil de estimar, se han reportado más de 62000 heteroziguidades (Jones *et al.*, 2004), aproximadamente 1 por cada 237 pb. En total se anotaron 6354 genes, un gen por 2342 pares de bases.

La mencionada heteroziguidad no está distribuida de igual manera a lo largo del genoma. Los cromosomas 5 y 6 son los más heterogéneos, y el 3 y el 7 los que menos.

La heterozigosidad en el cromosoma 5 incluye el *Mating Type-Like Locus* (*MTL locus*; Hull and Jonson, 1999), que posee dos alelos, llamados *MTIa* y *MTLa* formando un bloque de 8742 y 8861 pb respectivamente en cada uno de los homólogos del cromosoma 5 (Hull *et al.*, 2000). Esta alta heterozigosidad incluye inserciones y deleciones, inversiones, y polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism*, SNP; Jones *et al.*, 2004). El análisis de la secuencia del genoma de la cepa SC5314 de *C. albicans* reveló la existencia de un mínimo de 55700 SNPs en el genoma (Jones *et al.*, 2004). Actualmente disponemos de un mapa de SNPs distribuidos en los 8 cromosomas (Forche *et al.*, 2003, 2004, 2005) La mayoría de ellos se encuentran en regiones intergénicas. Sin embargo, 3,579 ORFs contenían polimorfismos, de los cuales 2,792 alteraban la proteína correspondiente (Jones *et al.*, 2004). Por tanto, el 40 % de las ORF existentes en *C. albicans* son diferentes en su secuencia proteica (Braun *et al.*, 2005), lo cual proporciona una explicación parcial a la obligada diploidía de este organismo. Varios pares de ORFs heterozigóticas pueden codificar genes esenciales, y su localización como alelos podría hacer imposible la pérdida de cualquiera de los homólogos del cromosoma en el que aquéllas residen. Sin embargo, existen evidencias de que en diferentes cepas pueden perderse ocasionalmente los cromosomas 3, 4, 5, parte del 6, y 7 sin conducir a letalidad, lo que indica que cualquier par de alelos haploletales conservados deben estar en uno u otro homólogo. Por supuesto, el modo de crecimiento clonal y el alto nivel de variaciones cromosómicas hacen que las divergencias entre alelos puedan variar entre aislados. En consecuencia, la facultad para perder un cromosoma particular parece ser específica de cada cepa. Una de las funciones de la heterozigosidad puede ser aportar variabilidad genética, y que los denominados “alelos”, debido a que ocupan posiciones equivalentes en el genoma, pueden codificar proteínas con diferente función. En otras ocasiones, parece que la presencia de dos alelos es necesaria para llevar a cabo funciones normales debido a problemas de dosis génica, lo que sugiere que su expresión está muy finamente regulada. En estos casos, es de esperar que la disrupción de cualquiera de los alelos ya origine fenotipo. Esta posibilidad ha recibido apoyo experimental en un escrutinio de genes que se mostraban haploinsuficientes para llevar a cabo filamentación normal utilizando mutagénesis mediada por transposón. Este ensayo identificó 146 genes haploinsuficientes para la filamentación, y el número total puede ser cerca de tres veces mayor (Uhl *et al.*, 2003).

La heterocigosidad en un organismo diploide sin un ciclo sexual plantea la pregunta de cómo puede determinarse el haplotipo. Tavanti y colaboradores (2003) usaron MLST como modelo de identificación de cepas, y posteriormente fue aplicado para investigar la frecuencia de recombinación (Tavanti *et al.*, 2004). Este método implica la amplificación de las regiones variables (usualmente SNPs) mediante PCR seguida de la secuenciación del producto, y de hecho fue el que se usó para confeccionar el actual mapa de SNP desarrollado por Forche y colaboradores (2004). Desafortunadamente, este método requiere una gran cantidad de datos y proporciona haplotipos para una limitada región, no para todo el cromosoma. Se pueden obtener haplotipos completos para el cromosoma 5, ya que las cepas pueden llegar a ser homocigóticas para este cromosoma por crecimiento en sorbosa. Sin embargo, el haplotipo reportado incluye un limitado número de SNPs (Forche *et al.*, 2005).

La inexistencia de un mapa físico completo y la presencia de bloques de repeticiones de DNA de longitud superior a la que proporciona una carrera de secuenciación imposibilitan finalizar la secuencia y conectar los super-contigs en un mapa completo de cada cromosoma. El único cromosoma finalizado es el 7, el más pequeño, cuyo mapeo se inició en 1998 y se ha finalizado en 2005 (Chibana *et al.*, 2005).

De las varias características específicas mencionadas del genoma de *C. albicans*, describiremos en cierta extensión la MRS por su relación con el presente trabajo. Existen 9 copias de este complejo por genoma haploide (Chindamporn *et al.*, 1995). Un fragmento de 8 Kb (HOK) y otro de 6 Kb (RB2) flanquean una repetición de 2 Kb (RPS), que incluye entre 7 y 9 copias de una secuencia repetida de 16 pb (COM16) y entre 6 y 8 copias de una secuencia de 29 pb (COM29, que contiene un sitio *Sfi*I) (Fig. 1). Las dos secuencias COM aparecen juntas en el inicio de la MRS y entre 3 y 4 veces en el interior de la misma, donde se asocian con una secuencia de 144 pb llamada "alt". Estas COMs son invariables, pero existen pequeñas diferencias en las secuencias "alt", que aparecen en diferentes combinaciones en las RPS de diferentes cromosomas (Chibana *et al.*, 1994). La heterogeneidad en el tamaño de las MRS es la principal causa de polimorfismos de longitud de los cromosomas (CLP; *Chromosomal Length Polimorphism*) en *C. albicans* (Chibana *et al.*, 2000). Al igual que el rDNA, la MRS parece poder expandirse o contraerse aumentando o disminuyendo el número de subunidades RPS durante la mitosis, aunque, al igual que en el caso del rDNA, el mecanismo por el cual esto ocurre no está claro.

La MRS se ha implicado en dos procesos que causan reordenamientos en el genoma: translocación cromosómica y pérdida de cromosoma. Chu *et al.* (1993), demostraron traslocación cromosómica mediante el examen de los cariotipos de dos cepas no relacionadas, 1006 y WO-1, usando PFGE (*Pulse-Fields Gel Electrophoresis*; electroforesis de campo pulsante), digestión con *Sfi*I, e hibridaciones *Southern* con sondas de marcadores cromosómicos y de sus fragmentos *Sfi*I. Las translocaciones parecen ocurrir en las MRS o cerca. Esto no fue específico de estas cepas, ya que estas translocaciones han sido encontradas en otras cepas (Chu *et al.*, 1993; Chibana *et al.*, 2000; Navarro-García *et al.*, 1995). El papel exacto de las MRS no está claro, pero se ha sugerido que la rotura en la doble cadena dentro de su secuencia puede conducir a translocación (Barton and Scherer, 1994; Iwaguchi *et al.*, 2004).

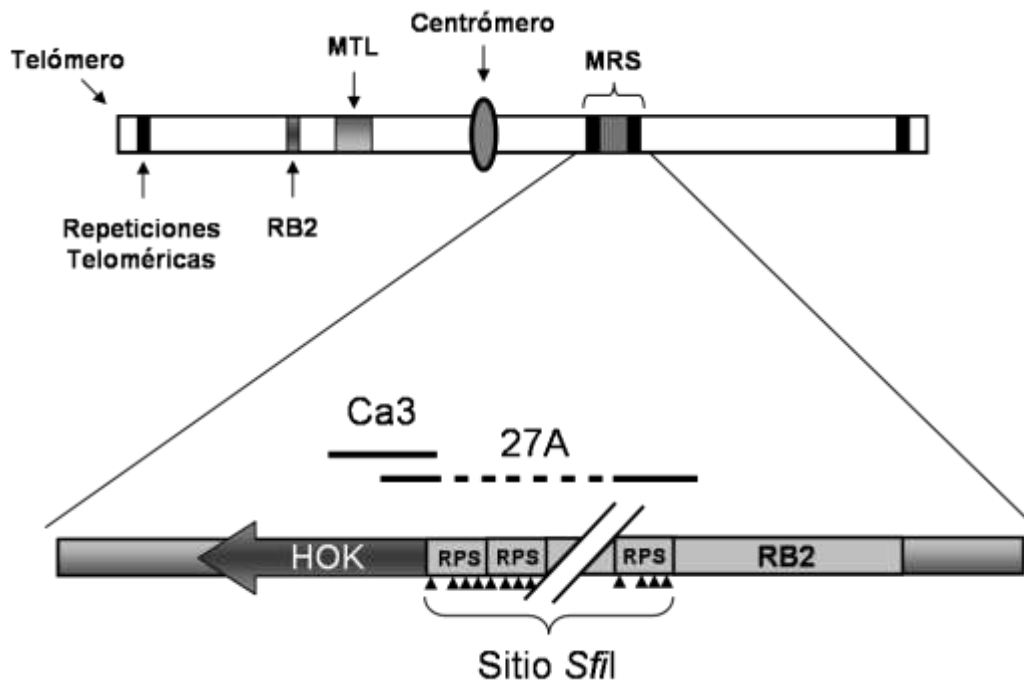


Fig. 1: Esquema detallado de la MRS en un cromosoma de *C. albicans* (cromosoma 5). Se muestra también la posición de las sondas Ca3 y 27A que generan RFLPs. La rotura en el medio del esquema indica que el número de estas repeticiones pueden variar.

La segunda clase de reordenamientos genómicos en los que parece estar involucrada la MRS es la pérdida de cromosoma. Lephart y colaboradores (2005) mostraron que la frecuencia de pérdida del cromosoma 5, que puede seleccionarse por crecimiento en sorbosa, estaba directamente relacionada con el tamaño de la MRS, siendo el Cr5 con la MRS más larga el que preferentemente se pierde.

2.6. Dinámica genómica.

La mayoría de las características del genoma descritas son responsables de la alta variabilidad genética del organismo. Las primeras evidencias de esta variabilidad proceden de análisis de los cariotipos de aislados clínicos y mutantes surgidos de los mismos en el laboratorio. Aunque la mayoría de las cepas exhibe un cariotipo estándar y lleva dos copias de cada cromosoma, translocaciones recíprocas pueden originar cromosomas quiméricos que se manifiestan como nuevas bandas. La mayoría de las translocaciones están propiciadas por secuencias especiales, principalmente las MRS (Chu *et al.*, 1993). Además, el tamaño de cada cromosoma no es fijo. Los cambios en la longitud de un determinado cromosoma dan lugar a polimorfismos (CLP). Por ejemplo, el número de copias de los genes rDNA influye en el tamaño de los homólogos del cromosoma R (Iwaguchi *et al.*, 1992) y la variación en la longitud de los telómeros puede contribuir a CLP de varios cromosomas (McEachern and Hicks, 1993). Otras secuencias esparcidas por el genoma, en concreto los elementos Ty y retrotransposones sin LTR (*non-LTR*) pueden contribuir a CLP y translocaciones. Finalmente, pérdida o duplicación de ciertos cromosomas origina frecuentemente aneuploidías (Larriba, 2004).

2.6.1. Aneuploidías

Como hemos mencionado anteriormente, *C. albicans* es diploide. Sin embargo la ploidía no es fija. Además, las alteraciones en la misma no se restringen a aislados naturales sino que ocurren en mutantes morfológicos y nutricionales espontáneos aislados en el laboratorio. Ya en los años 80 se describió una cepa con un contenido en DNA inestable. Se especuló que sufría una mutación en un gen que controlaba la ploidía (Suzuki *et al.*, 1986). Barton y Gull (1992) reportaron que el crecimiento en metilbencilamidazol carbamato (MBC) induce aneuploidía transitoria que era detectada por la aparición de un alelo recesivo *ade2* (cromosoma 3). Sin embargo, la cepa monosómica para el cromosoma 3 creció más lentamente que una cepa diploide, y bajo condiciones no selectivas, duplicó el cromosoma homólogo residual.

En la cepa WO-1 se han descrito aneuploides que han perdido la única copia del cromosoma más pequeño de la misma (una quimera 5I-6C), así como otros que la habían duplicado. Los primeros producían menos sectores opacos y menos filamentos

que la cepa original, mientras que los segundos producían más tubos germinativos (McEachern and Hicks, 1991). Sin embargo, otra variante estable de la cepa WO-1, WO-2, que había perdido tanto el cromosoma quimérico 5I-6C como el único homólogo intacto del cromosoma 7, y, en consecuencia, contenía un 10% de su genoma en estado haploide, produjo hifas y clamidosporas y llevó a cabo la transición white/opaque (Magee and Magee, 1997). Esto sugiere que aparentemente no se requiere una perfecta diploidía para realizar estos procesos.

Con frecuencia, los cambios en ploidía han sido correlacionados con la adquisición de nuevos fenotipos. Suzuki *et al.* (1989) correlacionaron cambios en la morfología colonial con alteraciones en los cariotipos. Pero el mayor esfuerzo en esta área lo han desarrollado Rutschenko y Sherman quienes propusieron que los reordenamientos cromosómicos podían ser un mecanismo para conseguir variabilidad genética en *C. albicans* (Rustchenko-Bulgac *et al.*, 1990). Los primeros experimentos describieron cambios en los cariotipos de mutantes nutricionales espontáneos con diferentes capacidades asimilatorias (Rustchenko *et al.*, 1994; Rustchenko-Bulgac and Howards, 1990). Otros experimentos fueron diseñados para analizar si la adaptación a antifúngicos u otros agentes podía estar mediada por reordenamientos cromosómicos. Así se reportó que el crecimiento prolongado de *C. albicans* en fluconazol podía conducir a la pérdida del cromosoma 4 o a una trisomía del cromosoma 3. Las células eran resistentes a fluconazol pero no se propuso ningún mecanismo de resistencia, salvo que no implicaba a *ERG11*, requerido para la biosíntesis de ergosterol, ni a los genes *MDR1* o *CDR1* y *CDR2* que codifican para componentes de las bombas de eflujo (Perepnikhatka *et al.*, 1999). En otro estudio se investigó la adaptación de seis poblaciones derivadas de un mismo aislado clínico sensible a fluconazol a concentraciones de fluconazol del doble de la MIC (concentración mínima inhibitoria), observándose adaptación a crecer en presencia de la droga (Cowen *et al.*, 2000). Tan sólo en tres de nueve muestras analizadas se observaron reordenamientos cromosómicos, y cada muestra mostró un cambio diferente. Sin embargo, cada muestra mostraba un incremento significativo en la expresión de al menos uno de cuatro genes implicados in la resistencia a azoles: *CDR1*, *CDR2*, *ERG11*, y *MDR1*. Estos resultados sugieren que los cambios cromosómicos acompañaron ocasionalmente a la adquisición de resistencia a fluconazol, pero no fueron determinantes para la misma.

La adquisición de resistencia a 5-FOA (5-FOA^R) por la cepa 3153A fue acompañada de inestabilidad en los cariotipos, pero algunos aneuploides mostraron

consistentemente una duplicación de un homólogo del cromosoma 4b o un alargamiento del cromosoma 5b. Puesto que los 5-FOA^S revertientes habían perdido el extracromosoma correspondiente, parece existir una relación causal entre las alteraciones cromosómicas mencionadas y la resistencia a 5-FOA (Wellington y Rustchenko, 2005). Sin embargo, no se analizaron las bases para la resistencia a la droga ni se reportaron análisis fenotípicos o bioquímicos de estos mutantes.

Existe, sin embargo, un caso bien estudiado en donde se ha observado una relación biunívoca entre un cambio cromosómico, monosomía del cromosoma 5, y un fenotipo determinado: la capacidad para utilizar la L-sorbosa como única fuente de carbono (Janbon *et al.*, 1998). Cuando células de diversas cepas de *C. albicans* se plaquean en medio con sorbosa en ausencia de otro azúcar, la mayoría de las células mueren pero tras unos días aparecen colonias. El análisis de los cariotipos indicó que estas cepas habían perdido un homólogo del cromosoma 5. Estas cepas crecieron más lentas que la original, de manera que cuando se crecen de nuevo en glucosa, aparecen variantes que han duplicado el homólogo residual y crecen más rápidas; estos euploides son incapaces de crecer en sorbosa. Se ha sugerido que el cromosoma 5 lleva múltiples genes de reguladores negativos que afectan la expresión de la sorbosa deshidrogenasa presente en el cromosoma 4. Un reciente trabajo ha identificado una región de 209 Kb cercana al telómero derecho que es candidata a contener los mencionados reguladores ya que su delección permite la adaptación a sorbosa (Kabir *et al.*, 2005). Apoyando esta posibilidad, un reciente estudio de adaptación de cepas *rad52* a crecer en sorbosa ha seleccionado cepas Sou⁺ que eran disómicas para el Chr5 pero uno de los homólogos estaba truncado, debido a una delección que incluía la región que de 209 kb que presumiblemente contiene los reguladores negativos (Andaluz *et al.*, 2007).

Se ha reportado que es frecuente encontrar lotes de la cepa común de laboratorio CAI4 que son trisómicas para el cromosoma 1 (Chen *et al.*, 2004). Esta trisomía surgió en la última etapa de la construcción de dicha cepa, de manera que el cultivo final era heterogéneo. Por tanto, algunas líneas de CAI-4 son trisómicas para el Chr1 (F3) y otras no (F2). Esta trisomía fue responsable de la avirulencia de la cepa en un modelo de candidiasis diseminada en ratón. Cuando la cepa inoculada era trisómica (F3) se generaron cepas euploides *in vivo*, bien surgidas en el cultivo original o durante la infección. Incluso, surgieron algunas cepas que exhibían tres copias del marcador *CZF1* presente en el cromosoma 4, posiblemente como consecuencia de la presencia de una copia extra de este cromosoma. Las alteraciones cariotípicas parecen estar causadas por

estrés dentro del huésped ya que la exposición 5-FOA o a fluconazol aumentó la frecuencia de la reversión a la disomía en las cepas trisómicas (Chen *et al.*, 2004). Estas observaciones fueron corroboradas por Selmecki *et al.*, (2005) utilizando la técnica de la hibridación genómica comparada (CGH; *Comparative Genome Hybryzation*). Además, tres cepas de CAI4 analizadas (F2, F3 y J1) fueron trisómicas para el cromosoma 2. Debemos señalar que nuestra cepa CAI4 es disómica tanto para el cromosoma 1 como para el 2. En un trabajo posterior, Selmecki y colaboradores (2006) encontraron que la aneuploidia en general es común en aislados clínicos resistentes a fluconazol. Además, en algunos casos la resistencia era debida a la formación de un isocromosoma compuesto por dos brazos derechos del cromosoma 5, y por tanto implicaba un mecanismo basado en la sobreexpresión de *ERG11* y/o *CDR*. Estas observaciones apuntan nuevamente a la importancia de los reordenamientos cromosómicos como mecanismos de adaptación de *C. albicans* al estrés y cambios ambientales que encuentra en el huésped.

Debemos concluir que, excepto para algunas aneuploidías específicas, no se ha demostrado una correlación unívoca entre alteraciones específicas en el cariotipo y un determinado fenotipo, puesto que una aneuploidía, por ejemplo, puede causar varios fenotipos diferentes al afectar a un gran número de genes, y un fenotipo dado puede estar acompañado por más de una aneuploidía, siendo posible que ninguna sea la causa del mismo (Larriba, 2004).

2.6.2. *Translocaciones cromosómicas*

Las translocaciones cromosómicas en *C. albicans* son fácilmente identificables mediante el uso de PFGE e hibridación *Southern blot* con sondas específicas (Thrash-Bingham and Gorman, 1992). Como se ha dicho anteriormente, la cepa WO-1 contiene un único cariotipo como resultado de tres translocaciones recíprocas: cromosoma 7 y 4, 5 y 6, y 5 y 1 (Chu *et al.*, 1993). En otro aislado clínico, la cepa 1001, se encontraron dos nuevas bandas cuando se comparó con la cepa 1006 como resultado de translocaciones entre los cromosomas 2 y 7 (en las MRS) (Navarro-García *et al.*, 1995). Se han encontrado además translocaciones recíprocas en los cromosoma 7 y 4 en dos cepas no relacionadas entre sí, donde una de ellas (NUM1000) fue triploide para una región del cromosoma 4 (Chibana *et al.*, 2000). En todos estos casos, las translocaciones ocurrieron por recombinación entre cromosomas no-homólogos a nivel de la MRS. En

los casos en que se analizaron en cierto detalle, las translocaciones no resultaron en la pérdida de material genético, aunque se afectó la conducta de las células. Sin embargo, dicha conducta no puede ser atribuida inequívocamente a las translocaciones, sino que como ocurre en el caso de la alta frecuencia de *switching* de la cepa WO-1, se debió a la homocigosis del locus *MTL*.

Un mutante nutricional de *C. albicans* correspondió a un aislado clínico que había perdido la capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono, incluyendo adonitol, xilitol, N-acetil-D-glucosamina y α -metil-D-glucósido, generalmente asimilables por la mayoría de las cepas de *C. albicans* (Asakura *et al.*, 1991), pero que era extremadamente virulento. PFGE reveló la presencia de 13 fragmentos cromosómicos, y el mapeo de los fragmentos *SfiI* reveló que siete de ellos eran translocaciones recíprocas que involucraban un homólogo de los cromosomas 1, 2 y 6, y ambos homólogos de los cromosomas 4 y 7. Una de las bandas estaba formada por fragmentos *SfiI* de los cromosomas 2, 4 y 7 (Iwaguchi *et al.*, 2001). De nuevo, el complicado patrón de fenotipos y de cariotipos impidió establecer una correlación entre ellos.

Las translocaciones han sido inducidas en laboratorio en varias ocasiones. Iwaguchi y colaboradores (2004) insertaron el gen *URA3* alternativamente en distintas regiones de la MRS, RUB (*URA3* clonado en RB2), RUS (en RPS), y HUK (en HOK) y encontraron diferencias en la preferencia de integración entre varios cromosomas. RUB fue encontrado en todos los cromosomas, RUS en el cromosoma 3 y 4, y HUK en todos excepto el cromosoma 1. Interesantemente, en un caso HUK se integró en el cromosoma 3, donde no existe ninguna secuencia HOK. Sin embargo, en general estos resultados pueden reflejar la variación en la secuencia entre los diferentes alelos de las MRS.

2.6.3. Mutación y Recombinación mitótica

Otros cambios más sutiles, incluyendo mutaciones puntuales, pequeñas adiciones o deleciones, y recombinación parecen jugar un papel directo en la biología y capacidad de adaptación de *C. albicans*, bien por sí solos o en combinación con alteraciones cromosómicas. Una fuente importante de variabilidad tiene su origen en su alto grado heterocigosis natural y en la capacidad única del organismo para modificarla en ausencia de un proceso sexual. Ya hemos comentado el alto nivel de

heterozigosis asociado a funciones asimilatorias. Por ejemplo, se ha encontrado que sustituciones de nucleótidos en el gen *ERG11* durante el curso de la infección pueden incrementar la resistencia a fluconazol (White, 1997; Marichal *et al.*, 1999). Esta diversidad de secuencia intra-allelica ha sido también detectada en los genes *ERG16* (White *et al.*, 1997) y *ERG3* (Miyazaki *et al.*, 1999), y se ha visto que los SNPs detectados en la secuencia del promotor del gen *SAP2* median una regulación diferencial en la expresión de los alelos (Staib *et al.*, 2002).

Coste *et al.* (2004) describieron la existencia de dos alelos del gen *TAC1*. Su producto, Tac1 regula la expresión de los genes *CDR1* y *CDR2* que codifican para transportadores ABC que median resistencia a azoles. Uno de los alelos, denominado “hiperactivo”, está presente en las cepas resistentes a azoles y causa sobreexpresión constitutiva de los genes *CDR1* y *CDR2*, mientras que el otro (denominado silvestre) está presente solamente en las cepas susceptibles al antifúngico y no origina esta sobreexpresión, y por consiguiente resistencia. Estos alelos contienen diferencias en su secuencia proteica (cambios no sinónimos), pero únicamente la mutación en el codón 977 (transversión de A a G; N977D) es suficiente para conferir sobreexpresión de los genes *CDR1* y *CDR2*. El alelo “hiperactivo” es codominante con el alelo silvestre (sin la mutación). Solamente las cepas homocigóticas con el alelo “hiperactivo” muestran alta expresión de los genes *CDR1* y *CDR2* y consecuentemente resistencia a azoles (Coste *et al.*, 2006).

En una célula diploide el proceso que media la conversión de un heterocigoto en un homocigoto se conoce como pérdida de heterocigosis (LOH). Cuando uno de los alelos es no funcional, cualquier acontecimiento genético que origine la inactivación del alelo funcional resulta en la expresión del fenotipo recesivo. Por tanto, la identificación de este fenotipo recesivo es una manera de detectar eventos de LOH. Dado el alto nivel de heterocigosis de *C. albicans* se ha estimado que LOH podría ser responsable de su alta capacidad de adaptación mediante la generación de nuevos fenotipos. LOH se ha estudiado en profundidad en diploides de *S. cerevisiae*. Hiraoka *et al.* (2003) caracterizaron las alteraciones genéticas que conducen a la inactivación del marcador heterocigótico o hemizigótico *URA3* situado en el cromosoma III o en el cromosoma V de una cepa diploide de *S. cerevisiae*. El análisis por PFGE y PCR de un gran número de clones que experimentaron LOH mostró que la mayor parte de las alteraciones que la originan son pérdida de cromosoma (6.8×10^{-5}) y recombinación alélica (4×10^{-5}). También, fueron detectados grandes reordenamientos cromosómicos, originados por

dos tipos de eventos de recombinación ectópica: delección intracromosómica y entrecruzamiento ectópico entre cromosomas. Estos eventos fueron raros, pero sus frecuencias fueron mucho más altas que la frecuencia de mutación puntual espontánea determinada por la inactivación del marcador *URA3*. En total, HR contribuyó al menos a la mitad de estas alteraciones, sugiriendo que juega un papel significativo en los procesos celulares que conducen a LOH. Por tanto, sería de esperar que la frecuencia de las mismas estuviera alterada en mutantes de recombinación. Los mutantes de recombinación, *rad50*, *rad51* y *rad52*, exhibieron un significativo aumento de LOH. El análisis detallado indicó que los acontecimientos responsables eran principalmente la pérdida de cromosoma y la mutación puntual, mientras que la frecuencia del resto de los eventos, recombinación ectópica (translocaciones) y alélica, estaban disminuidos (aunque varió entre los tres mutantes). Por tanto, el análisis de las alteraciones cromosómicas en estos mutantes proporcionó varias pistas de los mecanismos moleculares que conducen a LOH en *S. cerevisiae* (Yoshida *et al.*, 2003).

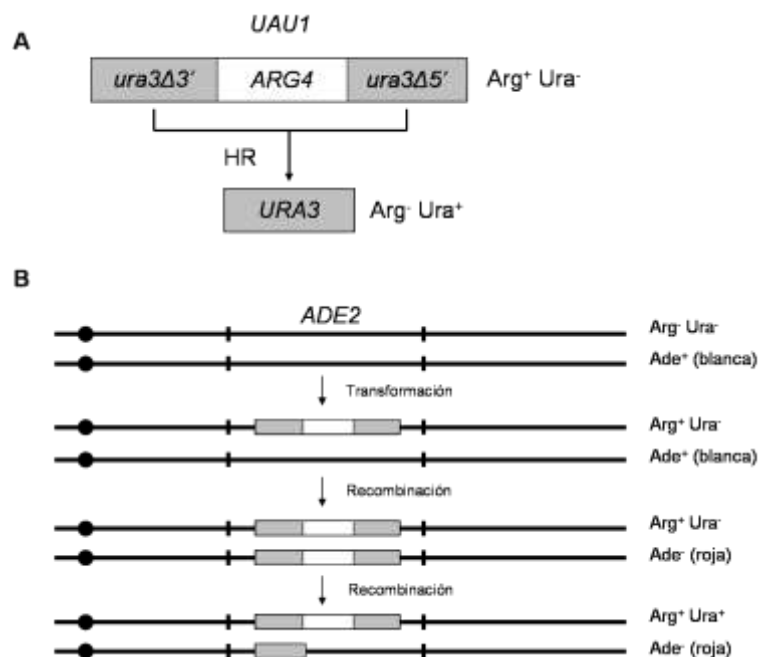


Fig. 3: Propiedades genéticas del casete *UAU1*. **(A)** Conversión de *UAU1* a *URA3*. El casete *UAU1* contiene el gen *ARG4* intacto flanqueado por dos delecciones del gen *URA3* (*ura3Δ3'* y *ura3Δ5'*). Los segmentos *URA3* no son funcionales, por lo que el casete *UAU1* confiere el fenotipo Arg⁺ Ura⁻. Los segmentos *URA3* comparten 530 pb de homología, por lo que pueden recombinar para producir una copia del gen *URA3* intacta. La recombinación elimina el *ARG4* y resulta en un fenotipo Arg⁻ Ura⁺. **(B)** Un alelo del gen *ADE2* es interrumpido con el casete *UAU1* a través de la transformación de una cepa Arg⁻ Ura⁻ con la subsiguiente selección de los transformantes Arg⁺. Durante el crecimiento de estos transformantes se pueden producir cepas con los dos alelos interrumpidos con el casete *UAU1*. Estos transformantes pueden seleccionarse una vez que hayan recombinado para generar el *URA3* activo en una de las copias del casete, produciendo Arg⁺ Ura⁺. (Enloe *et al.*, 2000).

Los reordenamientos genómicos que conducen a homocigosis en *C. albicans* se producen por mecanismos similares. Distintos trabajos han reportado altas frecuencias de recombinación mitótica en varios *loci* de *C. albicans*. Fonzi e Irwin (1993), utilizando el casete URA-blaster (*hisG-URA3-hisG*), determinaron frecuencias de recombinación mitótica intercromosómica (inactivación del alelo no interrumpido) e intracromosómica (por recombinación entre las *hisG*) de 10^{-6} y 10^{-4} , respectivamente. En un trabajo posterior, Enloe *et al.* (2000), encontraron una frecuencia de 10^{-3} eventos de recombinación mitótica por generación. Para ello, utilizaron el casete *UAU1* (5'-*ura3-ARG4-ura3-3'*) con el que interrumpieron varios genes, entre ellos *ADE2*. Este casete (*UAU1*) contiene una copia del gen *ARG4* flanqueada por dos fragmentos del gen *URA3* (que se solapan en cerca de 500 pb), de tal manera que la recombinación entre ambos conduce a un gen *URA3* activo y a la pérdida del gen *ARG4* (Fig. 3A). Se estimó en 10^{-8} por división celular la frecuencia en la que un heterocigótico *ADE2/ade2::UAU* (blanco, Arg⁺ Ura⁻) se convierte en homocigótico *ade2::UAU/ade2:U* (rojas, Arg⁺ Ura⁺) (Fig. 3B). Este proceso requiere dos pasos: la formación del homocigótico UAU y después la recombinación de los fragmentos del gen *URA3* en uno de los casetes ("loopout"), que se estimó en una frecuencia de 3×10^{-6} por división celular. Puesto que la frecuencia del evento final (10^{-8}) es el producto de las frecuencias de los dos eventos que conducen al mismo, ($3 \times 10^{-6} \times F$), podemos calcular F dividiendo 10^{-8} por 3×10^{-6} lo que proporciona un valor de 3×10^{-3} . Esta frecuencia es superior a la encontrada en *S. cerevisiae*. Existen al menos cuatro vías por las que una cepa con el casete UAU se puede convertir en UAU/U (Fig. 4), y sólo dos de ellas involucran la recombinación mitótica. Una posible explicación de esta diferencia con *S. cerevisiae* pueda ser la frecuencia con la que *C. albicans* pierde cromosomas, y después duplica el homólogo restante para retornar a la euploidía (Fig. 4). Más recientemente, Forche *et al.* (2003) utilizaron dos cepas heterocigóticas *GAL1/gal1* para determinar, mediante la observación de la aparición de células Gal⁻ (*gal1/gal1*) en placas que contienen 2-DOG (ver anteriormente), la frecuencia de recombinación. Se estimó una frecuencia media de recombinación mitótica *in vitro* de 10^{-9} eventos por célula y generación, aunque esta frecuencia fue más baja a la observada en un trabajo previo utilizando el mismo marcador (10^{-6} ; Gorman *et al.*, 1991). Lephart y Magee (2006) demostraron también que la recombinación mitótica es un evento muy común en *C. albicans*. Para ello, utilizaron una cepa derivada de la CAI4 (MRTØ) que contiene una copia del gen *IMH3* adyacente a la subunidad HOK de la MRS de un homólogo del cromosoma 5 (el que

contiene el *MTLa*) y una copia del gen *URA3* adyacente a la subunidad RB2 de la MRS del restante homólogo del cromosoma 5 (el que contiene el *MTLa*) (Fig. 5). Esta cepa permite la selección de no recombinantes, y recombinantes en dos regiones: una que incluye la MRS y otra que no la incluye (Fig. 5). Utilizando una variante del test de fluctuación de Luria-Delbruck, se encontró una frecuencia de recombinación de aprox. 10^{-6} eventos/Kb/generación en ambos intervalos, un valor muy cercano al descrito para los eventos de recombinación requeridos para el “loopout” del casete *UAU1* (Enloe *et al.*, 2000). Esta frecuencia es similar a la encontrada en *S. cerevisiae* (10^{-6} - 10^{-5}) (Montelone *et al.*, 1988).

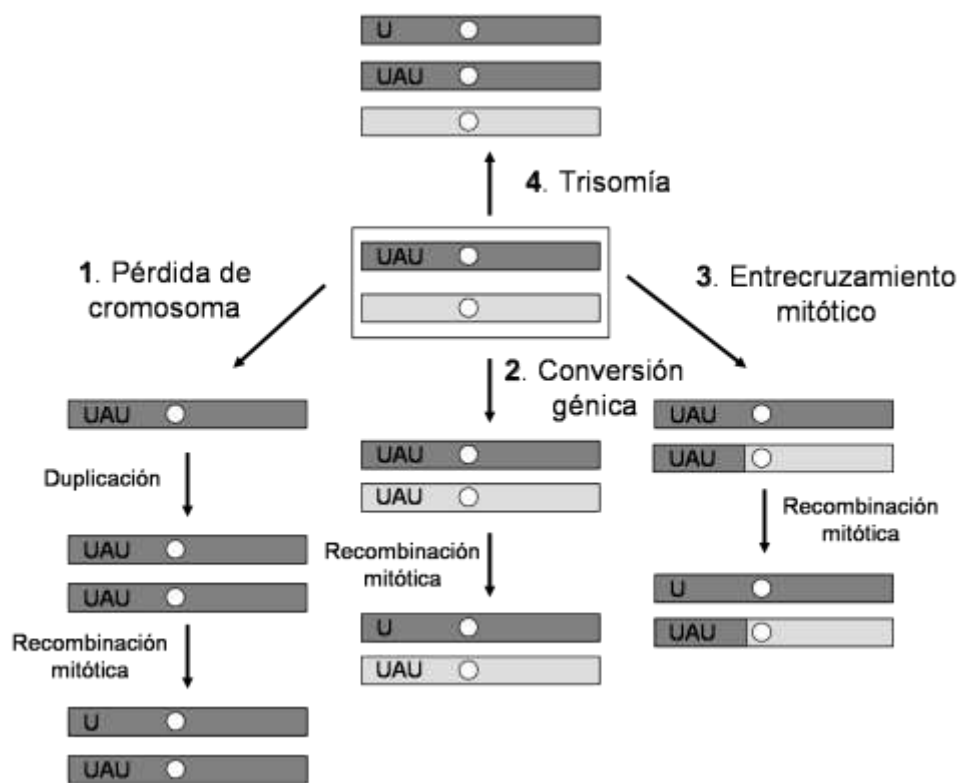


Fig. 4: Posibles rutas de generación de células *Arg⁺ Ura⁺*. **1.** El cromosoma que no contiene el casete *UAU* puede perderse, conduciendo a monosomía. El cromosoma restante puede duplicarse, retornando a la disomía y la recombinación mitótica en uno de ellos puede generar el gen *URA3* activo. **2.** La conversión génica puede originar homocigosis en la zona de inserción del casete. De la misma manera que en 1, la recombinación mitótica puede generar el gen *URA3* activo. **3.** Un entrecruzamiento mitótico que ocurra después de la fase S puede conducir al intercambio de la información centrómero-distal entre los dos homólogos. Tras la mitosis, se puede obtener una célula hija con ambos homólogos que contienen el casete *UAU*. La recombinación mitótica entre los fragmentos del gen *URA3* puede originar la cepa *Arg⁺ Ura⁺*. **4.** Segregación anómala de las cromátidas puede conducir a células trisómicas con dos homólogos que contienen el casete *UAU*. Después, la recombinación mitótica puede producir células *Arg⁺ Ura⁺* que contienen una copia del gen a interrumpir intacto.

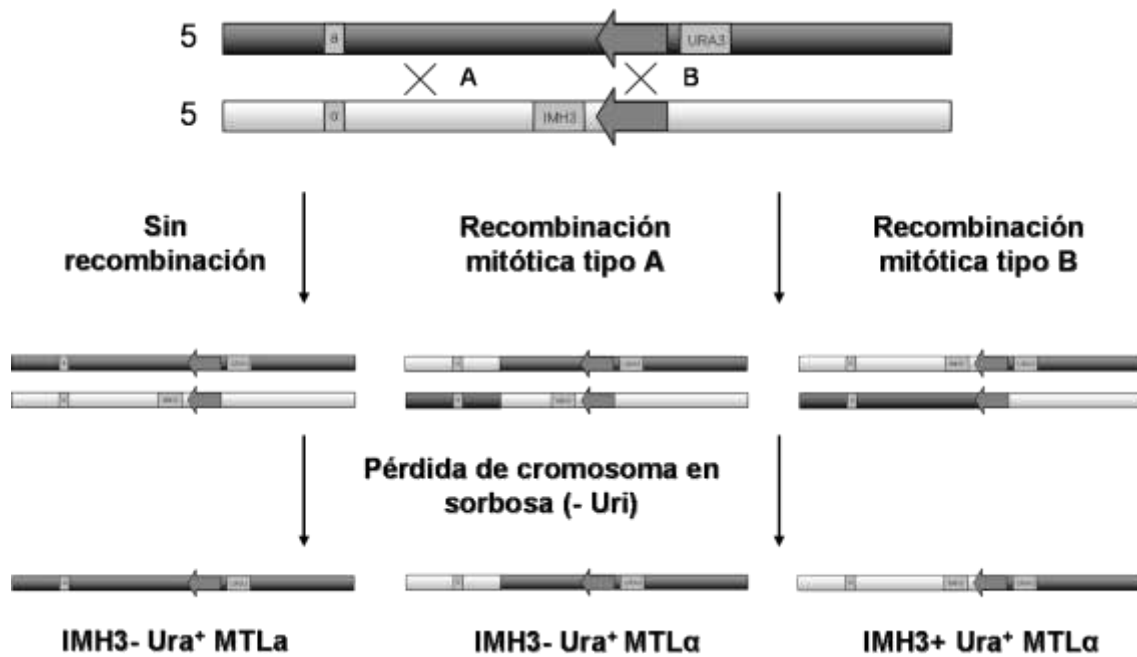


Fig. 5: Construcción y utilidad de la cepa MRTØ. Los eventos de recombinación que ocurren entre el locus *MTL* y el gen *IMH3* (Tipo A) y entre la *MRS* y el gen *IMH3* (Tipo B) se detectan en las cepas que se vuelven homocigóticas para el Cr5 tras crecimiento en sorbosa como única fuente de carbono. Los eventos de recombinación son identificados mediante siembra en sorbosa, selección de las colonias que pueden utilizar la sorbosa (*Sou*⁺) y que retiene el marcador *URA3*, e identificación del recombinante *MTLα* *Ura*⁺ por PCR. De estos recombinantes, los que por PCR contienen el gen *IMH3* deben haber experimentado un evento de recombinación en la *MRS* más que entre la región del gen *IMH3* y el locus *MTL*. (Lephart and Magee, 2006).

¿Qué ventajas podría tener la heterocigosidad para *C. albicans*? Se ha sugerido que LOH puede tener un papel parecido a la recombinación sexual (Yesland and Fonzi, 2000), resultando en variabilidad genotípica, y en ocasiones, fenotípica. De hecho, se ha demostrado que LOH en *C. albicans* puede ser crucial para un número de fenómenos relacionados con su biología y su susceptibilidad a antifúngicos. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, sólo células que llegan a ser homocigóticas para el locus *MTL* puede conjugar (Hull *et al.*, 2000; Magee and Magee, 2000). La relación entre la homocigosidad en el locus *MTL* y la susceptibilidad ha sido ampliamente debatida. El análisis de un número de aislados clínicos sometidos a tratamiento con fluconazol o de cepas inducidas a resistencia a fluconazol *in vitro* indicó una correlación entre la homocigosidad en el locus *MTL* y la resistencia a azoles (Rustad *et al.*, 2002). Sin embargo, el hecho de que cepas construidas genéticamente con disrupciones del locus *MTL* así como cepas naturales homocigóticas para *MTL* no sean intrínsecamente más resistentes a azoles que las que llevan *MTLα* y *MTLα*, sugirió que los productos

específicos de la conjugación no estaban directamente implicados en la resistencia (Rustad *et al.*, 2002; Pujol *et al.*, 2003). Por alguna razón, tras la exposición a la droga un gen de resistencia a la misma se hace homocigótico (y esta homocigosis afecta al locus *MTL*) y/o las cepas homocigóticas para *MTL* desarrollan resistencia con una frecuencia mayor que las heterocigóticas. Como se ha comentado anteriormente, la coexistencia de dos alelos del gen *TAC1* confiere resistencia a azoles. Trabajos adicionales han descubierto que la homocigosis en el locus *MTL* acompaña la adquisición de homocigosis en el gen *TAC1* mediante recombinación entre porciones o duplicación del cromosoma 5; pero esta homocigosis en el locus *MTL* no contribuye directamente a la resistencia a azoles exhibida (Coste *et al.*, 2006). En la misma línea, un análisis de 1294 aislados para el locus *MTL* y su susceptibilidad a algunos antifúngicos (fluconazol, intraconazol, voriconazol y flucitosina) indicó que la susceptibilidad fue menor en los homocigóticos *MTL* tipo *a/a*, después en los tipo *a/α* y por último los heterocigóticos *a/α*. (Odds *et al.*, 2007). Sin embargo no se estudió la distribución de los alelos *TAC1*.

Los cambios genómicos que conducen a LOH en *C. albicans* parecen ocurrir durante la infección. Forche *et al.* (2003) no observaron diferencias entre la virulencia de las cepas *GAL1/GAL1*, *gal1/gal1*, y *GAL1/gal1* en un modelo de candidiasis sistémica diseminada. La infección del ratón con un heterocigótico *GAL1/gal1* y la caracterización de las cepas recuperadas indicó que la aparición de cepas *gal1/gal1* se produjo en una frecuencia relativamente alta (10^{-2} - 10^{-4} del total de las células recuperadas) (Forche *et al.*, 2003). Posteriormente, el desarrollo de un microarray de SNP permitió examinar varias de estas cepas *Gal*⁻, demostrando que los eventos que conducen a LOH ocurren frecuentemente durante la infección, se producen independientemente en varios loci, y la pérdida de cromosoma o la recombinación mitótica son los procesos más comunes (Forche *et al.*, 2005). Por lo tanto, parece que la recombinación mitótica es relativamente frecuente durante la infección, al menos en este modelo. En la misma línea, mediante la utilización de MLST (Odds *et al.*, 2006, 2007; Bougnoux *et al.*, 2006), se ha observado que tras la colonización de diferentes individuos por la misma cepa, se produce una especie de microevolución causada por eventos de LOH que conducen a microvariación en los aislados recuperados. Aislados de diferentes sitios o en diferentes tiempos de cada paciente son idénticos o están altamente relacionados, aunque frecuentemente muestran pequeños cambios (microvariaciones). Por consiguiente, es posible que al menos algunos de estos eventos influyan en la virulencia

y supervivencia de este patógeno oportunista. Los procesos que conducen a LOH están bajo el control del mecanismo de mantenimiento de la integridad de DNA que incluye los sistemas de recombinación mitótica.

3. LOH y Recombinación Homóloga.

Vemos pues que la recombinación mitótica, es clave para entender la variabilidad genética de *C. albicans*. LOH se produce mediante mecanismos en los que la recombinación mitótica juega un papel predominante.

Las roturas de doble cadena (Double Strand Break, DSB) se están produciendo continuamente en las células. La presencia de un cromosoma roto es una amenaza seria para la supervivencia celular. En respuesta a esta amenaza las células han adquirido un arsenal impresionante de mecanismos de reparación que pueden agruparse en dos rutas generales. La recombinación homóloga (Homologous Recombination, HR) y la recombinación por fusión de extremos o Non-Homologous End-Joining (NHEJ). En HR, se requiere homología (50-100 bp) entre la secuencia a reparar y el molde no dañado (Paques y Haber, 1999); es precisa, requiere las proteínas del grupo de epistasis de Rad52 (Rad51, Rad52, Rad54/Rad55, Rad57, Rad59), DNA-RPA, y la ligasa Cdc9 (Paques y Haber, 1999; Symington, 2002). De todas las proteínas del grupo, sólo Rad52 es requerida para todos los acontecimientos de HR en *S. cerevisiae*. Los mutantes *rad52* de *S. cerevisiae* pueden aún reparar mediante la ruta de NHEJ. Aquí los extremos son ligados con poca o ninguna homología entre ellos; es mutagénica y utiliza un juego de proteínas totalmente diferentes (Ku70 y Ku80, Ligasa 4 (Dnl4), así como sus proteínas asociadas Lif1 y Lif2) (Frank-Vaillant y Marcand, 2001; Kegel *et al.*, 2001; Valencia *et al.*, 2001). Nos centraremos exclusivamente en la reparación mediada por HR, puesto que es el objeto principal de nuestro estudio.

HR es iniciada por la introducción de DSB en la molécula de DNA. Los extremos 5' son hidrolizados por exonucleasas que dejan ssDNA con extremos 3' protuberantes, a los cuales se une Rad51 y promueve el apareamiento y el intercambio de cadenas con el duplex homólogo intacto. Rad51 se ha conservado a lo largo de la evolución. La proteína de *S. cerevisiae* tiene un 30% de identidad con el sitio catalítico de la ATP-asa de RecA de bacterias, la cual une e hidroliza nucleótidos (Ogawa *et al.*

1993). Tras la unión a DNA, ScRad51 forma hélices dextrógiras. La unión de Rad51 es facilitada por la adhesión previa de RPA (*Replication Protein A*) que se cree que elimina la estructura secundaria del DNA y permite la formación del nucleofilamento de Rad51. El reclutamiento de Rad51 al complejo ssDNA-RPA es mediado por Rad52 que interactúa con Rad51 a través de los residuos 409-412 (Shinohara y Ogawa, 1998; Song y Sung, 2000). El desplazamiento de RPA necesita la acción de Rad52 a través de su región C-terminal (Sung, 1997). Otras proteínas, tal como Rad55 y Rad57 pueden también cooperar en la formación de nucleofilamentos. El filamento-Rad51 localiza un donador homólogo y con la ayuda de Rad54 causa una remodelación de la cromatina, desenrollamiento del DNA y el intercambio con el DNA homólogo. Posteriormente, Rad51 es desplazado con la ayuda de Rad54 (Mazin *et al.*, 2003; Solinger *et al.*, 2001).

3.1. Diferentes mecanismos de reparación de la rotura de la doble cadena

Existen al menos cuatro mecanismos diferentes de HR que pueden ser usados para la reparación de las DSB cromosómicas en las células mitóticas: La reparación de la DBS (DSBR, *Double-Strand Break Repair*), SDSA (*Síntesis-Dependent Strand Annealing*), anillamiento de cadena sencilla (*Single-Strand Annealing, SSA*), y recombinación inducida por rotura (*Break-Induced Replication, BIR*). Los dos primeros mecanismos son a su vez eventos que resultan en conversión génica, dependiendo de si los productos obtenidos implican entrecruzamiento o no (Paques and Haber, 1999).

3.1.1. DSBR

En este modelo (Fig. 2A), los extremos de la DBS son convertidos en extremos 3' de cadena sencilla para que puedan iniciar la invasión del duplex homólogo. Siguiendo a esta invasión, y ya en el duplex homólogo, el extremo 3' es extendido o elongado mediante síntesis de DNA. El bucle formado por la invasión es ligado con el otro lado de la DBS, y el extremo 3' de la cadena no invadida es también extendida mediante síntesis de DNA; formando lo que se conoce como intermediario de Holliday (dHJ) (Symington, 2002). La resolución de este intermediario origina de manera equitativa productos a través de entrecruzamiento (*crossover*) o productos sin mediación de entrecruzamiento (*non crossover*).

3.1.2. SDSA

Este modelo (Fig. 2B) fue propuesto para explicar los bajos niveles de entrecruzamiento observado en eventos de conversión génica inducida. Aquí, la invasión de la cadena se produce de la misma manera que en el DSBR. El bucle formado por la invasión puede elongarse por la síntesis de DNA de la cadena elongada o puede migrar con el DNA recién sintetizado. Después del desplazamiento del duplex donador, la cadena naciente (la que invade) se une con la otra cola 3' de cadena sencilla y la síntesis de DNA completa la reparación. La síntesis de DNA puede ocurrir después en el extremo 3' de la cadena que no invade para reparar la rotura o el hueco dejado. La diferencia con el modelo DSBR estriba en que la cadena que no invade puede ser elongada mediante síntesis de DNA sin utilizar como molde el bucle formado en la invasión del duplex intacto (Symington, 2002).

Como se ha dicho anteriormente, estos modelos se diferencian en cuanto a los productos que proporcionan. Mientras que el SDSA no origina productos con entrecruzamiento, DSBR puede dar productos con o sin entrecruzamiento.

3.1.3. BIR

La conversión génica habitualmente se produce en regiones cortas; pero no siempre es así, ya que se han encontrado eventos de conversión génica que involucran grandes zonas de DNA. En ciertos fondos genéticos, la conversión génica es eliminada y la reparación ocurre por una invasión del duplex donador mediante la rotura del cromosoma seguida de una replicación hasta el final del cromosoma donador (Symington, 2002). Esto es lo que se conoce como BIR (Fig. 2C). Este modelo se caracteriza porque después de la invasión de la cadena con el extremo 3' no hay una estabilización de esta cadena desplazada mediante el anillamiento con el otro extremo de la rotura (Paques and Haber, 1999). En este caso, la síntesis de DNA continúa hasta el final de la molécula (Symington, 2002). Se produce, por tanto, que las secuencias distales a la rotura se pierdan y sean remplazadas por la secuencia de la cadena donadora (Symington, 2002). Este proceso de intercambio no recíproco de material genético es conocido por ser importante en el mantenimiento de los telómeros en ausencia de telomerasa (Teng *et al.*, 2000).

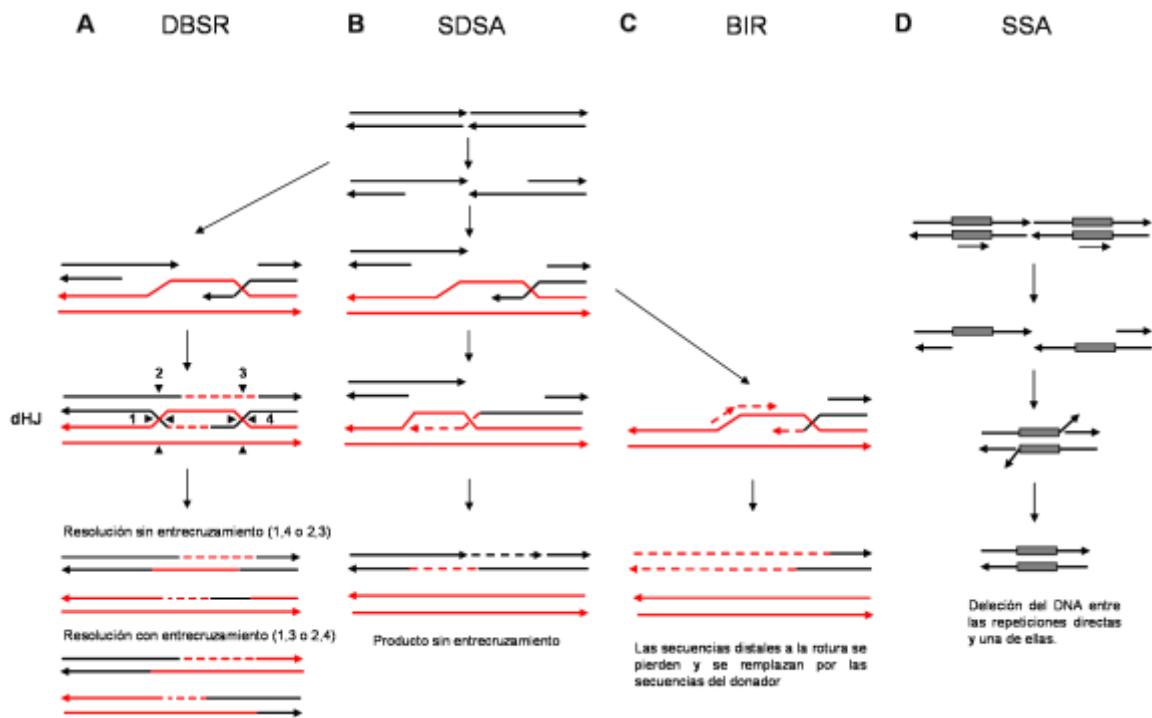


Fig. 6: Modelos de reparación de la DBS: **(A)** DSBR. Dependiendo de la resolución del intermediario de Holliday (dHJ), se generan productos con y sin entrecruzamiento. **(B)** SDSA. Este modelo solo origina productos sin entrecruzamiento. **(C)** BIR. El paso inicial en este modelo es el mismo que en el modelo de SDSA, pero la síntesis de DNA de la cadena que invade se produce hasta el final de la molécula. **(D)** SSA. En este modelo resulta en delección de una de las repeticiones y la región entre ambas. (Symington, 2002).

3.1.4. SSA

Este mecanismo (Fig. 2D) ocurre solamente cuando las DBSs se producen entre repeticiones directas. Después de la rotura, si la formación de cadena sencilla es lo suficiente extensa para llegar a las regiones homologas complementarias que flanquean la DBS, éstas pueden anillar. Las colas de cadena sencilla sobrante pueden ser eliminadas mediante la acción de las nucleasas, y los huecos que quedan pueden ser rellenados por la acción de la síntesis reparadora de DNA y la ligación. Este proceso produce, por tanto, la delección de una de las repeticiones invertidas existentes y la región de DNA existente entre ambas repeticiones, de manera que esta considerado como mutagénico (Symington, 2002).

Todos estos procesos o modelos requieren de las proteínas del grupo epistático de Rad52, por lo parece que este gen es bastante importante en la reparación de daño a DNA mediante HR.

4. **RAD52 en la Recombinación Homóloga**

El mecanismo de recombinación dependiente de *RAD51* es el más eficiente mecanismo de conversión génica y es requerido para la reparación de la mayoría de las DSBs producidas en las células mitóticas. Sin embargo, se ha detectado un grado significativo de recombinación en mutantes *rad51* de *S. cerevisiae*, sugiriendo que debe de existir un mecanismo alternativo de recombinación que ocurre en ausencia de *RAD51*. Este mecanismo requiere *RAD52* y en cierta medida, *RAD59* (homólogo de *RAD52*). La delección de *RAD52* en *S. cerevisiae* produce fuertes defectos en conversión génica, BIR, SSA, recombinación entre repeticiones invertidas, y la formación de supervivientes en ausencia de telomerasa (Symington, 2002). Haber y Hearn (1985) encontraron además que la conversión génica mitótica independiente de *RAD52* frecuentemente resulta en pérdida de cromosoma. Para ello examinaron la frecuencia de recombinación mitótica intercromosómica espontánea en células diploides *rad52*, hallando que la mayoría de los recombinantes *rad52* encontrados se habían producido por pérdida de uno de los dos cromosomas participantes en el proceso de recombinación. Consecuentemente, los mutantes *rad52* muestran mayores defectos en recombinación que los mutantes sencillos en todos los genes que conforman el grupo epistático de *RAD52* (Symington, 2002). Parece, por tanto, que *RAD52* es esencial en los procesos mediados por HR.

Tanto la proteína Rad52 de humanos como de levaduras es un multímero que se estructura en forma de anillo (Shinohara *et al.*, 1998). La proteína purificada se une preferentemente a la cadena sencilla de DNA (ssDNA), promoviendo el anillamiento de las secuencias complementarias. Necesita RPA para estimular el intercambio de moléculas grandes; pero en ausencia de ésta, facilita el anillamiento de DNA de menor tamaño como son los oligonucleótidos (Mortensen *et al.*, 1996). El papel que desempeña RPA en el anillamiento de cadenas probablemente pueda ser la de eliminar las estructuras secundarias existentes en las cadenas de DNA y permitir el acoplamiento de Rad52p (Krogh and Symington, 2004). Además, se ha comprobado que Rad59 interactúa con Rad52 formando un anillo heteromérico, sugiriendo que participan juntos en el anillamiento de cadenas (Davis and Symington, 2001). La presencia de más de una copia de *RAD52* suprime la sensibilidad a radiación exhibida por los mutantes *rad59*; en cambio Rad59 no fue capaz de sustituir a Rad52 en la recombinación independiente de

Rad51, sugiriendo que ambas proteínas interactúan y/o pueden tener funciones solapantes en este proceso (Davis and Symington, 2001).

Recientemente ha sido caracterizado el gen *RAD52* en *Candida albicans* (Ciudad *et al.*, 2004; Andaluz *et al.*, 2006). Los mutantes *rad52* no integran DNA con homología en los extremos, lo que sugiere que este gen es absolutamente necesario para la integración homóloga. Estos mutantes muestran también alta sensibilidad a MMS y UV, sugiriendo que *RAD52* es requerido para la reparación de DNA. Además, los mutantes *rad52* exhiben telómeros más largos y heterogéneos en presencia de telomerasa, por lo que cabe la posibilidad de que esta enzima y la HR funcionen simultáneamente en el proceso de mantenimiento de telómeros.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo fue investigar si la recombinación homóloga está implicada en el mantenimiento de la integridad genómica y dinámica genética en *C. albicans*. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos distribuidos en dos capítulos:

1. Detección y caracterización de un marcador auxotrófico heterocigótico presente en el linaje de la cepa silvestre SC5314 de *C. albicans*.
2. Mediante la utilización de este marcador, analizar los eventos de pérdida de heterocigosidad y reordenamientos cromosómicos ocurridos en mutantes *rad52-ΔΔ* de *C. albicans*.

CAPÍTULO I

1. RESULTADOS CAPÍTULO I

1.1. Identificación de *HIS4* como marcador heterocigótico en la cepa CAI4.

Con objeto de investigar la presencia de marcadores auxotróficos heterocigóticos en la cepa CAI4, se estudió la aparición de auxótrofos His⁻ y Arg⁻ tras tratamiento con luz UV. En primer lugar, unas 5000 células de esta cepa se sembraron en medio completo (YEPD) y, después de ser irradiadas con una dosis de 20 J/m², se replicaron en medio sintético SC (con 25 µg/ml de Uridina) que carecía de histidina. Entre los supervivientes (2515 células, es decir aproximadamente el 50% del total de las células sembradas) se identificaron 6 colonias que no crecían en ausencia de histidina (*his4.1-his4.6*), lo que se traduce en una frecuencia de aparición de auxótrofos de histidina del orden de 2-3 x 10⁻³ por superviviente. Un test de fluctuación (ver Material y Métodos) confirmó este resultado. En un experimento similar diseñado para obtener auxotrofos de arginina a partir de 8369 células no se obtuvo ningún mutante, lo que proporciona una frecuencia menor de 10⁻⁴.

En base a la similaridad de las secuencias proteicas con sus homólogos de *S. cerevisiae*, *C. albicans* posee al menos siete genes localizados en diferentes cromosomas que catalizan nueve pasos bien definidos en la biosíntesis de histidina (Fig. 1.1): *HIS1* (Cr5), *HIS2* (Cr7), *HIS3* (Cr2), *HIS4* (Cr4), *HIS5* (Cr4), *HIS6* (Cr4) e *HIS7* (Cr7). Al igual que en *S. cerevisiae*, el gen *HIS4* de *C. albicans* (Navarro-García *et al.*, 1998) codifica para una proteína de 838 aminoácidos compuesta por tres dominios estructurales: His4A, His4B, e His4C, cada uno responsable de una actividad diferente. His4A (posición 1-270; 271 aminoácidos) es una AMP ciclohidrolasa que cataliza el paso tercero de la ruta biosintética; His4B es una fosforibosil-ATP pirofosfatasa (271-360; 90 aminoácidos) que actúa en el paso segundo; e His4C (361-838; 477 aminoácidos), es una histidinol deshidrogenasa que actúa en los dos últimos pasos (Fink, 1964, 1966; Donahue *et al.*, 1982; Navarro-García *et al.*, 1998).

Las 6 colonias His⁻ aisladas fueron complementadas cuando se transformaron con un plásmido (pRMH1; Navarro-García *et al.*, 1998) que contiene el gen *HIS4* de la cepa 1001 de *C. albicans* y lleva el marcador *URA3*. Tras la curación del plásmido (previo crecimiento de los transformantes en medio rico y selección en placas

suplementadas con ácido 5-fluoroorótico (-5-FOA-), todas las cepas Uri⁻ fueron His⁻. Estos resultados indicaron que la cepa CAI4 es heterocigótica para *HIS4* (*HIS4/his4*).

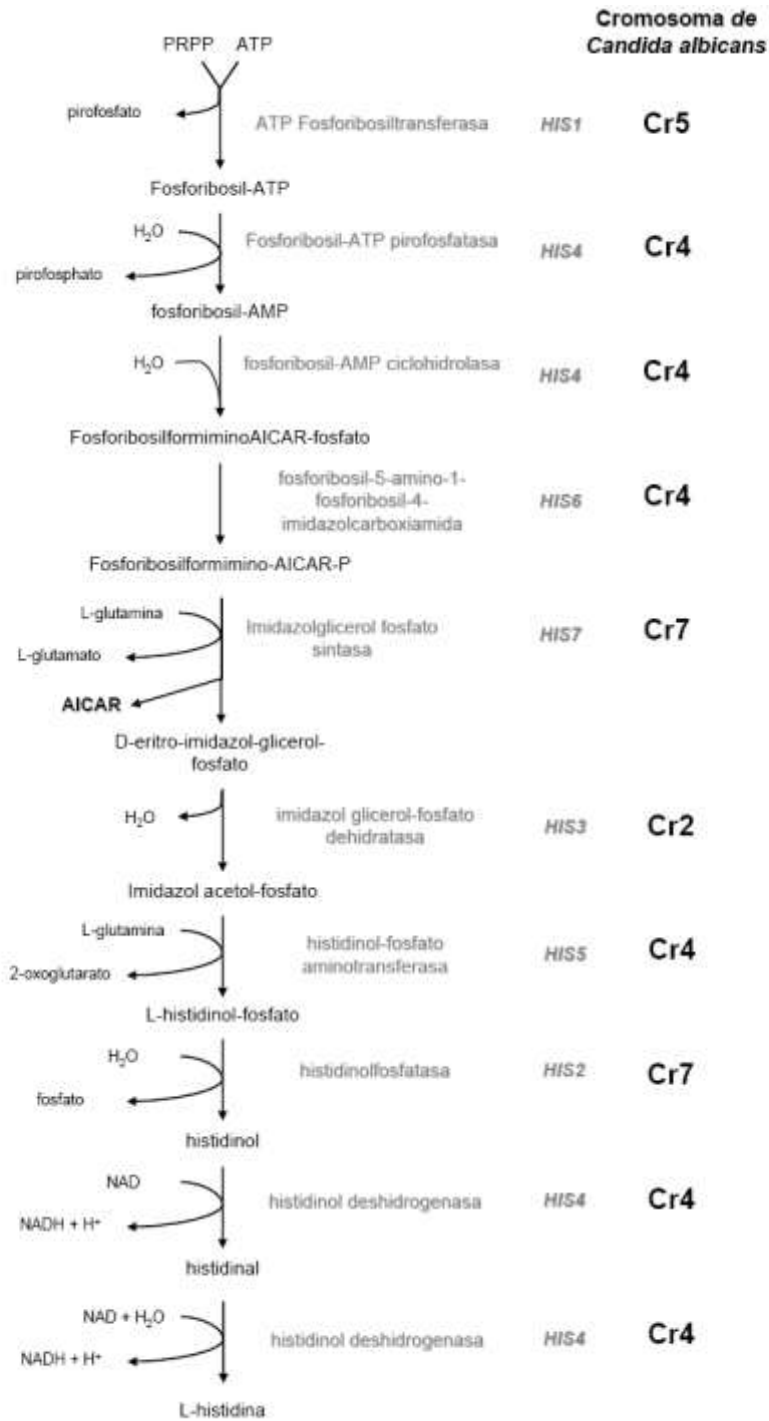


Fig. 1.1: Ruta biosintética de Histidina en *S. cerevisiae*. A la derecha de cada paso se indica la localización cromosómica de cada ortólogo en *C. albicans*.

1.2. Análisis genético de estos auxótrofos identifican pérdida de cromosoma y recombinación mitótica como responsable de fenómenos de LOH.

Para investigar los eventos genéticos que originan los mutantes auxótrofos para histidina, se analizó la naturaleza del Cr4, donde se localiza *HIS4*, en estos 6 auxótrofos de histidina aislados tras exposición a luz UV. El gen *HIS4* de *Candida albicans* está localizado en el fragmento BB del Cr4 (1.622 Mb), a aproximadamente 23 kb del telómero izquierdo. Una comparación de sus cariotipos electroforéticos con la cepa parental no reveló alteraciones obvias (Fig. 2.1A).

Todas estas cepas fueron heterocigóticas para el locus *MTL*, excepto la *his4.1*, que es homocigótica para *MTLa*, lo que sugiere que ha perdido la copia del Cr5 (1190 Kb) que contiene el alelo *MTLa*. (Fig. 2.1A, arriba). Además, la alta cantidad de producto resultante de la amplificación del alelo *MTLa1* por PCR cuando se compara con el de las otras cepas sugiere, aunque no prueba, duplicación del homólogo que contiene este alelo.

Para analizar en detalle la naturaleza y el número de copias del Cr4 en estos auxótrofos, investigamos los polimorfismos de restricción (RFLP) existentes en tres *loci* de este cromosoma. Cada uno de ellos está localizado en un fragmento *SfiI* diferente del Cr4: *CZF1*, en el fragmento 4H (Chen *et al.*, 2004), *PHR1*, localizado en el fragmento 4F2 (Yesland and Fonzi, 2000) y *RBT7*, en el fragmento 4N (Anja Forche, comunicación personal) (Fig. 2.1B). La región CEN (Centrómero) se ubica en el contig 19-10192 (Sanyal *et al.*, 2004), de tal manera que, *CZF1* está localizado en el brazo derecho, mientras que *PHR1*, *RBT7* e *HIS4* están en el brazo izquierdo (Fig. 2.1B). El gen *RBT7*, presenta varios RFLP en su ORF asociados a varios sitios de restricción, de tal manera que una enzima particular corta en un solo alelo; ello posibilita discernir entre ambos alelos (Anja Forche, comunicación personal). Como muestra la Fig. 2.1A, cuando el producto de PCR del gen *RBT7* fue digerido con *AluI*, la cepa control (CAI4) produjo dos fragmentos (como era de esperar, dado el polimorfismo existente en esta ORF). En cambio, con la excepción de la cepa *his4.6*, el resto de las cepas auxótrofas sólo muestran el fragmento de menor tamaño; además, todas conservan el mismo alelo. Cuando se digirió el DNA genómico de la cepa CAI4 con la enzima *SspI* y se sometió a hibridación *Southern* con una sonda específica del gen *CZF1* (Ver Material y Métodos), se produjeron dos fragmentos; uno de 2,3 Kb correspondiente al alelo *CZF1* que ha perdido el sitio *SspI*, y otro de 1,8 Kb correspondiente al segundo alelo que sí conserva

dicho sitio (Fig.2A). En este caso, cinco de los seis auxótrofos para histidina derivados de cepa CAI4 sólo muestran una banda. En cuatro de ellos (*his4.1*, *his4.2*, *his4.4* e *his4.5*) se conserva la banda de 2,3 Kb (alelo 1), mientras que la cepa *his3* conserva la de 1.8 kb (alelo 2). Al igual que ocurrió con el marcador *RBT7*, la cepa *his4.6* se mostró heterocigótica para este marcador (Fig. 2.1A). Resultados similares se encontraron al analizar el polimorfismo del *locus PHR1* con la enzima *Bam*HI. En la cepa parental CAI4, la hibridación *Southern* usando una sonda de este gen mostró dos bandas (8.4 y 7.4 Kb) cada una correspondiente a un alelo. Nuevamente, cinco de los seis auxótrofos fueron homocigóticos para *PHR1* ya que generaban solo una banda, aunque en este caso siempre correspondió a la de mayor tamaño, mientras que la cepa *his4.6* conservó ambos alelos (Fig. 2.1A).

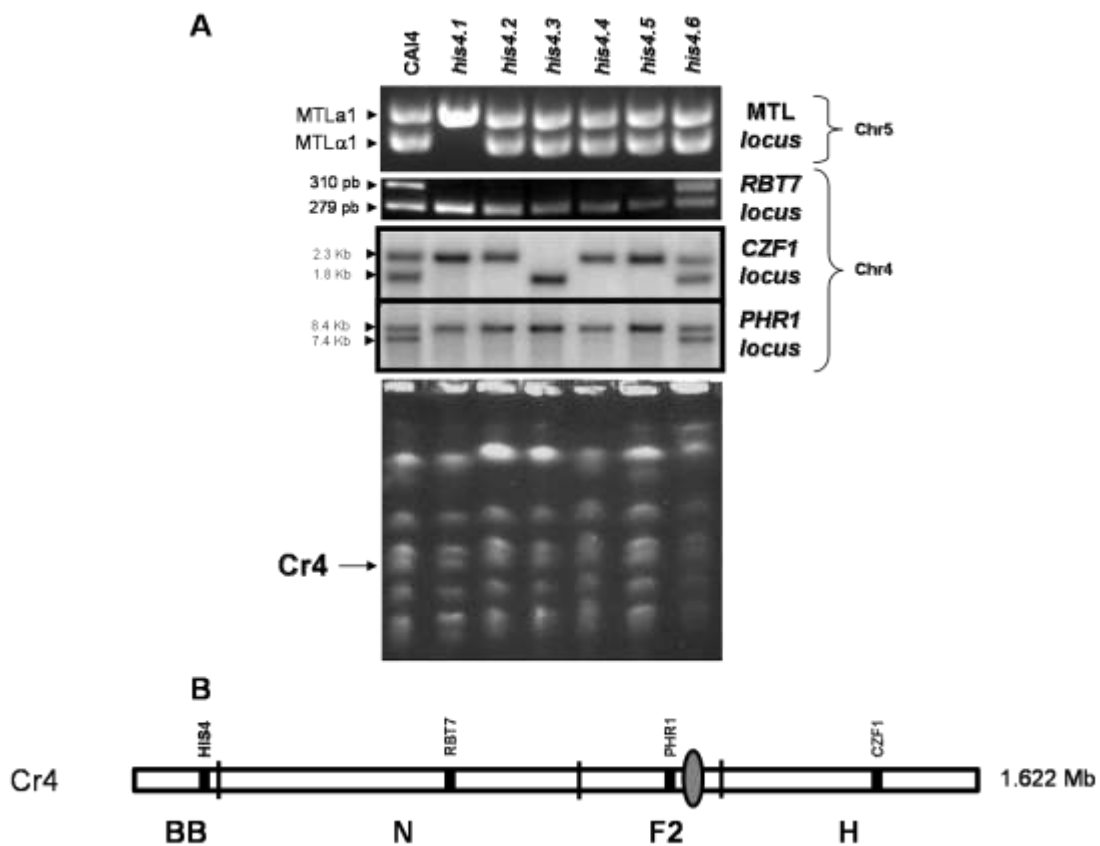


Fig. 2.1: Caracterización genética y los 6 auxótrofos para la histidina (cepas *his4.1-6*). (A) Análisis de la heterocigosidad en los *loci* indicados (*MTL*, *RBT7*, *CZF1* y *PHR1*). Los detalles se exponen en el texto. (B) Esquema del Cr4 donde se muestra la localización de varios marcadores (<http://albicansmap.ahc.umn.edu/>), los fragmentos *Sfi*I (Chu *et al.*, 1993) y el centrómero (círculo ovado en gris oscuro) (Sanyal *et al.*, 2004).

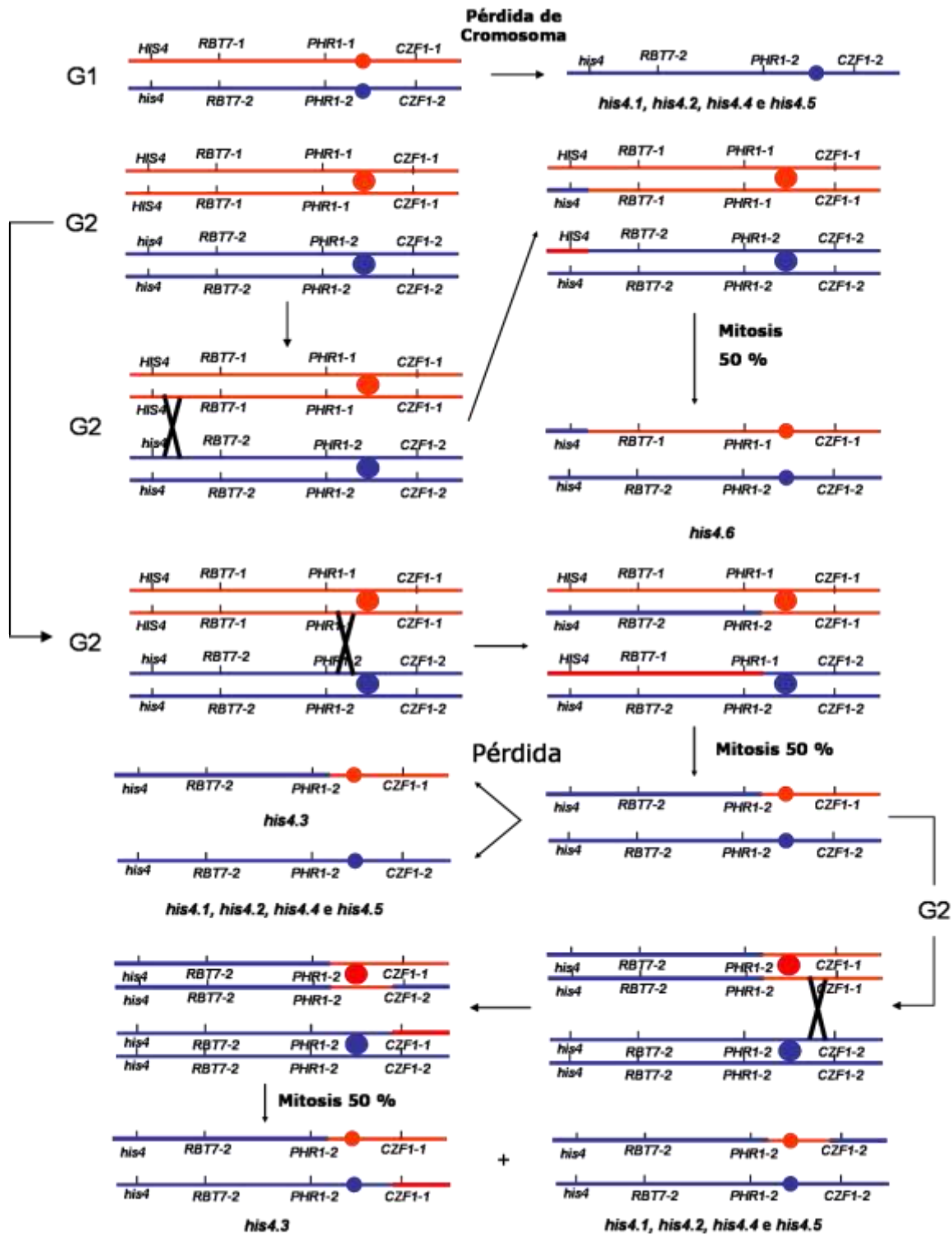


Fig. 3.1: Mecanismos potenciales de generación de cepas auxotrofas para histidina (*his4.1-his4.6*) mediante pérdida o reordenamientos de cromosoma 4. Los posibles puntos de recombinación se muestran con una "horquilla". El alelo 1 (*HIS4*) se muestra en azul, mientras que el alelo 2 (*his4*) en rojo.

En la Fig. 3.1, se muestran los acontecimientos genéticos potencialmente responsables de las alteraciones observadas: (1) Pérdida de cromosoma por segregación anómala (no disyunción) de las cromátidas hermanas en el proceso de división celular; como puede ser el caso de las cepas *his4.1*, *his4.2*, *his4.4*, e *his4.5* y (2) Un entrecruzamiento mitótico entre cromátidas no hermanas en la fase G2 del ciclo celular podría originar las cepas *his4.3* e *his4.6*. Por ejemplo, un entrecruzamiento mitótico entre *HIS4* y *RBT7* originaría la configuración encontrada en la cepa *his4.6* (ver Fig. 3.1). Un entrecruzamiento entre el gen *PHR1* y el centrómero (ver Fig. 3.1) seguido de la pérdida de un homólogo durante la mitosis podría originar tanto las cepas *his4.1*, *his4.2*, *his4.4* e *his4.5* (pérdida de homólogo 1) como la cepa *his4.3* (pérdida del homólogo 2). Finalmente, si además del entrecruzamiento anterior se produce otro entrecruzamiento entre el centrómero y el gen *CZF1*, tras la mitosis se podría también generar la configuración de la cepa *his3* en el 50% de los casos y las cepas *his4.1*, *his4.2*, *his4.4*, e *his4.5* en el otro 50% (Fig. 3.1). No obstante, la probabilidad de que se produzcan dos entrecruzamientos, uno entre el centrómero y *PHR1* y otro entre el centrómero y *CZF1*, es muy baja debido a la proximidad de ambos marcadores al centrómero.

Estos resultados sugieren que entrecruzamientos y pérdida de cromosomas independientemente o combinados pueden explicar los resultados obtenidos. La inactivación de un alelo por mutación puntual aunque posible no es necesaria para explicar estos resultados (ver más adelante).

1.3. Análisis de los SNPs de la ORF *HIS4* distingue dos alelos en la cepa CAI4 y su parental SC5314.

Para investigar las causas de la heterozigosidad del gen *HIS4*, a partir del DNA genómico de la cepa CAI4 se amplificó por PCR la ORF (2517 pb) y su producto se clonó en el plasmido pRMH1 (Pla *et al.*, 1996; ver Material y Métodos). Las secuencias de 8 clones (CAI4-1 a CAI4-8) se compararon con las existentes en la base de datos (<http://www.candidagenome.org/>): los dos alelos de la cepa SC5314, y un alelo de la cepa 1001 (Navarro-García *et al.*, 1998). En la cepa SC5314 se han descrito tres SNPs en las posiciones 266 (T/C), 405 (T/C) y 1983 (T/A) (Jones *et al.*, 2004); pero solo el cambio T por C en la posición 266 resulta en un cambio de aminoácido (Leu por Ser),

que presumiblemente no afecta a la actividad de la proteína. Nuestros resultados confirmaron la existencia de estos tres SNPs y revelaron la presencia de ocho nuevos polimorfismos, cinco sinónimos, es decir no producen un cambio en el aminoácido correspondiente de la proteína, y tres son no-sinónimos (posiciones 496, 769 y 929; Tabla 1.1), que sí lo producen. Estos SNPs definen claramente dos alelos: alelo 1, C²⁶⁶C⁴⁰⁵G⁴⁹⁶C⁷⁶⁹T⁹²⁹G¹⁷¹⁹T¹⁷⁷⁰T¹⁸⁹⁰T¹⁹⁰⁸T¹⁹³⁸T¹⁹⁸³, y alelo 2, T²⁶⁶T⁴⁰⁵C⁴⁹⁶G⁷⁶⁹G⁹²⁹C¹⁷¹⁹C¹⁷⁷⁰G¹⁸⁹⁰A¹⁹⁰⁸C¹⁹³⁸A¹⁹⁸³ (Tabla 1.1). Para simplificar identificaremos el alelo 1 con el haplotipo CT (C⁷⁶⁹T⁹²⁹) y al alelo 2 con el haplotipo GG (G⁷⁶⁹G⁹²⁹). Como se puede observar estas bases están siempre asociadas en los dos alelos. Para confirmar las heterozigosidades encontradas, se amplificaron las regiones que contienen los SNPs en cada cepa (oligos HIS42-F e HIS44-R, e HIS44-F e HIS5-R; Material y Métodos) y se secuenció el producto de PCR obtenido en cada caso. Los SNPs son detectados fácilmente al analizar la secuencia, por la presencia simultánea de las dos bases que lo conforman. La secuenciación de varios clones de la cepa SC5314 (SC5314-1 a SC5314-5; Tabla 1.1) indicó la presencia de los mismos SNPs, lo que muestra que su aparición en la cepa CAI4 no es fruto de mutaciones puntuales originadas por las manipulaciones genéticas que originaron esta última. Se han encontrado también evidencias de recombinación dentro de la ORF. Así, en la cepa CAI4, aparece un clon recombinante ocasionado presumiblemente por un entrecruzamiento entre las posiciones 1770 y 1980, ya que presenta la secuencia del alelo 1 hasta la posición 1770 y la del alelo 2 después de la base 1889. Igualmente, se encontraron indicios de recombinación en dos clones procedentes de la cepa SC5314; así, existen indicios de entrecruzamiento entre las bases 929 y 1719 en el clon 4 (SC5314-4), y homocigosidad en el SNP929 en el clon 5 (SC5314-5). Este último puede ser debido a una mutación puntual o a un mecanismo de conversión génica que afecta un fragmento corto que incluye este SNP. Aunque estos resultados sugieren la existencia de recombinación en este *locus*, también pueden considerarse otras posibilidades (ver Discusión). Finalmente, se ha encontrado un cambio puntual de C a T en la posición 1825 del clon CAI4-4, lo que resulta en un cambio de prolina a serina. El hecho de que dicho cambio se haya encontrado sólo en un clon sugiere que se trata de una mutación puntual. En conjunto, estos resultados indican que los dos alelos definidos por 11 SNPs son específicos del linaje SC5314 y razonablemente estables.

	<u>266</u>	<u>405</u>	496	769	929	1719	1770	1825	1890	1908	1938	<u>1983</u>
1001	C	C	G	G	G	G	T	C	T	T	T	T
SC5314 reported	C(S)/ T(L)	C/T	G	C	T	G	T	C	T	T	T	T/A
CAI4-1	C	C	G	C	T	G	T	C	T	T	T	T
CAI4-2	C	C	G	C	T	G	T	C	T	T	T	T
CAI4-3	C	C	G	C	T	G	T	C	T	T	T	T
CAI4-4	C	C	G	C	T	G	T	T(S)	T	T	T	T
CAI4-5	C	C	G	C	T	G	T	C	G	A	C	A
CAI4-6	T	T	C	G	G	C	C	C	G	A	C	A
CAI4-7	T	T	C	G	G	C	C	C	G	A	C	A
CAI4-8	T	T	C	G	G	C	C	C	G	A	C	A
SC5314-1	T	T	C	G	G	C	C	C	G	A	C	A
SC5314-2	C	C	G	C	T	G	T	C	T	T	T	T
SC5314-3	C	C	G	C	T	G	T	C	T	T	T	T
SC5314-4	C	C	G	C	T	C	C	C	G	A	C	A
SC5314-5	C	C	G	C	G	G	T	C	T	T	T	T
SC5314												
Nuestros datos	C(S)/ T(L)	C/T	G(E)/ C(Q)	C(H)/ G(D)	T(V) /G(G)	G/C	T/C		T/G	T/A	T/C	T/A

Tabla 1.1: Bases correspondientes a los SNPs detectados en los alelos del gen *HIS4* derivados de las cepas CAI4 y SC5314. En la primera fila se muestran las bases del alelo reportado de la cepa 1001 cuya posición se corresponde con los SNPs encontrados. En la segunda fila, se muestran los SNPs reportados durante la secuenciación del genoma de la cepa SC5314 tal como aparecen en la base de datos de *Candida albicans* (<http://www.candidagenome.org>). En la fila inferior se resumen los SNPs encontrados en los clones analizados en el presente estudio. En gris claro se muestra el alelo 1 (haplotipo CT), y en gris oscuro el alelo 2 (haplotipo GG). Los clones en un gris intermedio corresponden a nuevos alelos creados presumiblemente mediante la recombinación de ambos alelos originales (gris claro y gris oscuro). Las posiciones con los SNPs descritos por Jones *et al.* (2004) se muestran subrayados en la parte superior. En la línea inferior se indican en negrita las bases no presentes en el alelo de la cepa 1001. Entre paréntesis se indican los aminoácidos codificados por cada alelo a nivel de los SNPs no-sinónimos. La mutación puntual se indica en *itálica*.

1.4. Análisis funcional de los alelos *HIS4* en el linaje de la cepa SC5314.

Es claro que el alelo *HIS4* secuenciado de la cepa 1001 es activo (Tabla 1.1), ya que fue capaz de complementar la mutación *his4-34* de *S. cerevisiae* (al menos la actividad His4A e His4B inactivadas por la mutación; Navarro-García *et al.*, 1998), además de complementar la auxotrofia para histidina de las cepas obtenidas mediante tratamiento con luz UV. Por otra parte la cepa CAI4 posee dos alelos diferenciados (haplotipo CT y GG), de los cuales uno al menos es activo, ya que esta cepa es His⁺. Además, los experimentos con luz UV sugieren que el otro alelo no es funcional. Sin embargo, del análisis de la secuencia no está claro qué alelo es activo, ya que el alelo 1

es similar al alelo de la cepa 1001 pero difiere en las posiciones 769 (C en lugar de G, que resulta en His en lugar de Asp en la posición 257 de His4p) y 929 (T en lugar de G, que resulta en Val en lugar de Gly en la posición 310 de His4p), mientras que el alelo 2, aunque difiere bastante con el alelo de la cepa 1001 (lleva la base alternativa en los 9 restantes SNPs), conserva las bases del alelo de la cepa 1001 en las posiciones 769 y 929.

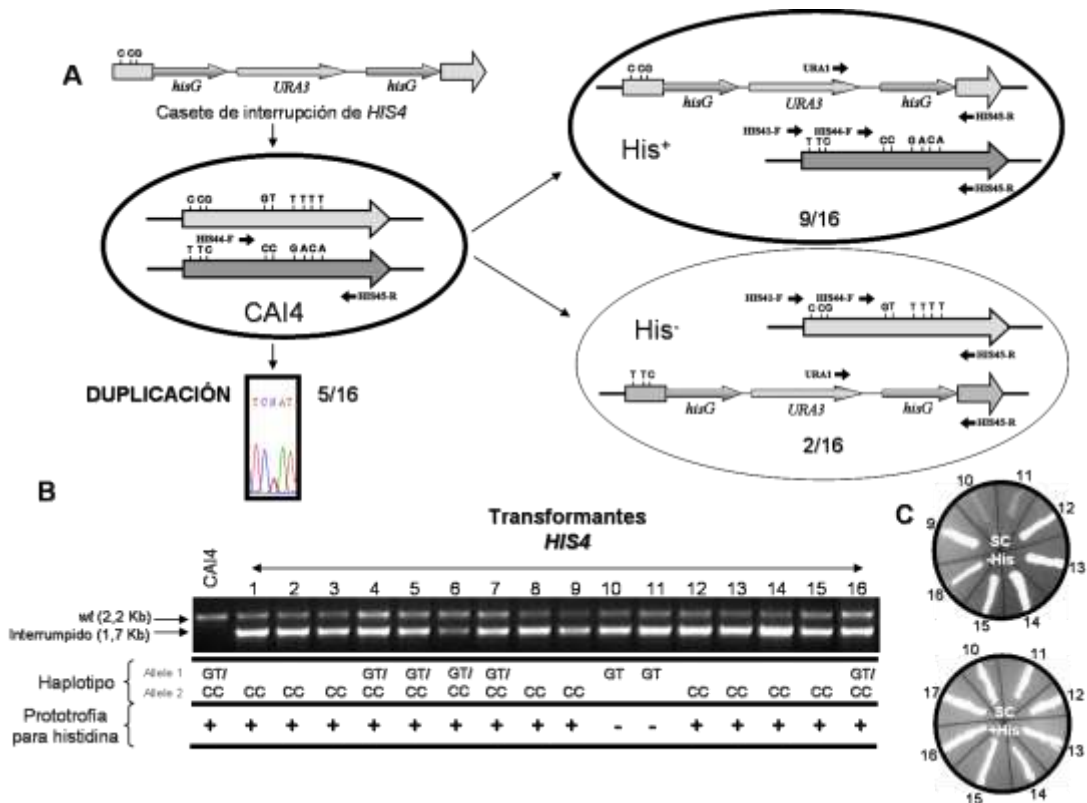


Fig. 4.1: Demostración de la existencia de un alelo funcional y otro no funcional del gen *HIS4* presentes en la cepa CAI4. (A) La cepa CAI4 se transformó con el casete de interrupción del gen *HIS4*. Los alelos se identifican mediante gris claro (inactivo, alelo 1) y gris oscuro (activo, alelo 2). El esquema muestra las bases polimórficas de cada alelo que permitirán su identificación tras la secuenciación de los fragmentos amplificados. El casete fue preparado a partir de de la cepa 1001 (nótese la presencia de tres heterozigosis en la región flanqueante 5' del casete respecto del alelo 2 y la identidad de las mismas bases con las del alelo 1, anterior a la zona donde se encuentra el *URA*-blaster y que son similares a las encontradas en el alelo 1). (B) Los transformantes se seleccionaron en medio SC menos uridina y se verificaron por *Southern blot* (datos no mostrados), y por PCR utilizando los oligonucleótidos *HIS41-F* y *HIS45-R* (2.2 Kb) para el alelo silvestre, e *HIS45-R* y *URA1* (1.7 kb) para el alelo interrumpido *hisG-URA3-hisG*. Los heterozigotos correctos muestran bandas de 2.2 Kb y 1.7 Kb correspondientes al alelo silvestre y al alelo interrumpido respectivamente. En los transformantes heterozigóticos *HIS4/his4Δ::hisG-URA3-hisG* correctos, las bases específicas del alelo residual se identificaron por secuenciación del producto de PCR entre las posiciones 1354 y 2080 de la ORF (un fragmento de 726 pb que incluye los SNPs 1719 hasta 1983 en la cepa original) utilizando los oligonucleótidos *HIS41-F* y *HIS45-R*. Para simplificar, sólo se indican las bases correspondientes a las posiciones 1719 y 1770, pero el resto se corresponde con el haplotipo que éstas definen. Algunos disruptantes conservan las dos bases de cada SNP (ver texto). En el panel A se muestra un ejemplo de una región de uno de estos electroferogramas en donde aparecen las dos bases en la misma posición. Para determinar su requerimiento de histidina, todos los heterozigotos se sembraron en medio mínimo en presencia y ausencia de histidina. El comportamiento de varias cepas en este ensayo se muestra gráficamente en el panel C.

Con objeto de abordar esta cuestión, se procedió a interrumpir una copia de cada alelo del gen *HIS4* con el casete de interrupción (Ver Material y Métodos). Los transformantes fueron seleccionados en medio sin uridina, pero suplementado con histidina para permitir el crecimiento de los posibles auxótrofos. El análisis de 31 transformantes mediante *Southern blot* (no mostrado) y PCR usando tres pares de oligonucleótidos (HIS41-F e HIS45-R, HIS41-F y URA2, y URA1 e HIS45-R, Fig. 4.1; ver Material y Métodos) indicó que 16 de ellos estaban correctamente interrumpidos en uno de los alelos (Fig. 4.1). El DNA de los heterocigotos se amplificó utilizando una pareja de “oligos” de la zona delecionada (ver Material y Métodos y Fig. 4.1), de manera que solo proporciona producto del alelo residual. La secuenciación de los productos de cada heterocigoto permite identificar el alelo no interrumpido a través de la identificación de la base presente en las posiciones de los SNP correspondientes.

Como se muestra en la Fig. 4.1B, solo dos transformantes retuvieron el haplotipo correspondiente al alelo 1 (alelo 2 interrumpido), mientras que la mayoría de ellos retuvieron el haplotipo correspondiente al alelo 2 (alelo 1 interrumpido). El análisis de las secuencias de las regiones 5' presentes en el casete de interrupción y en cada uno de los alelos sugiere una explicación para esta preferencia. Como se indica en Materiales y Métodos, este casete fue construido a partir del alelo *HIS4* de la cepa silvestre 1001. La secuencia de la región 5' de su ORF es idéntica a la del alelo 1 encontrado en las cepas SC5314 y CAI4; sin embargo, cuando se compara con la región correspondiente del alelo 2 se observan tres heterozigosidades (ver Tabla 1.1 y Fig. 4.1). Esta diferencia podría determinar la integración preferente en el alelo 1. Cinco disruptantes conservaban aún los dos alelos, lo que sugiere una duplicación de uno de ellos antes de la disrupción seguida de la integración del casete en una de las copias. Esta situación puede ser distinguida fácilmente mediante PCR, debido a que la banda correspondiente al alelo silvestre (la de 2.2 kb) exhibe una intensidad relativa sensiblemente mayor (Fig. 4B, transformantes 4, 5, 6, 7 y 16) comparada con la de los heterozigóticos normales. Cuando se determinó la capacidad de los transformantes para crecer en ausencia de histidina, se observó que aquellos que conservaba el alelo 1 (interrupción en el alelo 2; cepas 4C y 5C) eran auxótrofas, mientras que aquellos que conservan el alelo 2 (interrupción del alelo 1) permanecían protótrofos (Fig. 4.1C). Estos resultados confirman la heterozigosidad de *HIS4* e identifican los alelos activo (alelo 2) e inactivo (alelo 1).

1.5. Identificación del SNP responsable de la inactivación del alelo 1.

De entre los 11 SNP presentes en la ORF *HIS4* del linaje SC5314, 7 son sinónimos, mientras que 4 son no sinónimos y alteran la secuencia de la proteína correspondiente: C/T en la posición 266, G/C en la 496, C/G en la 769, y T/G en la 929, que resultan en los cambios Leu89Ser, Glu166Gln, His257Asp, y Val310Gly respectivamente. Por otra parte, como hemos mencionado el alelo activo de la cepa 1001 es idéntico al alelo inactivo excepto en las bases 769 y 929 donde se encuentra la base alternativa, lo que sugiere que uno de estos dos cambios es clave para la función del alelo. Con objeto de identificar cual de ellos es responsable de la inactivación, se sustituyeron individualmente las bases de las posiciones 769 y 929 de la ORF silvestre de la cepa 1001 por las correspondientes bases del alelo 1; de tal manera que el Asp²⁵⁷ fue sustituido por His²⁵⁷, y la Gly³¹⁰ por Val³¹⁰. Las ORFs mutadas se clonaron por separado en el vector pRMH1 (pRMH1-C769 y pRMH1-T929), y se determinó su capacidad para complementar un mutante *his4-ΔΔ* Uri⁻ (H47A2A). La construcción pRMH1-C769 complementó la auxotrofia de esta cepa en igual medida que la construcción PRMH1 (silvestre) que lleva el alelo silvestre de la cepa 1001, mientras que la construcción pRMH1-T929 fue incapaz de hacerlo. Por tanto, Asp257 no es crucial para la actividad de His4, mientras que Gly310 sí lo es, y su sustitución por Val condujo a la pérdida de actividad.

1.6. Análisis de la heterozigosis de *HIS4* en otras cepas de *C. albicans*.

La presencia de un alelo *HIS4* funcional y otro no funcional en el linaje de la cepa SC5314 nos indujo a investigar si esta situación es extensible a otros aislados clínicos que han sido usados frecuentemente en diferentes laboratorios (ver Tabla I). Para evaluar esta posibilidad, se secuenciaron zonas específicas de *HIS4* en otros aislados clínicos, prestando especial atención en la conservación del SNP 929T/G causante de la no funcionalidad de uno de los alelos. Para ello, usando el DNA genómico de los aislados 1001, 1006, 3153A, y 4919 como molde, se amplificó mediante PCR una región comprendida entre las posiciones 372 y 2080 de la ORF *HIS4* utilizando los oligonucleótidos HIS42-F e HIS4-5R (ver Material y Métodos), y el fragmento amplificado se secuenció para determinar los SNP (Tabla 2.1). El

polimorfismo responsable de la inactivación de la proteína (Val310) fue detectado en la cepa 3153A, mientras que las cepas 1001, 1006 y 4918 poseían residuos de Gly en ambos alelos. El polimorfismo G496T estaba conservado en todas las cepas a excepción de la cepa 4918. La cepa 1006 fue particularmente polimórfica en la región analizada, mostrando 7 nuevos polimorfismos, mientras que la cepa 4918 no exhibió ningún polimorfismo en esta región. Sorprendentemente, la cepa 4818 (aislada por Ardell Proctor en 1975 de la sangre de un paciente con candidiasis sistémica en Duke Hospital, Tabla I) parece estar relacionada con la cepa 1006 (cuyo parental CBS5736 es una cepa originaria de Holanda, Tabla I), ya que retiene una de las dos bases de 4 (posición 726, 729, 798, 893; Tabla 2.1) de los 7 SNPs específicos de la cepa 1006, y en todos los casos la base fue diferente a la encontrada en el resto de las cepas.

	ORF Position										
Strains	496	634	642	726	729	769	798	882	893	929	957
SC5314	G^E/C^Q	G ^D	A	T	A	C^H/G^D	A	G	G	T^V/G^G	C
1001	G^E/C^Q	G	A	T	A	G	A	G	G	G	C
1006	G^E/C^Q	G	A/G	T/C	A/T	G	A/G	G/A	G^S/C^T	G	C/T
3153A	G^E/C^Q	G	A	T	A	G	A	G	G	T^V/G^G	C
4918	G	A ^N	A	C	T	G	G	G	C	G	C

Tabla 2.1: Polimorfismos en el locus *HIS4* existentes en varias cepas de *C. albicans*. Las bases separadas por una barra determinan la existencia de un SNP en esa posición. Las bases y la posición en negrita indican polimorfismo con cambio de aminoácido (mostrado como superíndice). En gris claro se expresan las bases correspondientes al alelo 1 de la cepa SC5314 y en gris oscuro las pertenecientes al alelo 2. En *itálica* se muestra la base no presente en la secuencia de las demás cepas.

Si el SNP929 Val310Gly por si solo produce la heterozigosidad *HIS4/his4*, las cepas SC5314 y 3153A, pero no las otras tres, deberían producir auxótrofos después de tratamiento con luz UV. Esta predicción se verificó experimentalmente para todas las cepas a excepción de la 3153A, la cual no generó auxótrofos para la histidina. Así, no encontramos ningún auxótrofo de histidina al analizar 9239 supervivientes de esta cepa mientras que encontramos 13 auxótrofos entre 5529 supervivientes de la cepa SC5314 (en 6 grupos de aproximadamente 900 células por conjunto y colonia independiente), lo que revela una frecuencia aparición de His⁻ de aproximadamente $2-3 \times 10^{-3}$, similar a la encontrada en su derivado CAI4. Un análisis de la cepa 3153A indicó que fue trisómica para el Cr4, como se indicó por la diferencia de intensidad de los alelos *PHR1* y *RBT7*

(uno de los alelos revela el doble de intensidad que el otro; Fig. 5.1). También, se investigó el marcador *CZF1*, pero en contraste, mientras que la cepa SC5314 fue heterocigótica, la cepa 3153A fue homocigótica para este marcador (Fig. 5.1). Mismas conclusiones fueron extraídas del análisis de la secuencia de un SNP en el *locus HIS4* de esta misma cepa. Mientras que la cepa SC5314 muestra una cantidad semejante entre las bases que componen el SNP (T/G), la cepa 3153A contiene mayor cantidad de la base correspondiente al alelo activo (G). Todo esto explica la dificultad para obtener auxótrofos para la histidina en esta cepa tras tratamiento con UV y sugiere que la cepa 3153A presenta tres copias del Cr4 (dos de ellas conservan el alelo activo del gen *HIS4* de la cepa SC5314).

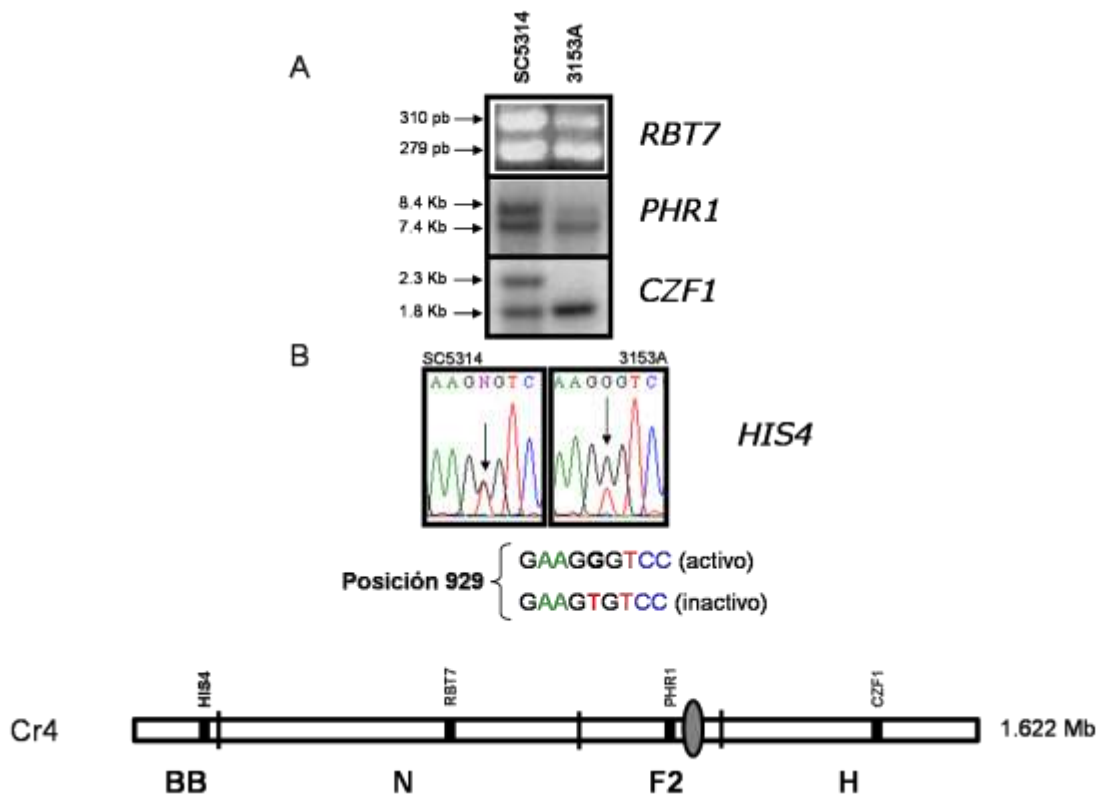


Fig. 5.1: Trisomía del Cr4 en la cepa 3153A. (A) El análisis de restricción de los *loci RBT7*, *PHR1* y *CZF1* se llevó a cabo como se describe en la Fig. 2.1 y en el texto asociado. La cuantificación de la intensidad de las bandas proporcionadas se llevó a cabo utilizando el software QuantityOne (BioRad). La intensidad relativa de las bandas derivadas de los *loci RBT7* y *PHR1* en la cepa SC5314 fue de 1:1, mientras que la en la cepa 3153A fue de 1:2. (B) Electroferogramas procedentes de la secuenciación de la región del gen *HIS4* que contiene el SNP T929G (indicado con una flecha) en las cepas SC5314 y 3153A. En la parte inferior de la figura se muestra la localización de los marcadores en el Cr4.

Con el fin de facilitar la detección rápida del SNP929 que determina la heterocigosidad de *HIS4* en aislados clínicos se diseñó una PCR alelo-específica que discriminase fácilmente entre alelos. Se utilizó un oligonucleótido directo común, y dos oligonucleótidos reversos que diferían en la última base que a su vez correspondía a la del SNP929 (ver Materiales y Métodos). Por tanto, uno era específico para el alelo 1 y otro específico para el alelo 2. Con el fin de incrementar al máximo la capacidad de discriminación entre alelos de los oligonucleótidos se utilizaron varios programas de PCR en donde se variaban las concentraciones de DNA molde y la temperatura de anillamiento. En las condiciones óptimas (50° C y 50 ng de DNA molde), el oligonucleótido específico para el alelo 1 (929-OFF) mostró especificidad (anilló con el alelo 1 y no lo hizo con el alelo 2); sin embargo, el oligonucleótido específico del alelo 2 anilló con ambos alelos bajo las mismas condiciones (alelos en las cepas heterocigóticas 2C y 4C). Por consiguiente, esta PCR puede usarse potencialmente para detectar el alelo inactivo (o alelo 1) en todos los casos. De hecho, como se muestra en la Fig. 6.1, el alelo inactivo fue identificado en las cepas SC5314, CAI4, 3153A, y en el heterocigótico *HIS4* auxótrofo para la histidina 4C, así como en todas las cepas His⁻ derivadas del tratamiento con luz UV. También estuvo presente en un derivado de la cepa SC5314, la cepa SN148 (Nobel and Johnson, 2005) (no mostrado). En cambio estaba ausente en las cepas 1001, 1006, 4918 y en el heterocigótico *HIS4* prototrofo 2C. Para identificar el alelo activo se utilizó el SNP769 (C769G), que como se describió anteriormente, estaba siempre asociado al SNP929; de tal manera que el haplotipo C769-T929 corresponde al alelo inactivo, mientras que el haplotipo G769-G929 corresponde al alelo activo. Cuando se llevó a cabo una PCR alelo-específica para el SNP769 bajo condiciones óptimas previamente determinadas experimentalmente, el oligonucleótido específico del alelo 1 solo amplificó su propio alelo, pero no el alelo 2, y viceversa. Como se observa en la Fig. 6.1, donde solo se muestra el resultado obtenido con el oligonucleótido específico del alelo activo (769-ON), dicho alelo estuvo presente en las cepas homocigóticas His⁺ 1001, 1006, 4918, en los heterocigóticos 3153A, SC5314 y CAI4 y en el heterocigótico 2C, y ausente en todos los auxótrofos His⁻. Los resultados obtenidos con la PCR específica para el SNP769 del alelo inactivo (no mostrado) coinciden con los resultados derivados de la PCR específica para el SNP929. Por consiguiente, los resultados de la PCR específica de SNP coincidieron con los obtenidos por secuenciación directa, y por lo tanto este ensayo puede ser utilizado rutinariamente para analizar la configuración alélica del gen *HIS4* de *C. albicans*.

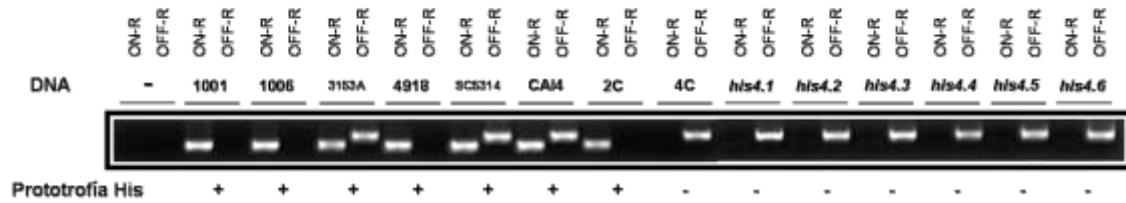


Fig. 6.1: Detección de ambos alelos utilizando los primers alelo-específicos. La PCR se llevo a cabo utilizando como molde 50 ng del DNA de cada una de las cepas. Las cepas analizadas son 1001 (wt), 1006 (Arg⁻, Ser⁻, Lys⁻, *ura3*, Mpa^R), 3153A (wt), 4918 (wt), SC5314 (wt), CAI4 (wt), 2C (*his4Δ::hisG-URA3-hisG/HIS4*), 4C (*his4/his4Δ::hisG-URA3-hisG*), e *his4.1-6* (aislados de la CAI4 mediante tratamiento con dosis de luz UV). La amplificación correspondiente al alelo 1 (inactivo) proporciona una banda de 579 pb, mientras que el alelo 2 (activo) amplifica una banda de 419 pb. Debajo se muestra la prototrofia exhibida por cada cepa.

1.7. Estudio de la secuencia promotora del gen *HIS4* de *C. albicans*.

La ORF del gen *HIS4* de *C. albicans* contiene 2517 pb, con una orientación 5'→3' hacia el telómero izquierdo, del que dista sólo 23 kb (Fig 7.1A). Está flanqueado por el gen *RBT5* (725 pb), telómero proximal y orientado en sentido opuesto a *HIS4*, y el gen *PEX5* (1778 pb; Navarro-García *et al.*, 1998), centrómero proximal y con la misma orientación que *HIS4*. (Fig. 7.1A). Entre el final de la ORF del gen *PEX5* y el inicio de la región codificante del gen *HIS4* existen 159 pb (región intergénica), donde presumiblemente debe localizarse al menos parte de la región promotora del gen *HIS4*. De hecho el análisis *in silico* de las secuencia presentes en la base de datos ha identificado una serie de motivos, entre los que destacan: 1) Dos cajas TATA consenso (TATATA y TTATTA; posiciones -156 y -121) y una no consenso (TATTTAT entre las posiciones -143 y -137)(Fig. 7.1B); 2) Una caja CAAT en la posición -184; 3) Dos bloques de pirimidina, uno entre las posiciones -80 y -70, y el otro más cercano al inicio de la ORF (entre -53 y -35); y entre éstos, localizada a 8 y 6 pb de distancia entre bloques, se encuentra una única secuencia CAAG (posición -92; Fig. 7.1B).

En *S. cerevisiae* los promotores de genes altamente expresados contienen regiones ricas en C y T, denominadas “bloques de pirimidinas” que, en algunos casos, van seguidas a una distancia aproximada de 10 pb de un elemento CAAG (Dobson *et al.*, 1982). En la región promotora del gen *HIS4* aparecen dos bloques de pirimidinas bien definidos, uno entre las posiciones -80 y -70, y el otro más cercano al inicio de la

ORF (entre -53 y -35); y entre éstos, localizada a 8 y 6 pb de distancia entre bloques, se encuentra una única secuencia CAAG (posición -92; Fig. 7.1B).

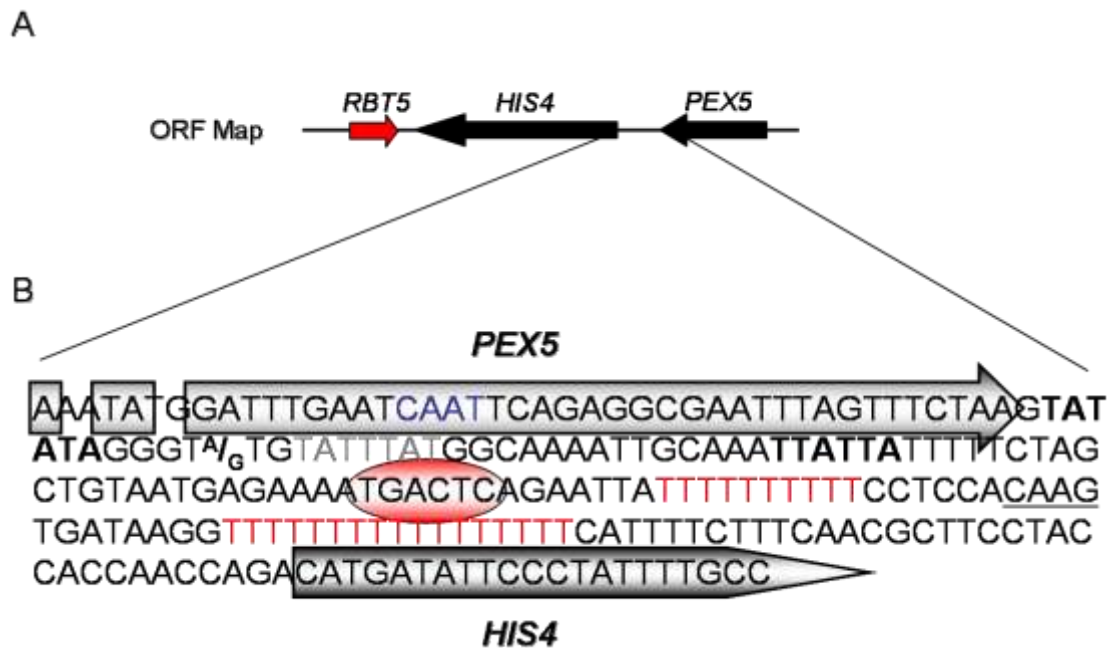


Fig. 7.1 (A) Localización cromosómica del gen *HIS4* de *C. albicans*. (B) Secuencia de la región promotora del gen *HIS4* de *C. albicans*. Los diferentes dominios de proteínas involucradas en la regulación de su expresión génica se muestran en varios colores: En rojo se muestran los bloques de pirimidinas, en negrita las cajas TATA (en gris la caja TATA no consenso encontrada), en azul la caja CAAT, y subrayado el elemento CAAG entre los bloques de pirimidina. La zona de unión del activador Gcn4 esta rodeada en rojo. El SNP encontrado en la posición -146 también se muestra (A/G).

Se ha descrito que la expresión del gen *ScHIS4* está bajo control de varios reguladores que conforman un mecanismo bien conocido, y que uno de estos mecanismos mantiene una expresión basal de este aminoácido durante todo el ciclo celular (Ardnt *et al.*, 1987). En este sentido, en la región promotora del gen *HIS4* de *C. albicans* se han identificado las secuencias consenso de unión de los activadores transcripcionales implicados en el control basal y general de aminoácidos en *S. cerevisiae*. En cuanto a las secuencias implicadas en el control basal, la secuencia para la unión del factor Bas1 (TGACTC; Hinnebusch, 1988) está localizada en la posición -93 de la región promotora, mientras que la zona de unión de Bas2 podría encontrarse entre las posiciones -125 y -109 (AAATTATTATTTTCTA); ya que en *S. cerevisiae* se han descrito como zonas ricas en A/T (Magbanua *et al.*, 1997). Se encontró también una única secuencia de unión del activador Gcn4 (posición -93, TGACTC; Hinnebusch, 1988), que esta involucrado en el control general de la transcripción. En el promotor

HIS4 de *S. cerevisiae* se encuentran hasta 5 sitios de unión de este activador, mientras que en cepas de *C. albicans*; tanto en la cepa SC5314 como en la 1001, solamente aparece uno (posición -93). Se ha descrito además que el factor Rap1 es absolutamente necesario para la transcripción correcta del gen *HIS4* en levaduras, hallándose el sitio de unión adyacente al de Gcn4 en *S. cerevisiae* (Devlin *et al.*, 1991). Si existiera un sitio de unión para este factor en el promotor del gen *HIS4* de *C. albicans*, debe estar altamente degenerado. En otros organismos como *K. lactis*, donde se ha definido la secuencia consenso de unión de este factor (5'-AYCYRTRCAYYW-3'; Larson *et al.*, 1994), no ha sido posible su localización (Lamas-Maceiras *et al.*, 1999). En nuestro caso, mientras que la secuencia consenso de unión para este factor descrita en *S. cerevisiae* no fue encontrada, sorprendentemente una secuencia bastante parecida a la referente a *K. lactis* apareció en la posición -328 del gen *HIS4* (5'-RTRCAYYW-3'); aunque en este caso no se encuentra localizada adyacente al sitio de unión del factor Gcn4.

1.7.1. Diferencias alélicas en el promotor de *HIS4*

Con el fin de confirmar la secuencia promotora de *HIS4* reportada en las bases de datos de *C. albicans*, y de analizar posibles polimorfismos en dicha región, amplificamos la región comprendida entre la base -616 y 922 en cada uno de los heterocigóticos 2C y 4C. Puesto que el complementario del cebador reverso se encuentra en el fragmento sustituido por el casete, sólo se amplificará la región correspondiente del único alelo no interrumpido. Las secuencias obtenidas para cada alelo (Tabla 3.1) indicaron la presencia de un nuevo SNP en la posición -146 (G/A; G corresponde al alelo 1 y A al alelo 2). Además, con el fin de confirmar las secuencias obtenidas y de comprobar que no contenían cambios inducidos por la manipulación genética, secuenciamos cinco clones independientes derivados de la cepa SC5314 (Ver Materiales y Métodos). Como se puede observar en la Tabla 3.1, cuatro de los cinco clones (HIS4P.1-4) corresponden al alelo 2 (activo), mientras que el alelo 1 (inactivo) estaba representado por un clon (HIS4P.5). Esta última disposición aparece en la secuencia de la región promotora de la cepa 1001 (G⁻¹⁴⁶), mientras que la otra (A⁻¹⁴⁶) aparece en la única secuencia de la base de datos perteneciente a la cepa SC5314. Además del SNP en la posición -146, se encuentra una región altamente polimórfica entre las posiciones -53 y -35, que contiene uno de los bloques de pirimidinas anteriormente descritos (17-19T) precedido por una o dos G. Esta región no solo varía

entre alelos, sino entre los clones de un mismo alelo. Así, el alelo activo de la cepa 2C lleva 2G y 18T (como se describió en la secuencia de la base de datos de *C. albicans*), mientras que cuatro clones de este alelo procedente de la cepa SC5314 solo contienen una G seguida de entre 17 y 19T. Igualmente, el alelo inactivo del heterocigótico 4C lleva una G y 17T, mientras que un clon correspondiente a la cepa SC5314 contiene una G y 18T (HIS4P.5). La variación en el número de bases T en esta región es probablemente debido al “DNA slippage” durante la replicación de esta región (Kunkel, 1986), mientras que la presencia de una o dos G podría ser el resultado de una transversión T a G. Kunkel (1986) encontró que secuencias tales como 5'-CGTTTTAC-3' desarrollan no solo variaciones en la cantidad de T en una alta frecuencia, sino también frecuentes transversiones de G a T. Por lo tanto, parecen existir dos alelos de la región promotora del gen *HIS4*: el alelo 2 representado por la secuencia de la cepa SC5314 (base de datos) y los clones HIS4P1.-4, y el alelo 1 representado por la secuencia reportada de la cepa 1001 (Navarro-García *et al.*, 1998) y el clon HIS4P.5. Dentro de cada alelo, son frecuentes las variaciones en la región que hemos denominado polimórfica.

Base de datos	
Cepas	Secuencia
1001	TGT.....G-TTTTTTTTTTTTTTTTTT (18T)
SC5314	TAT.....GGTTTTTTTTTTTTTTTTTT (18T)
Nuestros resultados	
Clones	Secuencia
2C	TAT.....GGTTTTTTTTTTTTTTTTTT (18T)
4C	TGT.....G-TTTTTTTTTTTTTTTTTT (17T)
HIS4P.1	TAT.....G-TTTTTTTTTTTTTTTTTT (18T)
HIS4P.2	TAT.....G-TTTTTTTTTTTTTTTTTT (19T)
HIS4P.3	TAT.....G-TTTTTTTTTTTTTTTTTT (18T)
HIS4P.4	TAT.....G-TTTTTTTTTTTTTTTTTT (17T)
HIS4P.5	TGT.....G-TTTTTTTTTTTTTTTTTT (18T)

Tabla 3.1: Secuenciación de la región promotora del gen *HIS4* de *C. albicans*. La secuencia mostrada corresponde a las posiciones -145-147 y al bloque de pirimidina situado entre las posiciones -53 y -35. Entre paréntesis se dispone el número total de T que contiene este bloque en cada caso. En gris claro se muestra la secuencia correspondiente al alelo 1 o inactivo, mientras que en gris oscuro la secuencia del alelo 2 o activo.

Para determinar qué diferencias en la región del promotor podrían afectar a la expresión, se realizaron hibridaciones *Northern* utilizando RNA de las siguientes cepas: CAI4, los dos heterocigóticos con distintos alelos (cepas 2C y 4C), y una de las cepas derivadas del tratamiento con luz UV (*his4.1*). Además, en un intento preliminar para determinar si las secuencias implicadas en el control de la biosíntesis de histidina eran funcionales, las mencionadas cepas se crecieron previamente en presencia y, cuando era posible, en ausencia de histidina. Como se observa en la Fig. 8.1, ambos alelos se expresaron en los correspondientes heterocigotos y la cepa *his4.1* expresó el alelo inactivo. Además, la presencia o ausencia de histidina no afectó significativamente el nivel de expresión del alelo activo en la cepa 2C, y lo mismo ocurrió en la cepa parental CAI4. Como era de esperar, el mutante *his4-ΔΔ* no expresó el mensaje, mientras que, al igual que el resto de las cepas, sí expresó el mRNA de *ACT1* utilizado como control de viabilidad celular y carga. Sin embargo, resultó llamativo que el nivel de expresión de *HIS4* en los heterocigotos fuera significativamente menor (10 %), de lo que correspondería a la mitad de la dosis génica (50%), cuando se comparó con CAI4 (en donde coexisten ambos alelos). Algo parecido sucedió con la cepa *his4.1*, que posiblemente posee dos copias del alelo no funcional, si bien en este caso el nivel de expresión alcanzó el 30% del silvestre. Resultados similares se encontraron utilizando el rRNA como control de carga (no mostrado). Estos resultados sugieren que la disrupción de un alelo con el casete *hisG-URA3-hisG* influye en la expresión del otro. Si bien esta situación no ha sido observada en heterocigotos derivados de la disrupción de otros genes, la localización especial de *HIS4*, a 23 Kb del telómero podría posibilitar o favorecer esta influencia. Por ejemplo, es posible que *HIS4*, al igual que otros genes subteloméricos, se encuentre sometido a silenciamiento, el cual podría verse afectado en la nueva situación creada, bien por la presencia de DNA extraño en esa zona, o por la propia expresión de *URA3*. Podría ocurrir también que la disrupción creara una situación de estrés que resultara en un incremento en la expresión de *ACT1*, con lo cual la baja expresión de *HIS4* observada en los heterocigóticos sería más aparente que real. Para complementar estos datos se realizó una RT-PCR utilizando nuevamente la expresión de *ACT1* como control. Como se observa en la Fig. 8.1B, todas las cepas, excepto la 4C que lleva el alelo inactivo, produjeron cDNA en la misma proporción.

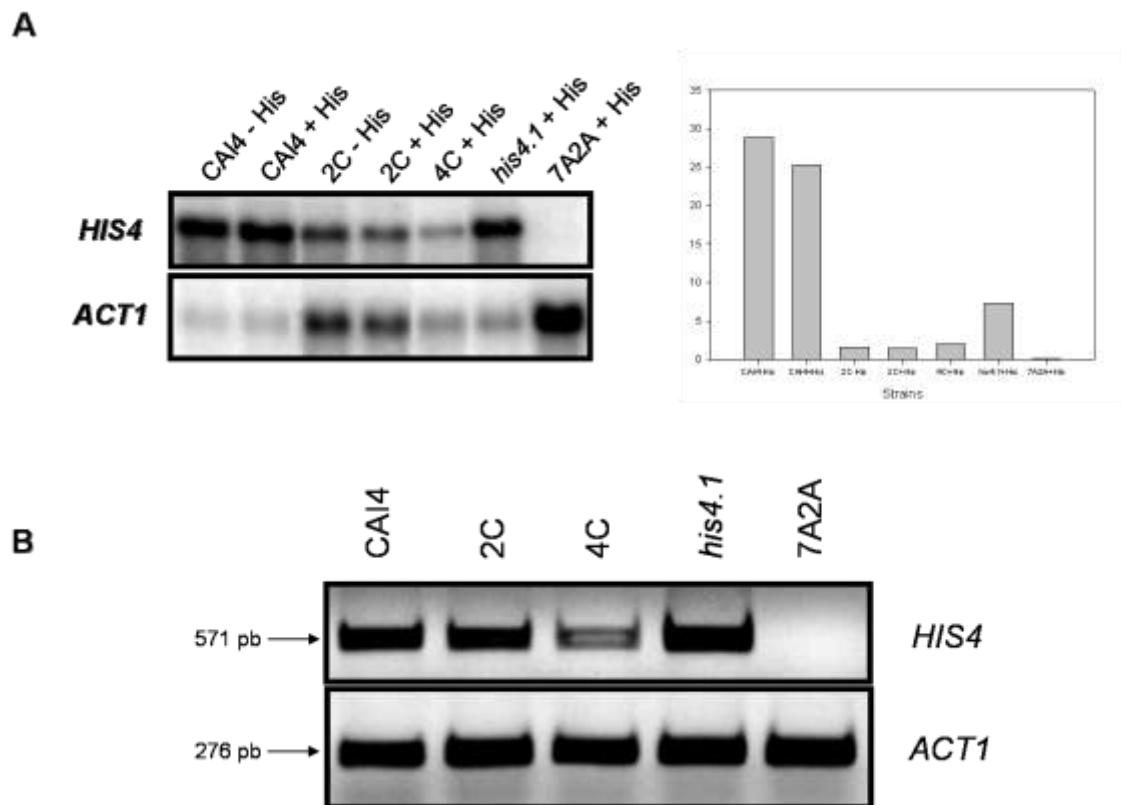


Fig. 8.1: Expresión del gen *HIS4* de *C. albicans*. **(A)** Expresión del gen *HIS4* bajo presencia y ausencia de histidina en el medio. *Northern blot* usando la sonda amplificada con los oligonucleótidos HIS43-F e HIS44-R. La cuantificación (a la derecha) del nivel de hibridación resultante en cada banda fue desarrollada con el Quantity ONE 1-D Analysis software (Bio-Rad). Las muestras fueron corridas e hibridadas por duplicado, no habiendo diferencias significativas entre ambas. **(B)** RT-PCR. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla II (Material y Métodos). Los oligonucleótidos HIS42-F e HIS43-R amplifican una banda de 571 pb, mientras que los oligos ACT-F y ACT-R amplifican una banda de 276 pb usada como control.

A pesar de los interrogantes que despiertan, estos resultados indican que las pequeñas diferencias observadas en promotor, no previenen la expresión de ninguno de los alelos cuando el otro está ausente. Sin embargo, no nos dicen nada de lo que ocurre cuando ambos alelos coexisten en la misma célula. Para afrontar esta cuestión, tratamos de poner a punto una RT-PCR específica de SNP. Para ello, se utilizó el cDNA amplificado a partir del RNA extraído de las cepas CAI4, 2C (con el alelo activo), y de las cepas 4C e *his4.1* (alelo inactivo). Este cDNA fue utilizado en una PCR con los primers alelo-específicos que discriminan entre alelos (véase apartado 1.6). Como se observa en la Fig. 9.1A, ambos alelos se expresan constitutivamente en la cepa CAI4, aunque parece que el nivel de expresión del alelo inactivo es más bajo. Como era de esperar, la cepa 2C sólo expresó el alelo activo mientras que la 4C así como el mutante

his4.1 sólo expresaron el alelo inactivo. Nuevamente, el alelo inactivo en la cepa 4C pareció expresarse mucho menos que el activo en la 2C, y lo mismo ocurrió, aunque no de forma tan significativa, en el mutante *his4* que sólo posee el alelo inactivo, aunque presumiblemente dos copias. El hecho de que los mismos cebadores amplificaron selectivamente una cantidad similar de DNA genómico de las mismas cepas hace sospechar que existe una expresión preferente del alelo activo. Sin embargo, puesto que el método utilizado no es cuantitativo y los resultados no concuerdan con los del análisis *Northern*, estos resultados deben ser evaluados con cautela, e indican la necesidad de realizar nuevos experimentos.

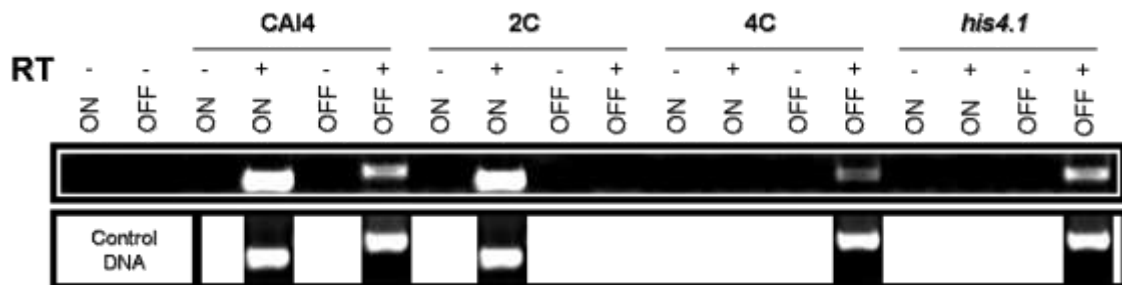


Fig. 9.1: RT-PCR específica de alelos del gen *HIS4*. Las cepas indicadas fueron crecidas a 30° C en medio sintético con histidina. Se muestra como ON a la utilización del primer común (directo) junto con el primer reverso 769ON-R, y como OFF al uso del común junto con el 929OFF-R (reverso) (ver Materiales y Métodos, Tabla III). El par primero amplifica una banda de 419 pb, mientras que el segundo la banda es de 579 pb. Todas las muestras fueron tratadas de la misma manera exceptuando la adición o no de la Retrotranscriptasa reversa (RT). En la parte inferior de la figura se expresa el control de las muestras con DNA en los casos donde hubo amplificación.

DISCUSIÓN CAPITULO I

En el presente capítulo, hemos investigado la presencia de dos marcadores nutricionales heterocigóticos, histidina y arginina, en la cepa CAI4 de *C. albicans*, mediante análisis de la generación de auxótrofos para estos aminoácidos tras tratamiento con bajas dosis de luz UV. Entre los supervivientes se encontraron auxótrofos para la histidina con una alta frecuencia (cerca de 3×10^{-3}), mientras que no se observaron auxótrofos para la arginina. Esta auxotrofia pudo ser complementada con el gen *HIS4*, indicando que la cepa CAI4 es heterocigótica para este gen. Auxótrofos para histidina en *C. albicans* han sido aislados anteriormente usando luz UV (Whelan and Magee, 1981), o combinándola con HNO_2 (Kakar *et al.*, 1983), así como con nitrosoguanidina (Altboum *et al.*, 1990). En el primer caso, se obtuvieron mutantes *his4* (A642) e *his5* (A5155), y en el segundo, la actividad afectada fue His4C. También se ha reportado la obtención de un mutante *his1-ΔΔ* (RM1000) mediante la delección secuencial de los alelos correspondientes. Sin embargo, no se realizaron estudios adicionales con estos mutantes.

El análisis detallado de la secuencia de *HIS4* ha demostrado, que tanto la cepa CAI4 como su parental (SC5314) poseen dos alelos *HIS4* con haplotipos bien definidos; siendo solamente uno funcional debido a un SNP en la posición 929 (G929T; Gly310Val). El alelo activo lleva G⁹²⁹ mientras que el inactivo lleva T⁹²⁹, de manera que una transversión G→T en el primero puede conducir a la homocigosidad e inactivación del producto génico. Confirmando esta observación, seis auxótrofos para la histidina aislados de la cepa CAI4 mediante luz UV conservan exclusivamente Val³¹⁰. La generación de estas cepas parece involucrar recombinación mitótica entre alelos, seguida de la segregación del alelo no funcional dentro de la misma célula (ver Fig. 3.1), pérdida de una copia del Cr4, o una combinación de ambos procesos. Curiosamente, cambios de residuos de Gly por Val o Asp en varias variantes de oncogenes *ras* y *p53* (Reddy *et al.*, 1982; Santos *et al.*, 1983; Takahashi *et al.*, 2002) previno la hidrólisis de GTP que quedó bloqueado en el sitio activo. Esta situación, parece originar una señalización permanente (Pai *et al.*, 1990), que resulta en la transformación maligna (Lancan *et al.*, 1992). El residuo de Gly juega también un papel crucial en la hidrólisis de ATP por algunas proteínas humanas, tales como la HSV-1 helicasa (Graves-Woodward *et al.*, 1997), el receptor TLR4 (*Toll-Like receptor 4*;

Arbour *et al.*, 2000), o el transportador de unión a ATP de retina (Suarez *et al.*, 2002), ya que la mutación a Val, Asp o Ala respectivamente inhibió total o parcialmente la actividad ATP-asa de las respectivas enzimas. Debemos reseñar que el cambio Gly310Val que inactiva la proteína His4 ocurre en el dominio His4B (cuya actividad fosforibosil-ATP pirofosfatasa cataliza la conversión del fosforibosil-ATP en fosforibosil-AMP en segundo paso de la síntesis de histidina; ver Fig. 1.1). Por tanto, parece probable que el residuo de Gly310 interactúe con el ATP y promueva su hidrólisis, mientras que la sustitución por Val bloquee este paso mediante la formación permanente de un complejo inactivo. En todo caso, la heterozigosidad del locus *HIS4* en la cepa SC5314 proporciona un nuevo marcador que puede ser usado en futuros análisis genéticos.

Además del SNP en la posición 929, otros diez polimorfismos, 8 de ellos no detectados durante la secuenciación del genoma, definen dos haplotipos bien preservados, uno por alelo. Sin embargo, hemos encontrado indicios de una frecuencia significativa de recombinación mitótica en la ORF del gen *HIS4*. La secuenciación de 8 clones *HIS4* derivados de la cepa CAI4 reveló un nuevo alelo (haplotipo) que pudo haberse producido por recombinación intragénica entre los otros dos. Puesto que no se analizaron las heterozigosidades en otros *loci* distales al punto de entrecruzamiento, no se puede distinguir entre conversión génica y entrecruzamiento mitótico. Además, al menos otro alelo recombinante, y posiblemente dos, fueron detectados durante la secuenciación de cinco clones *HIS4* procedentes de la cepa SC5314 (Tabla 1.1). Si se trata de auténticos recombinantes, estos datos sugieren que del 15 al 23 % de la población analizada había experimentado eventos de recombinación en la ORF *HIS4* (2517 pb), lo que se traduce en frecuencias de recombinación espontánea de 0,06-0,09 por cada 1000 pb, o 6×10^{-5} a 9×10^{-5} por base. A primera vista, la detección de estos clones híbridos en las cepas SC5314 y CAI4 corrobora la noción de que la recombinación mitótica en *C. albicans* es bastante común, como se ha descrito previamente (Enloe *et al.*, 2000; Lephart and Magee, 2006; Odds *et al.*, 2007). Sin embargo, este valor es extremadamente alto (aún cuando se considera la frecuencia más baja detectada, 12,5 % de la población en el caso de la CAI4) y merece una discusión adicional. Una posibilidad se deriva de la localización del gen *HIS4* a solo 23 Kb del telómero izquierdo. Se ha reportado que cerca del telómero se encuentran grandes regiones homocigóticas, sugiriendo que la frecuencia de recombinación mitótica es más alta en estas regiones (Jones *et al.*, 2004). Sin embargo, el hecho de que hayamos

observado una asociación idéntica entre las bases polimórficas en las cepas SC5314 y CAI4 no expresa la alta frecuencia de recombinación y sugiere que pueda tratarse de un artefacto. Por ejemplo, puede atribuirse a un efecto tardío de un evento de recombinación ocurrido al comienzo del cultivo. También puede ser posible que nuestros resultados sean consecuencia del bajo número de clones secuenciados. Otra posibilidad es que los clones recombinantes sean artefactos de PCR. Puesto que *C. albicans* es diploide, ambos alelos están presentes en el DNA usado como molde. Siempre que la síntesis de una cadena de DNA se termine antes de que ésta alcance el sitio de unión del segundo primer, esta banda de DNA puede unirse a la cadena complementaria en el siguiente ciclo de PCR. Si se une al otro alelo podría resultar en productos híbridos que contuvieran secuencias de los dos alelos originales. En este caso, este mecanismo ocurre en una alta frecuencia en la reacción de PCR. Aún considerando que este evento tenga lugar en los primeros ciclos de PCR, el número de moléculas de DNA excedería considerablemente estos artefactos (recombinantes). En ausencia de un experimento de fluctuación tipo Luria-Delbruck (o una modificación de este; Lephart and Magee, 2006) que determine la frecuencia real de recombinación (eventos/célula/generación) en una región particular del genoma no, se puede confirmar ni descartar ninguna posibilidad.

Resultó llamativo que en la cepa CAI4 el casete de *HIS4* se integrara preferentemente (x 5) en el alelo no funcional (alelo 1). Esta preferencia deriva posiblemente de la presencia de tres heterozigosidades en la región 5' del casete respecto al alelo funcional, mientras que esta región fue idéntica a la del alelo no funcional. Yesland y Fonzi (2000) encontraron que el casete de interrupción del gen *PHR1* se integraba con una preferencia tres o cuatro veces mayor en uno de los alelos y atribuyeron este efecto a la existencia de heterologías entre las regiones flanqueantes del casete y la región correspondiente del otro alelo. La integración específica de alelo puede ser bastante común en *C. albicans* en vista del elevado número de polimorfismos que posee en su genoma. Otra explicación potencial para esta preferencia de integración podría provenir de diferencias en las eficiencias relativas de transcripción entre ambos alelos. Yesland y Fonzi (2000) han sugerido que no sería sorprendente encontrar variaciones alélicas en la transcripción, la cual podría influenciar la recombinación (Paques and Haber, 1999); y esto ha sido verificado en los *loci* *SAP2* (Staib *et al.*, 2002) y *ADE2* (Tsang *et al.*, 1999). De hecho, en *C. albicans*, la actividad transcripcional incrementa la recombinación con DNA exógeno (Srikantha *et al.*, 1995). Sin embargo,

no parece ser éste el factor determinante en nuestro caso, puesto que los datos preliminares apuntan a una transcripción preferencial del alelo activo que es el que muestra menor frecuencia de integración. Obviamente, la respuesta a esta pregunta necesita estudios detallados de la expresión de ambos alelos *HIS4* en la cepa parental SC5314. Otra observación digna de mención es la frecuente duplicación de un alelo antes de la integración del casete de interrupción (cerca del 33% de los casos), probablemente como consecuencia de la duplicación de todo el cromosoma. Después, el casete de interrupción se integra en una de las copias resultantes. La preferencia de integración mencionada sugiere que el homólogo que sufre la duplicación es el que lleva el alelo no funcional, aunque se necesitan estudios adicionales para confirmar esta situación.

El análisis de la región promotora del gen *HIS4* de *C. albicans* identificó las secuencias de unión de algunos activadores transcripcionales, incluyendo los involucrados en el control transcripcional de la síntesis de aminoácidos en levaduras. Nuestros resultados indican que ambos alelos *HIS4* se expresan simultáneamente en la célula, aunque parece que el alelo inactivo se expresa en menor medida. La presencia de un SNP (posición -146; G alelo 1, A alelo 2) en la región promotora del gen *HIS4* podría explicar este resultado, aunque son necesarios estudios complementarios a este respecto. De hecho nuestras observaciones relativas a la posible expresión cooperativa entre alelos, o al efecto que la disrupción de un alelo tiene en la expresión del otro, proporcionan un interesante campo de investigación.

El SNP (G929T) estuvo presente en dos aislados analizados. Uno de ellos (SC5314) generó auxótrofos para la histidina bajo tratamiento con luz UV. El otro, la cepa 3153A se comportó de manera anómala, puesto que posee el SNP⁹²⁹ pero no originó auxótrofos tras la exposición a luz UV. Esto parece ser debido a que la cepa 3153A es aparentemente trisómica para el Cr4 teniendo dos alelos activos y uno inactivo. La ausencia de este SNP en tres aislados clínicos se correlacionó con la incapacidad para originar auxótrofos para la histidina tras tratamiento con luz UV. El hecho de que unas cepas posean el SNP⁹²⁹ y otras carezcan de él no se explica fácilmente. Recientemente, se ha reportado que diferencias alélicas en el gen *CDR2*, el cual codifica para una bomba de expulsión de drogas, resultan en diferentes capacidades para transportar azoles (Holmes *et al.*, 2006). Sin embargo, ambos alelos fueron igualmente frecuentes en 69 aislados clínicos, y dos cepas resistentes a azoles conservaron el alelo que confiere alta sensibilidad a este antifúngico. En este caso, se

sugirió que la posesión de dos alelos con diferente actividad podría ser ventajosa, aunque la razón sería diferente a la de resistencia a azoles, y estar relacionada con la adaptación de *C. albicans* a los diferentes ambientes encontrados en el huésped (Holmes *et al.*, 2006).

¿Podría aplicarse un razonamiento similar para la heterocigosidad en el *HIS4* detectada en este estudio? Aunque un 40% de las cepas analizadas presentaron el SNP⁹²⁹, el bajo número de aislados analizados no permite descartar que se trate de una mutación al azar que no haya sido seleccionada aún. Claramente, es necesario analizar la situación en un número mayor de aislados. Aunque otras mutaciones pueden también generar un gen *HIS4* inactivo, el papel crítico jugado por el SNP929 sugiere que pueda actuar como un “interruptor” que regula la síntesis de histidina en respuesta a condiciones ambientales. Ambos alelos *HIS4* de la cepa SC5314 pueden expresarse por lo que se sintetizaría tanto proteína activa como inactiva. La competición entre dominios His4B resultaría en una disminución de los niveles de fosforibosil-AMP. De esta manera se limita la síntesis de histidina a la vez que se previene el gasto de ATP. En un ambiente rico en histidina, esta situación podría dejar ATP libre para otras reacciones biosintéticas, confiriendo una posible ventaja selectiva para los heterocigóticos *HIS4/his4*. Sin embargo, es difícil evaluar esta posible competición ya que no conocemos la afinidad de cada proteína por el ATP o la contribución real de cada alelo al conjunto de moléculas totales His4 en la célula.

Se ha reportado recientemente que haplotipos de la catecol-O-metiltransferasa humana modulan la expresión de la proteína por alteración de la estructura secundaria del mRNA, aún cuando los SNP asociados sean no sinónimos (Nackley *et al.*, 2006). También, se ha demostrado que un SNP silencioso en el transportador MDR es el causante de cambios en el plegamiento de la proteína (Kimchi-Safarti *et al.*, 2007). Estos tipos de mecanismos reguladores podrían afectar la expresión de genes en *C. albicans*, ya que exhibe en su genoma alta densidad de estos SNPs. Nuevamente, la ORF *HIS4* constituye un buen modelo para este tipo de estudios.

CAPÍTULO II

2. RESULTADOS CAPÍTULO II

2.1. Generación de auxótrofos His⁻ en mutantes *rad52-ΔΔ*.

En el capítulo anterior hemos demostrado que *C. albicans* SC5314 y su derivado CAI4 son heterocigóticos para *HIS4*; de fundamental importancia es la presencia de un SNP (G929T), una de cuyas configuraciones (T) resulta en un alelo recesivo debido a la presencia de Val en lugar de Gly en la posición 310 de His4p. Por tanto, la frecuencia de aparición de auxotrofos para la histidina puede ser tomada como una medida de la frecuencia de LOH tanto en la cepa silvestre como en mutantes de recombinación de *C. albicans*. Cuando se incubaron en YEPD líquido, mutantes nulos *rad52* (Uri⁺ y Uri⁻) produjeron espontáneamente unos pocos auxotrofos (6 de 1100 colonias en un experimento), como se demostró por la aparición de colonias en medio SC completo que fueron incapaces de crecer cuando se replicaron a placas sin histidina. Por el contrario, no apareció ningún auxotrofo en cultivos paralelos de las cepas parentales Rad52⁺ (CAF2 o CAI4) crecidos en las mismas condiciones. Puesto que los auxotrofos obtenidos en este tipo de experimentos pueden derivar de un único evento mutacional ocurrido en el inicio del cultivo, se llevó a cabo un experimento de fluctuación para determinar la frecuencia real de aparición de auxótrofos. No se observó un solo auxotrofo entre casi 25000 colonias de CAF2 (ocho conjuntos de aproximadamente 3000 células cada uno) lo que indica una frecuencia de producción espontánea de His⁻ menor de 5×10^{-5} . Por el contrario, ocho conjuntos, de unas 1100 células cada uno, de la cepa *rad52-ΔΔ* Uri⁺ (TCR2.1) produjeron 3, 4, 1, 2, 2, 3, 3 y 3, auxotrofos respectivamente, lo que proporciona una frecuencia de 3×10^{-3} (mediana = 3). Datos similares se obtuvieron utilizando los derivados Uri⁻, tanto parental CAI4, como mutante (TCR2.1.1). Estos resultados indican que la mutación *rad52* incrementa la frecuencia de eventos que conducen a la auxotrofia para histidina en *C. albicans*, e identifican la recombinación homóloga como un guardián de la estabilidad genómica en este organismo. Se seleccionaron siete cepas His⁻ (*his.*1* a *his.*7*) derivadas de TCR2.1.1 para su estudio detallado.

Además, esta frecuencia de aparición de auxótrofos His⁻ aumentó considerablemente cuando las células *rad52* fueron tratadas con bajas dosis de UV (20 J/m²). Esta frecuencia es del orden de 4-5 veces mayor a la obtenida en la cepa silvestre

CAI4 y SC5314 (ver apartado 1.1), mientras que la supervivencia en este caso fue menor (10 %). Por tanto, se puede decir que la ausencia de Rad52 incrementa la frecuencia de aparición de auxótrofos para la histidina tras tratamientos con bajas dosis de UV.

Para investigar la posibilidad de que la auxotrofia para histidina se debiera a la inactivación del alelo funcional de *HIS4*, transformamos las cepas seleccionadas con el plásmido pRMH1 (Navarro-garcía *et al.*, 1998), que además de *HIS4* de la cepa 1001, lleva el marcador *URA3*. Como se describió en el capítulo anterior, este plásmido complementó un mutante nulo *his4* generado utilizando el URA-blaster. Como se muestra en la Tabla 1.2, todas las cepas excepto *his.*5* mostraron algún transformante Uri⁺, aunque con una eficiencia de 100 veces menor que la cepa CAI4 (datos no mostrados), lo que sugiere que la transformación estable y/o la integración/mantenimiento de plásmidos en *C. albicans* depende en gran medida de Rad52 (resultados no publicados). Cuando células procedentes de una colonia de transformación Uri⁺ se replicaron a placas sin histidina, cada una produjo colonias, lo que sugería que habían sido complementadas por *HIS4*. Sin embargo, los experimentos de complementación pueden complicarse por la reversión del fenotipo. Por tanto, realizamos un test adicional para analizar si la frecuencia de complementación del fenotipo His⁻ se correlacionaba con la del fenotipo Uri⁻. Como se muestra en la Tabla 1.2, todas las cepas transformadas mostraron abundantes colonias Uri⁺ pero sólo unas pocas His⁺ lo que sugería que las últimas eran revertientes His⁺ en lugar de haber sido complementadas por *HIS4*. Debido a esta contingencia, hemos denominado a nuestros mutantes *his**. Una vez más, cuando una cepa control Rad52⁺ *his4-ΔΔ* se complementó con el mismo plásmido produjo el mismo número de transformantes para cada marcador (Tabla 1.2). Una posibilidad es que, independientemente, o además de *HIS4*, los mutantes *his** posean otro gen *HIS* inactivado. Esto es poco probable, puesto que todos los auxotrofos obtenidos por exposición a luz UV fueron complementados por *HIS4*, lo que sugiere que es el único heterocigótico de todos los genes de la serie *HIS*. En todo caso, dados los problemas de transformación de las cepas nulas *rad52* y de reversión de las cepas *his** (ver más adelante), estos experimentos de complementación no resultaron concluyentes.

Cepa	H47A2A	<i>his*.1</i>	<i>his*.2</i>	<i>his*.3</i>	<i>his*.4</i>	<i>his*.5</i>	<i>his*.6</i>	<i>his*.7</i>	
Transformantes	16	1	5	1	1	-	1	3	
Número de colonias	SC-URA	163	985	1440	892	2162	-	1018	1047
	SC-HIS	157	1	1	24	93	-	3	8

Tabla 1.2: Complementación de las cepas *his** con el plásmido pRMH1 (*HIS4*). Todas las cepas se transformaron con 1-5 μ g de DNA (ver Material y Métodos). Posteriormente, una colonia de cada transformante se diluyó en agua, y tras tres diluciones (1/10), 100 μ l se sembraron en placas de medio SC-His y SC-Ura. Después de 24-48 horas de incubación se contaron las colonias aparecidas en cada placa. La cepa control (H47A2A) contiene el genotipo: *Δura3::imm434/Δura3::imm434 RAD52/RAD52 his4::hisG/his4::hisG.*, pero mostró un menor número de transformantes en comparación con la cepa CAI4 (datos no mostrados).

2.2. Los dos alelos de *HIS4* presentes en la CAI4 se encuentran también en las cepas *rad52-ΔΔ*, pero las ORFs exhiben una alta frecuencia de mutación.

Los auxótrofos para histidina deficientes en *His4* podían haberse formado por 1) pérdida del homólogo del cromosoma 4 con el alelo *HIS4* activo, 2) una deleción que elimine dicho alelo, 3) una pequeña deleción o mutación puntual que resulte en la inactivación de *His4p* activa, o 4) un evento de conversión génica utilizando el alelo inactivo como templado. Para distinguir entre las varias posibilidades, se secuenciaron varios clones del gen *HIS4* derivados de los auxótrofos. Como etapa previa fue necesario conocer si los SNPs encontrados en la cepa CAI4 se mantenían en dos cepas independientes *rad52-ΔΔ* (TCR2.1.1 y TCR2.2.1; Ciudad *et al.*, 2004) (Tabla 2.2). Para ello se seleccionaron al azar cuatro productos de PCR derivados de la ORF *HIS4* de cada mutante parental *rad52 His⁺*, se clonaron y se secuenciaron como se describió en el capítulo anterior. La secuencia de cuatro clones de la cepa TCR2.2.1 indicó la presencia de ambos alelos; el alelo 2, representado por tres clones (*rad52A-1*, *rad52A-2*, *rad52A-3*) y el alelo 1, representado por un clon (*rad52A-4*). El clon *rad52A-4* fue idéntico al alelo 1 excepto en dos sustituciones: C \rightarrow T en la posición 495 (silenciosa), y A \rightarrow G en la 1070 (señal de STOP), originando por tanto una proteína truncada de 356 aminoácidos. La secuencia única definida por los otros tres clones es idéntica a la del alelo 2. La segunda cepa *rad52-ΔΔ* (TCR2.1.1) (parental de los auxótrofos aislados) también conservó los dos alelos: el alelo 2, representado en un clon (*rad52B-2*), y el alelo 1 en tres clones (*rad52B-1* *rad52B-3* y *rad52B-4*), aunque también se observó un

número de mutaciones puntuales en sus secuencias. Cuando se comparó con su correspondiente de la cepa CAI4, el clon representativo del alelo 2 (rad52B-2) mostró tres nuevas sustituciones, dos de las cuales producen cambio de aminoácido. De igual manera, los tres clones del alelo 1 (rad52B-1, 3 y 4) también habían sufrido cambios cuando se compararon con la secuencia de cada alelo: rad52B-1 (una sustitución); rad52B-3 (una sustitución); y rad52B-4 (tres cambios). Además, existe la posibilidad de que el alelo rad52B-1 provenga de un alelo recombinante ya que posee la base alternativa en los SNPs 266, 496, 1770, y la base esperada en el resto de los SNPs, aunque no se descarta que sean mutaciones puntuales. Estos resultados indican que: 1) Los SNPs presentes en la CAI4 se mantienen en los derivados *rad52-ΔΔ*, y 2) al menos para la ORF *HIS4*, las cepas *rad52-ΔΔ* exhiben alta frecuencia de mutación puntual.

	182	189	236	266	299	361	425	495	496	769	929	1071	1116	1719	1770	1890	1908	1938	1983	2090	2355
Alelo 1	A(D)	T	A(K)	C(S)	T(V)	A(S)	C	T	G(E)	C(H)	T(V)	G	G	G	T	T	T	T	T	A(I)	C
Alelo 2	A(D)	T	A(K)	T(L)	T(V)	A(S)	T	T	C(Q)	G(D)	G(G)	G	G	C	C	G	A	C	A	A(I)	C
rad52A-1	A	T	A	T	T	A	T	T	C	G	G	G	G	C	C	G	A	C	A	A	C
rad52A-2	A	T	A	T	T	A	T	T	C	G	G	G	G	C	C	G	A	C	A	A	C
rad52A-3	A	T	A	T	T	A	T	T	C	G	G	G	G	C	C	G	A	C	A	A	C
rad52A-4	A	T	A	C	T	A	C	C	G	C	T	A	G	G	T	T	T	T	T	A	C
rad52B-1	G(G)	T	A	T	T	A	C	T	C	C	T	G	G	G	C	T	T	T	T	A	C
rad52B-2	A	T	A	T	A	A	G(G)	T	T	C	G	G	G	G	C	C	G	A	C	A	A
rad52B-3	A	T	A	C	T	A	C	T	G	C	T	G	A	G	T	T	T	T	T	A	C
rad52B-4	A	C	G(R)	C	T	A	C	T	G	C	T	G	G	G	T	T	T	T	T	G(V)	C

Tabla 2.2: Alelos *HIS4* en las cepas *rad52-ΔΔ*. En las dos primeras filas se muestran los dos alelos presentes en la cepa SC5314 y CAI4; alelo 1 (gris claro) y alelo 2 (gris oscuro). Los cambios respecto a la secuencia silvestre de estos alelos se muestran en rojo. Cuando la mutación resulta en cambio de aminoácido, éste se muestra entre paréntesis. En el cuadro rojo se indica la señal de STOP por haberse formado un codón de terminación. Los SNP que diferencian cada alelo se muestran en negra.

2.3. Las cepas auxótrofas His⁻ derivadas de *rad52-ΔΔ* han perdido el alelo activo de *HIS4* y retienen una alta frecuencia de mutación.

La etapa siguiente consistió en determinar qué alelo(s) estaba presente en las cepas *his**. En el capítulo anterior describimos una PCR específica de alelo que discrimina entre los alelos activo e inactivo. Cuando se aplicó a los auxótrofos para la histidina procedentes de la cepa TCR2.1.1 (*rad52-ΔΔ*), este ensayo reveló la presencia exclusiva del alelo inactivo y la ausencia del alelo activo en todos ellos, mientras que las

cepas parentales His⁺ CAI4 y TCR2.1.1 conservaron ambos alelos (Fig. 1.2). Ello sugería que todas las cepas *his** poseían el alelo inactivo.

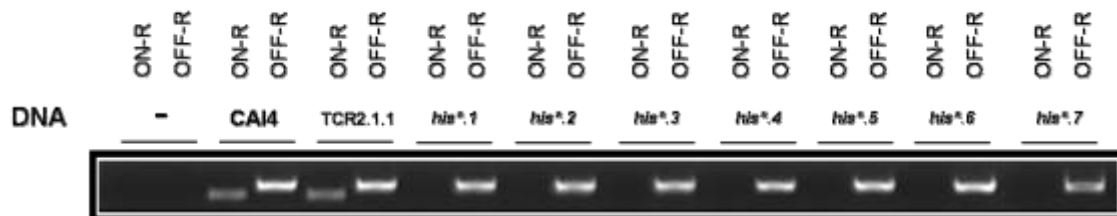


Fig. 1.2: PCR alelo-específica en las cepas His⁻ derivadas de un mutante *rad52-ΔΔ* (*his**). Los cebadores HIS42-F y ON-R revelaron la presencia del alelo 2 (funcional; banda de 419 bp), mientras que HIS42-F y OFF-R revelaron la presencia del alelo 1 (no funcional; banda de 579 bp) (ver apartado 1.6 y Fig. 6.1).

Este ensayo sólo detecta la presencia de G o T en la posición 929 de *HIS4* pero no nos dice nada del resto de la ORF. Con el fin de determinar si los alelos presentes en las cepas *his** habían surgido por mutación del funcional en la posición 929 o si habían sido heredado como tales, es decir se mantenía el haplotipo correspondiente, procedimos a secuenciar tres clones independientes de la ORF *HIS4* procedentes de cada una de las siete cepas *his** a fin de identificar sin ambigüedad los alelos presentes en cada una. Como se muestra en la Tabla 3.2, todos llevaban el alelo no funcional (alelo 1), mientras que el alelo 2 no se aisló en ningún caso. En un clon (*his*.4-3*) se observó una base correspondiente al otro alelo en el SNP⁹²⁹ (G en lugar de T) lo que sugiere que se trata de una mutación puntual. Sin embargo, el hecho de que esta base sea fundamental para la actividad His4B sugiere que ocasionalmente puede re-ganarse la actividad por mutación puntual. Además, a diferencia de la alta frecuencia de recombinantes encontrado dentro de la ORF en SC5314 y CAI4 (ver Tabla 1.1), no encontramos ningún recombinante ni en el parental *rad52* His⁺ (TCR2.1.1) ni en ninguno de los derivados His⁻, lo que indica que la frecuencia de recombinación está muy disminuida o ausente en las cepas *rad52*. Esto hace poco probable que la inactivación de *HIS4* haya podido ocurrir por conversión génica de la ORF funcional. Como era de esperar, la alta frecuencia de mutación observada en el parental *rad52* His⁺ se mantuvo en los auxotrofos His⁻. Además, las mutaciones puntuales por sustitución de una sola base ocurrieron siempre en nuevos sitios. Otra observación interesante derivada

de estos análisis es que los tres clones de cada auxótrofo diferían entre sí, pero, con la excepción de *his*2*, al menos un clon mostró una secuencia idéntica a la encontrada en el alelo 1. En resumen, estos resultados sugieren que aunque algunas de estas mutaciones pudieran ser responsables de la auxotrofia para histidina, no son necesarias para la misma y apuntan a pérdida o rotura de uno de los homólogos del cromosoma 4 (el que lleva el alelo funcional) como causa de la auxotrofia para histidina.

	48	90	114	137	166	182	188	416	431	496	497	511	530	534	548	525	828	1011	1035	1040	1223	1247	1265	1288	1426a	1609	1630	1718	1723	1738	1844	1962	1998	1998	1998	1998	1998	2148	2246				
Alelo 1	AAG	A	A	A	A	AGG	CGG	CGG	C	AGG	T	G	A	A	GGG	AGG	A	CGG	A	TGG	T	AGG	T	T	TGG	AGG	T	A	GGG	TGG	G	AGG	T	TGG	TGG	T	T	T	T	TGG	C		
Alelo 2	AAG	A	A	A	A	AGG	CGG	CGG	C	AGG	T	G	A	A	GGG	AGG	A	CGG	A	TGG	T	AGG	T	T	TGG	AGG	T	A	GGG	TGG	G	AGG	T	TGG	TGG	T	T	T	T	TGG	C		
his*1.1	A	A	A	A	A	C	C	C	A	T	G	A	A	A	A	A	C	A	T	A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
his*1.2	A	A	A	A	A	C	C	C	A	T	G	A	A	A	A	A	C	A	T	A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
his*1.3	A	A	A	A	A	C	C	C	A	T	G	A	A	A	A	A	C	A	T	A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
his*2.1	A	A	A	A	A	C	C	C	A	T	G	A	A	A	A	A	C	A	T	A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
his*2.2	A	A	A	A	A	C	C	C	A	T	G	A	A	A	A	A	C	A	T	A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
his*2.3	A	A	A	A	A	C	C	C	A	T	G	A	A	A	A	A	C	A	T	A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
his*3.1	A	A	A	A	A	C	C	C	A	T	G	A	A	A	A	A	C	A	T	A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
his*3.2	A	A	A	A	A	C	C	C	A	T	G	A	A	A	A	A	C	A	T	A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
his*3.3	GGG	A	G	GGG	C	C	C	A	C	G	A	A	A	A	A	A	C	A	T	A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
his*4.1	A	A	A	A	A	C	C	C	A	T	G	A	A	A	A	A	C	A	T	A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
his*4.2	A	A	A	A	A	C	C	C	A	T	G	A	A	A	A	A	C	A	T	A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
his*4.3	A	A	A	A	A	C	C	C	A	T	G	A	A	A	A	A	C	A	T	A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
his*5.1	A	A	A	A	A	C	C	C	A	T	G	A	A	A	A	A	C	A	T	A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
his*6.2	A	A	A	A	A	C	C	C	A	T	G	A	A	A	A	A	C	A	T	A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
his*6.3	A	T	A	A	A	C	C	C	A	T	G	A	A	A	A	A	C	A	T	A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
his*7.1	A	A	A	A	A	C	C	C	A	T	G	A	A	A	A	A	C	A	T	A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
his*7.2	A	A	A	A	A	C	C	C	A	T	G	A	A	A	A	A	C	A	T	A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
his*7.3	A	A	A	A	A	C	C	C	A	T	G	A	A	A	A	A	C	A	T	A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Tabla 3.2: Resumen de las mutaciones observadas en la secuenciación de los clones procedentes de cada cepa *his**. En rojo se indican los cambios con respecto a la secuencia del alelo original (alelo 1). Entre paréntesis se muestra el nuevo aminoácido en el caso de sustituciones no-sinónimas. En gris claro se indica el alelo 1, mientras que en gris oscuro el alelo 2. Los SNP que diferencian cada alelo se disponen en negrita.

2.4. Los auxótrofos *rad52 His⁻* producen revertientes *His⁺* a través de mecanismos diferentes a la restauración G929 (Gly310).

La alta frecuencia de mutación puntual detectada durante la secuenciación de los clones *HIS4* derivados de células *rad52* podía ser responsable de la aparentemente alta frecuencia de reversión de los auxotrofos *His⁻ rad52* detectada en los estudios de complementación. Un análisis más detallado de la aparición de los prototrofos indicó que 1) todos los auxotrofos *his** producían abundantes revertientes 2) los revertientes aumentaban a lo largo del tiempo de incubación, y 3) la frecuencia de reversión difería ampliamente entre los auxótrofos (Tabla 4.2). Dada la alta frecuencia de mutación puntual, analizamos la posibilidad de que la reversión fuera debida a la regeneración de

un alelo *HIS4* funcional mediante una tansversión T →G en la base 929, lo que restauraría la Gly³¹⁰. Con este fin, amplificamos por PCR una región de 1128 bp entre las bases 372 y 1500 utilizando los oligonucleótidos HIS42-F e HIS44-R en siete revertientes (cada uno derivado de uno de los auxótrofos) y este producto fue secuenciado. Estos oligonucleótidos delimitan una región que contiene tres SNPs no-sinónimos (496, 769, y 929) en la cepa SC5314. En todos los clones se mantuvieron las bases correspondientes al alelo no funcional, incluyendo T⁹²⁹. Estos resultados sugieren que en la mayoría de los casos la reversibilidad está causada por un evento diferente al de restauración de la base activa. Es claro sin embargo que el alto nivel de reversibilidad es una consecuencia de la ausencia de Rad52, puesto que el análisis de 21000 colonias derivadas del heterocigoto 4C (ver capítulo anterior) no originó ningún prototrofo, lo que indica una frecuencia de reversión espontánea del alelo 1 menor de 4×10^{-5} .

Experimentos preliminares sobre el análisis de la velocidad de crecimiento en presencia de histidina de estos revertientes indicaron un crecimiento más lento en comparación con los auxótrofos *his** y las cepas parentales (CAI4 y TCR.2.1.1) (no mostrado). Teniendo en cuenta que la velocidad de crecimiento debería ser superior en las cepas protótrofas capaces de sintetizar histidina, este resultado sugiere que pueda existir alguna alteración adicional en estos revertientes que origine la prototrofia, pero que afecte seriamente su velocidad de crecimiento; aunque más datos en este sentido son necesarios.

Cepas	Células sembradas por placa	Número de colonias									TOTAL
		Días de incubación									
		2	5	6	8	12	16	19	20	30	
<i>his*.1</i>	48x10 ⁵	3,5	24	48	30	66	28,5	4,5	0	0	359,5
<i>his*.2</i>	143x10 ⁵	0	31,5	29	10	10,5	0,5	0	0	0	116,5
<i>his*.3</i>	63x10 ⁵	0(0,5)*	0(20,5)	0(96,5)	0(6,5)	14(71)	25(13,5)	11(0)	38	10	240,5(354)
<i>his*.4</i>	170x10 ⁵	0,5	22,5	15	6,5	11,5	5	1	0	0	93
<i>his*.5</i>	74x10 ⁵	0,5	41,5	25,5	18	39,5	11,5	1	0	0	188
<i>his*.6</i>	29x10 ⁵	1	15	22,5	11,5	17,5	8	1,5	0	0	120
<i>his*.7</i>	77x10 ⁵	0,5	122	34	10,5	9	4,5	0	0	0	231,4

Tabla 4.2: Análisis de reversión de las cepas *his**. La aparición de colonias His⁺ se cuantificó a lo largo de 30 días. Se sembraron el mismo número de células de cada cepa en dos placas de medio SC menos histidina. Tras los tiempos de incubación indicados (28°C), se determinó el número de colonias (media entre las dos placas). () * microcolonias.

2.5. La mayoría, si no todos, los auxótrofos derivados de *rad52Δ* exhiben alteraciones en sus cariotipos electroforéticos.

Las alteraciones de los cariotipos electroforéticos son frecuentes en aislados clínicos y, en menor medida, en mutantes espontáneos de *C. albicans* que surgen en el laboratorio. En particular, la ganancia o pérdida de funciones asimilatorias en *C. albicans* esta asociada con alteraciones de varios cromosomas (Rustchenko *et al.*, 1994). Por otra parte, la pérdida de heterozigosidad (LOH) en *C. albicans* está frecuentemente acompañada por grandes reordenamientos cromosómicos (GCR –*Gross Chromosomal Rearrangements*) (Forche *et al.*, 2005). Con objeto de conocer si existen reordenamientos cromosómicos en los aislados auxótrofos His⁻ *rad52-ΔΔ* (*his**), analizamos sus cariotipos electroforéticos. Como se muestra en la Figura 2.2, la relación Cr4/Cr3 estaba significativamente disminuida en tres de las siete cepas His⁻ (*his*.3*, *his*.4* e *his*.6*). Todas las cepas mostraron cambios drásticos en la movilidad del cromosoma R (Fig. 2.2A). Además, las cepas *his*.2* e *his*.5*, mostraron reordenamientos cromosómicos que originaban nuevas bandas. Estos reordenamientos fueron particularmente evidentes en la cepa *his*.2* donde ambas copias del cromosoma 1 (Cr1) exhibían tamaños dramáticamente reducidos. La cepa *his*.1* parecía normal, excepto por la alterada movilidad del cromosoma R (CrR) y el aumento en intensidad relativa del cromosoma 7 (Cr7). Finalmente, la cepa *his*.3* presentó un incremento de fluorescencia en la región superior del Cr5. Los cariotipos electroforéticos de las siete cepas *his** en condiciones que permiten la separación de ambas copias de los cromosomas más pequeños (7 y 6, e incluso el 5 en algunas ocasiones) confirmaron estos resultados, y aportaron nuevos datos. Como se muestra en la Fig. 2.2B, todas las cepas His⁻ conservaban un solo homólogo del Cr7 y la cepa *his*.7* tiene un solo homólogo del Cr6. Además, en la cepa *his*.1* fue posible distinguir el cromosoma 7 de una extrabanda de similar tamaño que presumiblemente era la responsable del aumento relativo de la intensidad de este cromosoma cuando la separación se realizó en condiciones estándar.

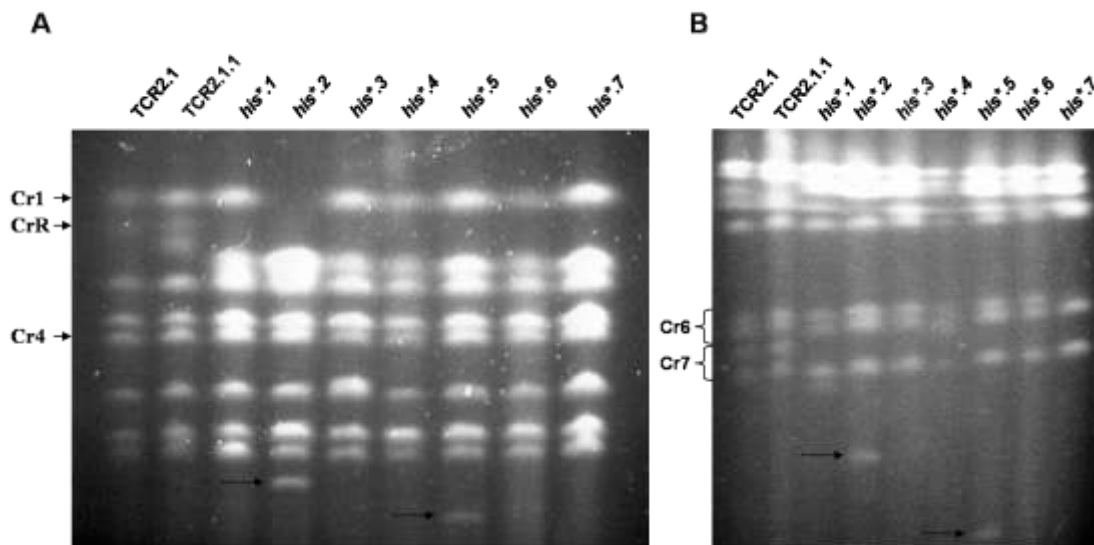


Fig. 2.2: Cariotipos electroforéticos de los auxótrofos para histidina derivados de la cepa TCR2.1.1. (A) PFGE en condiciones de separación estándar. (B) PFGE en condiciones de separación de los cromosomas de menor tamaño (ver Material y Métodos). Las flechas indican las bandas extracromosómicas.

2.6. Análisis de los reordenamientos cromosómicos en los mutantes His⁻ rad52-44.

Puesto que *HIS4* se localiza en el cromosoma 4, este cromosoma es un buen candidato para sufrir cambios que conduzcan a la auxotrofia para histidina. Estos fueron analizados mediante hibridaciones *Southern* utilizando sondas de genes localizados en los distintos fragmentos *Sfi*I de este cromosoma (Chu *et al.*, 1993). Un marcador del fragmento 4N (*HIS5*), localizado a 113 Kb del telómero izquierdo, sólo marcó el cromosoma 4 (1622 pb) en todos los auxotrofos (Fig. 3.2). Sin embargo, un marcador del fragmento 4H (*MNN42*) no sólo hibridó con el cromosoma 4 sino con bandas discretas de menor tamaño en cuatro cepas (*his*.1*, *his*.3*, *his*.4*, *his*.5*) y lo mismo ocurrió con una sonda del fragmento 4F2 (*PHR1*) (Fig. 3.2). En la cepa *his*.4*, la nueva banda tenía un tamaño similar al cromosoma 6 (1032 kb), mientras que en la cepa *his*.1*, la extrabanda era ligeramente menor que el cromosoma 7 (949 kb). Puesto que el cromosoma 4 tiene 1622 kb, estas bandas resultan de deleciones de 590 kb y 673 kb, respectivamente. Estos resultados identifican a un fragmento del cromosoma 4 como

responsable del aumento de fluorescencia de los cromosomas 6 y 7 en los cariotipos de las cepas *his*.4* e *his*.1* respectivamente mostrados en la Fig. 2.2. El cromosoma supernumerario de la cepa *his*.5* fue menor de 800 kb, lo que sugiere una deleción de 1 Mb, un tamaño cercano al del brazo izquierdo del cromosoma 4. Finalmente, en la cepa *his*.3*, tanto las sondas de 4H como de 4F2 marcaron una banda que migraba ligeramente por encima del cromosoma 5 (1190 Kb), lo que sugiere que es producto de una deleción de unas 300 kb en el cromosoma 4. Esta observación también explica la incrementada fluorescencia en la región superior del cromosoma 5 observada en el cariotipo electroforético de esta cepa. (Fig. 2.2).

Por otra parte, la cuantificación de las intensidades de las bandas marcadas isotópicamente (ver Material y Métodos) indicaron que, al menos para las cepas *his*.1* e *his*.5*, la relación del cromosoma 4 a la extra-banda derivada del mismo era de 2:1 (Fig. 3.2). Asumiendo la presencia de una copia de la extra-banda por célula, esta observación sugiere que estas cepas llevan dos copias completas del cromosoma 4, y por tanto deben poseer tres copias de todos los marcadores incluidos en las extra-bandas respectivas. Además, las estimaciones derivadas de la tinción de los cariotipos con bromuro de etidio indicaban una relación similar (Fig. 2.2A). Por tanto, al menos en algunas de las cepas que poseían un cromosoma truncado, parecía que el homólogo entero se había duplicado.

Para dirimir la cuestión de la existencia de deleciones intersticiales o roturas seguidas de adición de telómeros, hibridamos membranas con sondas de dos ORFs adicionales cercanas al telómero, incluyendo *HIS4* (localizada a 23 kb del telómero, en el fragmento *SfiI* BB) y *WMA6* (la ORF más cercana al telómero). Estas sondas marcaron el cromosoma 4 pero no ninguno de sus fragmentos, lo que apunta a rotura cromosómica seguida de adición de telómero como el evento más probable. Por tanto, concluimos que puesto que *PHR1* está localizado en el brazo izquierdo cerca del centrómero, es probable que el cromosoma 4 se haya roto en diferentes sitios de dicho brazo en las diferentes cepas *his** (*his*.1*, *his*.3*, *his*.4* e *his*.5*) y en todos los casos se ha adicionado un telómero para producir un cromosoma truncado aparentemente estable.

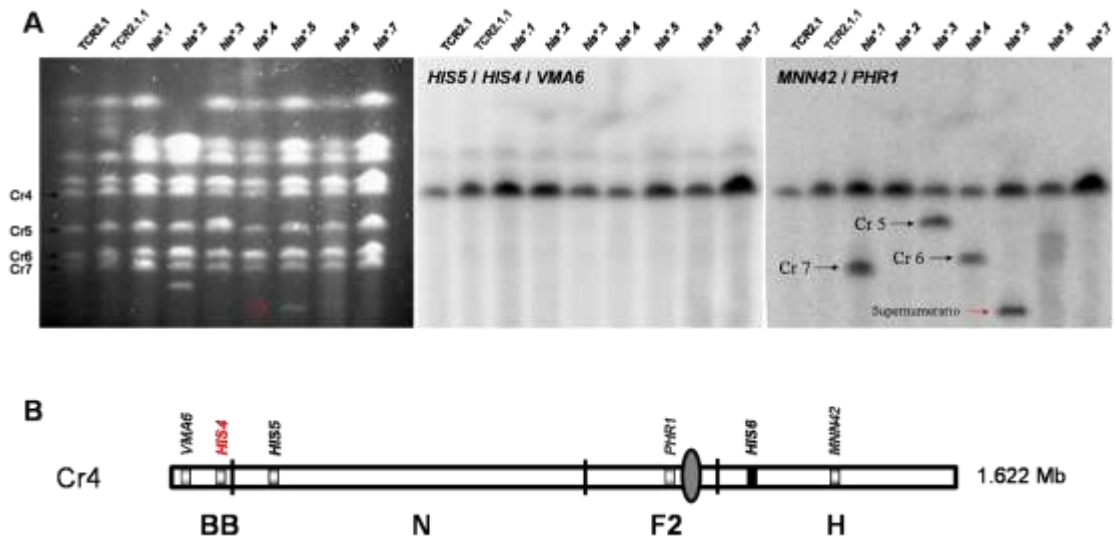


Fig. 3.2: (A) Electrocariotipos de las cepas *his** (izquierda) y *Southern blot* correspondientes (centro y derecha) usando las sondas específicas del Cr4 que se indican en cada panel. (B) Esquema de Cr4 donde se localizan los marcadores utilizados en este análisis. La región del centrómero se muestra como un círculo ovalado en gris oscuro (Sanyal *et al.*, 2004). La flecha roja señala la banda extracromosómica que deriva del Cr4.

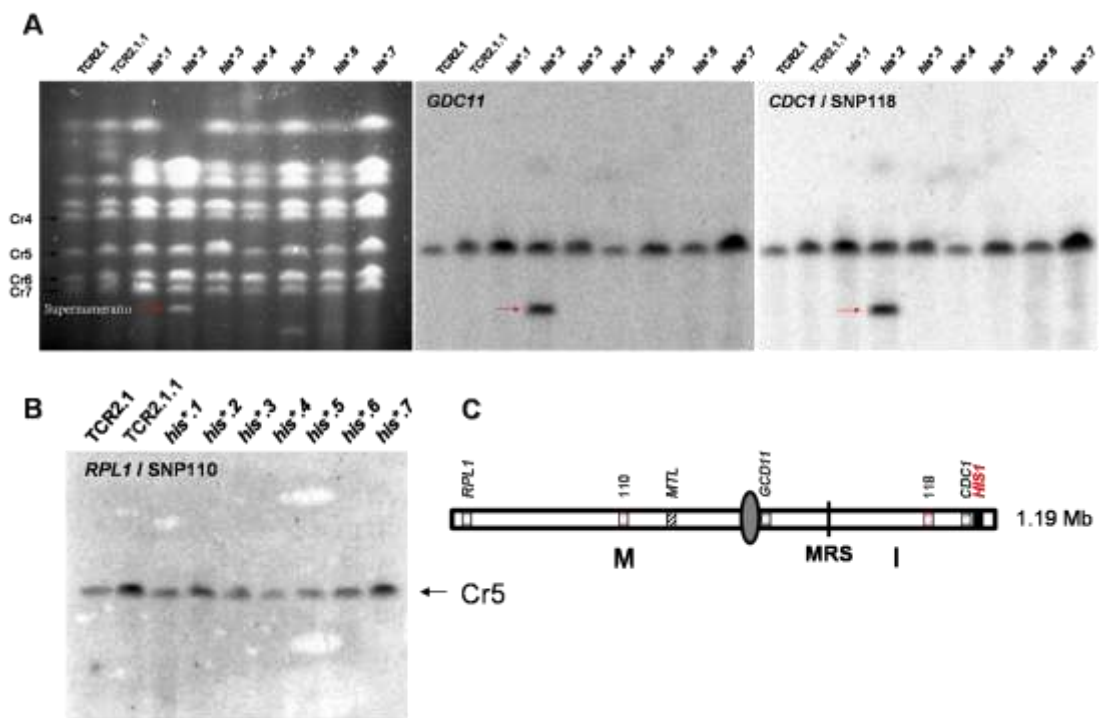
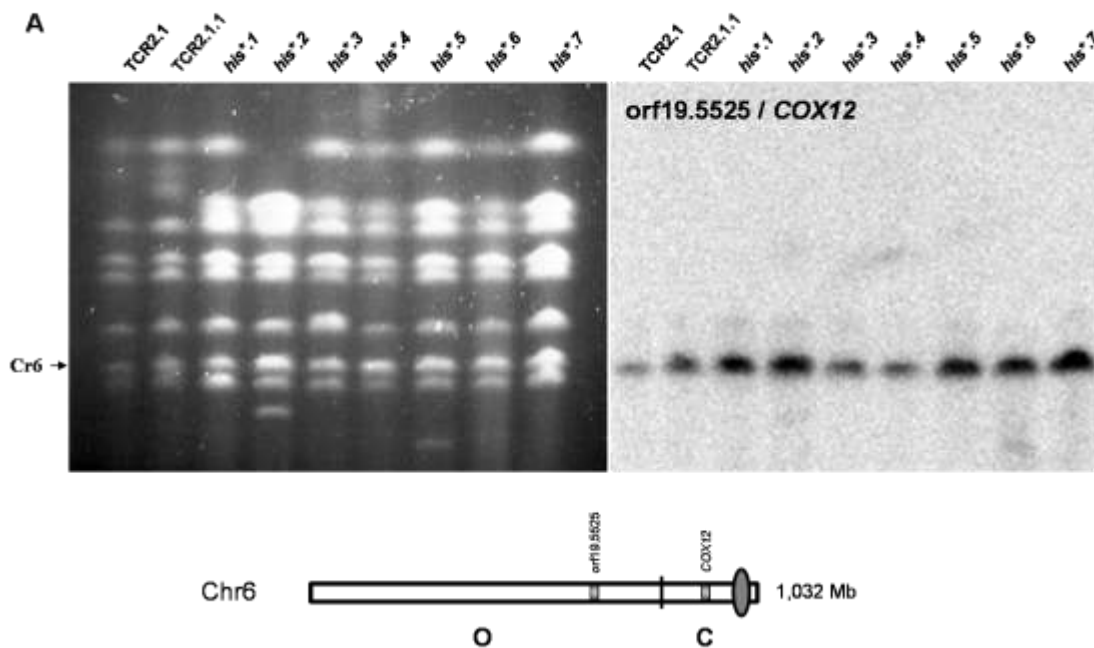


Fig. 4.2: (A) Electrocariotipos de las cepas *his** (izquierda) y *Southern blots* usando sondas específicas del Cr5 (centro y derecha). (B) Hibridación con sondas situadas en el brazo izquierdo del Cr5. En la parte superior de los paneles se muestra la sonda específica usada en cada caso (C) Esquema del Cr5. La región del centrómero se muestra como un círculo ovalado en gris oscuro (Sanyal *et al.*, 2004). La flecha roja señala la banda extracromosómica que deriva del Cr5.

Una inspección de los cariotipos presentados en la Fig. 2.2A, indicó que algunas cepas han perdido aparentemente una copia del cromosoma 5 (por ej. *his*4* e *his*6*). Cerca del telómero derecho del cromosoma 5 se encuentra *HIS1*, y por tanto reordenamientos en este cromosoma podían potencialmente originar auxotrofia para histidina. Cuando los cariotipos se analizaron en hibridaciones *Southern* con sondas de ambos fragmentos *Sfi*I del cromosoma 5, la sonda del fragmento *Sfi*I 5M (*GDC11*) marcó el cromosoma 5 en todas las cepas así como el cromosoma supernumerario en la cepa *his*2* (Fig. 4.2). El mismo resultado se obtuvo con sondas del fragmento 5I, *SNP18* y *CDC1*, este último a tan sólo a 45 Kb del telómero derecho. Puesto que el cromosoma supernumerario de la cepa *his*2* era más pequeño que el cromosoma 7 (949 kb), y el cromosoma 5 tiene un tamaño de 1190 kb, es probable que el primero se generara por una gran deleción de más de 250 kb, lo que supone más de 1/5 del cromosoma. Sin embargo, sondas de los marcadores *SNP110* y *RPL1* (Fig. 4.2), una ORF a 4 kb del telómero izquierdo, sólo marcaron el cromosoma 5, lo que sugiere, que al igual que en el Cr4, se trata de una rotura seguida de la adición de telómero.



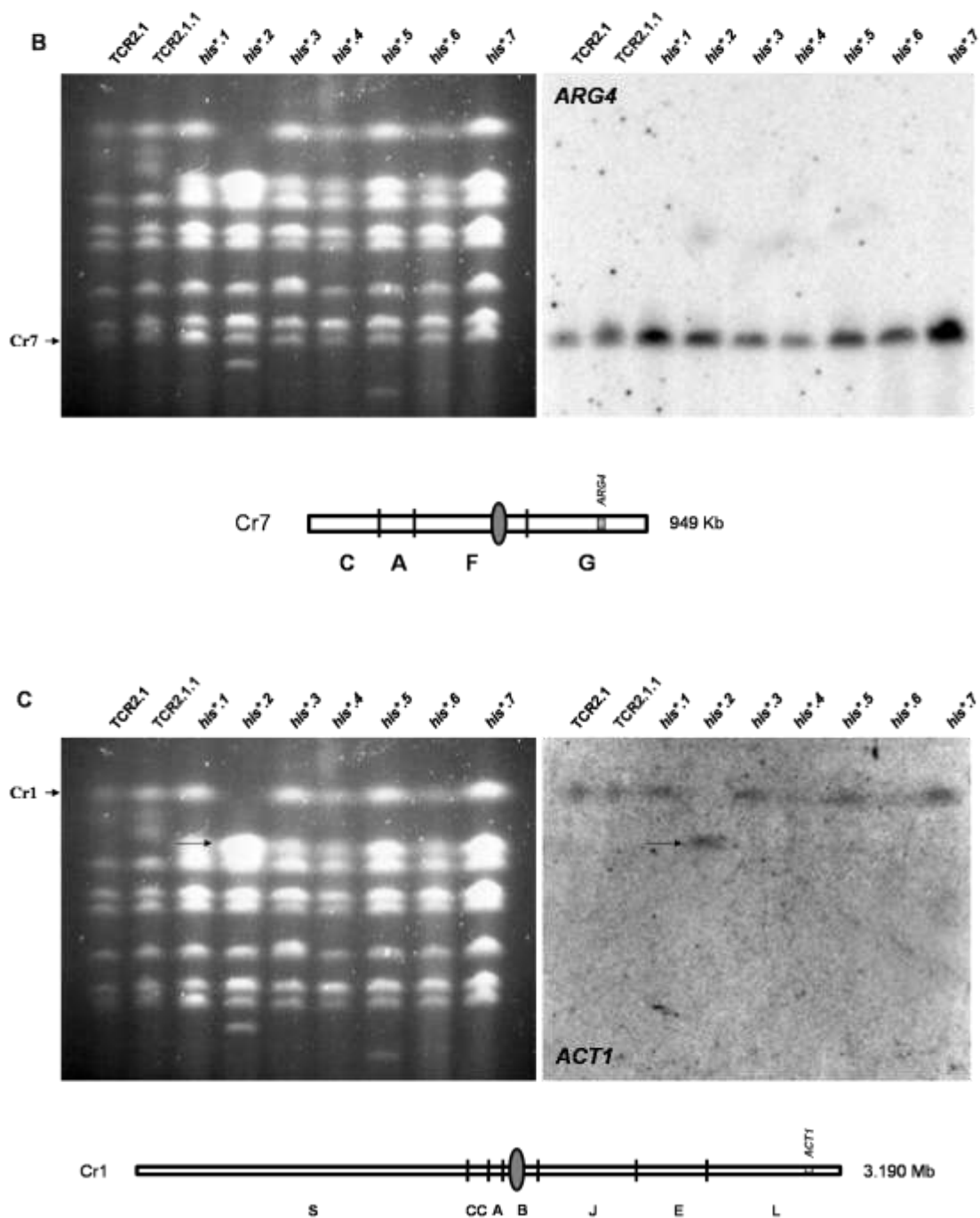


Fig. 5.2: Electrocariotipos de las cepas *his** (izquierda) y *Southern blots* usando sondas específicas del Cr6 (A), Cr7 (B) y Cr1 (C). Debajo de cada *Southern blot* se muestra un esquema del cromosoma correspondiente con la localización de la sonda utilizada en cada caso. La región del centrómero se muestra como un círculo ovalado en gris oscuro (Sanyal *et al.*, 2004). La flecha en el panel C señala el fragmento truncado correspondiente al Cr1.

Las sondas específicas de los fragmentos del Cr6, 6O (orf19. 5525) y 6C (COX12), y del Cr7, 7G (ARG4), solo marcaron sus respectivas bandas, lo que sugiere que no habían sufrido alteraciones adicionales a las ya indicadas. (Fig. 5.2), aunque no se descarta que puedan contener alguna alteración no detectada con los marcadores utilizados. Finalmente, como era de esperar, el Cr1 mostró una larga delección en la cepa *his*.2* (aproximadamente 1000 Kb; Fig. 5.2).

2.7. Análisis de los polimorfismos de los cromosomas 4 y 5 revela que la mayoría de las cepas *his han perdido una copia de cada cromosoma.**

Aunque es claro que el cromosoma 4 es propenso a sufrir grandes delecciones en ausencia de Rad52, no está claro si las delecciones fueron precedidas o no por pérdida de un homólogo. Para analizar esta cuestión, aprovechamos los polimorfismos de restricción (RFLP) existentes en tres *loci* de este cromosoma: *CZF1*, *PHR1* y *RBT7* (Fig. 3.1, Capítulo I). Mientras que la cepa parental (TCR2.1.1) originó las bandas correspondientes a los dos alelos en los tres *loci*, seis de los siete auxótrofos *His⁻* solo mostraron un alelo. La séptima cepa (*his*.3*) conserva la heterozigosis para los tres marcadores (Fig. 6.2A). Estos resultados sugieren que seis de las siete cepas auxótrofas *His⁻* son homocigóticas para todo el Cr4 y conservaban siempre los mismos alelos. La hipótesis más probable es que hayan perdido una copia del Cr4 (la misma en todas las cepas homocigóticas encontradas) y que este evento haya sido seguido por una duplicación del cromosoma residual (o parte de él). La conversión alélica es improbable, ya que la homocigosis ocurrió a ambos lados del centrómero.

La cepa *his*.3*, que aparentemente llevaba una sola copia del Cr4 entero, fue heterocigótica para los tres marcadores mencionados anteriormente. Por lo tanto, parece que esta cepa conserva los dos homólogos del Cr4 o al menos uno entero y una gran parte del otro. Como se indicó anteriormente, en esta cepa una copia del cromosoma 4 ha sufrido una delección de unas 300 kb y ahora migra cercana al cromosoma 5. El análisis de dos marcadores SNP (SNP83 y SNP84) localizados dentro de la región de 300 kb cercana al telómero izquierdo, indicó que, a diferencia de otros polimorfismos analizados, se habían vuelto homocigóticos. Este resultado claramente indica que uno de los homólogos sufrió una rotura que condujo a hemizigosidad en la región truncada,

pero la heterozigosis permaneció en la región conservada. La localización de *HIS4* en la región truncada explica la presencia exclusiva del alelo no funcional en esta cepa.

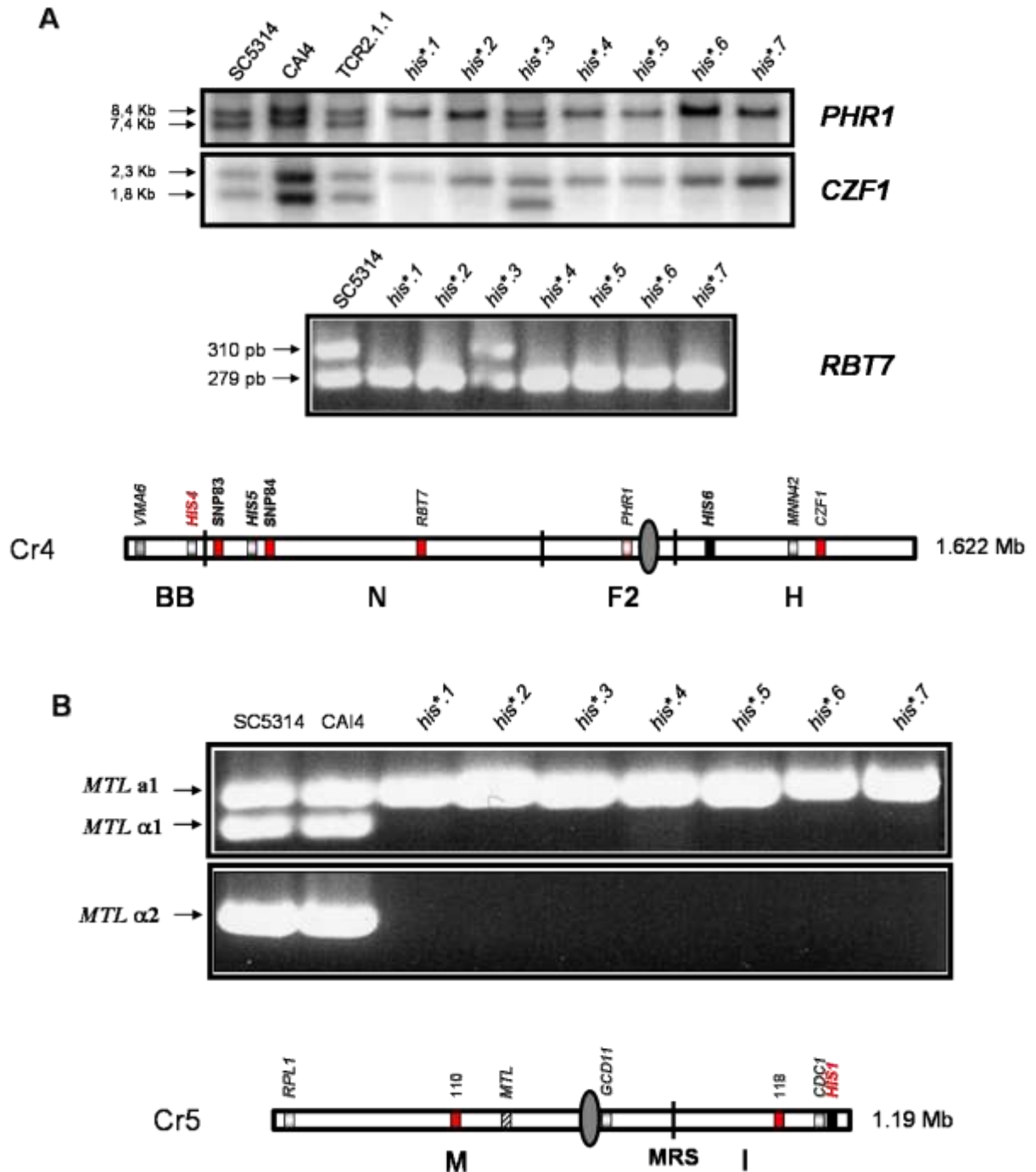


Fig. 6.2: Análisis de los polimorfismos en el Cr4 y Cr5. **(A)** Análisis de varios *loci* del Cr4 que presentan RFLPs (*PHR1*, *CZF1* y *RBT7*; ver Fig. 2.1 y apartado 1.2). Debajo se muestra un esquema del Cr4 con la localización de algunos de sus marcadores. **(B)** Análisis del *locus MTL* en el Cr5 (ver Fig. 2.1 y apartado 1.2). Debajo se muestra un esquema del Cr5 con la localización de algunos marcadores. En ambos casos el centrómero se muestra como un círculo ovalado en gris oscuro.

Estos resultados, junto con las observaciones descritas en la sección anterior sugieren el siguiente escenario. Las cepas *rad52* de *C. albicans* pierden una copia del cromosoma 4 con una alta frecuencia, seguida de la reduplicación del homólogo residual. La rotura de un homólogo de este cromosoma durante o después de la replicación seguida de la adición de un telómero a la porción céntrica también ocurre con frecuencia, bien en una de las copias originales (*his*.3*) o, si se ha perdido una copia, en una réplica del homólogo residual (*his*.1*, *his*.4*, y *his*.5*).

Con respecto al cromosoma 5, el análisis del *locus MTL* indicó que mientras el parental *rad52-ΔΔ His⁺* era heterocigótico para este *locus*, todos los auxótrofos *His⁻* fueron homocigóticos para el *MTLa1* puesto que carecían de *MTLα1* y *MTLα2* (Fig. 6.2B). Además, el análisis de dos SNPs, SNP110 y SNP118, indicó que ambos se habían vuelto homocigóticos en todas las cepas (Fig. 6.2B). Por otra parte, como se indicó anteriormente, una sonda del marcador SNP118 marcó el cromosoma truncado de la cepa *his*.2* mientras que una sonda del marcador SNP110 no lo hizo (Fig. 4.2). La explicación más simple es que en la cepa *his*.2* el homólogo *MTLα* del cromosoma 5, se había perdido. El homólogo residual se duplicó, pero una copia se rompió, y en ausencia de Rad52, el extremo expuesto fue reparado por la adición de telómero.

2.8. CGH ratifica las truncaciones observadas en PFGE y delimita las zonas de rotura

Los resultados presentados hasta ahora indican que la ausencia de Rad52 resulta en un incremento de la frecuencia de mutación puntual, pérdida de cromosomas seguida de duplicación del homólogo residual, y rotura de cromosomas. La hibridación genómica comparada o CGH (*Comparative Genome Hybridation*) puede utilizarse para evaluar el número de copias de cada gen en el genoma de una cepa determinada de *C. albicans*. Como se muestra en la Tabla 5.2, la mayoría de las cepas *his** analizadas se habían hecho trisómicas parciales para algunos cromosomas (*his*.2-his*.5*), mientras que permanecían disómicas para el resto de los mismos, lo que sugería la existencia de rotura de cromosoma en una de las tres copias. Estos resultados confirman los datos obtenidos mediante PFGE e hibridación *Southern* para las cepas *his*.3* e *his*.5*, que indicaban la presencia de tres copias del Cr4, una de ellas truncada (ver apartado 2.6).

La región no incluida en la trisomía de estas cepas se corresponde bien con el tamaño de las deleciones del cromosoma 4 reveladas por *Southern blot*. Como se observa en la Fig. 7.2, el Cr4 en la cepa *his*.3* poseía tres copias de todos los genes, excepto de los de la región adyacente al telómero izquierdo que mantenían dos copias. Por tanto, el fragmento truncado de este cromosoma incluye desde la última ORF presente en tres copias (orf19.4628; *MPE1*) hasta el telómero derecho (alrededor de 1300 Kb), y en consecuencia se han perdido unas 322 Kb. Una de las copias del Cr4 de la cepa *his*.5* exhibió una deleción mayor, de manera que la copia truncada se reduce a un fragmento de 527 Kb (desde la orf19.3838/*EFB1* hasta el telómero derecho), lo que indica que se han perdido 1095 Kb. Sin embargo, el final de la región trisómica no estaba del todo clara, ya que los “arrays” no contienen todas las ORFs. En todo caso, para las cepas *his*.3* e *his*.5*, estos resultados ratifican las conclusiones anteriores (ver apartado anterior), y además confirman que la rotura de una de las copias del Cr4 va a su vez seguida de una nueva duplicación del homólogo nativo. Los resultados de CGH confirmaron también que estas dos cepas no mostraban alteraciones cromosómicas adicionales.

Cepa	Cambio número de copias	Cromosoma	Región de aneuploidía (orf19)
TCR2.1.1	Ninguna		No se detectaron aneuploidías
<i>his*.1</i>	Ninguna		No se detectaron aneuploidías
<i>his*.2</i>	3X	R	19.6119-19.7279
	3X	1	19.6248-19.4883
	3X	6	19.3474-extremo derecho
<i>his*.3</i>	3X	4	19.4628-extremo derecho
<i>his*.4</i>	3X	R	19.4349-19.7281
<i>his*.5</i>	3X	4	19.3838-extremo derecho

Tabla 5.2: Resumen de las aneuploidías encontradas mediante la técnica de CGH.

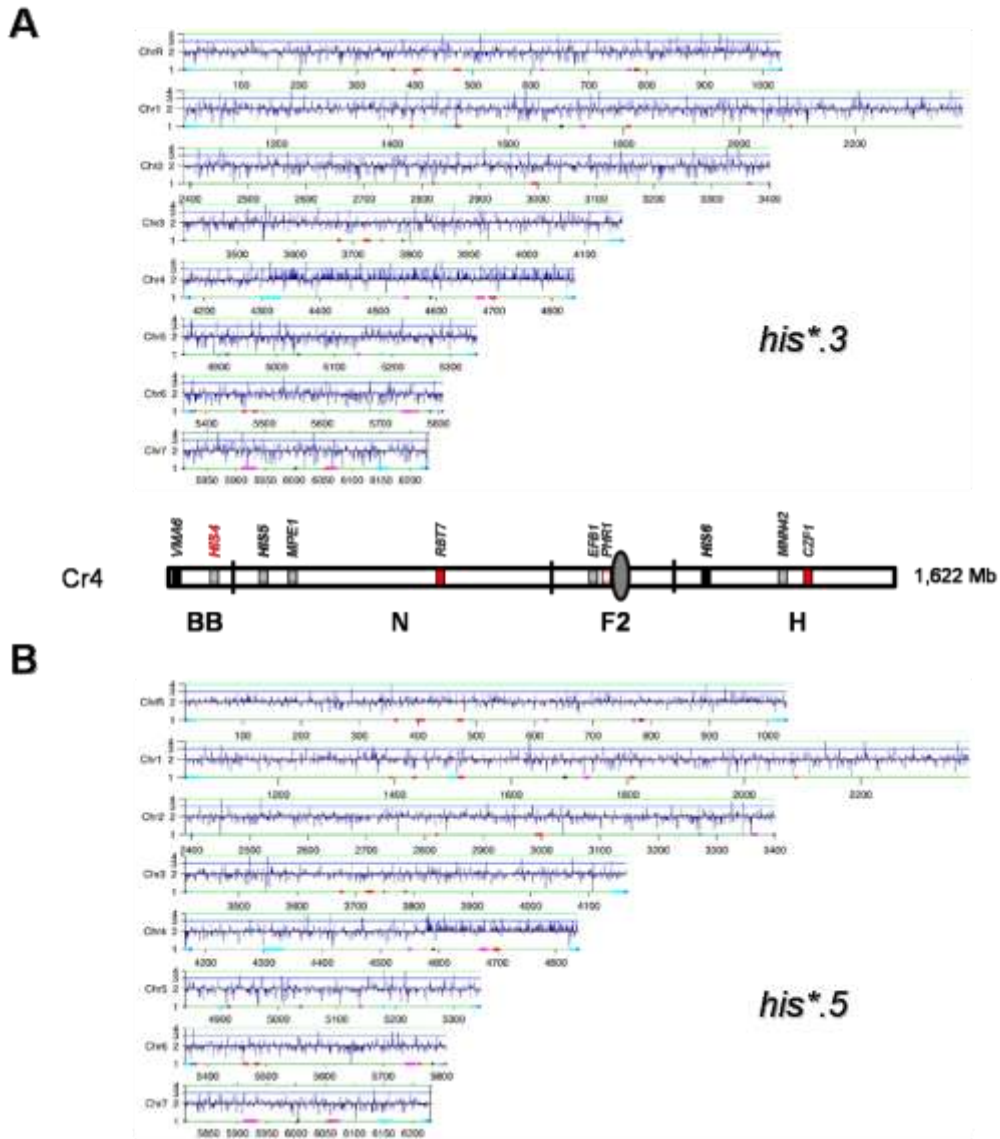
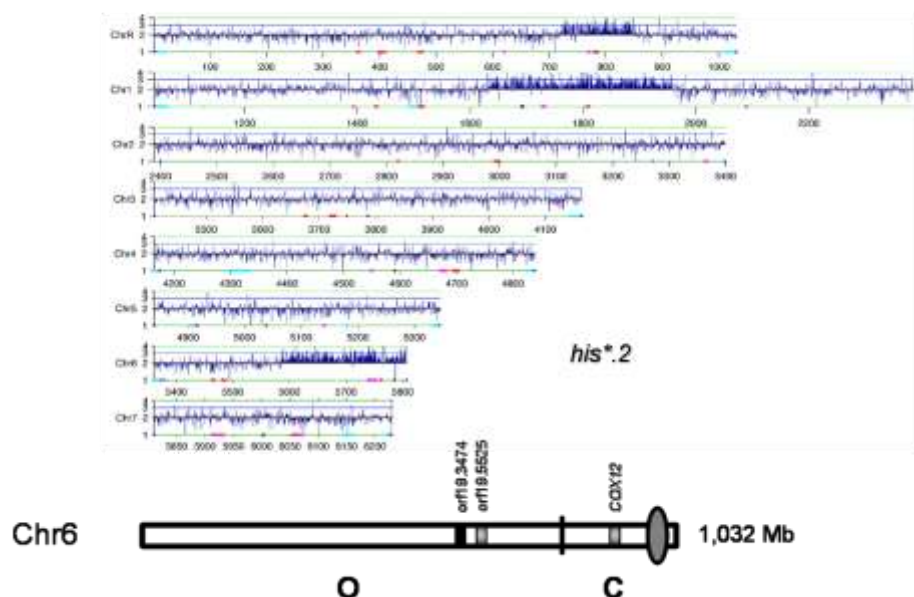


Fig. 7.2: Mapas cromosómicos de las cepas *his*3* (A) e *his*5* (B) derivados de la evaluación de la dosis génica mediante CGH. Los datos se ordenaron en el cromosoma como se ha descrito (Selmeki *et al.*, 2005). El eje y expresa el número de copias génicas obtenido de los valores de \log_2 . Se muestra también un esquema del Cr4 con la localización de algunos marcadores.

Para otras cepas, tal como *his*1*, *his*2*, e *his*4*, los resultados de CGH no concuerdan con los observados en las hibridaciones *Southern*. En la Fig. 8.2, se muestra un ejemplo (*his*2*). Mientras que los análisis de PFGE indicaban roturas de los cromosomas 1 y 5, CGH reveló la existencia de regiones en tres copias dentro de los cromosomas R, 1 y 6. La detección mediante CGH de una copia truncada del cromosoma 6 (entre orf19.3474 y el extremo derecho; aprox. 550 Kb) es nueva (una posibilidad es que no fuera detectada en PFGE debido a su pérdida en la carrera

electroforética), y sugiere una inestabilidad genómica acentuada en esta cepa. Esta inestabilidad es confirmada por la ausencia en este análisis del fragmento del cromosoma 5 detectado en PFGE. Sin embargo, confirmando parcialmente los resultados obtenidos mediante PFGE que mostraban una gran delección en el cromosoma 1 en esta cepa, este cromosoma también mostró aneuploidía (tres copias) en una región de aproximadamente 800 Kb (desde la orf19.6248 hasta orf19.4883). Estos resultados junto a los obtenidos mediante PFGE apuntan a una tetrasomía más que a una trisomía en esta zona, ya que solo podrían explicarse si existen cuatro copias truncadas del Cr1 (dos copias truncadas de 2221 Kb, aproximadamente el tamaño del Cr2, y dos copias truncadas de 1769 Kb, aprox. el tamaño del Cr3; véase Fig. 8.2B). Finalmente, CGH detectó tres copias de un fragmento del cromosoma R de un tamaño aproximado de 280 Kb (desde la orf19.6119 hasta orf19.7279). En ausencia de datos adicionales, es difícil realizar especulaciones prácticas acerca de los posibles reordenamientos. Puesto que CGH fue realizada con cultivos derivados de colonias que a su vez derivaban de un cultivo permanente y fueron enviados a otro laboratorio (Universidad de Minneapolis, MN), es posible que los cariotipos de estas cepas sean inestables y puedan variar considerablemente en los descendientes de cada auxótrofo. En todo caso, se necesitan experimentos adicionales para entender estos reordenamientos.

A



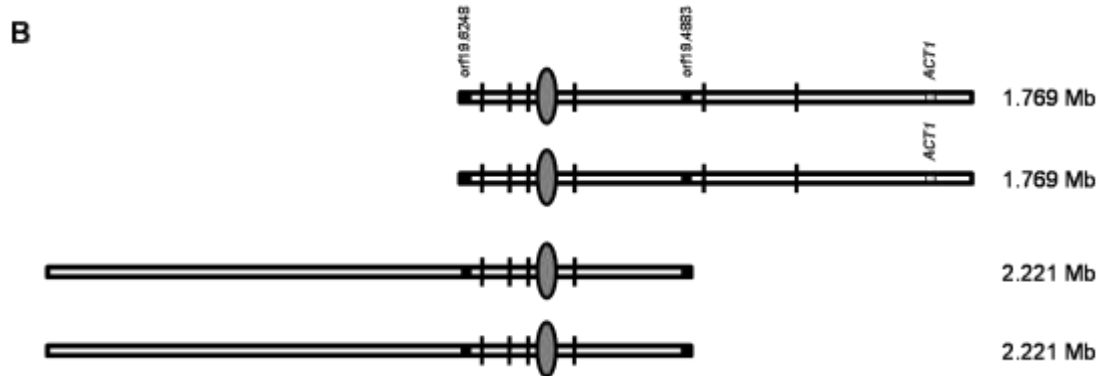


Fig. 8.2: (A) Mapa cromosómico como resultado de la CGH en la cepa *his*.2* (ver también Fig. 7.2). Debajo se muestra el mapa del Cr6 con la localización de algunos marcadores. (B) Posibilidades de truncación como resultado de los datos obtenidos mediante CGH en el cromosoma 1.

2.9. Los cariotipos de las cepas *his son altamente inestables.**

Si las deleciones cromosómicas observadas son debidas a la ausencia de Rad52, se esperaría que el cariotipo de cada cepa *his** fuera en sí mismo inestable y por tanto no representara productos finales. De hecho el análisis de diferentes muestras de dos cultivos permanentes, tres derivadas de la serie A, A1 (Fig. 9.2A panel 1), A2 (Fig. 9.2A panel 2) y A3 (Fig. 9.2A panel 3), y una de la serie B (B1) (Fig. 9.2A panel 4), ya mostró variabilidad en los cariotipos (resumidos en la Tabla 6.2). Por ejemplo, cuando se comparó con su correspondiente de la muestra A1, la cepa *his*.2* de la muestra A2 mostró nuevas bandas cromosómicas ausentes en la primera, una entre los Cr2 y Cr3, y la otra entre los Cr4 y Cr5. Estas bandas estaban ausentes en la muestras A3 y B1, pero en la segunda de ellas un fragmento cromosómico que migraba delante del Cr7 fue sustituido por otro de tamaño significativamente menor. La cepa *his*.4* carecía de un CrR completo en las muestras A2, A3 y B1. En la muestra A2, esta cepa mostró un nuevo fragmento que migraba considerablemente más rápido que el cromosoma 7. Finalmente, la cepa *his*.6* de la muestra B1 mostró una banda con un tamaño intermedio entre los Cr5 y Cr6 que nunca se había observado en las muestras de la serie A. El análisis *Southern* reveló que los fragmentos derivados del Cr4 detectados en las cepas de la muestra A1 se conservaban en las nuevas muestras. La única excepción correspondió a la nueva banda de la cepa *his*.6* de la muestra B1 que hibridó con la sonda *CZF1*, lo que la identifica como un fragmento del Cr4. Sin embargo, debemos

hacer notar que en las muestras A1 y A2 esta cepa mostró una nube que hibridaba con la misma sonda. Estos resultados indican que las diferentes cepas *his** ya contienen subpoblaciones con diferentes cariotipos, los cuales se manifiestan en los diferentes clones seleccionados que son analizados. También sugieren que estas cepas, y muy especialmente *his*.2*, poseen una acentuada inestabilidad cromosómica.

En un segundo grupo de experimentos, se estudiaron las variaciones en los cariotipos electroforéticos de los descendientes de estas cepas tras sucesivos pases. Como se muestra en la Fig. 9.2B y C, y se resume en la Tabla 6.2, se detectaron alteraciones en los cariotipos cuando se usaron los dos protocolos descritos en Materiales y Métodos (protocolo I y II). La cepa *his*.1* fue particularmente estable, ya que, en los clones del primer protocolo, solo mostró obvios GCR en el CrR, mientras que conservó el fragmento que migra a nivel del Cr7 y que, una vez más, se identificó como una copia truncada del Cr4 en la hibridación *Southern* (ver Fig. 9.2B). Esta banda también se conservó cuando se usó el segundo protocolo (Fig. 9.2C). La extrabanda derivada del Cr5 de la cepa *his*.2* no se detectó en los clones del primer protocolo; de hecho, apareció una banda por debajo (que según los resultados de CGH podría proceder del Cr6, aunque no se descarta que pueda derivar de una truncación mayor del Cr5) que mostró variaciones de tamaño entre los clones analizados, confirmando la alta inestabilidad cromosómica de esta cepa. Esto también fue evidente cuando se usó el segundo protocolo, ya que la banda procedente del Cr5 estuvo otra vez presente en los tres clones, pero la nueva banda de menor tamaño reapareció en los clones procedentes de los pases 6 y 10. En ambos protocolos, todos los clones de la cepa *his*.3* conservaron el fragmento derivado del Cr4 que migra por encima del Cr5 (como muestra la hibridación *Southern*), pero en el clon procedente del pase 10 en el segundo protocolo se observó una banda de tamaño inferior al Cr7. Las tres colonias de la cepa *his*.4* en el primer protocolo retienen el fragmento del Cr4 que migra a la altura del Cr6 (como se muestra en la hibridación *Southern*). Además, una nueva banda, que no hibridó con la sonda de *CZF1*, migró por debajo del Cr7 en los clones procedentes de los pases 6 y 10 del primer protocolo. En el pase 1 de este protocolo no se detectó una copia completa del Cr4. El tamaño menor de la posible banda correspondiente al Cr4 en el cariotipo electroforético, junto a que ésta no hibridó con una sonda de *CZF1*, sugiere que, si es un derivado del Cr4, éste ha perdido una parte del brazo derecho. No se detectaron cambios en el cariotipo de esta cepa cuando se usó el segundo protocolo. En el caso de la cepa *his*.5*, el fragmento derivado del Cr4 que migra por debajo del Cr7 se detectó otra vez

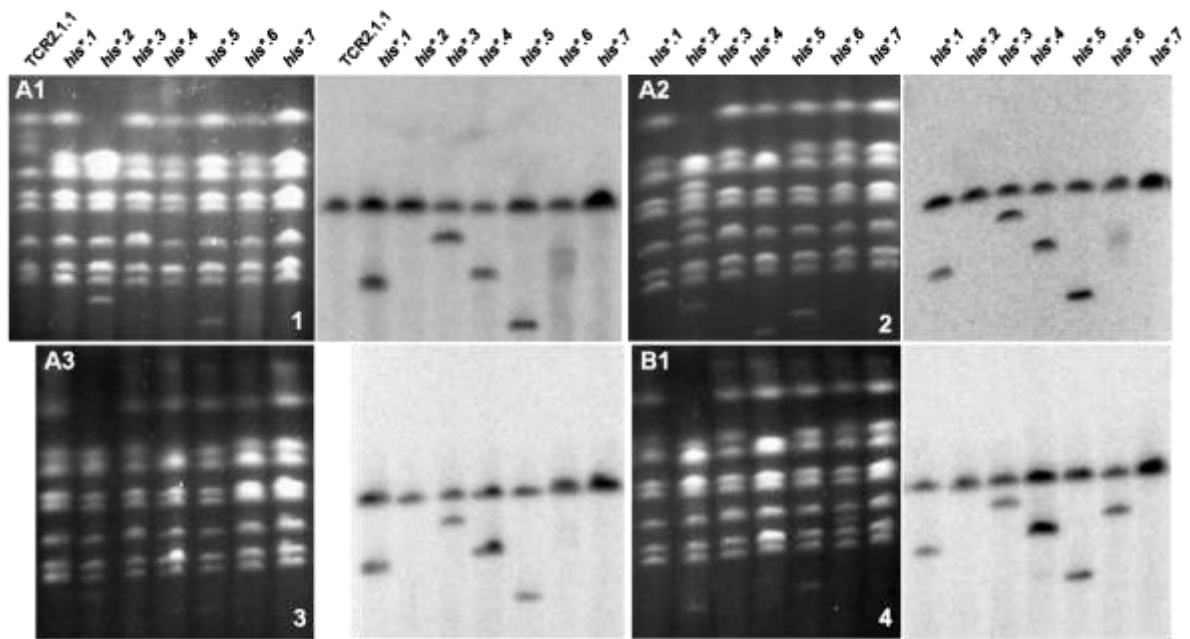
en los clones de los pases 1 y 6 del primer protocolo y en los tres clones del segundo protocolo, pero estuvo ausente en el clon del pase 10 del primer protocolo. El clon procedente del pase 10 en el segundo protocolo mostró una banda de tamaño entre el Cr2 y Cr3 que podría representar un Cr2 o un CrR truncados. Las tres colonias de la cepa *his*.6* en el primer protocolo mostraron un fragmento truncado del Cr4 (ya que hibridó con una sonda de *CZF1*) que migro entre el Cr5 y Cr6. Interesantemente, este fragmento estuvo presente también en un derivado de la serie B (B1). Puesto que las cepas sometidas a pases derivan del cultivo A, es claro que la subpoblación representada por estos clones estaba inicialmente presente en ambos cultivos. Finalmente, para la cepa *his*.7*, no se observaron cambios distinguibles en todas las colonias examinadas.

Estos resultados indican que aunque para una determinada cepa *his** el cariotipo parece inestable, los clones individuales llevan fragmentos discretos de DNA que podrían ser indicativos de la existencia de sitios frágiles.

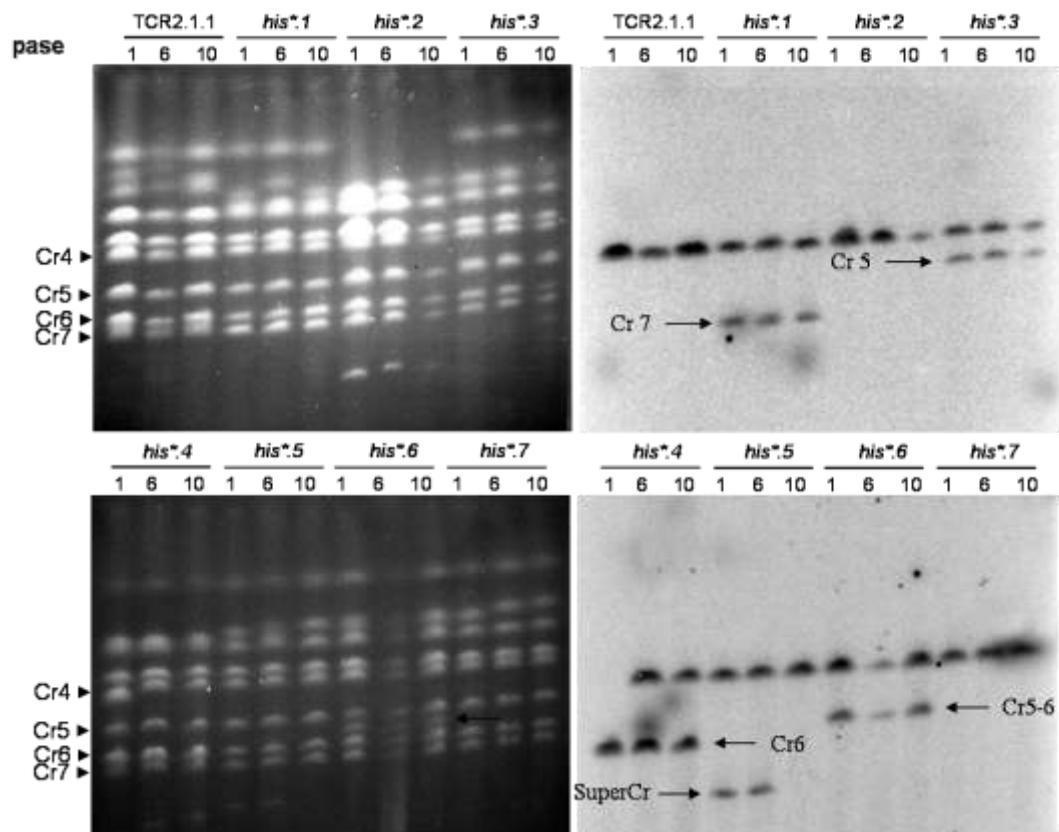
Cepas	Alteraciones en el cariotipo									
	Cultivos originales				Cambios en los pases					
	A		B	Protocolo I (número de pases)			Protocolo II (número de pases)			
A1	A2	A3	B1	1	6	10	1	5	10	
TCR2.1.1	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
<i>his*.1</i>	CrR Cr4*(673 Kb)	CrR Cr4*(673 Kb)	CrR Cr4*(673 Kb)	CrR Cr4*(673 Kb)	CrR Cr4*(673 Kb)	CrR Cr4*(673 Kb)	CrR Cr4*(673 Kb)	CrR Cr4*(673 Kb)	CrR Cr4*(673 Kb)	CrR Cr4*(673 Kb)
<i>his*.2</i>	Cr1*(?) Cr5*(350 Kb)	Cr1*(?) Cr5*(350 Kb) Cr?*(Cr2-Cr3) Cr?*(Cr4-Cr5)	Cr1*(?) Cr5*(350 Kb)	Cr1*(?) -	Cr1*(?) -	Cr1*(?) -	Cr1*(?) -	Cr1*(?) Cr5*(350 Kb)	Cr1*(?) Cr5*(350 Kb)	Cr1*(?) Cr5*(350 Kb)
<i>his*.3</i>	Cr4*(322 Kb)	Cr4*(322 Kb)	Cr4*(322 Kb)	Cr4*(322 Kb)	Cr4*(322 Kb)	Cr4*(322 Kb)	Cr4*(322 Kb) Cr?*	Cr4*(322 Kb)	Cr4*(322 Kb)	Cr4*(322 Kb)
<i>his*.4</i>	- Cr4*(590 Kb)	CrR* Cr4*(590 Kb)	CrR* Cr4*(590 Kb)	CrR* Cr4*(590 Kb)	CrR* Cr4*(590 Kb) Cr4*(100 Kb)	CrR* Cr4*(590 Kb)	CrR* Cr4*(590 Kb) Cr?*(<Cr7)	- Cr4*(590 Kb)	- Cr4*(590 Kb)	- Cr4*(590 Kb)
<i>his*.5</i>	Cr4*(1000 Kb)	Cr4*(1000 Kb)	Cr4*(1000 Kb)	Cr4*(1000 Kb)	Cr4*(1000 Kb)	Cr4*(1000 Kb)	-	Cr4*(1000 Kb)	Cr4*(1000 Kb) CrR*(?)	Cr4*(1000 Kb) CrR*(?) Cr2*(?)
<i>his*.6</i>	-	-	-	Cr4*(520 Kb)	Cr4*(520 Kb)	Cr4*(520 Kb)	Cr4*(520 Kb)	-	-	-
<i>his*.7</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 6.2: Alteraciones cromosómicas observadas en los cultivos originales y durante los distintos pases. Los pases se realizaron a partir de células procedentes del cultivo A. Los cromosomas truncados se muestran con un asterisco y entre paréntesis se muestra el tamaño aproximado de la deleción si es conocida, y con ? si se desconoce o no se sabe de que cromosoma se trata.

A



B



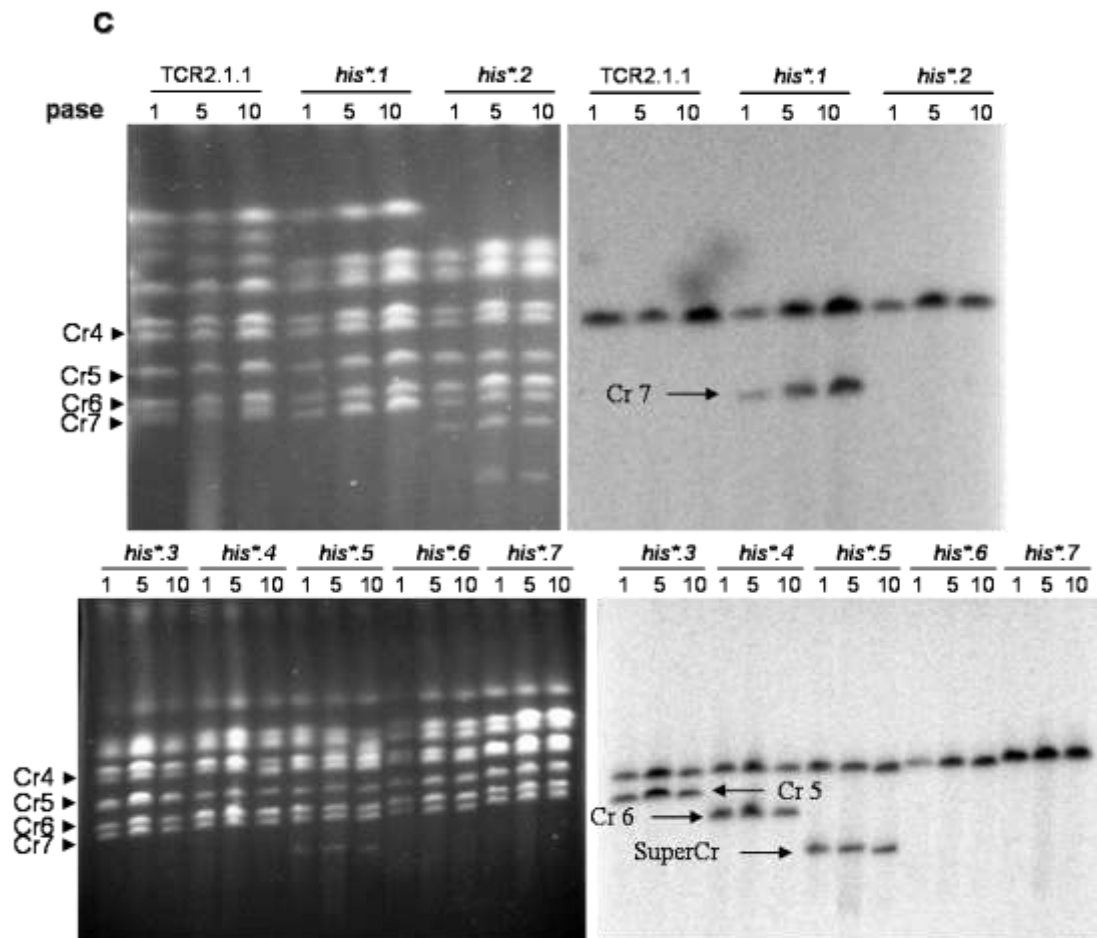


Fig. 9.2: Inestabilidad cromosómica en las cepas *his**. (A) Cariotipos electroforéticos e hibridación *Southern* usando una sonda del gen *CZF1* (ver Materiales y Métodos) de tres colonias independientes procedentes de cultivos permanentes de la serie A (A1, A2 y A3), y de una colonia procedente de un cultivo permanente de la serie B (B1) (B y C) PFGE e hibridación *Southern* (con la misma sonda que en A) de colonias independientes procedentes de pases a partir de masa celular (protocolo I)(B), o a partir de colonias individuales (protocolo II)(C). Las flechas señalan el marcaje de las bandas truncadas que derivan del Cr4.

DISCUSIÓN CAPÍTULO II

El objetivo global del presente estudio fue determinar el efecto de la ausencia de HR en la estabilidad genómica de *C. albicans*. Para ello, hemos analizado la frecuencia de aparición espontánea de auxótrofos para histidina en cepas nulas *rad52*. Según nuestros estudios, las diferentes cepas del linaje SC5314 son heterocigóticas para *HIS4* (*HIS4/his4*), pero no para ningún otro de los genes implicados en la biosíntesis de histidina. En este escenario, la ORF *HIS4* es el candidato más probable cuya alteración puede conducir a la auxotrofia para histidina. Hemos encontrado que los mutantes *rad52* de *C. albicans* exhiben una frecuencia media de producción de cepas His⁻ de $2-3 \times 10^{-3}$, al menos 100 veces mayor (y probablemente 10^6 veces mayor, ver más adelante) que la cepa parental. Puesto que solamente hemos analizado 23000 colonias de la cepa CAI4, no podemos hacer comparaciones más precisas. Sin embargo, Forche *et al.*, (2003) encontraron una frecuencia de 10^{-9} eventos de recombinación/célula/generación en la conversión de *gal1/GAL1* en *gal1/gal1*. Con independencia del mecanismo que cause LOH (es decir, la generación de cepas *gal1/gal1*), se puede concluir que la inactivación simultánea de dos alelos funcionales es extremadamente baja en aislados clínicos de *C. albicans*. Nuestros resultados son notables en el sentido de que las alteraciones genéticas analizadas en este trabajo surgieron espontáneamente y no estuvieron influenciadas por agentes mutagénicos, como FOA, frecuentemente usados como agentes de contraselección en el análisis de GCR (Yoshida *et al.*, 2003; Chen and Kolodner, 1999).

Los estudios de complementación de los auxótrofos no produjeron resultados concluyentes. Por este motivo, hemos utilizado la nomenclatura *his*.x*, para referirnos a las siete cepas His⁻ analizadas, siendo x el orden en que fueron seleccionadas en el correspondiente escrutinio. La transformación de las cepas *rad52* de *C. albicans* es muy ineficiente, debido a una intrínsecamente baja eficiencia de transformación o a problemas de mantenimiento de plásmidos (Tesis A. Ciudad). Sin embargo, hemos demostrado que todos los auxótrofos analizados llevaban exclusivamente el alelo inactivo de *HIS4*, lo que indica que son *his4*, sin perjuicio de que puedan estar afectados en otro gen *HIS*.

Las cepas nulas *rad52* exhibieron una alta inestabilidad genética en forma de mutaciones puntuales. Debemos hacer notar que estas mutaciones puntuales no eran

necesarias para inactivar la ORF, ya que, como acabamos de resaltar, todos los auxótrofos para histidina llevaban sólo el alelo inactivo, mientras que no encontramos ningún alelo activo con una mutación de pérdida de función (ej., G929→T929) entre los 21 clones secuenciados. Debemos mencionar sin embargo que uno de los clones representativos del alelo no funcional llevaba G929, lo que indica que podía haber regainado Gly310 y por tanto la actividad His4p. Sin embargo, el análisis de varios revertientes (uno de cada cepa *his**) indicó que el caso comentado era la excepción y no la regla.

Las células diploides *rad52* de *S. cerevisiae* exhiben un incremento significativo (24 veces mayor) en la frecuencia de inactivación del marcador *URA3* (mutaciones intragénicas) en comparación con la cepa silvestre (Yoshida *et al.*, 2003). En la misma línea, una búsqueda de genes que previenen la acumulación de mutaciones en el gen *CAN1* de *S. cerevisiae*, reveladas por originar resistencia a canavanina, seleccionó a *RAD52* (además de otros genes). En este sistema, el mutante nulo *rad52* mostró un incremento de unas 14 veces en la frecuencia de mutación. Se ha reportado que *RAD52*, así como otros miembros del grupo epistático de genes de recombinación homóloga, suprimen las mutaciones originadas por las polimerasas pronas a causar error, Rev3 y Pol32, así como una gran variedad de reordenamientos cromosómicos (Huang *et al.*, 2002, 2003; Kunz *et al.*, 1998). Viceversa, la ausencia de Rad52 podría dejar a las polimerasas Rev3 y Pol32 como únicas responsables para rellenar las deleciones mediante “síntesis translesión”, con la consiguiente introducción de mutaciones.

La auxotrofia para histidina en las cepas *rad52* de *C. albicans* estuvo acompañada por un a explosión de eventos de LOH, la mayoría de ellos derivados de la pérdida de cromosomas, estando particularmente afectados a primera vista aquéllos que llevan más genes *HIS*. Así, el Chr5 (*HIS1*) se había hecho totalmente homocigótico en todas las cepas *his**, y lo mismo ocurrió con el Chr7 (*HIS2* e *HIS7*), mientras que el cromosoma 4 (*HIS4*, *HIS5*, e *HIS6*) se hizo homocigótico en todas las cepas excepto en una que resultó ser hemizigótica para dos de sus genes, *HIS4* e *HIS5*, como consecuencia de una fragmentación. Por tanto, la frecuencia de pérdida de los cromosomas 5 y 7 fue al menos tan alta como la calculada para auxotrofos His⁻, y la del cromosoma 4 ligeramente menor. Por otra parte, las siete cepas *his* sólo conservaron el alelo no funcional de *HIS4*, una indicación de que habíamos seleccionado para la pérdida del alelo funcional. En seis casos, este evento ocurrió por pérdida del Chr4 que contenía dicho alelo. El análisis de los cariotipos sugirió que la pérdida del cromosoma

4 pareció estar acompañada de una duplicación del homólogo residual. Además, la cuantificación de la intensidad de las bandas marcadas radiactivamente sugirió que cuando la copia original o una de las dos copias resultantes de esta duplicación sufrió una truncación (durante el acto de replicación o en una de las copias resultantes), la copia residual aparentemente se re-duplicó. Estas sugerencias fueron confirmadas por CGH al menos para las cepas *his*.3* e *his*.5*. Es probable que la pérdida de un cromosoma precediera a la duplicación del homólogo residual, lo que podría representar un intento de restaurar la dosis génica. En este contexto, es también pertinente señalar que para los dos cromosomas analizados, Chr4 y Chr5, la pérdida siempre afectó al mismo homólogo. Aunque se ha demostrado que, al menos en ciertas cepas, puede perderse cualquier homólogo del cromosoma 5 y además con la misma frecuencia, en otras un homólogo se perdió con una frecuencia mucho mayor. Hasta la fecha no se ha reportado nada similar para el cromosoma 4. Nuestros datos sugieren que el homólogo residual de este cromosoma lleva alelos funcionales de genes esenciales que están presentes en versiones deletéreas o menos activas en el homólogo perdido.

La pérdida de cromosomas es un fenotipo bien conocido en diploides *rad52* de *S. cerevisiae* (Mortimer *et al.*, 1981; Haber and Hearn, 1985) y un comportamiento similar se ha observado en otros mutantes de recombinación, tales como *rad51* y *rad54* (Klein, 2001). Por otra parte, los mutantes de recombinación *rad50*, *rad51*, *rad52*, *rad50 rad52*, *rad51 rad52* de células diploides de *S. cerevisiae* (en el que el ChrIII que llevaba una heterozigosis *LEU2/leu2* se había hecho hemizigótico para *URA3* y *ADE2*), exhibieron un incremento significativo de LOH. Por ejemplo, la frecuencia de LOH en células *rad52* fue 27 veces mayor que en células silvestres, siendo la mayoría de los eventos (50%) pérdida de cromosoma. Los mutantes *rad52* también exhibieron una frecuencia reducida de todos los tipos de recombinación y un incremento significativo (x 25) en la frecuencia de mutaciones puntuales intragénicas. Esta observación indica que rutas mutagénicas han sustituido a HR. La importancia de *rad52* en HR es subrayada por la ausencia de haplotipos recombinantes en los 29 clones de *HIS4* secuenciados derivados en las cepas *rad52*, mientras que sí se observaron haplotipos aparentemente recombinantes en la cepa SC5314 así como en su isogénica *ura3/ura3* CAI4, de la cual procedía el mutante *rad52* utilizado.

Un resultado inesperado fue la alta frecuencia de GCR observada en las cepas *His⁻ rad52* (diferentes a pérdida de cromosoma). Al menos 4 (y en algunas muestras 5) de las 7 cepas *his** contenían copias truncadas del Cr4, y en un caso se observó una

copia truncada del Cr5. No está claro porqué las deleciones son tan frecuentes en el cromosoma 4. A primera vista, el hecho de que afecten a la porción izquierda del cromosoma donde se localiza el marcador heterocigótico *HIS4* (23 kb del centrómero) apunta a la selección de la auxotrofia para histidina como una razón de su abundancia. Sin embargo, el único caso en que la auxotrofia deriva exclusivamente de la truncación de *HIS4* es el representado por *his*.3*, lo que sugiere que pueden existir otras razones para la alta frecuencia de truncaciones en este cromosoma. Una posibilidad es que la truncación preceda a la pérdida de cromosoma. En este escenario *his*.3* sería una cepa intermedia destinada a perder el cromosoma truncado. Sin embargo, nuestros análisis de estabilidad han indicado que el fragmento truncado de ésta y de otras cepas es bastante estable. La otra posibilidad es que, como hemos especulado anteriormente, la rotura ocurra tras la pérdida del cromosoma homólogo, en cuyo caso parece estar no relacionada y ser dispensable para la adquisición del nuevo fenotipo. Un caso claro de esta situación lo encontramos en la cepa *his*.2*, que posee una truncación en el brazo izquierdo del cromosoma 5 no relacionada con la adquisición de auxotrofia para histidina, ya que el único gen *HIS* de este cromosoma, *HIS1*, además de ser aparentemente homocigótico se localiza cerca del extremo derecho. Por tanto, mientras que es posible, e incluso probable, que hayamos seleccionado para la pérdida de alelo activo del cromosoma 4 (lo que ocurrió principalmente por pérdida de cromosoma), no hemos seleccionado para deleciones cromosómicas, las cuales, en la mayoría de los casos, no parecen estar relacionadas con la adquisición del fenotipo seleccionado. Es más probable que representen acontecimientos frecuentes que surjan tras la pérdida del homólogo del cromosoma 4 que lleva el alelo *HIS4* funcional y por tanto represente un rasgo frecuente de las cepas *rad52* de *C. albicans*. En un estudio previo, hemos observado también deleciones cromosómicas en los mutantes *Sou*⁺ derivados de *rad52*, pero en este caso sólo investigamos las que implicaban al cromosoma 5 (Andaluz *et al.*, 2007).

Se piensa que DBSs ocurren espontáneamente en las células silvestres. Sin embargo, ello no resulta necesariamente en fragmentación de cromosomas, puesto que la transición del primer evento al segundo requiere el arrastre de cada una de las cromátidas hermanas a una célula hija por el huso acromático. En *S. cerevisiae*, la fragmentación es normalmente evitada por la inducción del *checkpoint* de daño a DNA, que detiene las células en metafase dando tiempo para reparar el daño cuando las cohesinas aún mantienen unidas ambas cromátidas. De hecho, se ha descrito que a este

respecto las funciones del *checkpoint* actúan sinérgicamente con las funciones de HR (Klein, 2001; Myung *et al.*, 2001). Incluso en células deficientes en HR, el *checkpoint* de daño a DNA podría facilitar la adición de telómero, ya que la telomerasa es más activa durante las fases S o G2 del ciclo celular (Diede and Gottschling, 1999; Marcand *et al.*, 2000). Si la reparación es lenta, las células se adaptan a la parada por *checkpoint* y el cromosoma roto segrega erróneamente. Estudios recientes han mostrado que, en células silvestres, durante la metafase las dos mitades del cromosoma roto son mantenidas juntas por los componentes de la maquinaria de recombinación, incluyendo el complejo Rad50-Mre11-Xrs2 y Rad52, que se unen a y mantienen ligados los extremos de DNA. La eliminación de estos componentes promueve la pérdida de asociaciones intracromosómicas entre los fragmentos céntricos y acéntricos (que no contienen el centrómero) en la entrada en metafase, con lo que las cromátidas rotas no pueden repararse. En la transición metafase-anafase, el fragmento cromosómico acéntrico es segregado junto con su cromátida hermana en la misma célula. Además, en estos mutantes, el fragmento céntrico también segrega de manera correcta menos frecuentemente que el cromosoma no roto (Kaye *et al.*, 2004, Lobachev *et al.*, 2004). Por lo tanto, la presencia de defectos intrínsecos en la reparación de DBS espontáneos en los mutantes *rad52* de *C. albicans* podría explicar la frecuente pérdida de un homólogo (segregación incorrecta del fragmento céntrico). De manera análoga, la pérdida de las interacciones intracromosómicas (entre fragmentos rotos) derivada también de la pérdida de Rad52 y podría explicar la alta frecuencia de fragmentación de cromosomas observada en estos mutantes (segregación incorrecta del fragmento acéntrico).

Todas las deleciones analizadas en este estudio parecen corresponder a roturas de cromosomas que son reparadas mediante la adición de telómeros más que a deleciones intersticiales, como sugiere la ausencia de marcadores adyacentes o cercanos al telómero en el brazo correspondiente de los cromosomas truncados. La alternativa es que los telómeros o las secuencias subteloméricas que carecen de ORFs actúen como sustratos de recombinación para originar deleciones intersticiales (ej. SSA u otros tipos de HR) en *C. albicans*. Esto es improbable, puesto que ocurrieron en cepas *rad52* que son deficientes o están muy afectadas en las rutas de HR. Se ha reportado que la mayoría de GCR ocurridos en células de *S. cerevisiae* deficientes en HR implicaban adición de telómeros, un proceso que requiere una telomerasa funcional (Pennaneach and Kolodner, 2004), mientras que la frecuencia de las translocaciones disminuía con

respecto a la cepa silvestre (Myung *et al.*, 2001; Pennaneach *et al.*, 2006). La naturaleza exacta del daño al DNA que conduce a GCR no se ha caracterizado definitivamente. DBS espontáneas pueden generarse por agentes que dañan el DNA o endonucleasas, pero también por errores durante la replicación del DNA o la progresión de la horquilla de replicación tras las lesiones. Por ejemplo, una mella en la banda líder o retardada conduce a la formación de extremos romos o con extremos 3'-protuberantes respectivamente. (Friedberg, 2005). Cuando las DBS no son reparadas por HR, como ocurre en ausencia de Rad52, la porción céntrica del cromosoma (el fragmento que contiene el centrómero) puede todavía ser reparado mediante la adición de un nuevo telómero; los extremos 3' de cadena sencilla, generados por la resección del extremo del cromosoma roto, parecen ser las dianas más probables para la adición *de novo* de telómero *in vivo* (Kramer y Haber, 1993; Schulz and Zakian, 1994; Myung and Kolodner, 2003; Pennaneach *et al.*, 2006). Una posibilidad es que los puntos de rotura que estamos observando ocurran en genes que están siendo transcritos activamente, puesto que se sabe que la transcripción estimula la recombinación mitótica (Aguilera, 2002). Sin embargo, es también posible que las roturas ocurran en sitios frágiles cuya presencia en levaduras ha sido ya sugerida (Cha and Kolodner, 2002). Estos sitios podrían contener secuencias que presentan dificultades de replicación, debido a una combinación de un avance lento de las horquillas de replicación (por ejemplo por reducción en la expresión de la subunidad catalítica de la DNA polimerasa α , Pol1p - Lemoine *et al.*, 2005-), otras perturbaciones en la replicación del DNA (tal como mutaciones en la DNA polimerasas α o δ ; -Gordenin *et al.*, 1993-) y la presencia de secuencias con repeticiones invertidas. La replicación incompleta o retardada conduce a la formación de huecos en las bandas recién replicadas y en consecuencia a la aparición de DSB (revisado por Arlt *et al.*, 2006). Bajo condiciones normales, la HR repara las lesiones y produce un incremento en la frecuencia de eventos de recombinación mitótica, incluyendo intercambio entre cromátidas hermanas. Por el contrario, es de esperar que en ausencia de HR, se produzcan roturas de cromosomas. Un análisis sistemático de puntos de rotura en nuestro sistema puede ayudar a entender las características de los sitios frágiles en *C. albicans*.

La alta frecuencia de truncaciones sugiere que las cepas *his** han adquirido un nivel adicional de inestabilidad genética, que estaba ausente en la cepa *rad52* de la cual derivaron. Esta inestabilidad queda reflejada en la extrema inestabilidad de los cariotipos, cuando se comparan con el de la cepa parental *rad52*, así como por la alta

frecuencia de reversión a la prototrofia para histidina, que contrasta con la alta estabilidad de una cepa His⁻ obtenida por disrupción del alelo funcional. Del mayor interés resultó la observación de que el análisis de varios revertientes no fuera nunca causado por la reversion T929 → G929, lo que sugiere que la alta inestabilidad genética había generado mutaciones de segundo sitio que de alguna manera introducen Gly en lugar de la Val codificada por el triplete en la posición 310 de His4p. El cambio de aminoácido podía estar mediado por una sustitución C → A en el anticodón de uno de los tRNAs de Gly, (i.e. CCC → CAC). Una alteración similar originó un fenotipo mutador en *Escherichia coli*, que resultó estar mediado por una corrupción traduccional de la DNA polimerasa III, a través de la modificación de la subunidad catalítica (α) o de lectora de pruebas (ϵ) (Al Mamun and Humayun, 2006). Entre los potenciales candidatos a sufrir corrupción por errores traduccionales se encuentran las diferentes subunidades de las DNA polimerasa (véase más adelante). La menor tasa de crecimiento de los revertientes encajaría en una situación de este tipo.

Nuestros resultados sugieren que *C. albicans* difiere de *S. cerevisiae* en muchos aspectos. Primero, en un estudio llevado a cabo por Yoshida *et al.* (2003) en *S. cerevisiae*, solo un raro clon *rad52* experimentó LOH por pérdida de cromosoma seguida de duplicación del homólogo restante, mientras que en los mutantes *rad52* de *C. albicans* la reduplicación parece ser la regla. Segundo, la clase de eventos representados por truncación directa o duplicación de cromosomas seguida de delección no se observó en mutantes diploides *rad52* (Yoshida *et al.*, 2003), mientras que fue muy frecuente en cepas *rad52-ΔΔ* de *C. albicans*. Es claro que la rotura de cromosomas ocurre (o está muy incrementada) como consecuencia de la ausencia de Rad52, puesto que no se ha reportado durante la reversión de células silvestres (Rad52⁺) Sou⁺ a Sou⁻, un proceso que tiene lugar por duplicación de la copia residual del Cr5 (Janbon *et al.*, 1999). Por el contrario, la rotura de cromosomas se ha observado durante la generación de mutantes Sou⁺ a partir de mutantes *rad52* (Andaluz *et al.*, 2007). Interesantemente, la truncación cromosómica seguida de la adición *de novo* de telómero contribuyó al 45 % de GCRs en un ensayo experimental basado en la presencia de marcadores seleccionables localizados en el segmento terminal no esencial del cromosoma V en una cepa haploide silvestre de *S. cerevisiae* (Chen and Kolodner, 1999), y su frecuencia se incrementó en los derivados *rad52* (Myung *et al.*, 2001; ver también más arriba). Por tanto, en este respecto, *C. albicans* se parece más a células haploides que a diploides de *S. cerevisiae*.

Y tercero, los eventos genéticos que conducen a la auxotrofia para histidina en *C. albicans* parecen ir acompañados por múltiples alteraciones genéticas, principalmente pérdida y/o truncación de cromosomas y mutaciones puntuales, no relacionadas a con aquella, como si algunas células hubieran adquirido un fenotipo mutador excepcional, una de cuyas manifestaciones sería la auxotrofia para His. Ye hemos especulado que una o más lesiones en el DNA causadas por la mutación *rad52* podía conducir a la corrupción de una o más DNA polimerasas, que serían las responsables más directas de la asombrosa inestabilidad genética de las cepas *his**.

En humanos, un buen número de enfermedades están asociadas a respuestas defectivas a diversos tipos de daño al DNA (Friedberg *et al.*, 2005), y el desarrollo y progresión del cáncer se correlacionan con la inestabilidad genética que conduce a reordenamientos cromosómicos (GCR). Por ejemplo, mutaciones en *BCRA1* y *BCRA2* están implicadas en el 15-25% de casos familiares de cáncer de mama. *BCRA2* se une directamente a Rad51 y recuerda las funciones mediadoras de Rad52 en eucariotas superiores, lo que sugiere que en eucariotas superiores *BCRA2* ha reemplazado a Rad52 en muchas funciones. Por otra parte, *C. albicans* es, al igual que las células somáticas humanas, diploide y posee una elevada cantidad de polimorfismos. Estas características, junto con los recientes avances en el conocimiento tanto de su genoma como de su biología molecular, convierten a *C. albicans* en un sistema genético atractivo para identificar y caracterizar reordenamientos genéticos, lo que proporciona una nueva dimensión al análisis de los procesos de recombinación en *C. albicans*.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La cepa de *C. albicans* SC5314 y su derivado CAI4 son heterocigóticas para el gen *HIS4*. Dentro de la ORF *HIS4* hemos encontrado 11 SNPs, siete sinónimos y cuatro no sinónimos que definen dos haplotipos. La funcionalidad está determinada por la base presente en el SNP⁹²⁹, de manera que G determina funcionalidad y T determina no funcionalidad debido a la presencia de Gly³¹⁰ o Val³¹⁰, respectivamente. Este cambio se encuentra dentro del módulo His4B de la proteína His4, por lo que afectaría a su actividad como fosforibosil-ATP pirofosfatasa.
2. La generación de auxótrofos para histidina en estas cepas tras tratamiento con luz UV parece involucrar (1) recombinación mitótica entre alelos, seguida de la segregación del alelo no funcional dentro de la misma célula, (2) pérdida de una copia del Cr4 (donde se localiza *HIS4*), o (3) una combinación de ambos procesos.
3. Hemos encontrado indicios de una frecuencia significativa de recombinación mitótica dentro de la ORF del gen *HIS4*, que puede haberse producido por recombinación intragénica entre los dos alelos existentes.
4. El SNP⁹²⁹ se identificó también en la cepa 3153A que mantenemos en nuestro laboratorio, si bien esta cepa no originó auxótrofos para histidina debido a que contiene tres copias del Cr4. En cambio dicho SNP estuvo ausente en otras cepas comúnmente utilizadas en diferentes laboratorios como la 1001, 1006 y 4918. A diferencia de las cepas SC5314 y CAI4, estas tres cepas no originaron auxótrofos para histidina tras el tratamiento con luz UV.
5. El análisis de la región promotora del gen *HIS4* de *C. albicans* identificó las secuencias de unión de algunos activadores transcripcionales, incluyendo los involucrados en el control transcripcional de la síntesis de aminoácidos en levaduras. Los dos alelos *HIS4* de la cepa CAI4 se expresan simultáneamente en la célula, aunque parece que el alelo inactivo se expresa en menor medida. La presencia de un SNP (posición -146; G alelo 1, A alelo 2) en la región promotora del gen *HIS4* podría explicar este resultado. Además, la presencia o ausencia de histidina en el medio no afecta significativamente el nivel relativo de expresión del alelo activo.
6. Los mutantes *rad52* de *C. albicans* mantienen los dos alelos *HIS4* presentes en el linaje de la cepa SC5314.

7. Los mutantes *rad52* de *C. albicans* exhiben una frecuencia media de LOH (determinada por la aparición de auxotrofos para histidina) al menos 100 veces mayor que la cepa parental CAI4, siendo la pérdida de cromosoma el evento más común que la origina. La ausencia de clones recombinantes entre los clones *HIS4* obtenidos de estos mutantes sugiere que la recombinación mitótica está disminuida respecto a la observada en los parentales SC5314 y CAI4.
8. Las cepas nulas *rad52*, así como sus derivados His^- , exhibieron también una alta frecuencia de mutación puntual dentro de ORF *HIS4*. Esta frecuencia de mutación puede ser la responsable de la alta frecuencia de reversión que sufren los derivados His^- , aunque este proceso es independiente de la restauración de Gly^{310} .
9. Finalmente, las cepas *rad52* His^- muestran alta frecuencia de fragmentación de cromosomas que no está relacionada con la adquisición de la auxotrofia. Además, parece que tras la pérdida o rotura de un cromosoma tiene lugar una duplicación del homólogo residual o del homólogo no truncado, respectivamente. Las roturas que originan los cromosomas truncados en estas cepas parecen ser reparadas mediante la adición de telómero *de novo*. Estos cromosomas truncados se mantienen razonablemente estables a lo largo de varias generaciones.
10. Hemos sugerido que la inestabilidad genética tan acentuada que presentan las cepas *rad52* His^- es debida a una mutación adicional ocurrida en el parental *rad52*, como consecuencia del fenotipo mutador de este mutante. La nueva mutación podría afectar a componentes clave de la maquinaria de replicación.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Cepas y condiciones de cultivo.

Cepa	Genotipo	Parental	Referencia
SC5314	Wild type		Gillum <i>et al.</i> , 1984
CAF2	$\Delta ura3::imm434$	SC5314	Fonzi e Irwin, 1993
CAI4	$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$	CAF2	Fonzi e Irwin, 1993
1001	Wild type		(ATCC 64385) Navarro-García <i>et al.</i> , 1998
1006	Arg ⁻ , Ser ⁻ , Lys ⁻ , <i>ura3</i> , Mpa ^R	CBS5736* 834 (STN57) ATCC32032 DSM3454 IFO1856	Van Uden & Buckely, 1970 Suzuki <i>et al.</i> , 1986 Goshorn <i>et al.</i> , 1992 Chu <i>et al.</i> , 1993.
3153A	Wild type		Evans <i>et al.</i> , 1974
4918	Wild type		Manning & Mitchell, 1980
H47A2A	$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ $\Delta his4::hisG/\Delta his4::hisG$	CAI4	Este trabajo
SN148	<i>arg4/arg4 leu2/leu2 his1/his1</i> <i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>iro1::imm434/iro1::imm434</i>	RM1000#2	Noble and Johnson, 2005
TCR2.1	$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ $\Delta rad52::hisG/\Delta rad52::hisG$ - <i>URA3-hisG</i>	CAI4	Ciudad <i>et al.</i> , 2004
TCR2.1.1	$\Delta ura3::imm434/\Delta ura3::imm434$ $\Delta rad52::hisG/\Delta rad52::hisG$	CAI4	Ciudad <i>et al.</i> , 2004

Tabla I: Cepas utilizadas en este estudio. * Diferentes nombres de la cepa CBS5736/ATCC32032

Las cepas utilizadas en este estudio están indicadas en la Tabla I; y provienen de la cepa prototrófica SC5314, la cual fue usada para secuenciar el genoma de *C. albicans*. Las células fueron crecidas normalmente a 28° C en medio YEPD (2% de Glucosa, 1% de extracto de levadura y 2% de Peptona). Para el aislamiento de los auxótrofos His⁻, las células fueron crecidas en medio sintético SC completo y las colonias resultantes fueron replicadas en placas de medio SC menos histidina. Cada colonia original de los siete auxótrofos para histidina procedentes de la cepa TCR2.1.1 (*his*.1-7*) se reaisló en YEPD y se comprobó que originaba células que no crecían en medio SC menos histidina. Una de las nuevas colonias se utilizó para inocular dos matraces de medio YEPD que se crecieron hasta DO = 1. Estos cultivos se recogieron

independientemente (series A y B), se dividieron en pequeños lotes y se guardaron a -80°C.

II. Transformación de *C. albicans*.

El método de transformación de *C. albicans* usado en este estudio está basado en el que se ha descrito en Wilson *et al.*, 1999. Cultivos crecidos durante toda la noche se usaron para inocular, en una dilución de 1/100, 50 ml de YEPD +uridina, y se incubaron a 30° C durante dos generaciones (3-4 horas). Las células se recogieron, y una vez lavadas con 25 ml de agua estéril, se resuspendieron en 1 ml de tampón LATE (0,1M de Acetato de Litio, 10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1 mM de EDTA). 0,1 ml de esta suspensión se mezcló con 10 µl de DNA de esperma de salmón sonificado (Stratagene), 1-25 µg de DNA control, y 600 µl de tampón PLATE (50 % de Polietilenglicol 4000 en el tampón LATE), y se vorteoó fuertemente. Después de una incubación a 30° C durante toda la noche, la mezcla se somete a un choque térmico a 42° C durante 15 minutos. Las células son recogidas, y una vez lavadas con 1 ml de agua esteril se siembran en placas de medio selectivo (SC-Ura). Las placas se incuban a 30° C durante 2-3 días.

III. Test de fluctuación.

Este test fue realizado para calcular la frecuencia de auxótrofos His⁻ en las cepas CAF2, CAI4, TCR2.1 y TCR2.1.1. Ocho colonias aisladas en YEPD de las cepas CAI4 (16 horas) y TCR2.1.1 (48 horas) fueron diluidas en agua y cerca de 2500 colonias fueron sembradas en placas de medio completo YEPD a una densidad cercana a 300 células por placa. Después de 24 horas, en el caso de la cepa CAI4 y CAF2, y 48 horas para las cepas TCR2.1.1 y TCR2.1, las colonias se replicaron en medio SC sin histidina y fueron analizadas a las 24 horas y 48 horas después, respectivamente. Los posibles auxótrofos para histidina encontrados fueron verificados mediante replica de nuevo en el mismo medio (SC sin histidina).

IV. Análisis de la estabilidad de cariotipos.

Para abordar esta cuestión, analizamos en primer lugar posibles variaciones en las dos series de cultivos permanentes guardados a -80°C (series A y B, ver apartado I). Se tomaron tres muestras de la serie A (A1, A2, y A3) y una de la serie B que se sembraron en una placa de YEPD. En cada caso los cariotipos se obtuvieron a partir de una colonia de esta placa seleccionada al azar; después los cariotipos electroforéticos se sometieron a hibridación *Southern* utilizando una sonda del cromosoma 4 (*CZF1*). En una segunda serie de experimentos, analizamos los cariotipos de los descendiente de células de la serie A, utilizando dos protocolos complementarios. El primer protocolo (protocolo I) se diseñó para determinar cambios no acumulativos presentes en la población (Fig. 9.2B). Con este objetivo, células de un cultivo permanente guardado a -80°C se utilizaron para inocular por estría una placa de YEPD. Se tomó masa celular de la región de crecimiento confluyente y se pasó sucesivamente a 9 nuevas placas con el mismo medio. Se tomó una colonia aislada de las placas de los pases 1, 6 y 10, y se creció en medio YEPD líquido para preparar las muestras para el análisis de los cariotipos. El segundo protocolo (protocolo II) se diseñó para detectar cambios acumulativos en los pases sucesivos (Fig. 9.2C). Una nueva placa de YEPD se inoculó por estría con células de un cultivo permanente de la serie A, y los pases se hicieron igual que antes pero siempre a partir de una colonia aislada. Colonias de los pases 1, 5 and 10 se seleccionaron al azar y procesaron como en el caso anterior para analizar los cariotipos.

V. Extracción de ácidos nucleicos y análisis.

a. Análisis Southern.

La extracción de DNA se llevo a cabo mediante el método de obtención de protoplastos con Zymoliasa (Sherman *et al.*, 1982). En otros experimentos se utilizó el método basado en el protocolo “Smash and Grab” (Hoffman y Winston, 1987). Un cultivo de 15 ml crecido hasta una DO entre 1 y 2 se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min. A continuación las células se suplementan con 200 µl de “breaking buffer” (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 100 mM Tris.Cl pH 8, y 1mM EDTA pH 8),

200 μ l de “glass beads” (Sigma) y 200 μ l de una solución PCI (Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico) al 24:24:1 y se lisan mediante agitación en “vortex” (durante 4 min.). El extracto se centrifugó tras la adición de TE (200 μ l; 10 mM Tris; 1 mM EDTA). El sobrenadante se precipitó con Etanol absoluto (2.5 V) y se lavó con Etanol al 70 %, resuspendiéndose en 400 μ l de TE. La suspensión fue suplementada con 3 μ l RNAasa (10 mg/ml) para eliminar el RNA. Tras la incubación a 37° C, el DNA se precipitó nuevamente con 7.5M de NH₄OAc (5.3 μ l) y 1 ml de Etanol, y se lavó con Etanol al 70 %.

Análisis mediante hibridación *Southern* sometió al DNA genómico a digestión con las enzimas de restricción indicadas, y a electroforesis transferida a nitrocelulosa e hibridada con un fragmento de DNA utilizado como sonda marcado radiactivamente con ³²P (α ³²-dCTP). La solución de hibridación contenía 6x SSC, 12.5x reactivo Denhardt's [1% (p/v) ficoll, 1% (p/v) polyvinylpyrrolidona, 1% (p/v) BSA fracción V], 0.5 % (p/v) SDS y 100 μ g/ml de DNA de esperma de salmón (Stratagene). Después de la hibridación la membrana se lavó primero a 65° C con una solución 5x SSC/0.1 % SDS y luego con otra 0.1x SSC/0.1 % SDS. Las bandas marcadas se revelaron utilizando el *Molecular Imager FX* (Bio-Rad Laboratories). La cuantificación de las bandas marcadas isotópicamente se realizó utilizando el Quantity ONE-1D Software (Bio-Rad).

Las sondas utilizadas se sintetizaron utilizando los oligonucleótidos indicados en la Tabla II. Los genes *CZF1* y *PHR1* exhiben un polimorfismo de restricción (RFLP) asociado a las enzimas *SspI* y *BamHI* respectivamente (Xi Chen, comunicación personal; Chen *et al.*, 2004).

b. Análisis Northern.

Para el análisis *Northern*, todas las cepas fueron crecidas en agitación a 30° C en medio sintético con histidina. Las muestras de RNA fueron extraídas mediante el método “hot phenol” (Schmitt *et al.*, 1990). 15 μ g de cada una de las muestras fue corrido en condiciones desnaturalizantes. Para ello, las muestras se incubaron a 65° C durante 10 minutos en 1x tampón de RNA (0,02 M MOPS, 5 mM acetato sódico, 1mM EDTA pH 7), 50% (v/v) de formamida y 15% (v/v) de formaldehído al 37% (p/v). Previa adición de 4 μ l de 6x tampón de carga [74 % (p/v) sacarosa, 0,2% SDS, 8% de

azul bromofenol saturado], se cargaron en un gel al 1% de agarosa con 1x tampón de RNA y 15% de formaldehído al 37%, y se corrieron en 1x tampon RNA y 15% de formaldehído. Una vez corrido se transfirió a membrana de nitrocelulosa. Tras la transferencia ésta fue hibridada con las sondas correspondientes marcadas con ^{32}P (α^{32} – dCTP). Primeramente, se utilizó como sonda un fragmento de de 624 pb del gen *HIS4* amplificado por PCR a partir del DNA de la cepa CAI4 mediante los oligonucleótidos HIS43-F e HIS44-R (Tabla II; Fig. 8.1). La sonda para determinar expresión de *ACT1* se amplificó igualmente por PCR usando los oligonucleótidos indicados en la Tabla II. Tras la transferencia a membranas de nitrocelulosa, estas fueron hibridadas con las sondas correspondientes marcadas con ^{32}P .

Sonda	Oligonucleótidos	Tamaño
<i>CZF1</i>	CZF1-F 5'-CACAATCTGTAGGTTACCTAG-3' CZF1-R 5'-TGCTGCTCTGATGGAGACAA-3'	382 pb
<i>PHR1</i>	PHR1-F5'-TAAACGTGACGTCAAGTATT-3' PHR1-R 5'-ACGATCATCTAATGAACCAC-3'	425 pb
<i>RBT7</i>	RBT7-F 5'-GAGTGAAAAATAAGTGACGAAC-3' RBT7-R 5'-TTAGGATGTACCACACTTCATC-3'	1009 pb
<i>HIS4</i>	HIS43-F 5'- ATTGCCGAAATTAGATAGTA-3' HIS44-R 5'- TTTTCTTTTGGTAATTGTG-3'	624 pb
<i>ACT1</i>	ACT-F 5'-GCTGCTTTAGTTATCGATAACGG-3' ACT-R'5'-GTGGAGCAACTCTCAATTCATTG-3'	279 pb

Tabla II: Oligonucleótidos utilizados para la síntesis de las sondas correspondientes.

c. *PCR alelo-específica y RT-PCR.*

Las reacciones fueron diseñadas esencialmente como descrito en Holmes *et al.*, 2006. Para la PCR alelo-específica fue usado como primer común y directo el oligonucleótido HIS42-F (ver Tabla III), localizado en la posición 370 de la ORF del gen *HIS4*, junto con los *primers* reversos específicos de los dos alelos correspondientes (activo e inactivo). Como primer específico del alelo 2 (activo) fue usado el oligonucleótido correspondiente al SNP en la posición 769 (C/G, 769G), mientras que el primer específico del SNP 929 (T/G, 929T) fue el específico del alelo 1 (inactivo). Esta PCR fue optimizada a una temperatura de anillamiento de 50° C y como molde fueron usados 50 ng de DNA genómico. La utilización del primer común junto con el

reverso específico del alelo 1 amplifica una banda de 579 pb, mientras que con el primer reverso específico del alelo 2 la banda es de 419 pb.

Para la RT-PCR, todas las cepas se crecieron en agitación a 30° C en medio sintético con histidina. Las muestras de RNA fueron extraídas mediante el método “hot phenol” (Schmitt *et al.*, 1990) y tratadas con DNA-asa (Roche) para eliminar la contaminación de DNA. Las muestras tratadas (10 µg) se usaron como molde para la producción de cDNA usando el primer HIS43-R (Tabla III) y la Retrotranscriptasa reversa (SuperScript II (RT) RNA-ase H-Reverse Transcriptase; Invitrogene), en el caso de la RT-PCR específica de alelo, y con Random Primer (Invitrogene) y la misma retrotranscriptasa para la RT-PCR convencional. Las reacciones control, para confirmar que la amplificación no fue resultado de la contaminación de DNA en las muestras de RNA, se trataron de la misma manera pero sin la adición de SuperScript II. La presencia del alelo 1 o 2 en las muestras de cDNA fue confirmada usando los mismos *primers* y condiciones utilizadas para la PCR alelo-específica. Los oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR convencional se exponen en la Tabla III.

PCR Alelo-especifica

Primer directo común (HIS42-F)	5'-GAAATATAATGCCAATGAAA-3'
Primer específico alelo 1 (929OFF-R)	5'-TAAACGTTTAGTGTAGGACA-3'
Primer específico alelo 2 (769ON-R)	5'-ACCATAAACTGAATCACATC-3'
RT-PCR alelo-específica	
Primer reverso para producción cDNA (HIS43-R)	5'-GTTTAGTGTAGGACCCTTCA-3'
Primers alelo 1 y 2	Como los primers para la PCR alelo específica

RT-PCR			Tamaño
<i>HIS4</i>	HIS42-F	5'-GAAATATAATGCCAATGAAA-3'	571 pb
	HIS43-R	5'-GTTTAGTGTAGGACCCTTCA-3'	
<i>ACT1</i>	ACT-F	5'-GCTGCTTTAGTTATCGATAACGG-3'	276 pb
	ACT-R	5'-GTGGAGCAACTCTCAATTCATTG-3'	

Tabla III: Oligonucleótidos utilizados para la PCR alelo-específica y la RT-PCR.

VI. Electroforesis de campo pulsante (PFGE).

Se inocularon 10 ml de YPD con 0.1 ml de muestra de un cultivo exponencial de *C. albicans*. El cultivo fue mantenido en agitación a 30° C durante 48 horas. Las células

se centrifugaron, se lavaron dos veces con 50 mM de EDTA, pH 8, y se resuspendieron en 1 ml de CPES (40 mM Ácido Cítrico, 120 mM Fosfato de Sodio, 20 mM EDTA, pH 8, 1.2 M Sorbitol y 5mM ditioneitol) suplementado con 0.2 mg de *Zymoliasa 20000*. Una alícuota de 1ml de CPE (igual que el CPES pero sin sorbitol y DTT), que contiene 1% de agarosa de bajo punto de fusión a 50° C, se suplementó y el total fue mezclado fuertemente. Alícuotas de 200 µl se transfirieron después a un molde de muestras y se mantuvieron a -20° C. Cuando los bloques (“plugs”) se solidificaron, fueron transferidos a tubos de test, suplementados con 6ml de CPE, e incubados a 30° C durante 4 horas. El CPE se reemplazó después con 5ml de tampón TESP (1M Tris-HCl, 0.5 M EDTA, 2% SDS, 1 mg /ml de Proteínasa K) y se incubó durante toda la noche a 50 °C. Las muestras se lavaron después 3 veces con TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) a 50° C y 6 veces a temperatura ambiente. Los “plugs” se almacenaron a 4° C en 50 mM EDTA, pH 8.

Dos protocolos diferentes fueron usados para separar los cromosomas. En el primer protocolo, todos los cromosomas se separaron excepto para los homólogos del Cr6 y Cr7. Las muestras se sometieron a electroforesis en un aparato de electroforesis de campo pulsante (Rotaphor, Biometra), en un gel de 0.6 % de agarosa durante 24 horas a 80V con una rampa lineal de 120-300 segundos, y después 48 horas a 80V con 420-900 segundos de rampa lineal. Un segundo protocolo fue usado para separar ambos homólogos de los cromosomas más pequeños, Cr6 y Cr7 (Legrand *et al.*, 2004; Lephart *et al.*, 2005). En este caso, las muestras se corrieron en un gel al 1% de agarosa a 180V con una rampa lineal de 60-120 seg., 120° de ángulo durante 48 horas; y después a 120 V con 300-420 seg. de rampa lineal, 120° durante 48 horas, en el mismo aparato.

VII. Análisis de los polimorfismos en el Cr4 y Cr5.

Se comprueba la heterozigosidad existente en el locus *MTL* (Cr5) mediante PCR, utilizando los primers y el protocolo descrito en Rustad y colaboradores (2002) (excepto la temperatura de anillamiento que fue a 55° C en vez de a 57° C), para la amplificación de tanto el gen *MTLa1* como *MTLalpha1*. El estado del Cr4 se comprueba mediante el análisis del polimorfismo de restricción (RFLP) existente en tres loci: *RBT7* (4N), *CZF1* (4H) y *PHR1* (4F2). En el del gen *RBT7*, se amplificó por PCR un fragmento de 1009 pb usando los primers RBT7-F y RBT7-R (ver Tabla II). El producto de PCR fue cortado con la enzima *AluI*, proporcionando dos fragmentos de

310 pb y 279 pb que diferencian los dos alelos. En el caso de los polimorfismos de los genes *CZF1* y *PHR1*, el DNA fue cortado con las enzimas *SspI* y *BamHI*, respectivamente. El DNA se transfirió e hibridó con sondas amplificadas por PCR usando los oligonucleótidos *CZF1-F* y *CZF1-R* (ver Tabla II), que amplificaron una sonda de 382 pb para el gen *CZF1*, y *PHR1-F* y *PHR1-R* (ver Tabla II), que amplificaron una sonda de 425 pb en el caso del gen *PHR1*. Las bandas correspondientes proporcionadas tienen un tamaño de 2.3 kb y 1.8 kb en el caso del gen *CZF1*, y 8.4 kb y 7.4 kb para el *PHR1*.

VIII. Hibridación Genómica Comparada (CGH).

La hibridación genómica comparada (CGH; *Comparative Genomic Hybridation*) fue realizada como se describió en Selmeki *et al.*, 2005.

IX. Construcción del casete de interrupción del gen *CaHIS4*.

Se utiliza el vector *pDMHIS4* (Navarro-García *et al.*, 1998), el cual contiene clonada la ORF silvestre del gen *HIS4* (2517 pb) de la cepa 1001 de *Candida albicans*. El fragmento *EcoRI-SacI* de 3628 pb procedente de este vector se subclonó en los mismos sitios del vector pGEM-7Z(+). La construcción resultante (*pHIS4*) se corta con *PstI* para eliminar la parte central del gen (1536 pb), y después de tratamiento con la enzima *Klenow*, se inserta el URA-blaster (Fonzi and Irwin, 1993) mediante extremos romos. Se obtiene así el vector *pH4*, cuyo fragmento de 5813 pb *XhoI-SacI* es utilizado para transformar la cepa silvestre de *C. albicans* CAI4 (Fonzi and Irwin, 1993). Las cepas resultantes interrumpidas en el locus *HIS4* son identificadas mediante *Southern blot* empleando como sonda el fragmento *XhoI-SacI* utilizado como casete para la interrupción del gen (datos no mostrados). Alternativamente, los transformantes se analizaron por PCR utilizando los oligonucleótidos mostrados en la Tabla IV.

Oligonucleótidos	Secuencia	Tamaño
URA1 HIS45-R	5'-GGTATAGAAATGCTGGTTGG-3' 5'- CTTTAGCTTGTCTCTCCACT-3'	1,7 Kb
HIS41-F URA2	5'- TCCTCCACAAGTGATAAGTT-3' 5'-CGAATCAATGGCACTACAGC-3'	1.65 Kb
HIS41-F HIS45-R	5'- TCCTCCACAAGTGATAAGTT-3' 5'- CTTTAGCTTGTCTCTCCACT-3'	2.2 Kb

Tabla IV: Oligonucleótidos utilizados para detectar la interrupción correcta de uno de los alelos *HIS4* en la cepa CAI4. La localización de alguno de ellos se muestra en la Tabla VI.

Los transformantes correctamente interrumpidos en el locus *HIS4* se utilizaron para comprobar el estado del alelo restante o no interrumpido. Para ello, el DNA de estas cepas (16 en total) fue extraído, y utilizado como molde para amplificar una zona del locus *HIS4* (726 pb) que había sido sustituida por el casete en el alelo interrumpido. El casete de integración se integra desde las posiciones 524 a 2061 del gen *HIS4* de *C. albicans*. Los *primers* utilizados fueron el HIS44-F (posición 1352) e HIS45-R (posición 2059); de tal manera que el producto de PCR sintetizado, y luego secuenciado, nos pondría de manifiesto los SNPs existentes entre la G/C¹⁷¹⁹ al T/A¹⁹⁸³ del alelo no interrumpido.

X. Mutagénesis Dirigida.

Con objeto de originar cambios en aminoácidos específicos del gen *HIS4* de la cepa 1001, se utilizó un KIT de Mutagénesis Dirigida (QuikChange[®] II Site Directed Mutagenesis Kit; Stratagene). Los cambios fueron realizados en el vector pRMH1 (Navarro-García *et al.*, 1998), que contiene dicho gen. Mediante oligonucleótidos específicos que contienen las sustituciones deseadas en una posición central (ver Tabla V), fueron introducidos, de manera independiente, cambios directos en las posiciones 769 (G→C) y 929 (G→T) de la secuencia nucleotídica. Se utilizó como molde para la mutagénesis el vector de pHIS4 de 6625 pb (ver arriba), el cual contiene el gen *HIS4* de la cepa 1001. Una vez realizada la reacción de mutagénesis, las construcciones resultantes fueron secuenciadas para comprobar el cambio correcto en las posiciones correspondientes. El fragmento *EcoRI-SacI* de 3628 pb de las correctas fue subclonado mediante relleno con *Klenow* en el sitio *Sma I* del vector pRM1 (Pla *et al.*, 1995). De esta manera, se obtuvo el vector pRMH1 con el cambio correspondiente en la posición

769 (pRMH1-C769) y otro en la posición 929 (pRMH1-T929) que fueron utilizados para complementar la mutación *his4Δ* de la cepa H47A2A (ver Tabla I).

Oligo	Cambio	Secuencia
MUTA769-F	G/C	5'-GGATTGTGACTCTCATGTGATTGAGTTTATGGTGGAGC-3'
MUTA769-R	G/C	5'-GCTCCACCATAAACTGAATCACATGAGAGTCACAATCC-3'
MUTA929-F	G/T	5'-GATTGGAAAATGCACCTGAAGTGCCTACACTAAACG-3'
MUTA929-R	G/T	5'-CGTTTAGTGTAGGACACTTCAGGTGCATTTTCCAATC-3'

Tabla V: Oligonucleótidos utilizados para la realización de mutagénesis dirigida en los sitios especificados. En *itálica* se muestra la base sustituida en la secuencia silvestre (posiciones 769 y 929).

XI. Secuenciación del gen *CaHIS4*.

El gen *HIS4* de *C. albicans* (2517 pb) fue amplificando por PCR utilizando un par de oligonucleótidos localizados en la posición -71 y +21 de la ORF (Ver Tabla). Se utilizó como molde el DNA cromosómico de la cepa CAI4 y sus derivados generados en este estudio. De esta manera, fue sintetizado de cada cepa un fragmento que contenía el gen de 2600 pb, el cual fue clonado en el vector pGEM-T (Promega). Los clones correctos se sometieron a secuenciación (secuenciador automático *ABI Prism*; *Applied Biosystems*; en el Servicio de Secuenciación de la Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid) mediante la utilización de cuatro parejas más de oligonucleótidos (4 directos y 4 reversos) localizados en posiciones relativas similares a lo largo del gen (Ver Tabla VI), de manera que todas las secuencias proporcionadas por cada “oligo” se superponen generando una secuencia fiable. Cada clon suministró 10 secuencias, que fueron analizadas con el software *SeqMan* (DNASStar, *Lasergene*) obteniendo una secuencia única correcta. El conjunto de todas las secuencias consenso obtenidas de cada cepa, se comparó mediante el software *MegAlign* (DNASStar, *Lasergene*) con las existentes en la base de datos (ambos alelos de la cepa SC5314 y un alelo de la cepa 1001). Los SNP se confirmaron mediante la secuenciación del producto de PCR amplificado a partir del DNA genómico de las cepas SC5314 y CAI4 de dos regiones: una de 1031 pb mediante la utilización de los oligonucleótidos HIS42-F e HIS44-R (contiene los SNP entre las posiciones 266 y 929), y la otra de 726 pb utilizando los

oligonucleótidos HIS44-F e HIS45-R (contiene los SNP entre las posiciones 1719 y 1983).

Oligonucleotido	Secuencia 5'-3'	Posición Relativa
HIS41-F	TCCTCCACAAGTGATAAGTT	-71
HIS41-R	AGAGAACTTTACCAAGATGC	+40
HIS42-F	GAAATATAATGCCAATGAAA	372
HIS42-R	GAATCACTGGAACGTAGTTT	469
HIS43-F	ATTGCCGAAATTAGATAGTA	876
HIS43-R	GTTTAGTGTAGGACCCTTCA	943
HIS44-F	TTTGATGGTGTA AAACTTGA	1354
HIS44-R	TTTTTCTTTTGGTAATTGTG	1500
HIS45-F	ATTTTGTTGCTAGTAATTTG	1952
HIS45-R	CTTAGCTTGTCTCTCCACT	2080
HIS4P-F	GATGTTCAAATGGGGTTAGGTGTG	-616
HIS4P-R	TGGTCGGTGGTGGCATTATCAA	185

Tabla VI: Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y posterior secuenciación de la ORF *HIS4* (2517 pb) de *Candida albicans*, y su región promotora (802 pb). Son denominados como F los directos, y como R los reversos en la secuencia. Se muestran en **negrita** los *primers* utilizados para la amplificación del fragmento que contiene el gen completo (ORF). Se refiere como posición relativa al número de base desde el extremo 5' del oligo dentro de la propia ORF, expresándose en negativo el número de bases antes del inicio de la ORF y con positivo las bases posteriores al final de la misma.

La región promotora del gen *HIS4* de *C. albicans* se secuenció de la misma manera que la ORF. Para ello, se amplificó por PCR utilizando dos oligonucleótidos específicos (HIS4P-F e HIS4P-R; ver Tabla VI) una región de 802 pb de la cepa SC5314 comprendida entre las posiciones -616 y +185 de la ORF, y el producto obtenido fue clonado en el vector pGEM-T (Promega). Las construcciones resultantes fueron sometidas a secuenciación utilizando el mismo par de oligonucleótidos que se usaron para la amplificación. En el caso de las cepas 2C y 4C, se amplificó por PCR una región de 1557 pb comprendida entre las posiciones 616 antes del inicio de la ORF y 922 dentro de la misma en ambas cepas. Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos HIS4P-F e HIS43-R, los cuales solo producen amplificación del alelo no interrumpido, y el producto en cada caso fue secuenciado utilizando los mismos *primers*.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. **Aguilera, A.** (2002) The connection between transcription and genomic instability. *EMBO J.* **21**:195-201.
2. **Al Mamun, AA., Humayun, MZ.** (2006) *Escherichia coli* DNA polymerase II can efficiently bypass 3,N(4)-ethenocytosine lesions *in vitro* and *in vivo*. *Mutat Res.* **593**:164-76.
3. **Altboum, Z., Gottlieb, S., Lebens, GA., Polacheck, I., Segal, E.** (1990) Isolation of the *Candida albicans* histidinol dehydrogenase (*HIS4*) gene and characterization of a histidine auxotroph. *J Bacteriol* **171**: 3898-3904.
4. **Andaluz, E., Gomez-Raja, J., Hermosa, B., Ciudad, T., Rustchenko, E., Calderone, R., Larriba, G.** (2007) Loss and fragmentation of chromosome 5 are major events linked to the adaptation of *rad52-DeltaDelta* strains of *Candida albicans* to sorbose. *Fungal Genet Biol.* **44**:789-98.
5. **Andaluz, E., Larriba, G., Calderone, R.** (1996) A *Candida albicans* gene encoding a DNA ligase. *Yeast.* **12**:893-8.
6. **Andaluz, E., Calderone, R., Reyes, G., Larriba, G.** (2001) Phenotypic analysis and virulence of *Candida albicans* *LIG4* mutants. *Infect. Immun.* **69**:137-147.
7. **Andaluz, E., Ciudad T., Gómez-Raja, J., Calderone, R. Larriba, G.** (2006) Rad52 depletion in *Candida albicans* triggers both the DNA-damage checkpoint and filamentation accompanied by but independent of expression of hypha specific genes. *Molecular Microbiology* **59**:1452-72.
8. **Arlt, MF., Durkin, SG., Ragland, RL., Glover, TW.** (2006) Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. *DNA Repair.* **5**:1126-35.
9. **Arndt, KT., Styles, C., Fink, GR.** (1987) Multiple global regulators control *HIS4* transcription in yeast. *Science* **237**: 874-880.
10. **Asakura, K., Iwaguchi, S., Homma, M., Sukai, T., Higashide, K., Tanaka, K.** (1991) Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeasts of *Candida albicans* and *C. glabrata*. *J Gen Microbiol.* **137**:2531-8.
11. **Barton, RC., Gull, K.** (1992). Isolation, characterization, and genetic analysis of monosomic, aneuploid mutants of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **6**, 171–177.
12. **Barton, RC., Scherer, S.** (1994). Induced chromosome rearrangements and morphologic variation in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **176**: 756–763.
13. **Bennett, RJ., Johnson, AD** (2005) Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu Rev Microbiol.* **59**:233-55.
14. **Bennett, RJ., Johnson, AD.** (2003) Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J.* **22**: 2505-2515.
15. **Berman, J.** (2006) Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* **9**:595-601.
16. **Bougnoux, ME., Diogo, D., Francois, N., Sendid, B., Veirmeire, S., Colombel, JF., Bouchier, C., Van Kruiningen, H., d'Enfert, C., Poulain, D.** (2006) Multilocus sequence typing reveals intrafamilial transmission and microevolutions of *Candida albicans* isolates from the human digestive tract. *J Clin Microbiol.* **44**:1810-20.
17. **Braun, BR. et al.** (2006) A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS Genet.* **1**:36-57.
18. **Calderone, R.** (2002) *Candida* and Candidiasis. Washington: ASM press.
19. **Capoluongo, E., Moretto, D., Giglio, A., Belardi, M., Prignano, G., Crescimbeni, E., Cordiali-Fei, P., Maini, A., Di Carlo, A., Mercantini, R.,**

- Giannetti, A., Ameglio, F.** (2000). Heterogeneity of oral isolates of *Candida albicans* in HIV-positive patients: correlation between candidal carriage, karyotype and disease stage. *J Med Microbiol.* **49**: 985-991.
20. **Carrillo-Muñoz AJ., Brio S, Quindos G.** (2001) A new generation of antifungal drugs. *Rev Iberoam Micol.* **18**: 2-5.
21. **Cha RS., Kleckner N.** (2002) ATR homolog Mec1 promotes fork progression, thus averting breaks in replication slow zones. *Science* **297**:602-6.
22. **Chen, C., Kolodner, RD.** (1999) Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nat Genet.* **23**:81-5.
23. **Chen, X, Magee, BB., Dawson, D, Magee, PT., Kumamoto CA** (2004) Chromosome 1 trisomy compromises the virulence of *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* **51**: 551–565.
24. **Chibana, H., Beckerman, JL., Magee, PT.** (2000). Fine-resolution physical mapping of genomic diversity in *Candida albicans*. *Genome Res.* **10**: 1865–1877.
25. **Chibana, H., Iwaguchi, S., Homma, M., Chindamporn, A., Nakagawa, Y., Tanaka, K.** (1994). Diversity of tandemly repetitive sequences due to short periodic repetitions in the chromosomes of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **176**: 3851–3858.
26. **Chibana, H., Oka, N., Nakayama, H., Aoyama, T., Magee, BB., Magee, PT., Mikami, Y.** (2005). Sequence finishing and gene mapping for *Candida albicans* chromosome 7, and syntenic analysis against *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Genetics.* **170**:1525-37
27. **Chio, T.** (2004) Morphogenesis in *C. albicans*. In: Pathogenic Fungi. Structural Biology and Taxonomy. Edited by G. San-Blas and R. Calderone. England: Caister Academic Press.
28. **Chu, WS., Magee, BB. Magee, PT.** (1993) Construction of an SfiI macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J Bacteriol.* **175**:6637-51.
29. **Ciudad, T., Andaluz, E., Steinberg-Neifach, O., Lue, NF., Gow, NA., Calderone, RA., Larriba, G.** (2004) Homologous recombination in *Candida albicans*: role of CaRad52p in DNA repair, integration of linear DNA fragments and telomere length. *Mol Microbiol* **53**: 1177–1194.
30. **Coste, A., Turner, V., Ischer, F., Morschhauser, J., Forche, A., Selmecki, A., Berman, J., Bille, J., Sanglard, D.** (2006) A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics.* **172**:2139-56.
31. **Coste AT., Karababa, M., Ischer, F., Bille, J., Sanglard, D.** (2004) *TAC1*, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*. *Eukaryot Cell.* **3**:1639-52.
32. **Cowen, LE., Sanglard, D., Calabrese, D., Sirjusingh, C., Anderson, JB., Kohn, LM.** (2000) Evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*. *J Bacteriol.* **182**:1515-22.
33. **Davis, AP., Symington, LS.** (2001) The yeast recombinational repair protein Rad59 interacts with Rad52 and stimulates single-strand annealing. *Genetics* **159**:515-25.
34. **Devlin, C., Tice-Baldwin, K., Shore, D., Arndt, KT.** (1991) *RAP1* is required for *BAS1/BAS2*- and *GCN4*-dependent transcription of the yeast *HIS4* gene. *Mol Cell Biol.* **11**:3642-51.
35. **Diede, SJ., Gottschling, DE.** (1999) Telomerase-mediated telomere addition *in vivo* requires DNA primase and DNA polymerases alpha and delta. *Cell* **99**:723-33.

36. **Dobson, MJ., Tuite, MF., Roberts, NA., Kingsman AJ., Kingsman SM., Perkins RE., Conroy, SC., Fothergill LA.** (1982) Conservation of high efficiency promoter sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **10**: 2625-37.
37. **Donahue, TF., Farabaugh, PJ., Fink, GR.** (1982) The nucleotide sequence of the *HIS4* region of yeast. *Gene* **18**: 47-59.
38. **Dranginis, AM.** (1990) Binding of yeast $\alpha 1$ and $\alpha 2$ as a heterodimer to the operator DNA of a haploid-specific gene. *Nature.* **347**:682-5.
39. **Enloe, B., Diamond, A., Mitchell, A.P.** (2000) A single-transformation gene function test in diploid *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **182**: 5730-5736.
40. **Evans, EG., Odds, FC., Richardson, MD., Holland, KT.** (1974) The effect of growth medium of filament production in *Candida albicans*. *Sabourandia.* **12**:112–119
41. **Fink, GR.** (1964) Gene-Enzyme Relations in Histidine Biosynthesis in Yeast. *Science* **146**: 525-7.
42. **Finley, KR., Berman, J.** (2006) Microtubules in *Candida albicans* hyphae drive nuclear dynamics and connect cell cycle progression to morphogenesis. *Eukaryot Cell.* **4**:1697-711.
43. **Fonzi, WA., Irwin, MY.** (1993) Isogenic stain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717-728.
44. **Forche A, Magee PT, Magee BB, May G.** (2004) Genome-wide single-nucleotide polymorphism map for *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* **3**:705-14.
45. **Forche, A., May, G., Magee PT.** (2005) Demonstration of loss of heterozygosity by single-nucleotide polymorphism microarray analysis and alterations in strain morphology in *Candida albicans* strains during infection. *Eukaryot. Cell* **4**:156-165.
46. **Forche, A., May G., Beckerman J., Kauffman S., Becker J., Magee PT..** (2003) A system for studying genetic changes in *Candida albicans* during infection. *Fungal Genet. Biol.* **39**:38-50.
47. **Frank-Vaillant, M. Marcand, S.** (2001) NHEJ regulation by mating type is exercised through a novel protein, Lif2p, essential to the ligase IV pathway. *Genes Dev* **15**:3005-12.
48. **Friedberg, Walker, Siede, Wood, Schultz, Ellenberger.** (2005) In DNA Repair and Mutagenesis. Second Edition. ASM Press. Washington D.C.
49. **Gillum, AM., Tsay, EY., Kirsch, DR.** (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyF* mutations. *Mol Gen Genetics* **198**: 179-182.
50. **Goodwin, TJD., Poulter, RTM.** (2000) Multiple LTR-retrotransposon families in the asexual yeast *Candida albicans*. *Genome Res.* **10**: 174-191.
51. **Gordenin, DA., Lobachev, KS., Degtyareva, NP., Malkova, AL., Perkins, E., Resnick, MA.** (1993) Inverted DNA repeats: a source of eukaryotic genomic instability. *Mol Cell Biol.* **13**:5315-22.
52. **Gorman, JA., Chan, W., Gorman, JW.** (1991) Repeated use of *GAL1* for gene disruption in *Candida albicans*. *Genetics* **129**:19-24.
53. **Goshorn, AK., Scherer, S.** (1989) Genetic analysis of prototrophic natural variants of *Candida albicans*. *Genetics.* **123**:667–673
54. **Gow, NA., Brown, AJ., Odds, FC.** (2002) Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol.* **5**:366-71.
55. **Graser, Y., Volovsek, M., Arrington, J., Schonian, G., Presber, W., Mitchell, TG., Vilgalys, R.** (1996) Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:12473-7.

56. **Graves-Woodward, KL., Gottlieb, J., Challberg, MD., Weller, S.K.** (1997). Biochemical analysis of mutations in the HSV-1 helicase-primase that alter ATP-hydrolysis, DNA unwinding, and coupling between hydrolysis and unwinding. *J Biol Chem* **272**: 4623-4630.
57. **Haber, JE, Hearn, M.** (1985) Rad52-independent mitotic gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae* frequently results in chromosomal loss. *Genetics* **111**:7-22.
58. **Hazan, I., Sepulveda-Becerra, M., Liu, H.** (2002) Hyphal elongation is regulated independently of cell cycle in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **13**:134-145.
59. **Hinnebusch, AG.** (1988). Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **52**: 248-273.
60. **Hiraoka, M., Watanabe, K., Umezu, K., Maki, H.** (2000) Spontaneous loss of heterozygosity in diploid *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Genetics* **156**(4):1531-48.
61. **Hoffman, CS. Winston, F.** (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267- 272.
62. **Holmes, AR., Tssao, S., Ong, S-W., Niimi, K., Monk, BC., Niimi, M., Kaneko, A., Holland, BR., Schmid, J., Cannon, R.D.** (2006) Heterozygosity and functional allelic variation in the *Candida albicans* efflux pump genes *CDR1* and *CDR2*. *Mol Microbiol* **62**:170-186.
63. **Huang G, Wang H, Chou S, Nie X, Chen J, Liu H.** (2006) Bistable expression of WOR1, a master regulator of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**(34):12813-8.
64. **Huang, ME., Rio, AG., Galibert, MD., Galibert, F.** 2002. POL32, a subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* polymerase delta, suppresses genomic deletions and is involved in the mutagenic bypass pathway. *Genetics* **160**:1409-1422.
65. **Hull, CM., Johnson, AD.** (1999) Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* **285**:1271-1275.
66. **Hull, CM., Raisner RM., Johnson, AD.** (2000) Evidence for mating of the asexual yeast *Candida albicans*. *Science* **289**:307-310.
67. **Ibrahim, AS., Magee, BB., Sheppard, DC., Yang, M., Kauffman, S., Becker, J., Edwards, JE., Magee, P.T.** (2005). Effects of ploidy and mating type on virulence of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **73**, 7366–7374.
68. **Iwaguchi, S., Homma, M., Tanaka, K.** (1992) Clonal variation of chromosome size derived from the rDNA cluster region in *Candida albicans*. *J. Gen Microbiol.* **138**:1177-84.
69. **Iwaguchi, SI., Sato, M., Magee, BB., Magee, PT., Makimura, K., Suzuki, T.** (2001) Extensive chromosome translocation in a clinical isolate showing the distinctive carbohydrate assimilation profile from a candidiasis patient. *Yeast* **18**:1035-46.
70. **Iwaguchi, S., Suzuki, M., Sakai, N., Nakagawa, Y., Magee, PT., Suzuki, T.** (2004). Chromosome translocation induced by the insertion of the URA blaster into the major repeat sequence (MRS) in *Candida albicans*. *Yeast.* **21**: 619–634.
71. **Janbon, G., Sherman, F., Rustchenko E..** (1998) Monosomy of a specific chromosome determines L-sorbose utilization: a novel regulatory mechanism in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:5150-5.
72. **Janbon, G., Sherman, F., Rustchenko, E.** (1999) Appearance and properties of L-sorbose-utilizing mutants of *Candida albicans* obtained on a selective plate. *Genetics.* **153**:653-64.

73. Jones, T., Federspiel, NA., Chibana, H. Dungan *et al.* (2004) The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **101**: 7329-7334.
74. Kabir, MA., Ahmad, A., Greenberg, IR., Wang, Y-K., Rustchenko, E. (2005) Loss and gain of chromosome 5 controls growth of *Candida albicans* on sorbose due to disperse redundant negative regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 12147–12152.
75. Kakar, SN., Partridge, RM., Magee, PT. (1983) A genetic analysis of *Candida albicans*: isolation of a wide variety of auxotrophs and demonstration of linkage and complementation. *Genetics* **104**:241-255.
76. Kaye JA, Melo JA, Cheung SK, Vaze MB, Haber JE, Toczyski DP. (2004) DNA breaks promote genomic instability by impeding proper chromosome segregation. *Curr Biol.* **14**:2096-106.
77. Kegel, A., Sjostrand, JO., Astrom, SU. (2001) Nej1p, a cell type-specific regulator of nonhomologous end joining in yeast. *Curr Biol.* **11**(20):1611-7.
78. Kimchi-Sarfaty, C., Oh, JM., Kim, IW., Sauna, ZE., Calcagno, AM., Ambudkar, SV., Gottesman, MM. (2007) A "silent" polymorphism in the *MDR1* gene changes substrate specificity. *Science* **315**:525-528.
79. Klein, HL. (2001) Mutations in recombinational repair and in checkpoint control genes suppress the lethal combination of *srs2Delta* with other DNA repair genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **157**:557-65.
80. Kramer, KM., Haber, JE. (1993) New telomeres in yeast are initiated with a highly selected subset of TG1-3 repeats. *Genes Dev.* **7**:2345-56.
81. Krogh, BO., Symington, LS. (2004) Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet.* **38**:233-71.
82. Kunkel, TA. (1986) Frameshift mutagenesis by eucaryotic DNA polymerases in vitro. *J Biol Chem.* **261**:13581-7.
83. Kunz, BA., Ramachandran, K., Vonarx, EJ. (1998) DNA sequence analysis of spontaneous mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **148**:1491-505.
84. Lamas-Maceiras, M., Cerdan, ME., Freire-Picos, MA. (1999) *Kluyveromyces lactis* *HIS4* transcriptional regulation: similarities and differences to *Saccharomyces cerevisiae* *HIS4* gene. *FEBS Lett.* **458**: 72-6.
85. Larriba, G. (2004) Genome instability, recombination, and adaptation in *Candida albicans*, In Pathogenic Fungi: host interactions and emerging strategies for control, Chapter 8, p. 285-334. Horizon Press, UK, G. San Blas, and R. Calderone, (eds).
86. Larriba, G., Rubio Coque, J.J., Ciudad, T., Andaluz, E. (2000) *Candida albicans* molecular biology reaches its maturity. *Internat. Microbiol.* **3**: 247-252.
87. Larson, GP., Castanotto, D., Rossi JJ., Malafa, MP. (1994) Isolation and functional analysis of a *Kluyveromyces lactis* *RAP1* homologue. *Gene* **2;150**:35-41.
88. Lasker, BA., Page, LS., Lot, T.J., Kobayashi, G.S. (1992). Isolation, characterization, and sequencing of *Candida albicans* repetitive sequence element 2. *Gene.* **116**: 51–57.
89. Legrand, M., Lephart, P., Forche, A., Magee, PT, Magee, BB (2004) Homozygosity at the *MTL* locus in clinical strains of *Candida albicans* is correlated with karyotypic rearrangements. *Mol Microbiol.* **52**:1451-1462.
90. Lemoine, FJ., Degtyareva, NP., Lobachev, K., Petes, TD. (2005) Chromosomal translocations in yeast induced by low levels of DNA polymerase a model for chromosome fragile sites. *Cell* **120**:587-98.
91. Lephart, PR. Magee, PT. (2006) Effect of the major repeat sequence on mitotic recombination in *Candida albicans*. *Genetics* **174**:1737-1744.

92. **Lephart, PR., Chibana, H., Magee, PT.** (2005). Effect of the major repeat sequence on chromosome loss in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell.* **4**: 733–741.
93. **Lo, HJ., Kohler, JR., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., Fink, GR.** (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell.* **90**:939-49.
94. **Lobachev, K., Vitriol, E., Stemple, J., Resnick, MA., Bloom, K.** (2004) Chromosome fragmentation after induction of a double-strand break is an active process prevented by the RMX repair complex. *Curr Biol.* **14**:2107-12.
95. **Lockhart, SR., Reed, BD., Pierson, CL., Soll, DR.** (1996) Most frequent scenario for recurrent *Candida* vaginitis is strain maintenance with "substrain shuffling": demonstration by sequential DNA fingerprinting with probes Ca3, C1, and CARE2. *J Clin Microbiol.* **34**:767-77.
96. **Magbanua, JP., Fujisawa, K., Ogawa, N., Oshima, Y.** (1997) The homeodomain protein Pho2p binds at an A/T-rich segment flanking the binding site of the basic-helix-loop-helix protein Pho4p in the yeast PHO promoters. *Yeast* **13**: 1299-308.
97. **Magee, BB., Magee, PT.** (1997). WO-2, a stable aneuploid derivative of *Candida albicans* strain WO-1, can switch from white to opaque and form hyphae. *Microbiology* **143**, 289–295.
98. **Magee, BB., PT. Magee.** (2000) Induction of mating in *Candida albicans* by construction of *MTLa* and *MTLalpha* strains. *Science* **289**:310-313.
99. **Manning, M., Mitchell, TG.** (1980) Strain variation and morphogenesis of yeast- and mycelial-phase *Candida albicans* in low-sulfate, synthetic medium. *J Bacteriol* **142**:714-719.
100. **Marcand, S., Brevet, V., Mann, C., Gilson, E.** (2000) Cell cycle regulation of telomere elongation. *Curr. Biol.* **10**:487-490.
101. **Marichal, P., Koymans, L., Willemsens, S., Bellens, D., Verhasselt, P., Luyten, W., Borgers, M., Ramaekers, FC., Odds, FC., Bossche, HV.** (1999) Contribution of mutations in the cytochrome P450 14alpha-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology* **145**: 2701-2713.
102. **Mazin, A. V., Alexeev, A. A., Kowalczykowski, S. C.** (2003). A Novel Function of Rad54 Protein. Stabilization of the Rad51 nucleoprotein filament. *J. Biol. Chem.* **278**: 14029-14036
103. **McEachern MJ, Hicks JB.** (1991) Dosage of the smallest chromosome affects both the yeast-hyphal transition and the white-opaque transition of *Candida albicans* WO-1. *J Bacteriol.* **173**:7436-42.
104. **McEachern MJ, Hicks JB.** (1993) Unusually large telomeric repeats in the yeast *Candida albicans*. *Mol Cell Biol.* **13**(1):551-60.
105. **Miller, MG., Johnson, AD.** (2002) White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type (*MTL*) locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* **110**: 293-302.
106. **Miyazaki, Y., Geber, A., Miyazaki, H., Falconer, D., Parkinson, T., Hitchcock, C., Grimberg, B., Nyswaner, K., Bennett, JE.** (1999) Cloning, sequencing, expression and allelic sequence diversity of ERG3 (C-5 sterol desaturase gene) in *Candida albicans*. *Gene* **236**:43-51.
107. **Montelone, BA., Hoekstra MF., Malone RE.** (1988) Spontaneous mitotic recombination in yeast: the hyper-recombinational rem1 mutations are alleles of the *RAD3* gene. *Genetics* **119**: 289–301.
108. **Morschhauser, J.** (2002) The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta* **1587**: 240-248.

109. **Mortensen, UH., Bendixen, C., Sunjevaric, I., Rothstein, R.** (1996) DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:10729-34.
110. **Mortimer, RK., Contopoulou, R., Schild D.** (1981) Mitotic chromosome loss in a radiation-sensitive strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **78**:5778-82.
111. **Myung K., Kolodner RD.** (2003) Induction of genome instability by DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* **2**:243-58.
112. **Myung, K., Datta, A., Kolodner, R.D.** (2001) Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **104**:397-408.
113. **Nackley, AG., Shabalina, SA., Tchivileve, IE., Satterfield, K., Korchynslyi, O., Makarov, SS., Maixner, W., Diatchenko, L.** (2006) Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science* **314**:1930-1933.
114. **Navarro-Garcia, F., Perez-Diaz, R.M., Magee, B.B., Pla, J., Nombela, C., Magee, P.** (1995). Chromosome reorganization in *Candida albicans* 1001 strain. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**, 361–366.
115. **Navarro-García, F., Pérez-Díaz, R.M., Negredo A.I., Pla J., Nombela, C.** (1998) Cloning and sequence of a 3-835 kbp DNA fragment containing the *HIS4* gene and a fragment of a *PEX5*-like gene from *Candida albicans*. *Yeast* **14**: 1147-1157.
116. **Noble, SM., Johson, AD.** (2005) Strains and strategies for large-scale deletions studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eucaryotic Cell* **4**:298-309.
117. **Odds, FC., Auger, P., Krogh, P., Neely, AN., Segal, E.** (1989) Biotyping of *Candida albicans*: results of an international collaborative survey. *J Clin Microbiol.* **27**:1506-9.
118. **Odds, FC., Bougnoux, ME., Shaw, DJ., Bain, JM., Davidson, AD., Diogo, D., Jacobsen, MD., Lecomte, M., Li, SY., Tavanti, A., Maiden, MC., Gow, NA., d'Enfert, C.** (2007) Molecular Phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* **6**:1041-52.
119. **Odds, FC., Davidson, AD., Jacobsen, MD., Tavanti, A., Whyte, JA., Kibbler CC., Ellis, DH., Maiden, MC., Shaw, DJ., Gow NA.** (2006) *Candida albicans* strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol.* **44**:3647-58.
120. **Ogawa, T., Yu X., Shinohara A., E. H. Egelman.** (1993) Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament. *Science* **259**:1896-1899.
121. **Olaiya, AF., Sogin, SJ.** (1979) Ploidy determination of *Candida albicans*. *J Bacteriol.* **140**:1043-9.
122. **Pai, EF., Krengel, U., Petsko, GA., Goody, RS., Kabsch, W., Wittinghofer, A.** (1990) Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J* **9**:2351-2359.
123. **Paques, F., Haber JE.** (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**:349-404.
124. **Pennaneach, V., Kolodner, RD.** (2004) Recombination and the Tel1 and Mec1 checkpoints differentially effect genome rearrangements driven by telomere dysfunction in yeast. *Nat Genet.* **36**(6):612-7.

125. **Pennaneach, V., Putnam, CD., Kolodner, RD.** (2006) Chromosome healing by de novo telomere addition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* **59**(5):1357-68.
126. **Perepnikhatka, V., Fischer, FJ., Niimi, M., Baker, RA, Cannon, RD., Wang Y-K., Sherman, F., Rustchenko, E.** (1999) Specific chromosome alterations in fluconazole-resistant mutants of *Candida albicans*. *J Bacteriol.* **181**: 4041–4049.
127. **Philpott-Howard, JN., Wade, JJ., Mufti, GJ., Brammer, KW. Ehninger, G.** (1993) Randomized comparison of oral fluconazol versus oral polyenes for the prevention of fungal infection in patients at risk of neutropenia. Multicentre study group. *J. Antimicrob. Chemother.* **31**:59-64.
128. **Pla, J., Pérez-Díaz R., M., Navarro-García, F., Sánchez, M. Nombela, C.** (1995) Cloning of the *Candida albicans* *HIS1* gene by direct complementation of a *C. albicans* histidine auxotroph using an improved double-ARS shuttle vector. *Gene*, **165**: 115-120
129. **Poulter, RTM.** (1995) Genetics of *Candida* species. In *The Yeast*, vol 6, pp. 285-308. Edited by A. H. Rose, A. E. Wheals & J. S. Harrison. San Diego, CA: Academic Press.
130. **Pujol, C., Reynes, J., Renaud, F., Raymond, M., Tibayrenc, M., Ayala, FJ., Janbon, F., Mallie, M., Bastide, JM.** (1993) The yeast *Candida albicans* has a clonal mode of reproduction in a population of infected human immunodeficiency virus-positive patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:9456-9.
131. **Reddy, EP., Reynolds, RK., Santos, E., Barbacid, M.** (1982) A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* **300**:149-152.
132. **Riggsby, WS., Torres-Bauza, LJ., Wills, JW., Townes, TM.** (1982) DNA content, kinetic complexity, and the ploidy question in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol.* **2**:853-62.
133. **Riggsby, WSL** (1990) Physical characterization of *Candida albicans* genome. In: *The Genetics of Candida*. D.R. Kirsch, R. Kelly, and M.B. Kurtzs, eds. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 125-146.
134. **Rustad, TR., Stevens, DA., Pfaller, MA., White, TC.** (2002) Homozygosity at the *Candida albicans* *MTL* locus associated with azole resistance. *Microbiology* **148**: 1061-1072.
135. **Rustchenko, E.** (2007) Chromosome instability in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* **7**:2-11.
136. **Rustchenko, EP., Curran, TM., Sherman, F.** (1993) Variations in the number of ribosomal DNA units in morphological mutants and normal strains of *Candida albicans* and in normal strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **175**: 7189–7199.
137. **Rustchenko, EP., Howard, DH., Sherman, F.** (1994) Chromosomal alterations of *Candida albicans* are associated with the gain and loss of assimilating functions. *J Bacteriol.* **176**:3231-41.
138. **Rustchenko, EP., Howard DH., Sherman, F.** (1997) Variation in assimilating functions occurs in spontaneous *Candida albicans* mutants having chromosomal alterations. *Microbiology.* **143**: 1765–1778.
139. **Rustchenko-Bulgac, EP., Howard, DH.** (1993) Multiple chromosomal and phenotypic changes in spontaneous mutants of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* **6**:1195-207.

140. **Rustchenko-Bulgac, EP., Sherman, F., Hicks JB.** (1990) Chromosomal rearrangements associated with morphological mutants provide a means for genetic variation of *Candida albicans*. *J Bacteriol.* **172**: 1276–1283.
141. **Santos, E., Reddy, E.P., Pulciani, S., Feldman, R.J., and Barbacid, M.** (1983) Spontaneous activation of a human proto-oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**:4679-4683.
142. **Sanyal, K., Baum, M., Carbon, J.** (2004). Centromeric DNA sequences in the pathogenic yeast *Candida albicans* are all different and unique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 11374–11379.
143. **Saville, SP., Lazzell, AL., Monteagudo, C., Lopez-Ribot, JL.** (2003) Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell.* **2**:1053-60.
144. **Scherer, S., Magee, PT.** (1990) Genetics of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* **54**: 226-241.
145. **Schmitt, ME., Brown TA., Trumpower, BL.** (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **18**:3091–3092.
146. **Schulz, VP., Zakian, VA.** (1994) The *saccharomyces PIF1* DNA helicase inhibits telomere elongation and de novo telomere formation. *Cell* **76**:145-55.
147. **Selmecki, A., Bergmann, S., Berman J.** (2005) Comparative genome hybridization reveals widespread aneuploidy in *Candida albicans* laboratory strains. *Mol Microbiol.* **55**:1553-65.
148. **Sherman, F., Fink, GR., Lawrence, CW.** (1974) Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
149. **Shinohara, A., Shinohara, M., Ohta, T., Matsuda, S., Ogawa, T.** (1998) Rad52 forms ring structures and co-operates with RPA in single-strand DNA annealing. *Genes Cells.* **3**:145-56.
150. **Shinohara, A., Ogawa, T.** (1998) Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. *Nature* **391**: 404–407.
151. **Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M., Soll, DR.** (1987) "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* **169**:189-97.
152. **Solinger, JA., Lutz, G., Sugiyama, T., Kowalczykowski, SC., Heyer, WD.** (2001) Rad54 protein stimulates heteroduplex DNA formation in the synaptic phase of DNA strand exchange via specific interactions with the presynaptic Rad51 nucleoprotein filament. *J Mol Biol.* **307**:1207-21.
153. **Soll, DR., Langtimm, CJ., McDowell, J., Hicks, J., Galask, R.** (1987) High-frequency switching in *Candida* strains isolated from vaginitis patients. *J Clin Microbiol.* **25**:1611-22.
154. **Soll, DR.** (2004) Mating-type locus homozygosis, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans*. *Bioessays.* **26**:10-20.
155. **Song, B., Sung, P.** (2000) Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *J Biol Chem* **275**: 15895–15904.
156. **Srikantha, T., Borneman, AR., Daniels, KJ., Pujol, C., Wu, W., Seringhaus, MR., Gerstein, M., Yi, S., Snyder, M., Soll, DR.** (2006) TOS9 regulates white-opaque switching in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* **5**(10):1674-87.

157. **Srikantha, T., Morrow, B., Schroppel, K., Soll, D.R.** (1995) The frequency of integrative transformation at phase-specific genes of *Candida albicans* correlates with their transcriptional state. *Mol Gen Genet* **246**:342-352.
158. **Staib, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Hof, H., Morschhauser, J.** (2002) Host versus in vitro signals and intrastrain allelic differences in the expression of a *Candida albicans* virulence gene. *Mol Microbiol.* **44**:1351-66.
159. **Suárez, T., Biswas, S.B., Biswas, E.E.** (2002) Biochemical defect in retina-specific human ATP-binding cassette transporter nucleotide binding domain 1 mutants associated with macular degeneration. *J Biol Chem* **277**:21759-21767.
160. **Sudbery, P., Gow, N., Berman J.** (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **12**:317-324.
161. **Sudbery, PE.** (2001) The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Mol Microbiol.* **41**:19-31.
162. **Sung, P.** (1997) Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. *Genes Dev.*, **11**, 1111–1121.
163. **Suzuki, T., Kobayashi, I., Kanbe, T., Tanaka, K.** (1989) High frequency variation of colony morphology and chromosome reorganization in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* **135**: 425–434.
164. **Suzuki, T., Rogers, AL. Magee, PT.** (1986) Inter- and intra-species crosses between *Candida albicans* and *Candida guilliermondii*. *Yeast* **2**:53-58
165. **Symington, LS.** (2002) Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 630–670.
166. **Takahashi, T., Munakata, M., Ohtsuka, Y., Nisihara, H., Nasuhara, Y., Kamachi-Satoh, A., Dosaka-Akita, H., Homma, Y., Kawakami, Y.** (2002) Expression and alteration of ras and p53 proteins in patients with lung carcinoma accompanied by idiopathic pulmonary fibrosis. *Cancer.* **95**:624-33.
167. **Tavanti, A., Gow NA., Maiden, MCJ., Odds, F., Shaw DJ.** (2004) Genetic evidence for recombination in *Candida albicans* based on haplotype analysis. *Fungal Genet. Biol.* **41**:553-562.
168. **Teng, SC., Chang, J., McCowan, B., Zakian, VA.** (2000) Telomerase-independent lengthening of yeast telomeres occurs by an abrupt Rad50pdependent, Rif-inhibited recombinational process. *Mol. Cell* **6**:947–952.
169. **Thrash-Bingham, C., Gorman, JA.** (1992). DNA translocations contribute to chromosome length polymorphisms in *Candida albicans*. *Curr. Genet.* **22**, 93–100.
170. **Thrash-Bingham, C., Gorman, JA.** (1993). Identification, characterization and sequence of *Candida albicans* repetitive DNAs Rel-1 and Rel-2. *Curr. Genet.* **23**: 455–462.
171. **Tsang, PW., Cao, B., Siu, PY., Wang, J.** (1999) Loss of heterozygosity, by mitotic gene conversion and crossing over, causes strain-specific adenine mutants in constitutive diploid *Candida albicans*. *Microbiology* **145**:1623-9.
172. **Tsang, CS., Samaranayake, LP.** (2000) Oral yeast and coliforms in HIV-infected individuals in Hong Kong. *Mycoses* **43**:303-308.
173. **Tzung, KW., Williams, RM., Scherer, S., Federspiel, N., Jones, T., Hansen, N., Bivolarevic, V., Huizar, L., Komp, C., Surzycki, R., Tamse, R., Davis, R.W., Agabian, N.** (2001) Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 3249-3253.

174. **Uhl, MA., Biery, M., Craig, N., Johnson, A.D.** (2003). Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *C. albicans*. *Embo. J.***22**: 2668–2678.
175. **Valencia, M., Bentele, M., Vaze, MB., Herrmann, G., Kraus, E., Lee, SE., Schar, P., Haber, JE.** (2001) NEJ1 controls non-homologous end joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **414**:666-9.
176. **Van Uden, N., Buckley, H.** (1970) Genus 2. *Candida* Berkhout in Lodder J. (Ed) *The Yeast*, North-Holland Publishing Co, pp. 893-1087.
177. **Warena, AJ., Konopka JB.** (2002) Septin function in *Candida albicans* morphogenesis. *Mol Biol Cell* **13**:2732-2746.
178. **Wellington, M., Rustchenko, E.** (2005) 5-Fluoro-orotic acid induces chromosome alterations in *Candida albicans*. *Yeast*. **22**: 57–70.
179. **Whelan, WL. Magee, PT.** (1981) Natural heterozygosity in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* **145**:896-903.
180. **Whelan, WL., Soll DR.** (1982) Mitotic recombination in *Candida albicans*: recessive lethal alleles linked to a gene required for methionine biosynthesis. *Mol Gen Genet.* **187**:477-85.
181. **Whelan, WL., Partridge, RM., Magee, PT.** (1980) Heterozygosity and segregation in *Candida albicans*. *Mol Gen Genet* **180**: 107-113.
182. **Whelan, WL** (1987) The genetics of medically important fungi. *Crit Rev Microbiol.* **14**:99-170.
183. **White, TC.** (1997) Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother.* **41**:1482-7.
184. **White, TC., Marr, KA., Bowden RA.**(1998) Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:382-402.
185. **Wilson, RB., Davis, D., Mitchell, AP.** (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol.* **181**(6):1868-74.
186. **Yesland, K., Fonzi W. A.** (2000) Allele-specific gene targeting in *Candida albicans* results from heterology between alleles *Microbiology* **146**: 2097-2104.
187. **Yoshida, J., Umez, K., Maki, H.** (2003) Positive and negative roles of homologous recombination in the maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **164**:31-46.
188. **Zordan, RE., Galgoczy, DJ., Johnson, AD.** (2006) Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:12807-12.

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA
FACULTAD DE CIENCIAS
DPTO. ANATOMÍA, BIOLOGÍA CELULAR Y ZOOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

“Análisis del papel de *RAD52* en la estabilidad genómica de *C. albicans*”.

Jonathan Gómez Raja

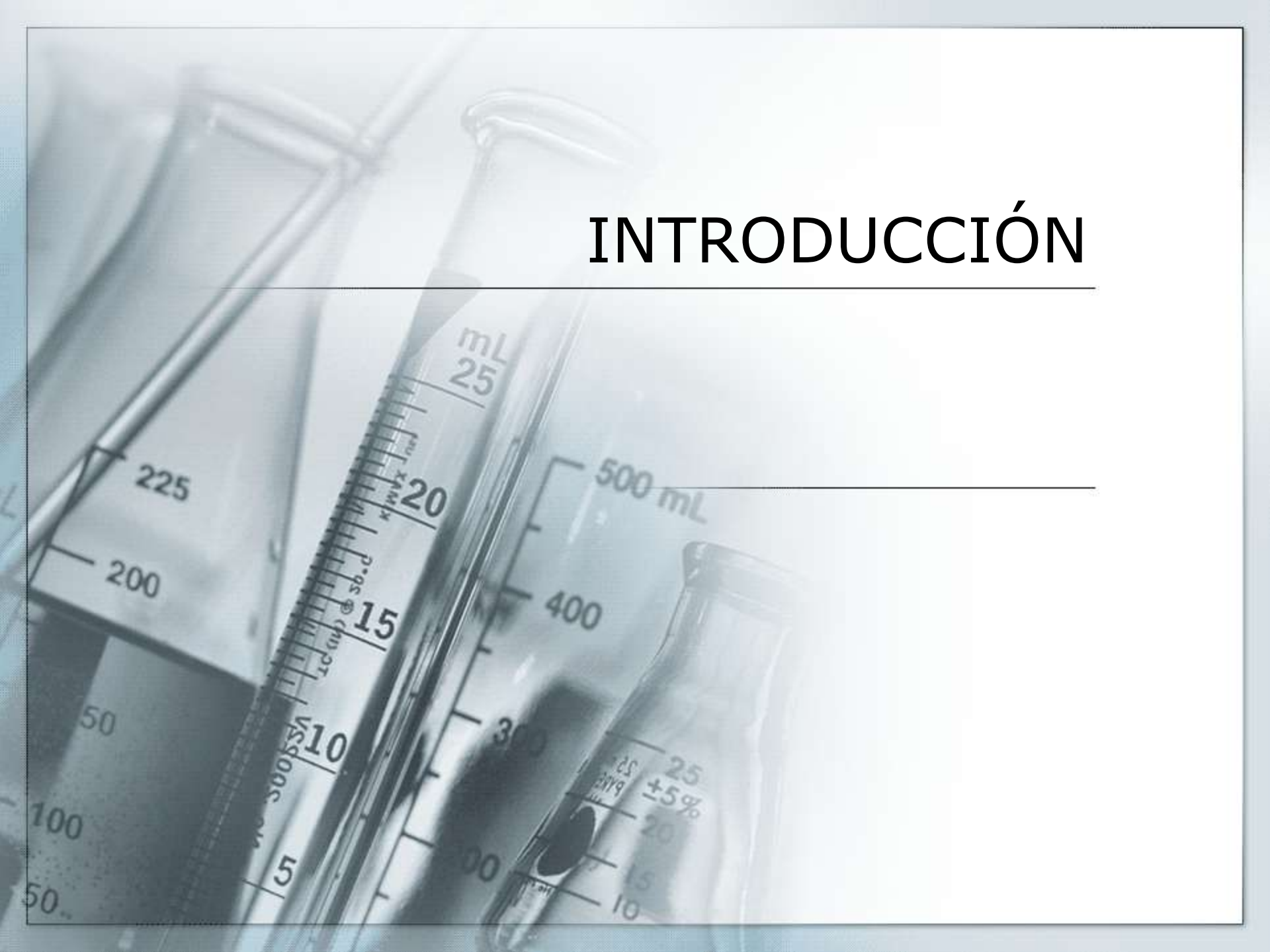
Directores:

Germán Larriba Calle

Encarnación Andaluz López

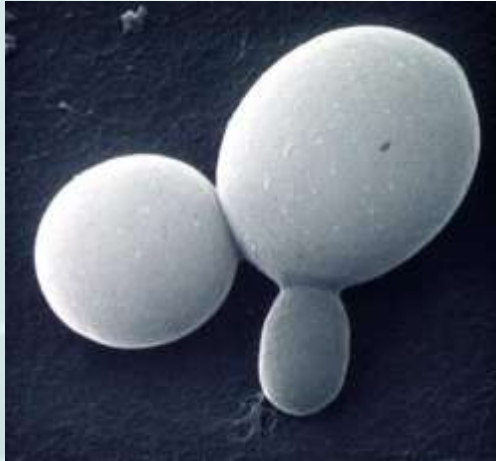
Badajoz, Julio de 2007

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

Candida albicans como problema médico.



CANDIDIASIS

Tratamiento: Compuestos azólicos

Problemática: Resistencias

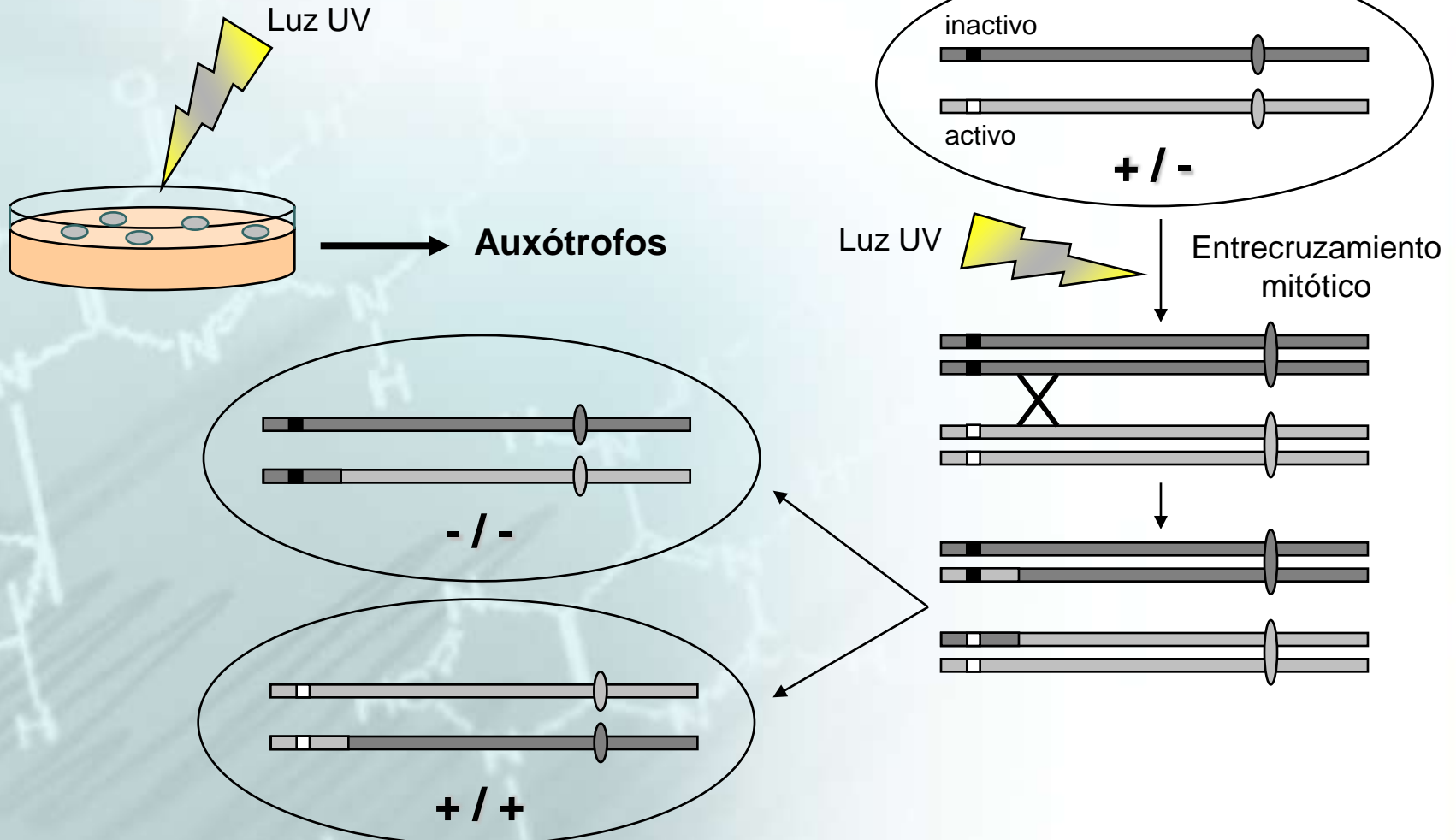
Características de *Candida albicans*:

1. Diploidía
2. Polimorfismo
3. Reproducción predominantemente clonal
4. Adaptabilidad

INTRODUCCIÓN

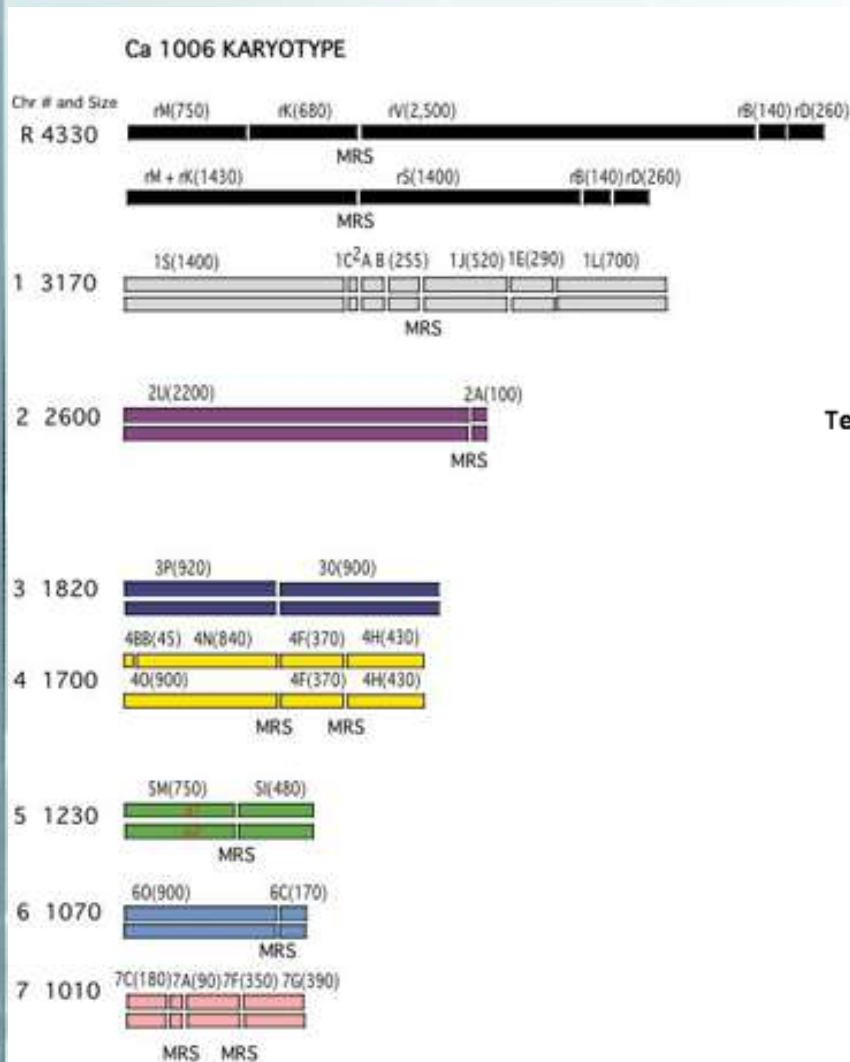
Diploidía

- Cuantificación de DNA
 - Cantidad DNA = diploides de *S. cerevisiae*



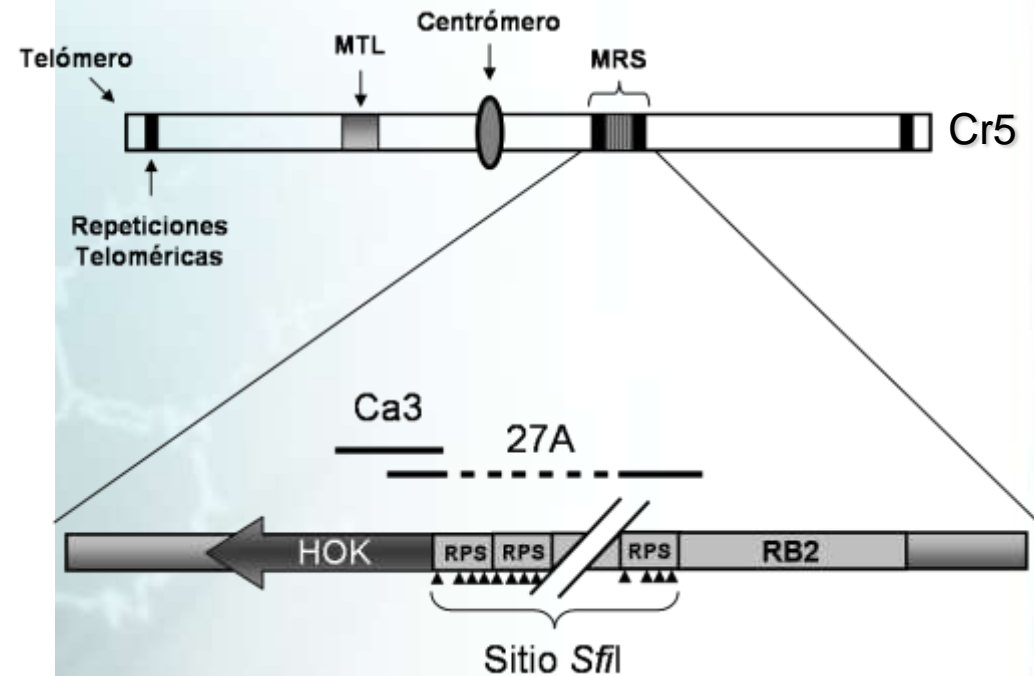
INTRODUCCIÓN

EL GENOMA DE *C. albicans*



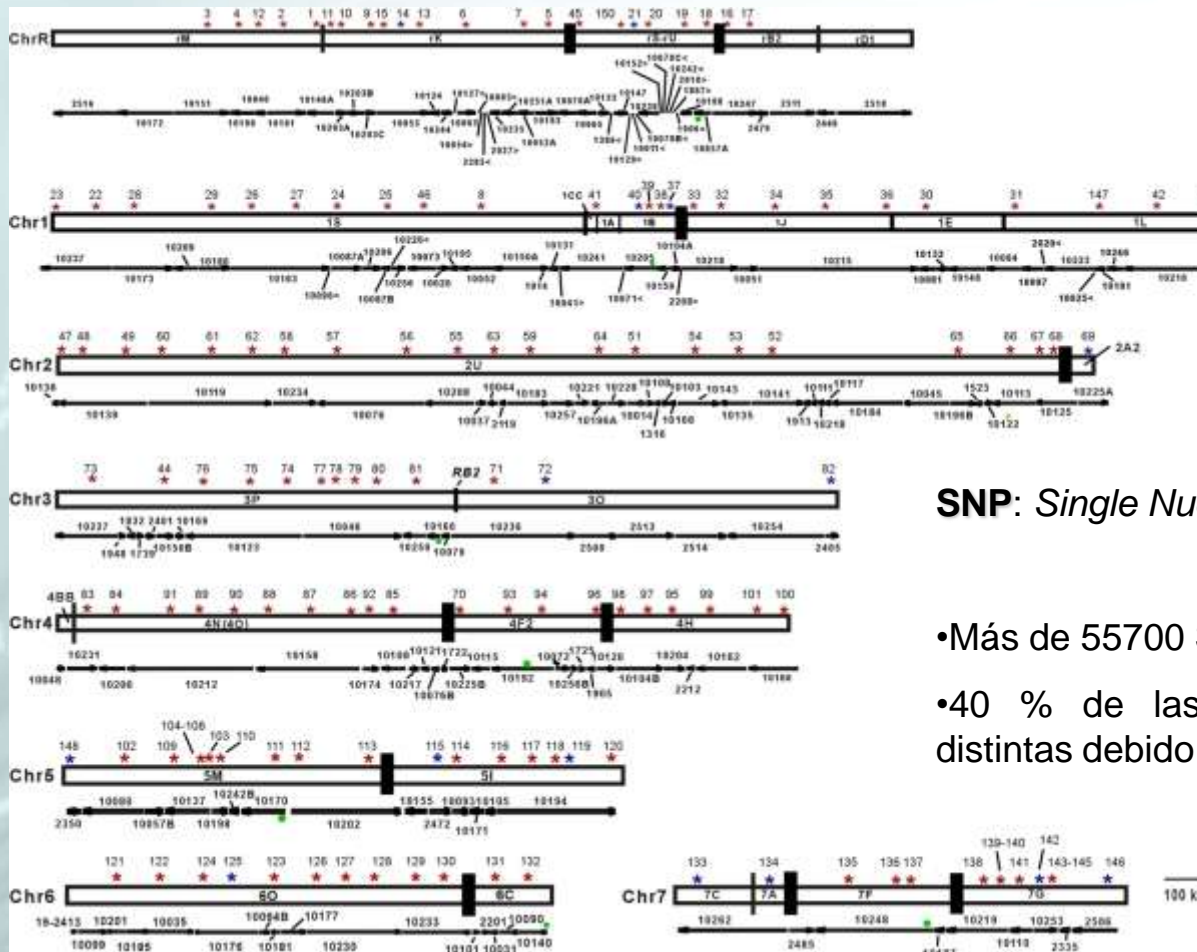
Secuencias especiales

- Repeticiones rDNA
- MRS (*Major Sequence Repeat*)
- Centrómero
- Secuencia telomérica y subtelomérica (CARE2/Rel2)



EL GENOMA DE *C. albicans*

- Secuenciación del genoma de la cepa SC5314 reveló una sorprendente cantidad de heterozigosidad natural



SNP: *Single Nucleotide polymorphism*

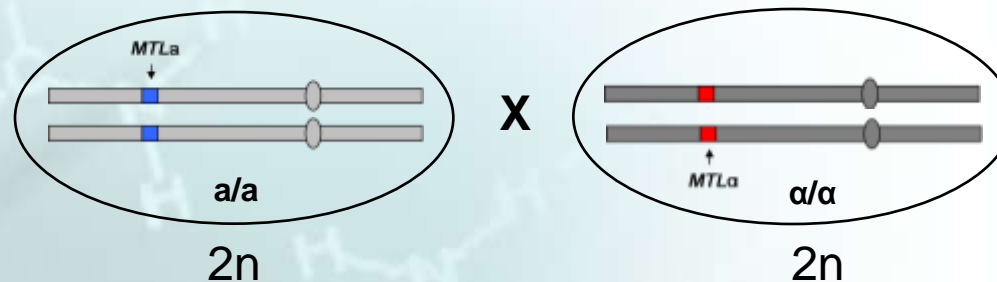
- Más de 55700 SNP en 32 Mb de genoma diploide
- 40 % de las ORF codifican para proteínas distintas debido a las diferencias entre alelos.

LOH y Recombinación mitótica



Ejemplos LOH en *C. albicans*:

- **Adaptación a sorbosa:** Pérdida de una copia del Cr5
- **Conjugación:** Homozigosis en el *locus MTL*



- **Resistencia a azoles:** Homozigosis en *TAC1*

Procesos de LOH en *C. albicans*:

1. Pérdida de cromosoma
 2. Recombinación mitótica
 3. Mutación puntual
- } Única fuente de variabilidad

LOH y Recombinación mitótica

Maquinaria de mantenimiento de la integridad del DNA

RAD52 en S. cerevisiae

- Defectos en:
 - Conversión génica
 - BIR (Reparación inducida por rotura)
 - SSA (Anillamiento de cadena sencilla)
 - Recombinación entre repeticiones invertidas
 - Mantenimiento de telómeros en ausencia de telomerasa
- Pérdida de cromosoma
- Aumento de mutación puntual

RAD52 en C. albicans

- Defectos:
 - Integración homóloga
 - Reparación de DNA
 - Mantenimiento de telómeros



OBJETIVOS

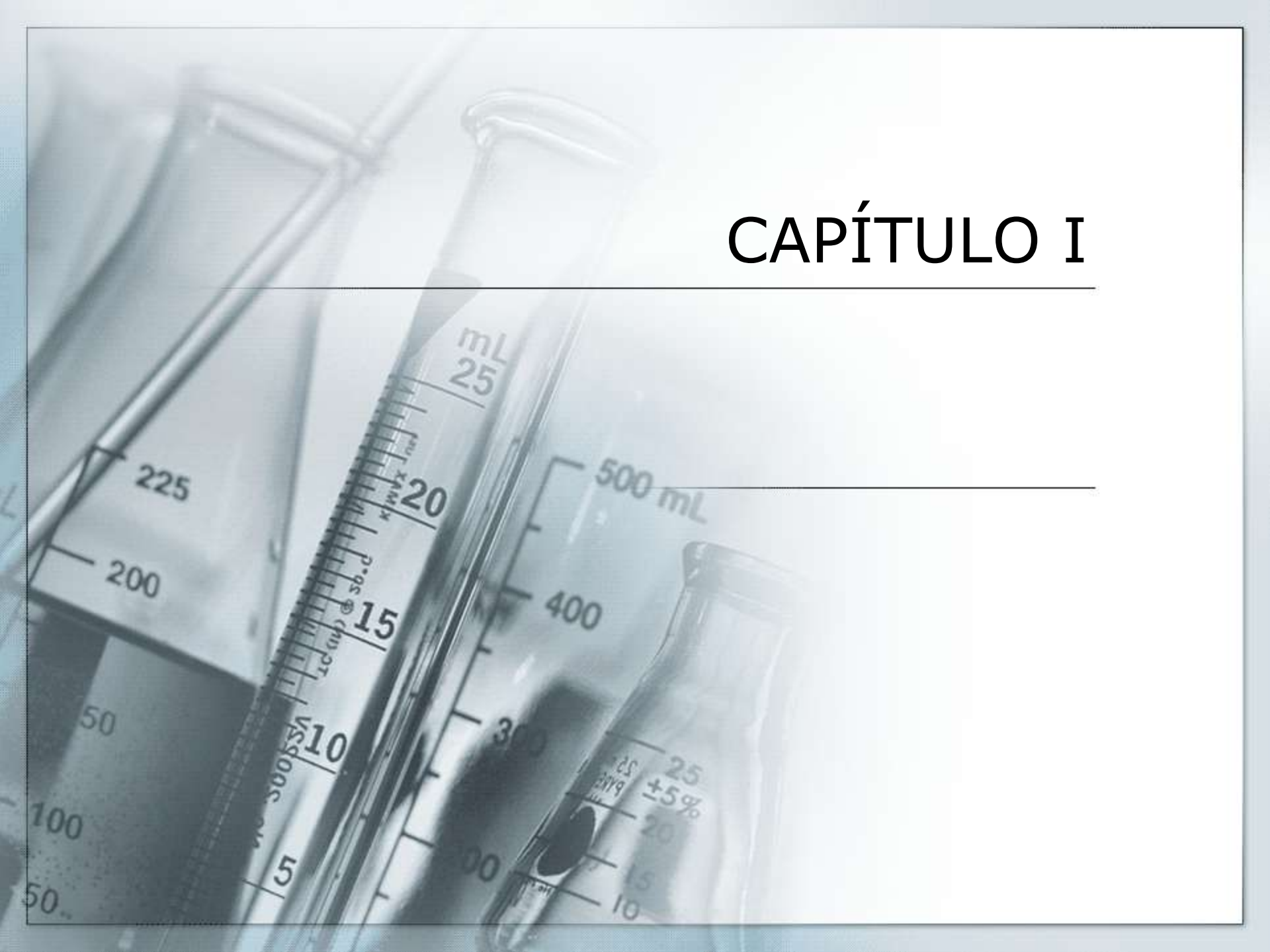
OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo fue investigar si la recombinación homóloga está implicada en el mantenimiento de la estabilidad genómica en *C. albicans*.

1. Detección y caracterización de un marcador auxotrófico heterocigótico presente en el linaje de la cepa modelo SC5314 de *C. albicans*.

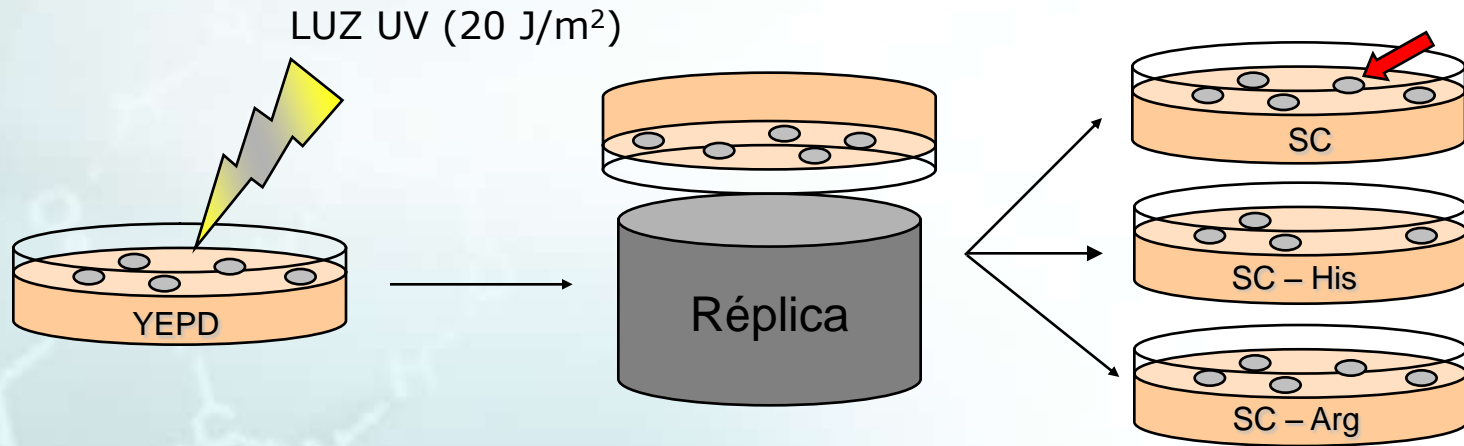
2. Mediante la utilización de este marcador, analizar los eventos de pérdida de heterocigosidad y reordenamientos cromosómicos ocurridos en mutantes *rad52-ΔΔ* de *C. albicans*.

CAPÍTULO I



CAPÍTULO I

Identificación de *HIS4* como marcador heterocigótico en la cepa CAI4



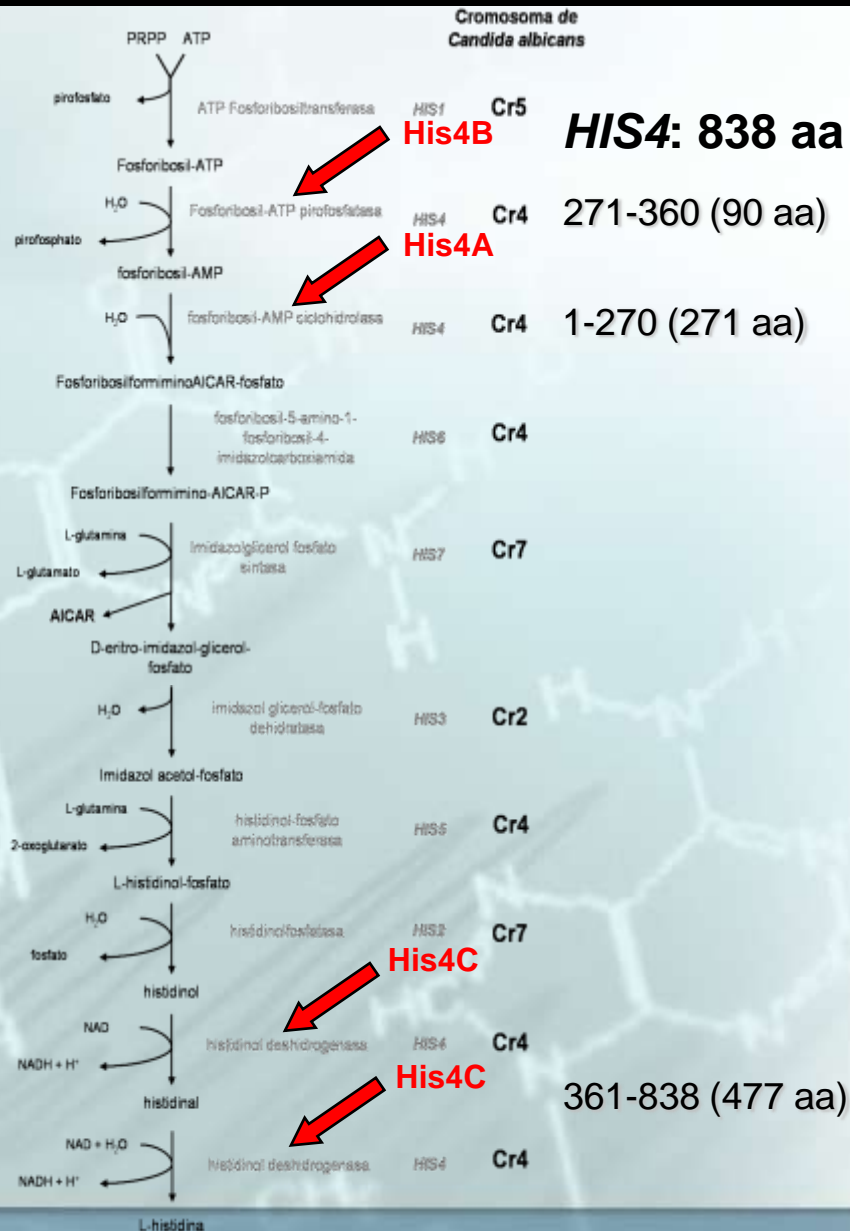
His⁻ : 6/2515 → Frec. = 2-3 x 10⁻³
Arg⁻ : 0/8369 → Frec. = < 10⁻⁴

➔ *his4.1-his4.6*

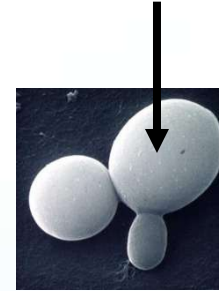
La cepa CAI4 es heterocigótica para algún gen implicado en la ruta biosintética de la histidina

CAPÍTULO I

Identificación de *HIS4* como marcador heterocigótico en la cepa CAI4



HIS4 (URA3)



His⁻

his4.1-his4.6

Uri⁻

SC-URA



His⁺

Uri⁺

5-FOA



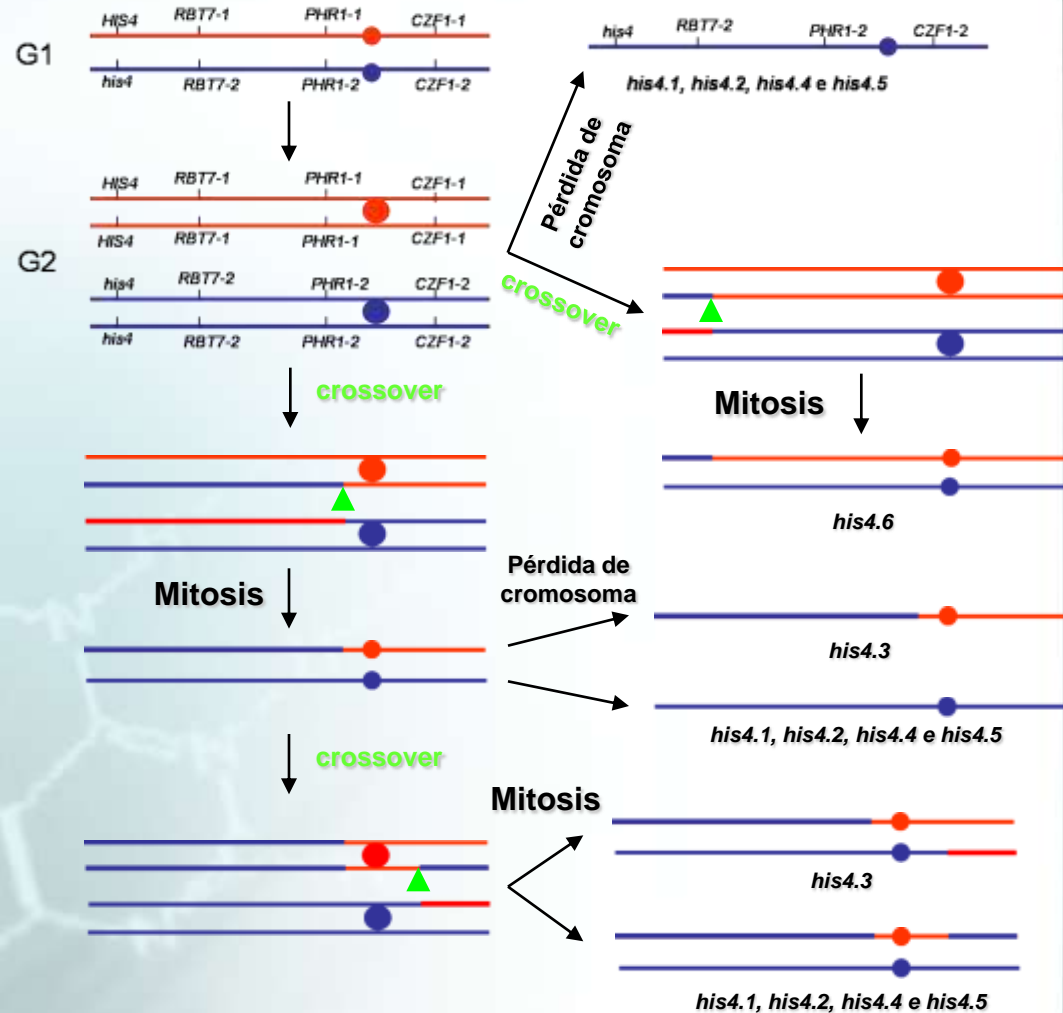
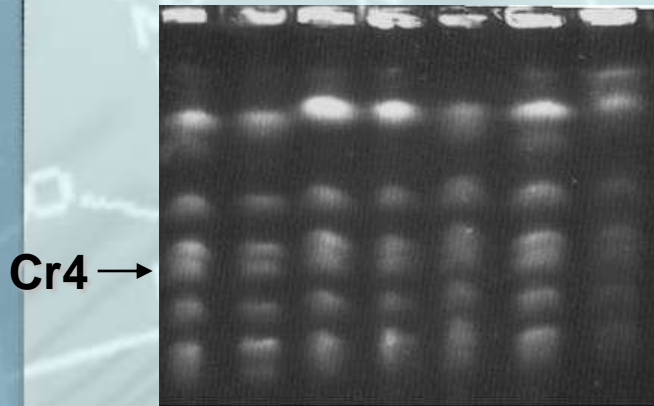
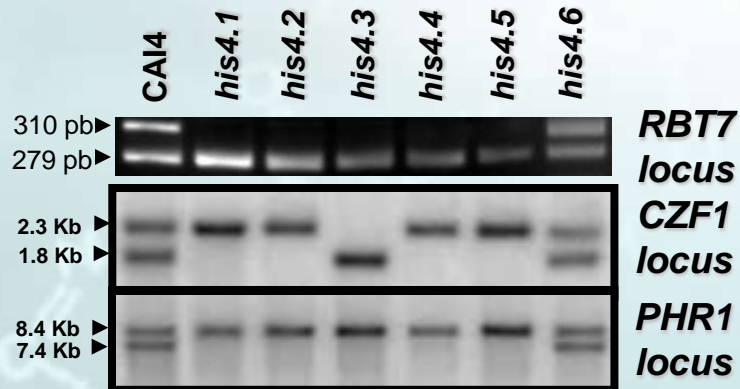
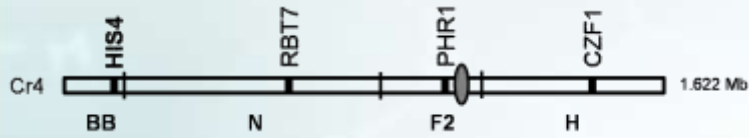
His⁻

Uri⁻

La cepa CAI4 es heterocigótica para *HIS4*

CAPÍTULO I

Identificación de los eventos genéticos que conducen a la auxotrofia para histidina



1. Recombinación mitótica
2. Pérdida de cromosoma
3. Una combinación de ambos

CAPÍTULO I

Análisis de los SNPs de la ORF *HIS4*

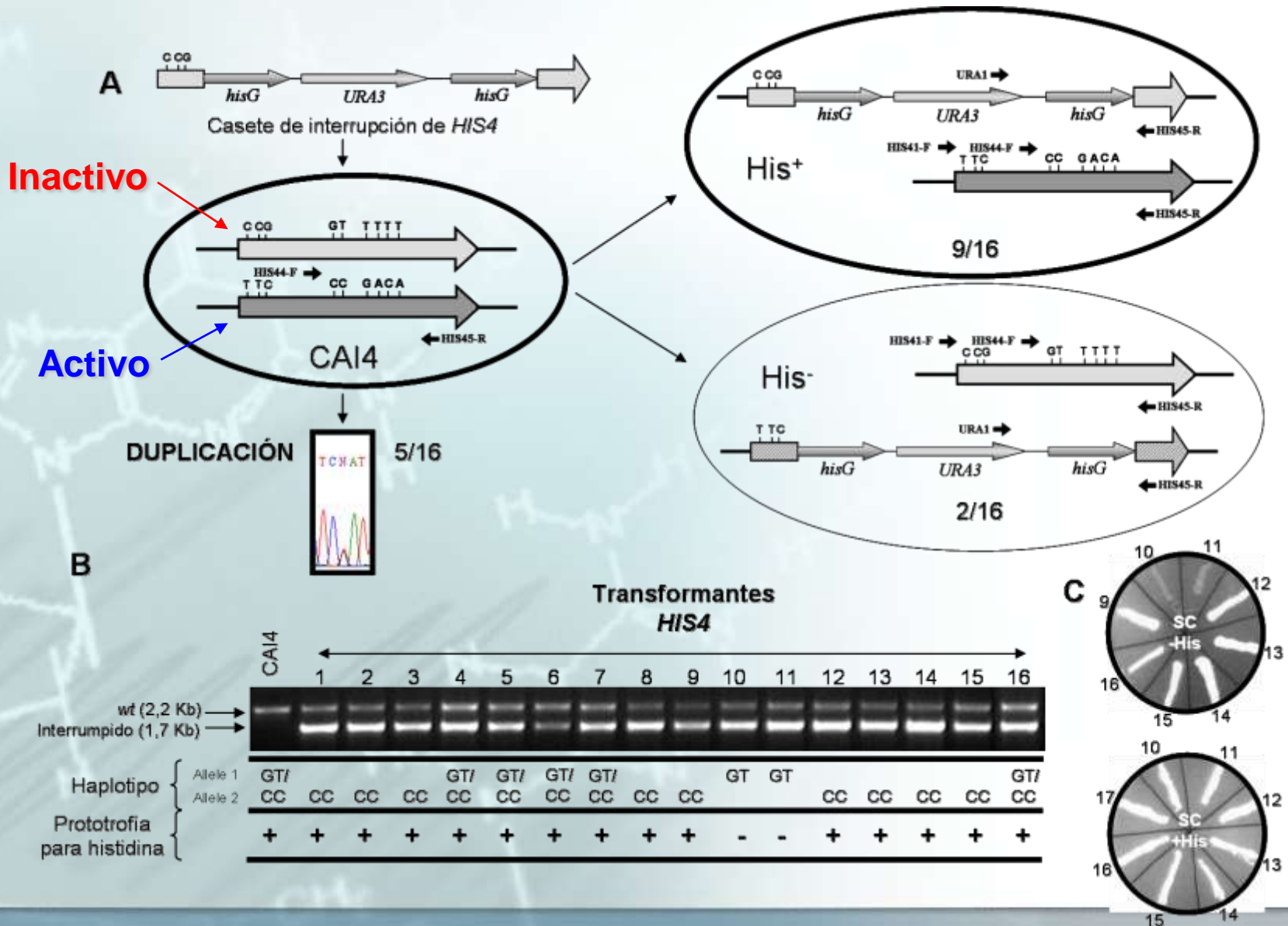
	<u>266</u>	<u>405</u>	496	769	929	1719	1770	1825	1890	1908	1938	<u>1983</u>
1001	C	C	G	G	G	G	T	C	T	T	T	T
SC5314 reported	C(S)/ T(L)	C/T	G	C	T	G	T	C	T	T	T	T/A
CAI4-1	C	C	G	C	T	G	T	C	T	T	T	T
CAI4-2	C	C	G	C	T	G	T	C	T	T	T	T
CAI4-3	C	C	G	C	T	G	T	C	T	T	T	T
CAI4-4	C	C	G	C	T	G	T	T(S)	T	T	T	T
CAI4-5	C	C	G	C	T	G	T	C	G	A	C	A
CAI4-6	T	T	C	G	G	C	C	C	G	A	C	A
CAI4-7	T	T	C	G	G	C	C	C	G	A	C	A
CAI4-8	T	T	C	G	G	C	C	C	G	A	C	A
SC5314-1	T	T	C	G	G	C	C	C	G	A	C	A
SC5314-2	C	C	G	C	T	G	T	C	T	T	T	T
SC5314-3	C	C	G	C	T	G	T	C	T	T	T	T
SC5314-4	C	C	G	C	T	C	C	C	G	A	C	A
SC5314-5	C	C	G	C	G	G	T	C	T	T	T	T
SC5314												
Nuestros datos	C(S)/ T(L)	C/T	G(E)/ C(Q)	C(H)/ G(D)	T(V) /G(G)	G/C	T/C		T/G	T/A	T/C	T/A

Análisis de los SNPs de la ORF *HIS4*

1. La cepa CAI4 posee dos alelos que difieren en 11 posiciones y definen dos haplotipos
2. Los haplotipos son relativamente estables y ya existían en el precursor SC5314, lo que sugiere que no son fruto de las manipulaciones genéticas que originaron la cepa CAI4 a partir de la cepa SC5314
3. Existen, no obstante, indicios de recombinación mitótica dentro de la ORF del gen *HIS4*, que puede haberse producido por recombinación entre cromátidas no hermanas

CAPÍTULO I

Análisis funcional de los alelos *HIS4* en el linaje de la cepa SC5314



CAPÍTULO I

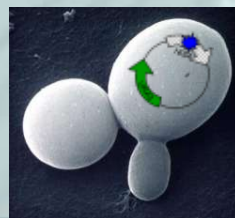
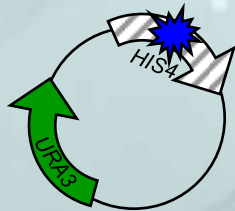
Identificación del SNP responsable de la inactivación del alelo 1.

	<u>266</u>	<u>405</u>	<u>496</u>	<u>769</u>	<u>929</u>	1719	1770	1825	1890	1908	1938	<u>1983</u>
1001	C	C	G	G	G	G	T	C	T	T	T	T
Alelo 1	C	C	G	C	T	G	T	C	T	T	T	T
SC5314 reportado	C(S)/ T(L)	C/T	G	C	T	G	T	C	T	T	T	T/A
SC5314 Nuestros datos	C(S)/ T(L)	C/T	G(E)/ C(Q)	C(H)/ G(D)	T(V) /G(G)	G/C	T/C		T/G	T/A	T/C	T/A

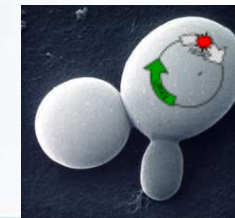
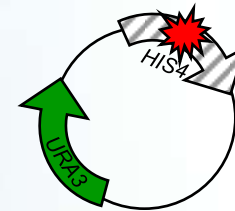
HIS4 (1001): CCG-769G(Asp)-929G(Gly)-GTCTTTT

CCG-769C(His)-929G(Gly)-GTCTTTT

CCG-769G(Asp)-929T(Val)-GTCTTTT

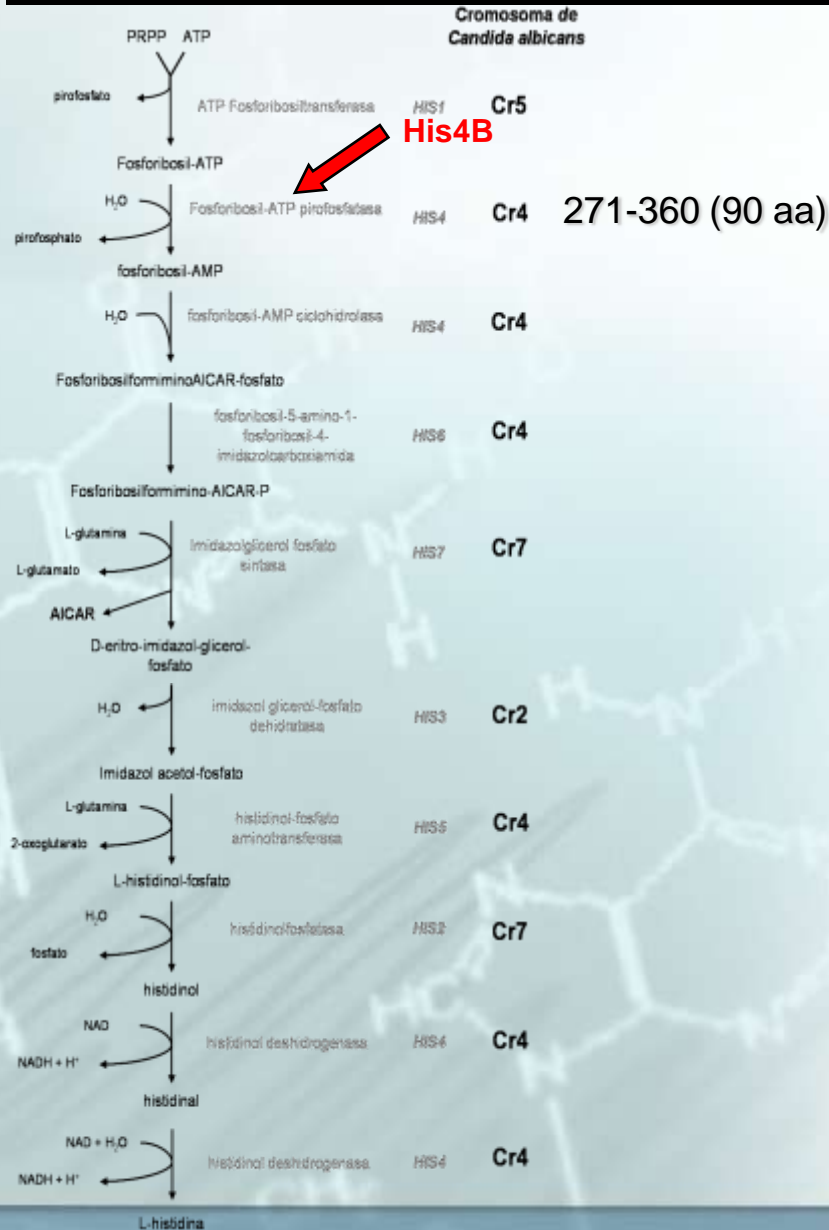


His⁺



His⁻

Identificación del SNP responsable de la inactivación del alelo 1.



CAPÍTULO I

Análisis de la heterozigosidad de *HIS4* en otras cepas de *C. albicans*

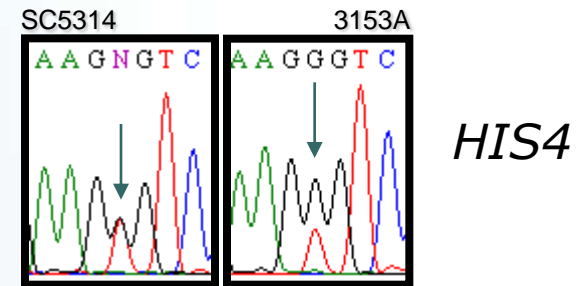
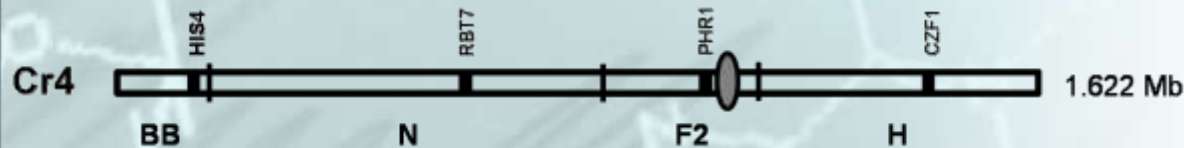
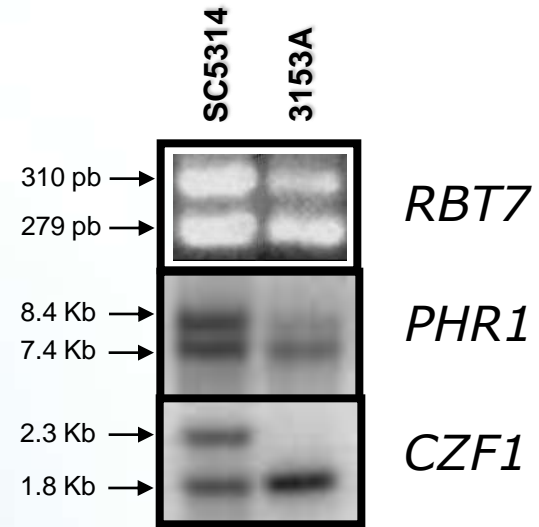
Strains	ORF Position										
	496	634	642	726	729	769	798	882	893	929	957
SC5314	G ^E /C ^Q	G ^D	A	T	A	C ^H /G ^D	A	G	G	T ^V /G ^G	C
1001	G ^E /C ^Q	G	A	T	A	G	A	G	G	G	C
1006	G ^E /C ^Q	G	A/G	T/C	A/T	G	A/G	G/A	G ^S /C ^T	G	C/T
3153A	G ^E /C ^Q	G	A	T	A	G	A	G	G	T ^V /G ^G	C
4918	G	A ^N	A	C	T	G	G	G	C	G	C

3153A

His⁻ : 0/9239

SC5314

His⁻ : 13/5529 → Frec. = 2-3 x 10⁻³

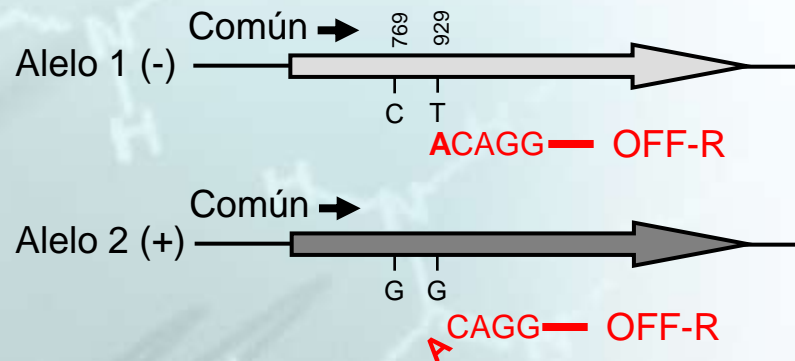


Posición 929 { GAAGGGTCC (activo)
GAAGTGTCC (inactivo)

CAPÍTULO I

Análisis de la heterozigosidad de *HIS4* en otras cepas de *C. albicans*

Strains	ORF Position										
	496	634	642	726	729	769	798	882	893	929	957
SC5314	G ^E /C ^Q	G ^D	A	T	A	C ^H /G ^D	A	G	G	T ^V /G ^G	C
1001	G ^E /C ^Q	G	A	T	A	G	A	G	G	G	C
1006	G ^E /C ^Q	G	A/G	T/C	A/T	G	A/G	G/A	G ^S /C ^T	G	C/T
3153A	G ^E /C ^Q	G	A	T	A	G	A	G	G	T ^V /G ^G	C
4918	G	A ^N	A	C	T	G	G	G	C	G	C



DNA	-		1001		1006		3153A		4918		SC5314		CAI4		2C		4C		<i>his4.1</i>		<i>his4.2</i>		<i>his4.3</i>		<i>his4.4</i>		<i>his4.5</i>		<i>his4.6</i>	
	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R
	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	



Prototrofia His

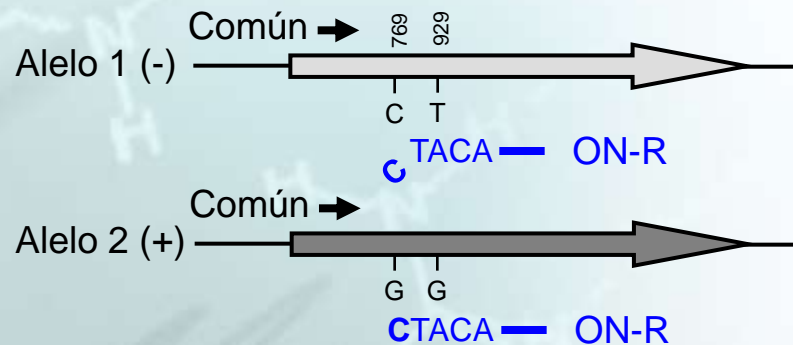
+ + + + + + + - - - - - - -

CAPÍTULO I

Análisis de la heterozigosidad de *HIS4* en otras cepas de *C. albicans*

Strains	ORF Position										
	496	634	642	726	729	769	798	882	893	929	957
SC5314	G ^E /C ^Q	G ^D	A	T	A	C ^H /G ^D	A	G	G	T ^V /G ^G	C
1001	G ^E /C ^Q	G	A	T	A	G	A	G	G	G	C
1006	G ^E /C ^Q	G	A/G	T/C	A/T	G	A/G	G/A	G ^S /C ^T	G	C/T
3153A	G ^E /C ^Q	G	A	T	A	G	A	G	G	T ^V /G ^G	C
4918	G	A ^N	A	C	T	G	G	G	C	G	C

Los resultados de la PCR alelo específica coincidieron con los obtenidos por secuenciación directa, y por lo tanto este ensayo puede ser utilizado rutinariamente para analizar la configuración alélica del gen *HIS4* de *C. albicans* en otros aislados.



DNA	-		1001		1006		3153A		4918		SC5314		CA14		2C		4C		<i>his4.1</i>		<i>his4.2</i>		<i>his4.3</i>		<i>his4.4</i>		<i>his4.5</i>		<i>his4.6</i>	
	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R	ON-R	OFF-R		
	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	



Prototrofia His

+ + + + + + - - - - -

CAPÍTULO I

Estudio de la secuencia promotora del gen *HIS4* de *C. albicans*



PEX5

```
AAATATGGATTGGAATCAATTCAGAGGCGAATTTAGTTTCTAAGTATA  
TAGGGTAGTGTAATTATGGCAAATTGCAAATTATTATTTTTCTAGCT  
GTAATGAGAAAATGACTCAGAATTATTTTTTTTTTTCCTCCACAAGTGA  
TAAGGTTTTTTTTTTTTTTTTCATTTTCTTTCAACGCTTCCTACCACC  
AACCAGACATGATATTCCCTATTTTGCC
```

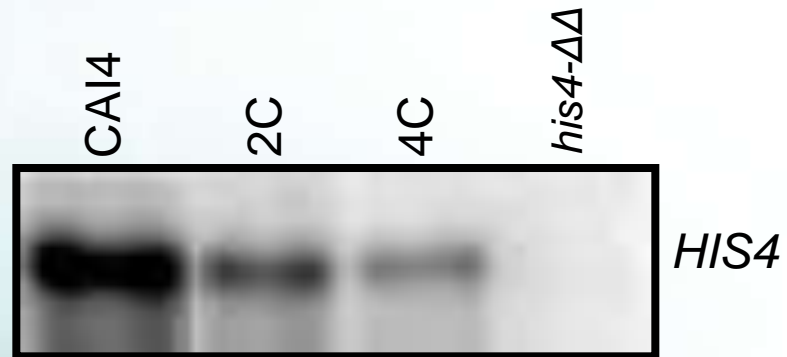
HIS4

Estudio de la secuencia promotora del gen *HIS4* de *C. albicans*

•Diferencias alélicas en el promotor de *HIS4*

Base de datos	
Cepas	Secuencia
1001	TGT.....G-TTTTTTTTTTTTTTTTTT (18T)
SC5314	TAT.....GGTTTTTTTTTTTTTTTTTT (18T)
Nuestros resultados	
Clones	Secuencia
2C	TAT.....GGTTTTTTTTTTTTTTTTTT (18T)
4C	TGT.....G-TTTTTTTTTTTTTTTTTT (17T)
HIS4P.1	TAT.....G-TTTTTTTTTTTTTTTTTT (18T)
HIS4P.2	TAT.....G-TTTTTTTTTTTTTTTTTT (19T)
HIS4P.3	TAT.....G-TTTTTTTTTTTTTTTTTT (18T)
HIS4P.4	TAT.....G-TTTTTTTTTTTTTTTTTT (17T)
HIS4P.5	TGT.....G-TTTTTTTTTTTTTTTTTT (18T)

Análisis de la expresión de ambos alelos *HIS4*



Ambos alelos pueden expresarse desde sus respectivos promotores

OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo fue investigar si la recombinación homóloga está implicada en el mantenimiento de la estabilidad genómica en *C. albicans*.

1. Detección y caracterización de un marcador auxotrófico heterocigótico presente en el linaje de la cepa modelo SC5314 de *C. albicans*.

- La cepa CA14 y su parental SC5314 son heterocigóticos para el gen *HIS4*

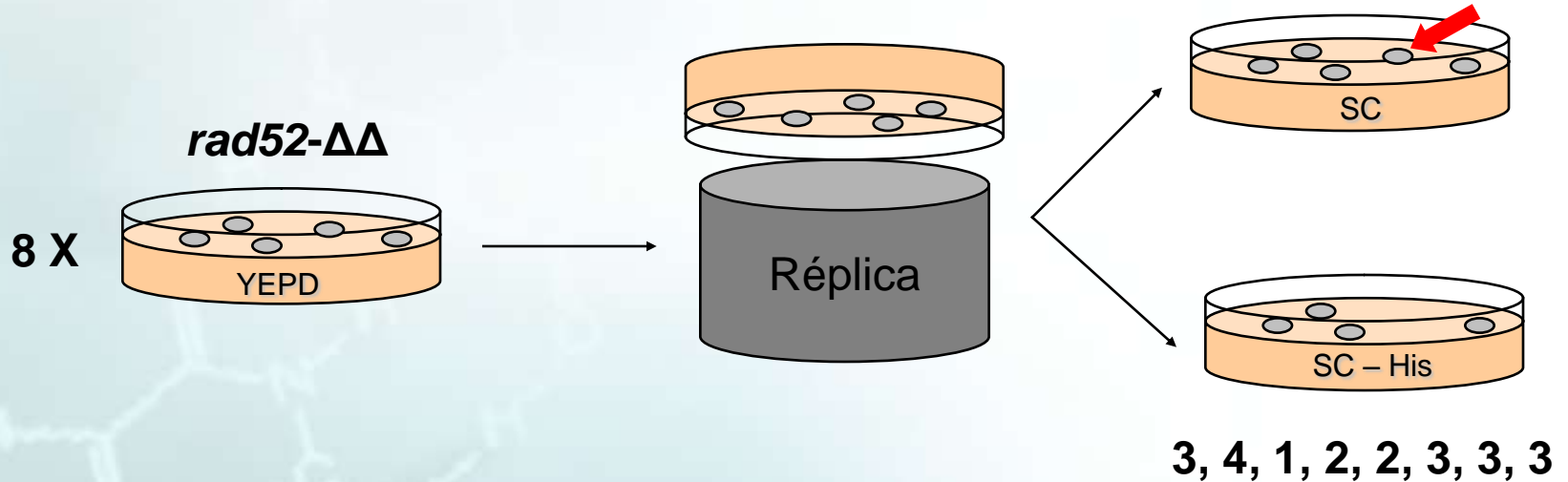
2. Mediante la utilización de este marcador, analizar los eventos de pérdida de heterocigosidad y reordenamientos cromosómicos ocurridos en mutantes *rad52-ΔΔ* de *C. albicans*.



CAPÍTULO II

CAPÍTULO II

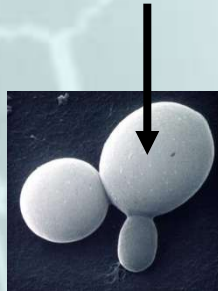
Generación de auxótrofos His⁻ en mutantes *rad52-ΔΔ*



ra52-ΔΔ (Uri⁺/Uri⁻): 21/8800 → Frec. = 3×10^{-3}
CAF2/CAI4 : 0/25000 → Frec. = $< 5 \times 10^{-5}$

TCR2.1.1 → *his*.1-his*.7*

HIS4 (URA3)

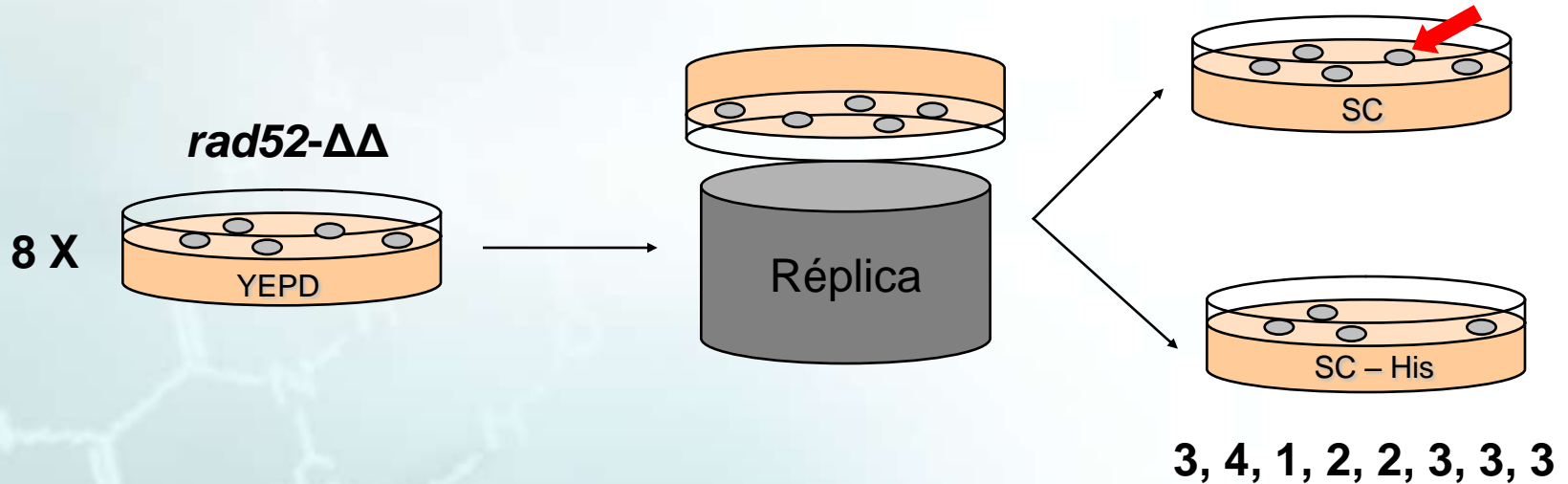


His⁻

Uri⁻

CAPÍTULO II

Generación de auxótrofos His⁻ en mutantes *rad52-ΔΔ*



rad52-ΔΔ (Uri⁺/Uri⁻): 21/8800 → Frec. = 3×10^{-3}
 CAF2/CAI4 : 0/25000 → Frec. = $< 5 \times 10^{-5}$
 TCR2.1.1 → *his*.1-his*.7*

Complementación con *HIS4*:

	Cepa	<i>his4/his4</i>	<i>his*.1</i>	<i>his*.2</i>	<i>his*.3</i>	<i>his*.4</i>	<i>his*.5</i>	<i>his*.6</i>	<i>his*.7</i>
Transf.		16	1	5	1	1	-	1	3
Número colonias	Uri ⁺	163	985	1440	892	2162	-	1018	1047
	His ⁺	157	1	1	24	93	-	3	8

CAPÍTULO II

Análisis de la configuración alélica de *HIS4* en los mutantes *rad52-ΔΔ*

	182	189	236	266	299	361	405	495	496	769	929	1071	1116	1719	1770	1890	1908	1938	1983	2098	2355	
Alelo 1	A(D)	T	A(K)	C(S)	T(V)	A(S)	C	T	G(E)	C(H)	T(V)	G	G	G	T	T	T	T	T	T	A(I)	C
Alelo 2	A(D)	T	A(K)	T(L)	T(V)	A(S)	T	T	C(Q)	G(D)	G(G)	G	G	C	C	G	A	C	A	A(I)	C	
TCR2.2.1-1	A	T	A	T	T	A	T	T	C	G	G	G	G	C	C	G	A	C	A	A	A	C
TCR2.2.1-2	A	T	A	T	T	A	T	T	C	G	G	G	G	C	C	G	A	C	A	A	A	C
TCR2.2.1-3	A	T	A	T	T	A	T	T	C	G	G	G	G	C	C	G	A	C	A	A	A	C
TCR2.2.1-4	A	T	A	C	T	A	C	C	G	C	T	A	G	G	T	T	T	T	T	T	A	C
TCR2.1.1-1	G(G)	T	A	T	T	A	C	T	C	C	T	G	G	G	C	T	T	T	T	T	A	C
TCR2.1.1-2	A	T	A	T	C(A)	G(G)	T	T	C	G	G	G	G	C	C	G	A	C	A	A	A	T
TCR2.1.1-3	A	T	A	C	T	A	C	T	G	C	T	G	A	G	T	T	T	T	T	T	A	C
TCR2.1.1-4	A	C	G(R)	C	T	A	C	T	G	C	T	G	G	G	T	T	T	T	T	T	G(V)	C

Los dos alelos de *HIS4* presentes en la CAI4 se encuentran también en las cepas *rad52-ΔΔ*, pero las ORFs exhiben una alta frecuencia de mutación

CAPÍTULO II

Los auxótrofos *rad52* His- producen revertientes His+ a través de mecanismos diferentes a la restauración G929 (Gly310)

1. Reversión independiente de la generación de Gly310
2. Todos los auxotrofos *his** producían abundantes revertientes
3. Los revertientes aumentaban a lo largo del tiempo de incubación
4. La frecuencia de reversión difería ampliamente entre los auxótrofos
5. Es exclusiva de los mutantes *rad52*

His⁺ en 4C: 0/21000 \longrightarrow Frec. de reversión espontánea del alelo 1 menor de 4×10^{-5}

Cepas	Células sembradas por placa	Número de colonias									TOTAL
		Días de incubación									
		2	5	6	8	12	16	19	20	30	
<i>his*.1</i>	48x10 ⁵	3,5	24	48	30	66	28,5	4,5	0	0	359,5
<i>his*.2</i>	143x10 ⁵	0	31,5	29	10	10,5	0,5	0	0	0	116,5
<i>his*.3</i>	63x10 ⁵	0(0,5)*	0(20,5)	0(96,5)	0(6,5)	14(71)	25(13,5)	11(0)	38	10	240,5(354)
<i>his*.4</i>	170x10 ⁵	0,5	22,5	15	6,5	11,5	5	1	0	0	93
<i>his*.5</i>	74x10 ⁵	0,5	41,5	25,5	18	39,5	11,5	1	0	0	188
<i>his*.6</i>	29x10 ⁵	1	15	22,5	11,5	17,5	8	1,5	0	0	120
<i>his*.7</i>	77x10 ⁵	0,5	122	34	10,5	9	4,5	0	0	0	231,4

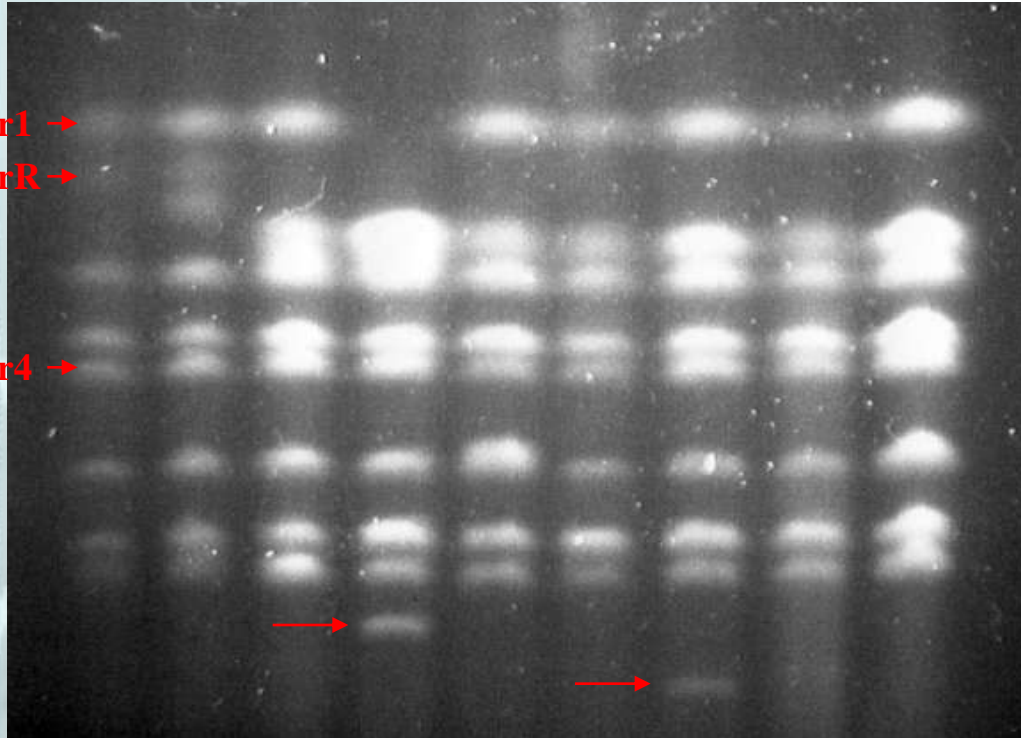
CAPÍTULO II

1. El alelo activo se ha perdido en las cepas *his**, por lo tanto estas cepas son *his4*
2. Estas cepas exhiben una alta frecuencia de reversión, que es generalmente independientes de la generación de Gly310
3. Esta alta frecuencia de reversión puede explicar la aparición de cepas revertientes en los ensayos de complementación con *HIS4*

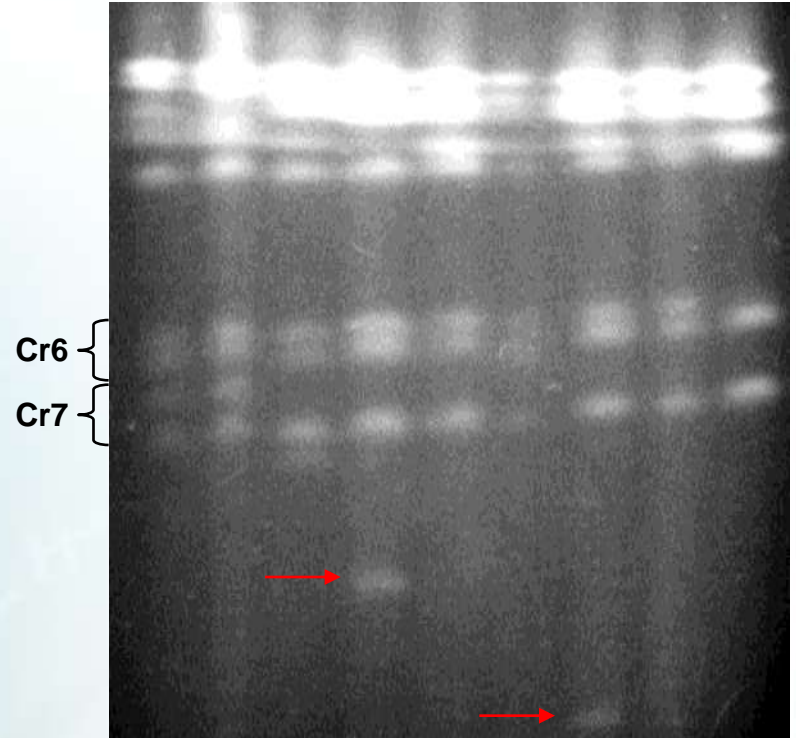
CAPÍTULO II

Análisis de cariotipos electroforéticos de las cepas *his**

TCR2.1
TCR2.1.1
his.1*
his.2*
his.3*
his.4*
his.5*
his.6*
his.7*



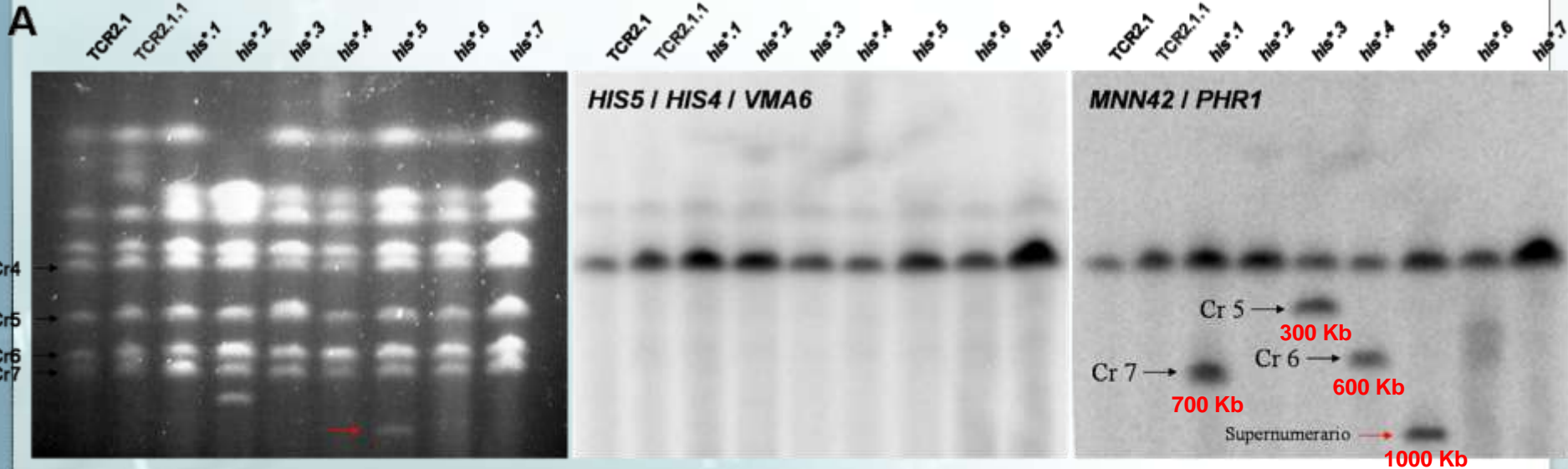
TCR2.1
TCR2.1.1
his.1*
his.2*
his.3*
his.4*
his.5*
his.6*
his.7*



La mayoría, si no todos, los auxótrofos derivados de *rad52*Δ exhiben alteraciones en sus cariotipos electroforéticos

CAPÍTULO II

Análisis de los reordenamientos cromosómicos en los mutantes His⁻ *rad52-ΔΔ*

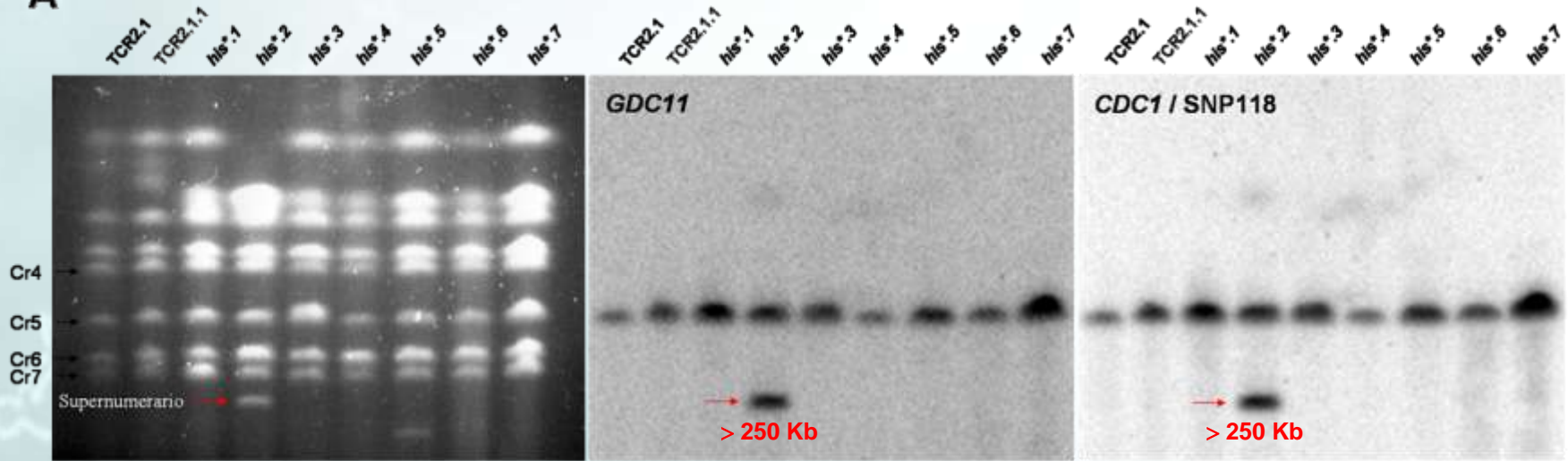


CAPÍTULO II

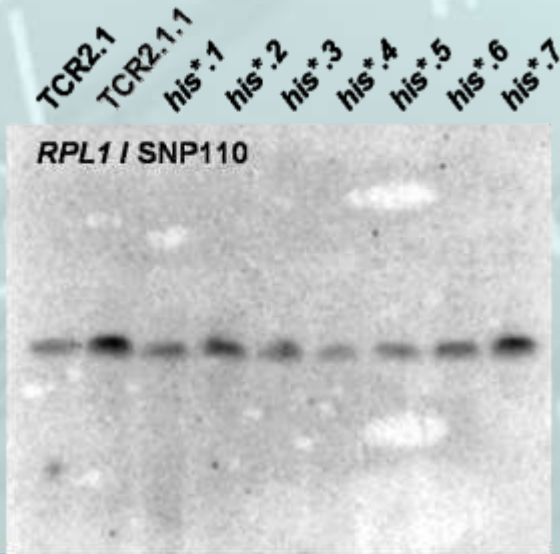
Análisis de los reordenamientos cromosómicos en los mutantes His⁻

rad52-ΔΔ

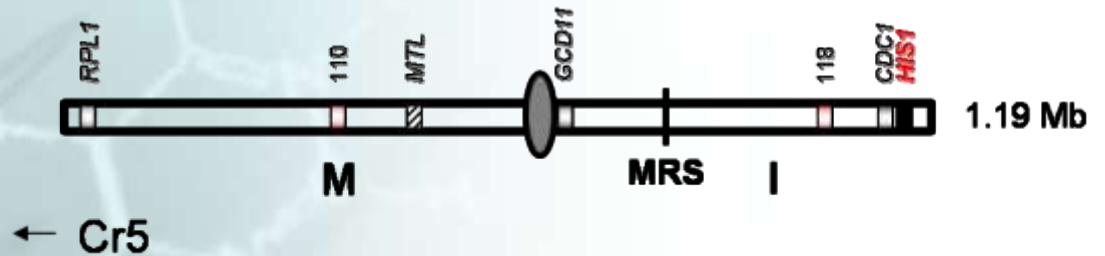
A



B

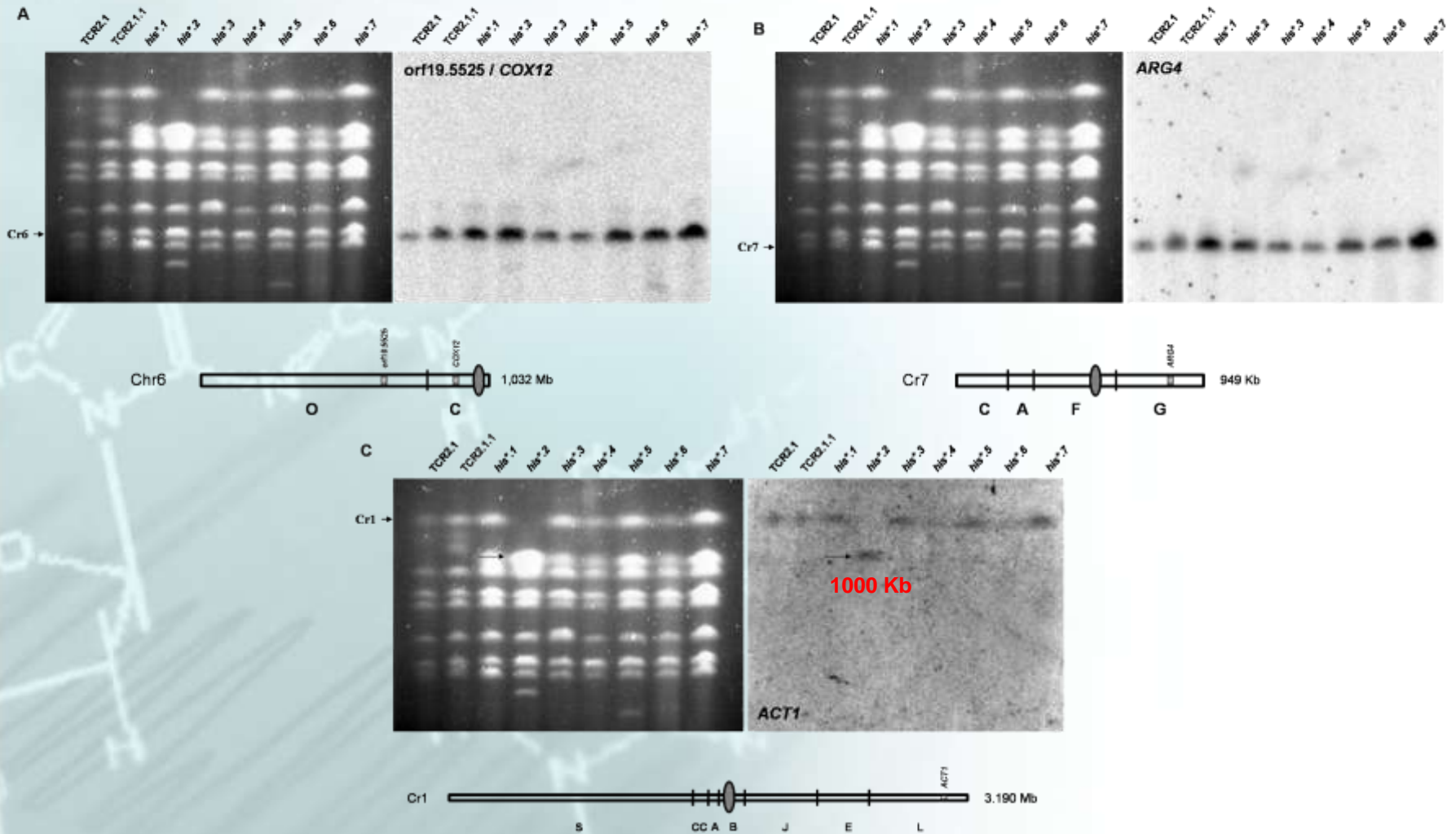


C



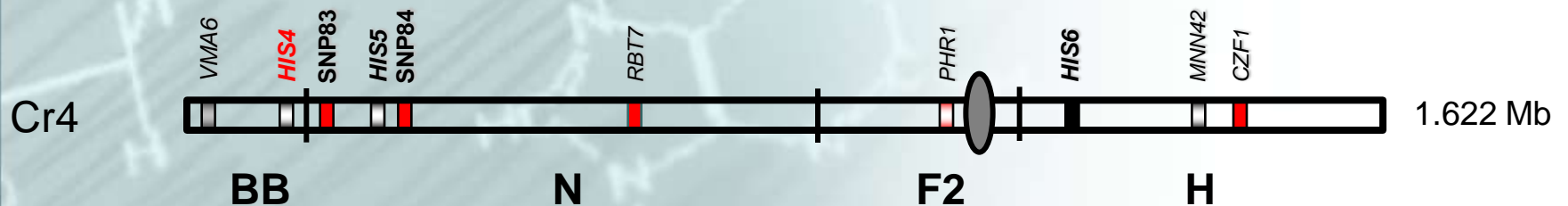
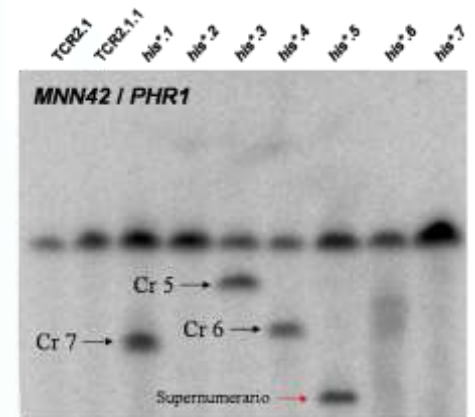
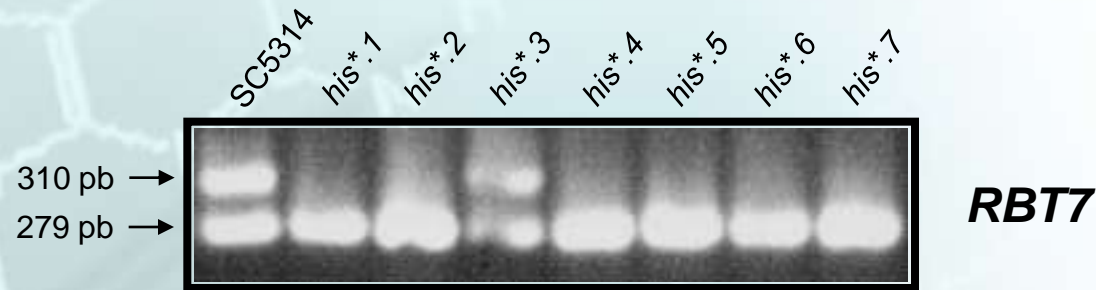
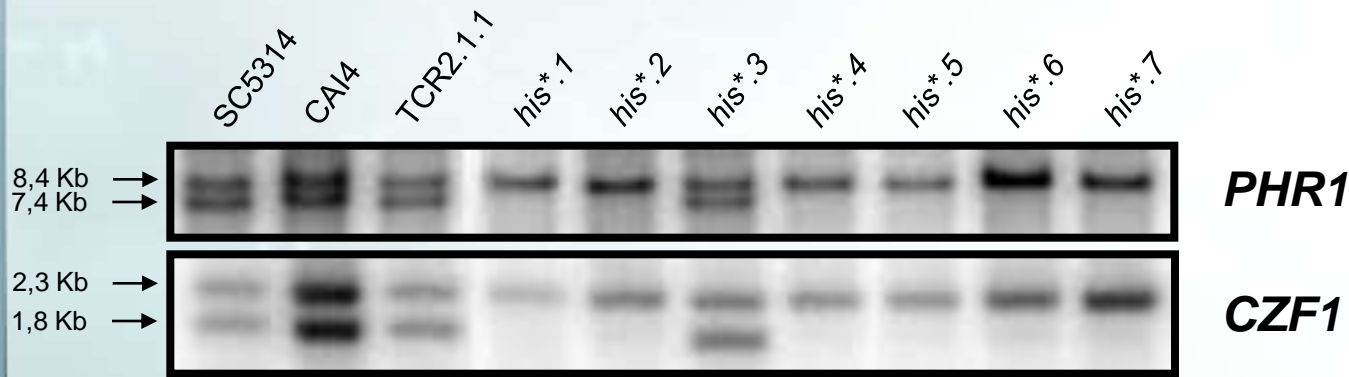
CAPÍTULO II

Análisis de los reordenamientos cromosómicos en los mutantes His⁻ *rad52-ΔΔ*



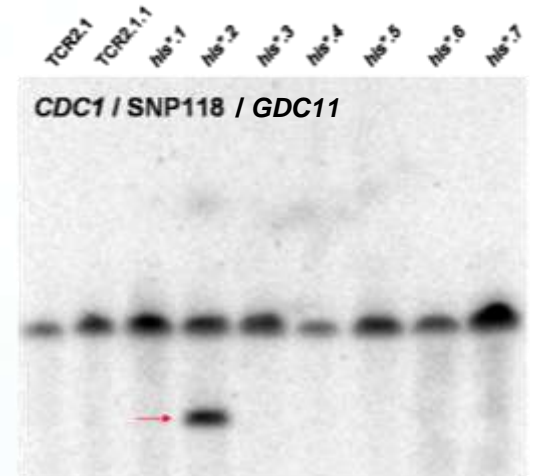
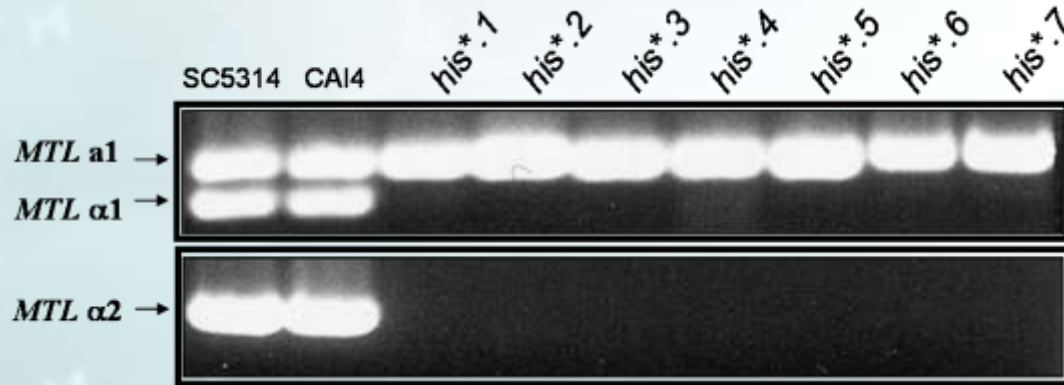
CAPÍTULO II

Análisis de los polimorfismos de los cromosomas 4 en las cepas *his**

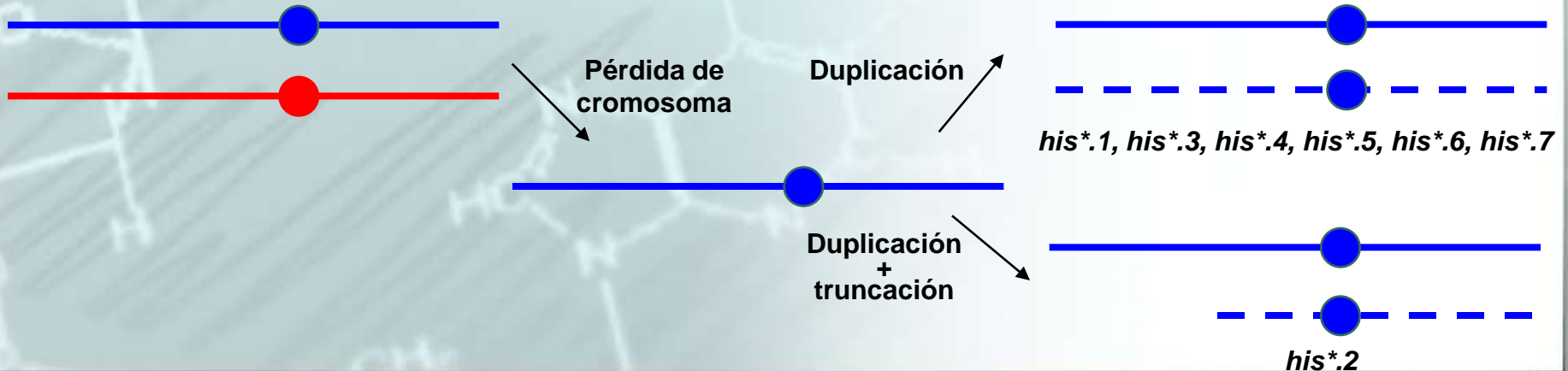
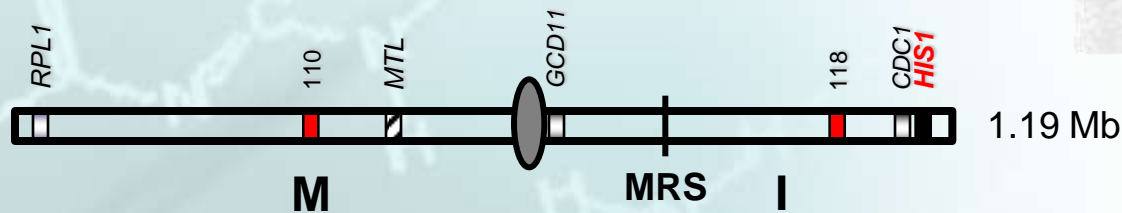


CAPÍTULO II

Análisis de los polimorfismos de los cromosomas 5 en las cepas *his**



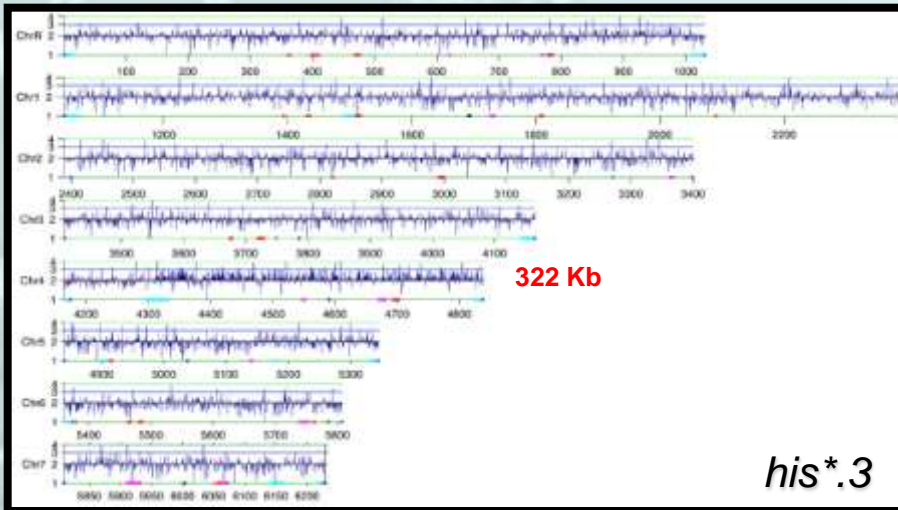
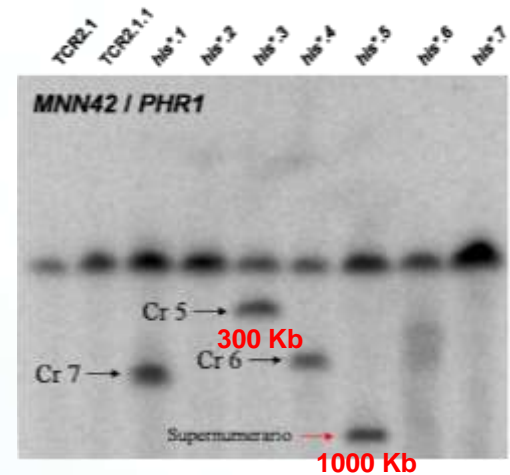
Cr5



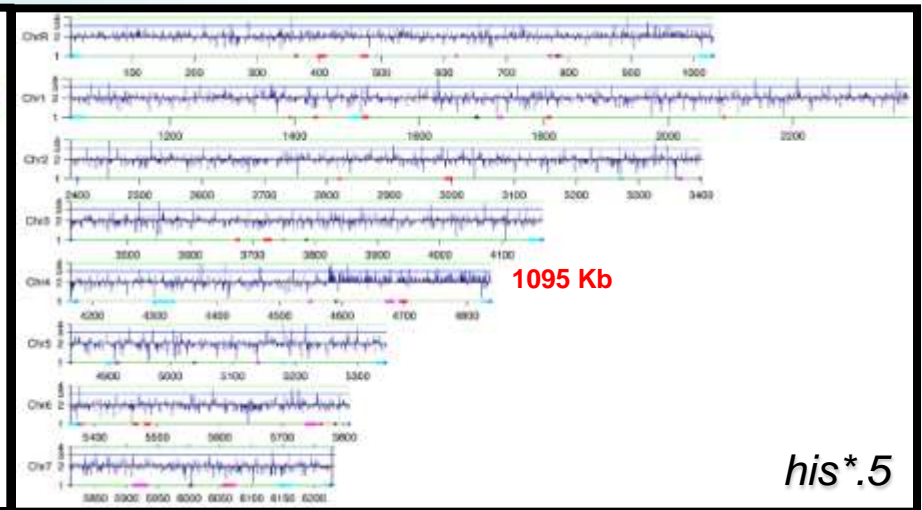
CAPÍTULO II

CGH ratifica las truncaciones observadas en PFGE y delimita las zonas de rotura

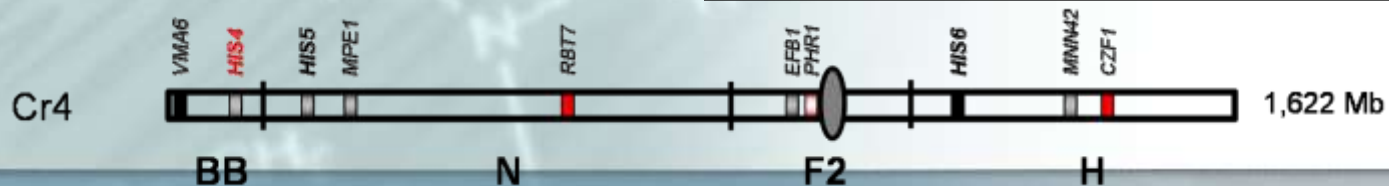
Cepa	Cambio Número de copias	Cromosoma	Región de aneuploidía
TCR2.1.1	Ninguna		No se detectaron aneuploidías
<i>his*.1</i>	Ninguna		No se detectaron aneuploidías
<i>his*.2</i>	3X	R	19.6119-19.7279
	3X	1	19.6248-19.4883
	3X	6	19.3474-extremo derecho
<i>his*.3</i>	3X	4	<i>MPE1</i> -extremo derecho
<i>his*.4</i>	3X	R	19.4349-19.7281
<i>his*.5</i>	3X	4	<i>EFB1</i> -extremo derecho



his.3*



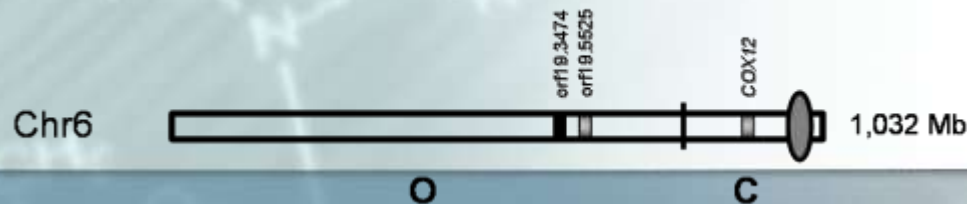
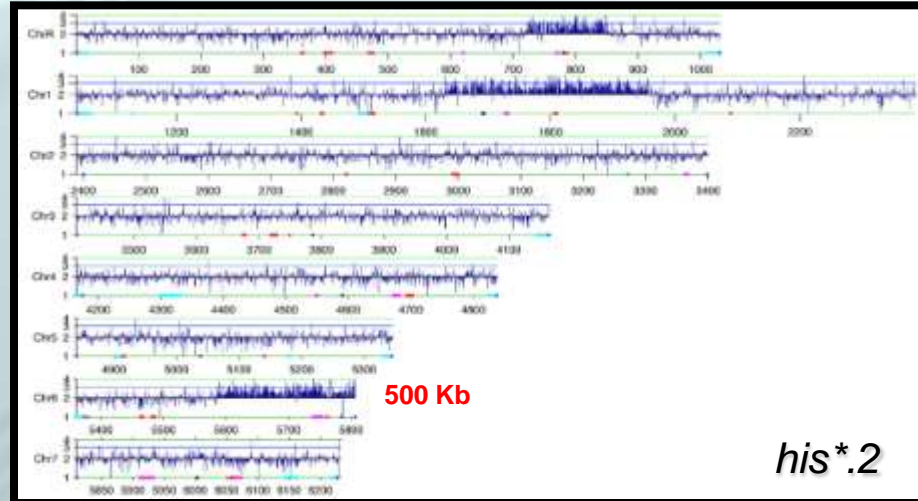
his.5*



CAPÍTULO II

CGH ratifica las truncaciones observadas en PFGE y delimita las zonas de rotura

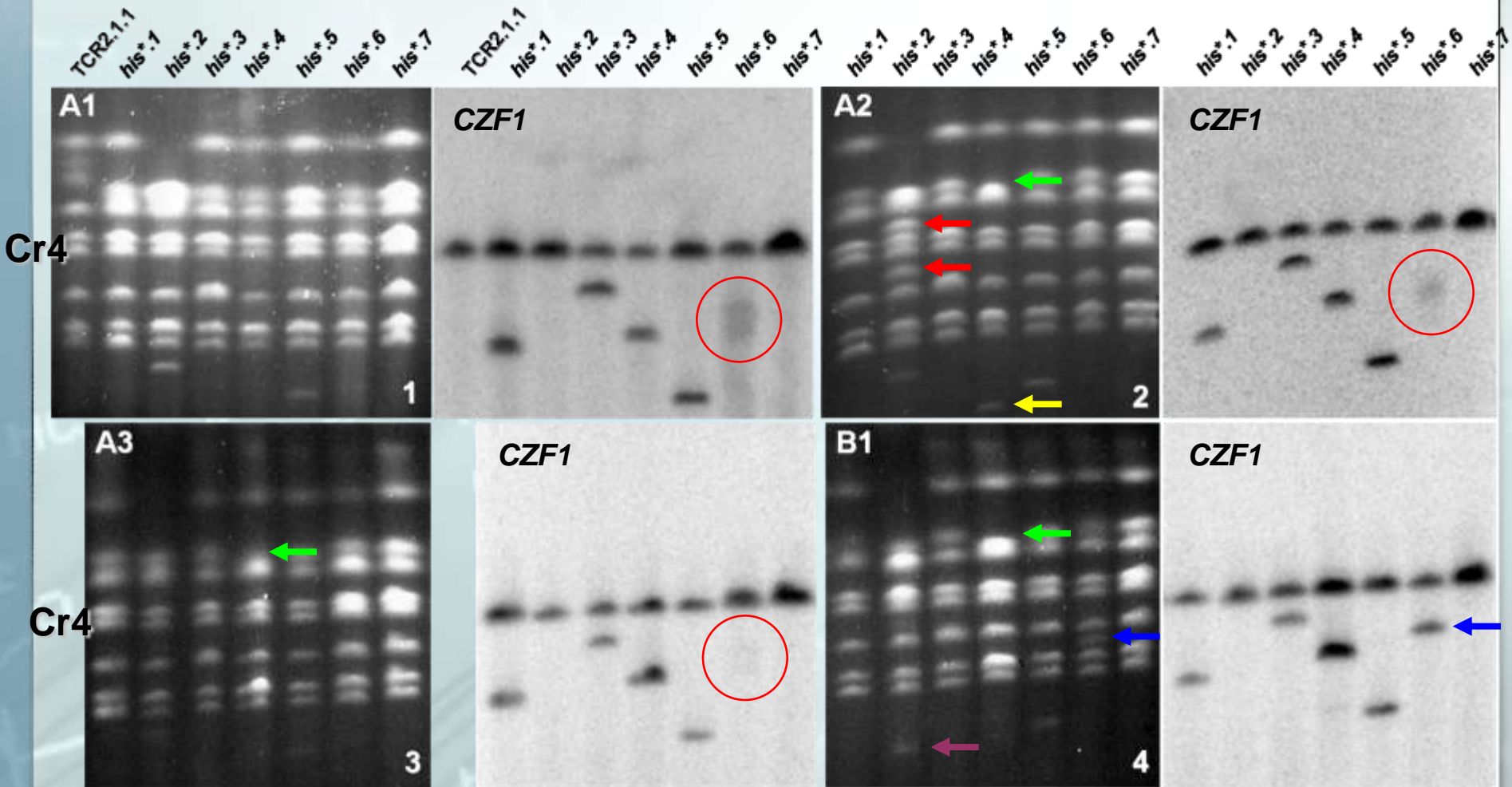
Cepa	Cambio Número de copias	Cromosoma	Región de aneuploidía
TCR2.1.1	Ninguna		No se detectaron aneuploidías
<i>his*.1</i>	Ninguna		No se detectaron aneuploidías
<i>his*.2</i>	3X	R	19.6119-19.7279
	3X	1	19.6248-19.4883
	3X	6	19.3474-extremo derecho
<i>his*.3</i>	3X	4	<i>MPE1</i> -extremo derecho
<i>his*.4</i>	3X	R	19.4349-19.7281
<i>his*.5</i>	3X	4	<i>EFB1</i> -extremo derecho



CAPÍTULO II

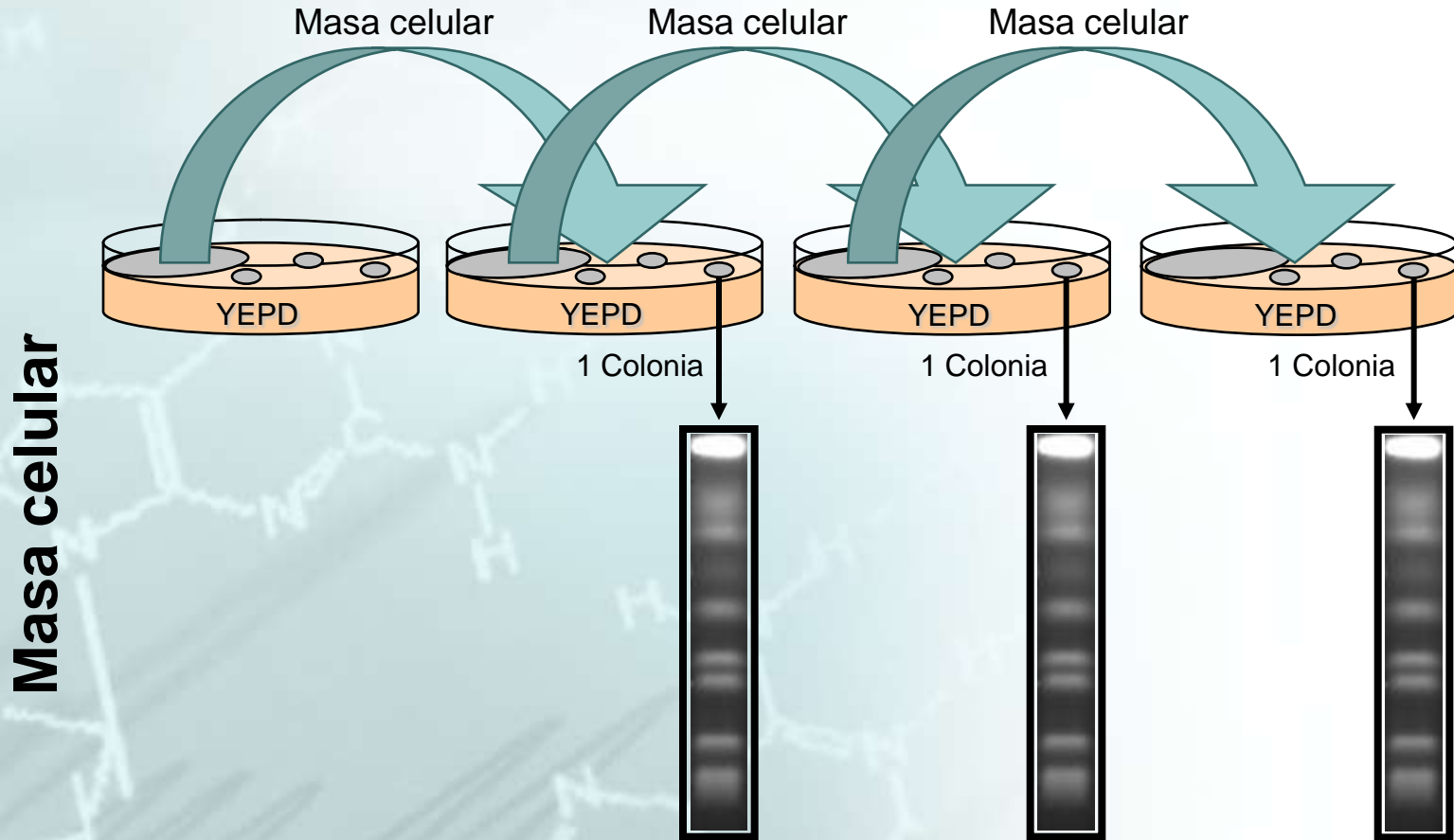
Análisis de la estabilidad de cariotipos en las cepas *his**

A



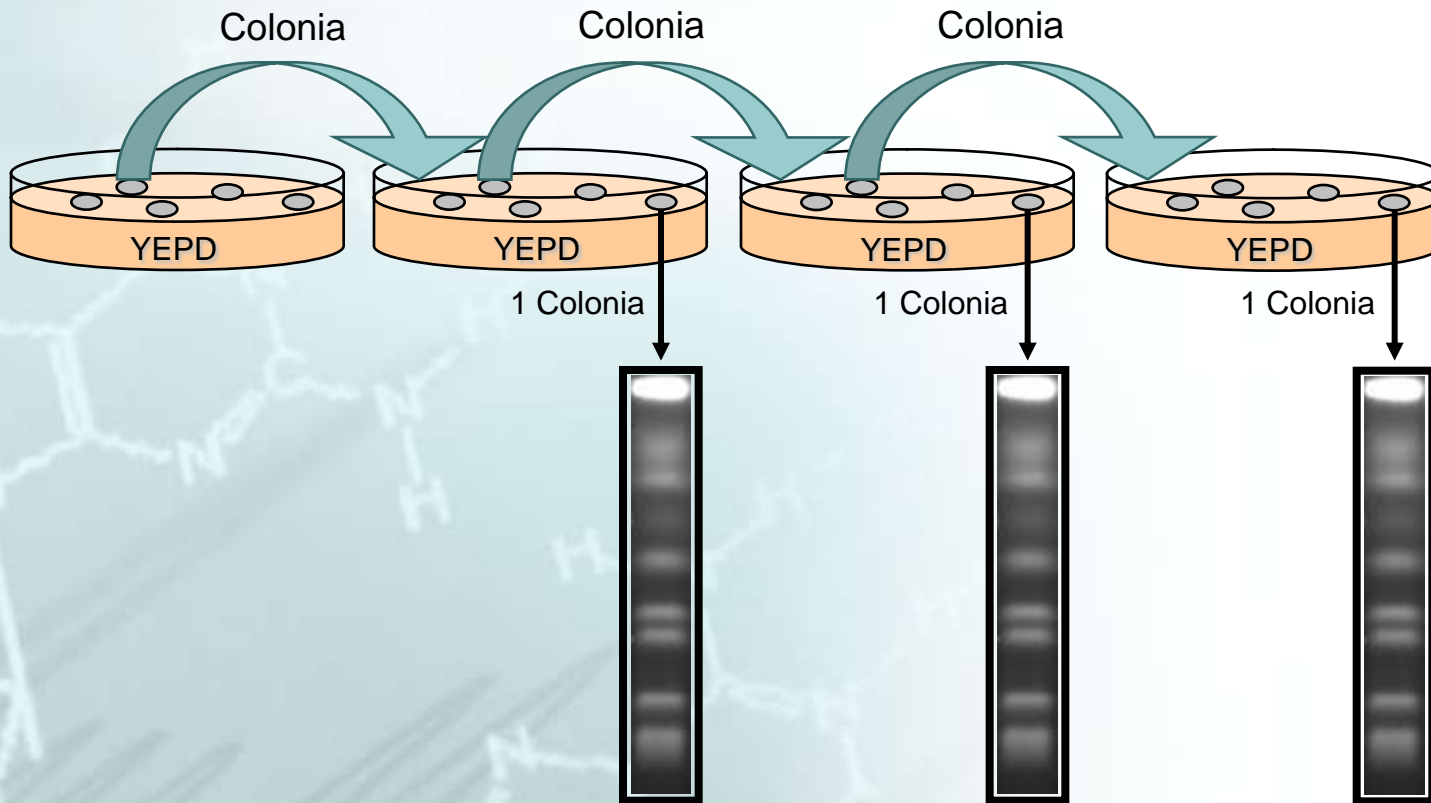
- Existencia de subpoblaciones con diferentes cariotipos en las cepas *his**
- La cepa *his*.2* acentuada inestabilidad cromosómica

Análisis de la estabilidad de cariotipos en las cepas *his**



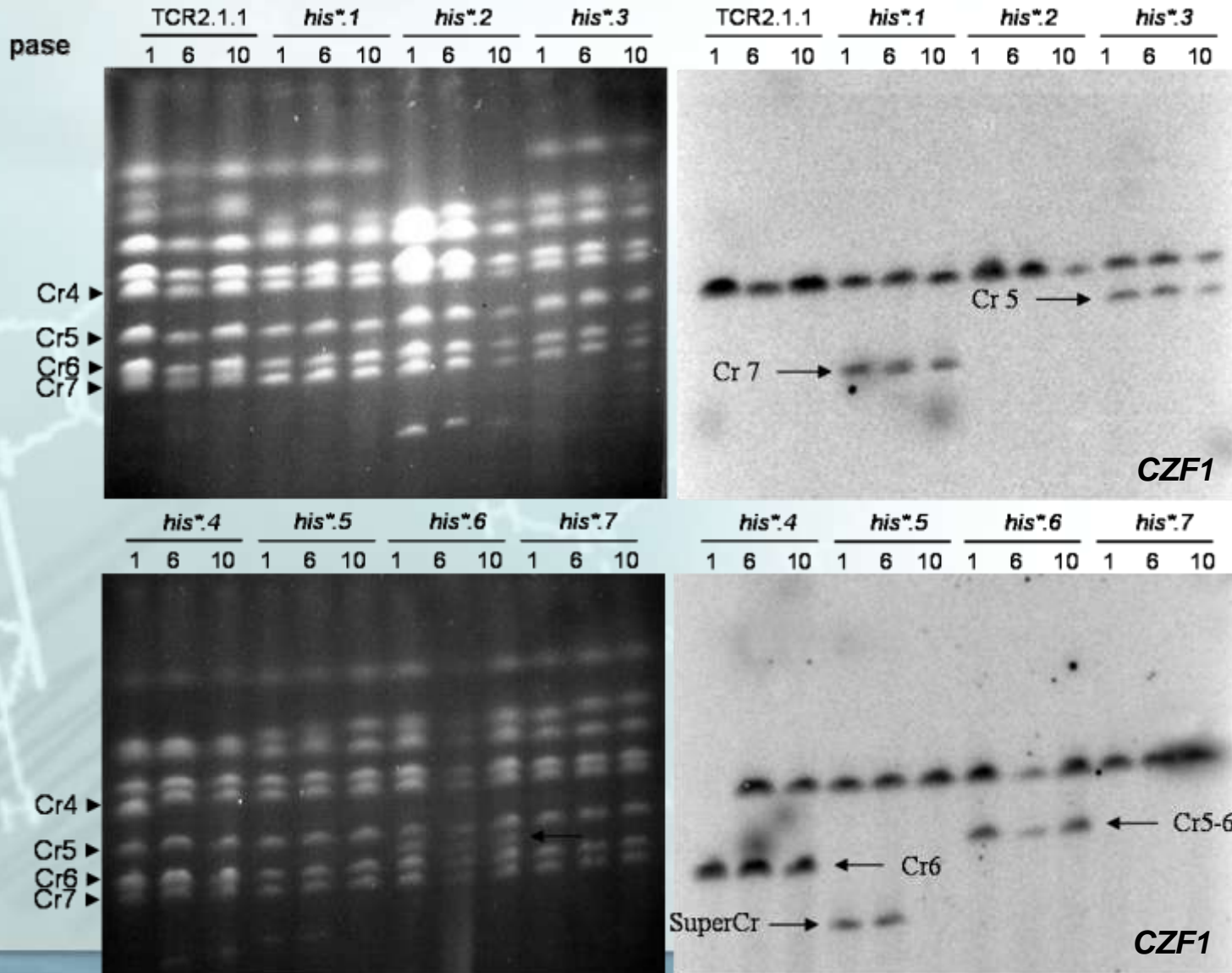
Análisis de la estabilidad de cariotipos en las cepas *his**

Colonias individuales



Análisis de la estabilidad de cariotipos en las cepas *his**

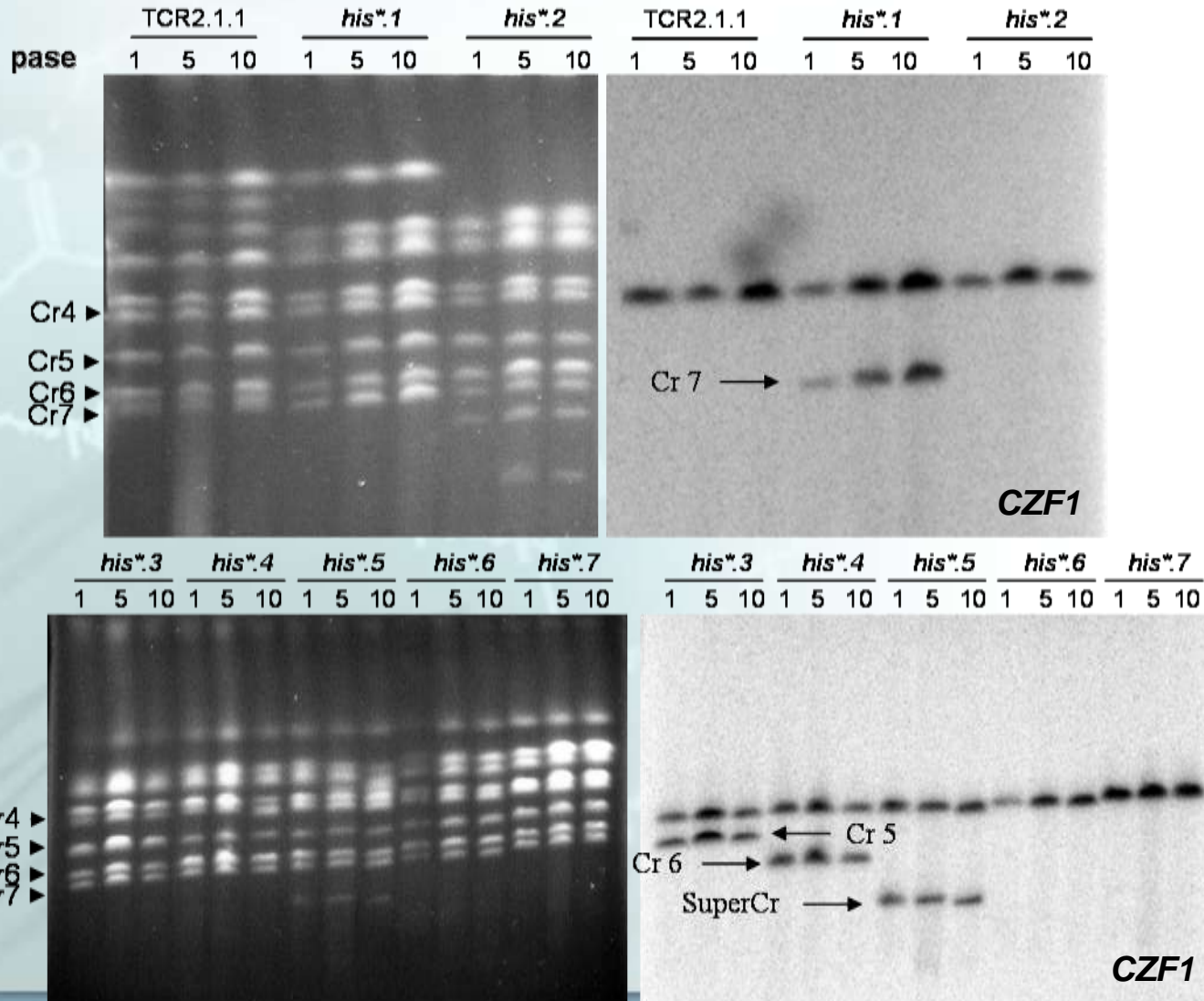
B



Masa celular

Análisis de la estabilidad de cariotipos en las cepas *his**

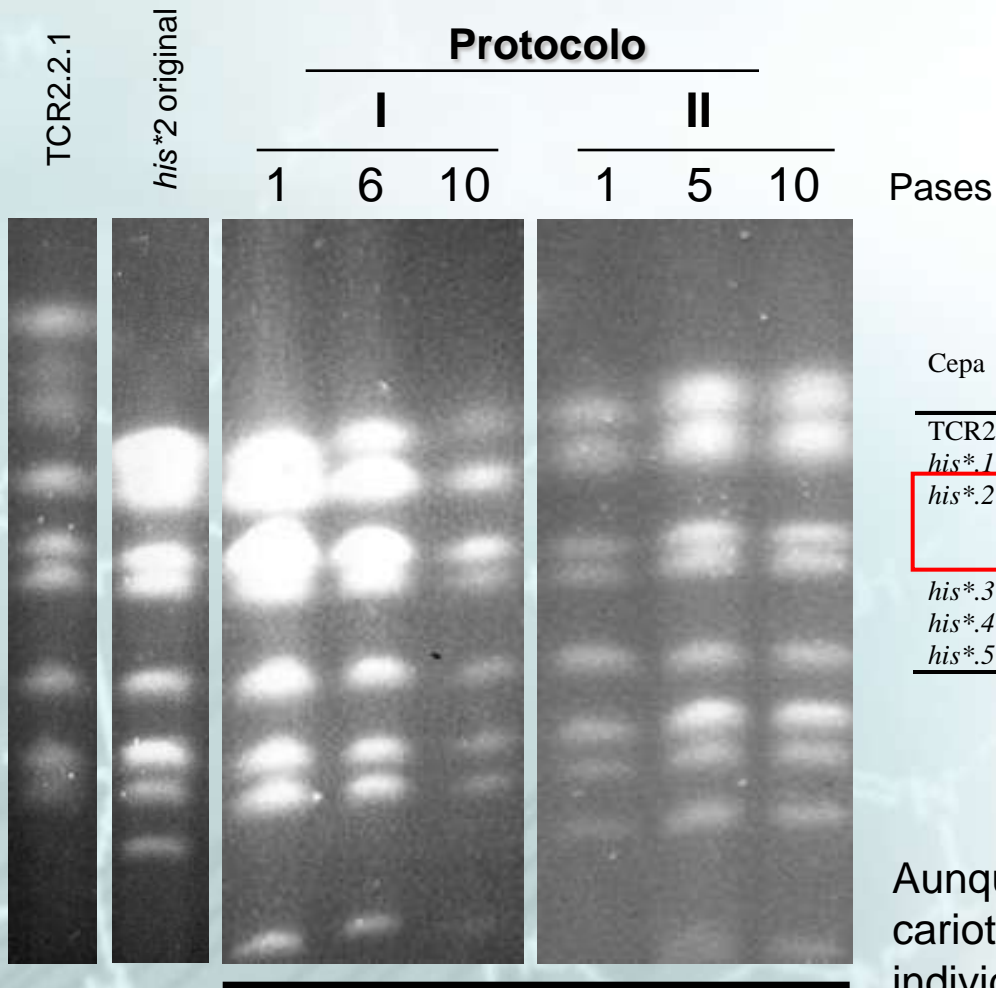
c



Colonias individuales

CAPÍTULO II

Análisis de la estabilidad de cariotipos en las cepas *his**

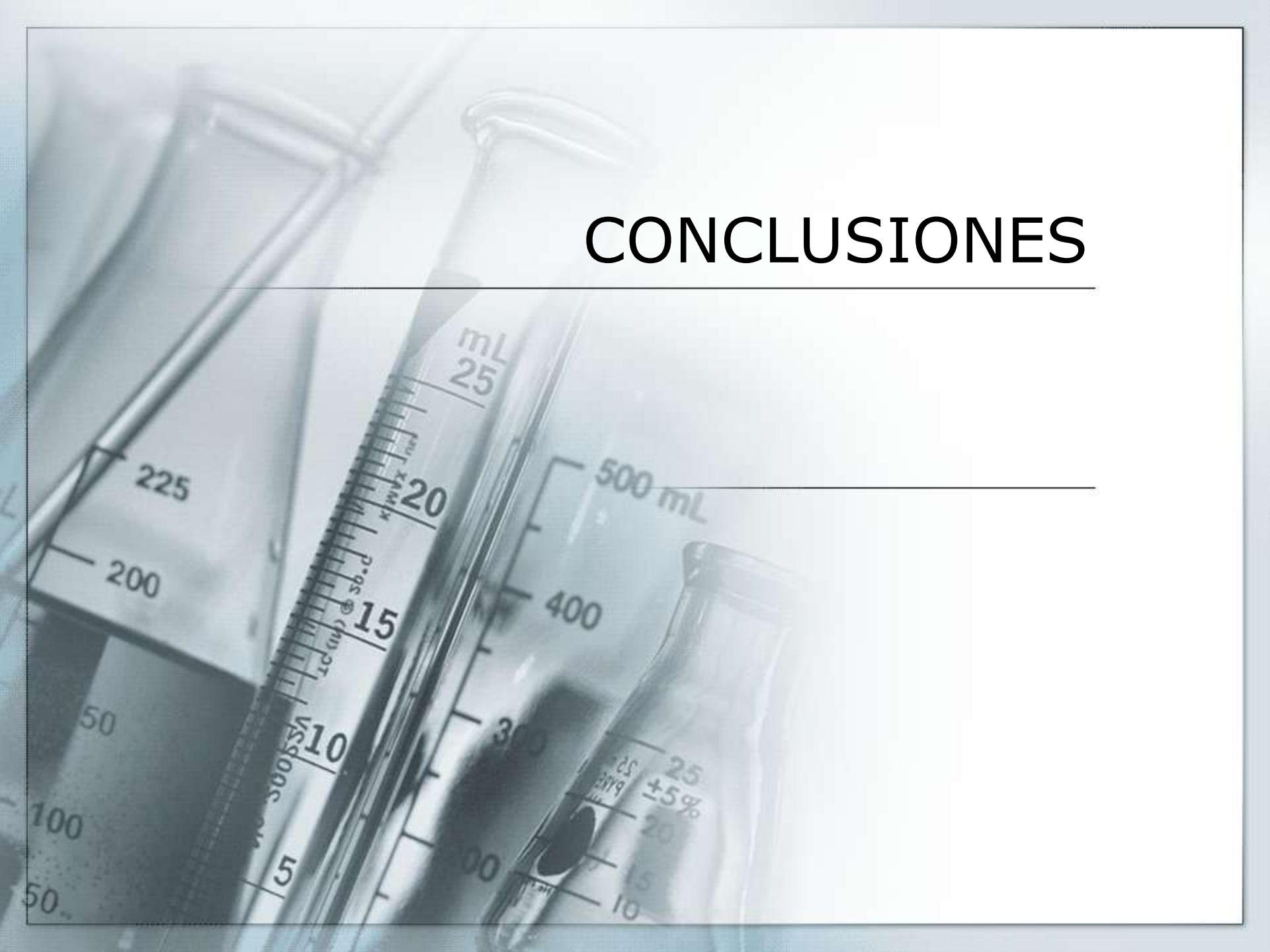


his*2

Cepa	Cambio Número de copias	Cromosoma	Región de aneuploidía
TCR2.1.1	Ninguna		No se detectaron aneuploidías
<i>his*.1</i>	Ninguna		No se detectaron aneuploidías
<i>his*.2</i>	3X	R	19.6119-19.7279
	3X	1	19.6248-19.4883
	3X	6	19.3474-extremo derecho
<i>his*.3</i>	3X	4	<i>MPE1</i> -extremo derecho
<i>his*.4</i>	3X	R	19.4349-19.7281
<i>his*.5</i>	3X	4	<i>EFBI</i> -extremo derecho

Aunque para una determinada cepa *his** el cariotipo parece inestable, los clones individuales llevan fragmentos discretos de DNA que podrían ser indicativos de la existencia de sitios frágiles.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. La cepa de *C. albicans* SC5314 y su derivado CAI4 son heterocigóticos para el gen *HIS4*. Dentro de la ORF *HIS4* hemos encontrado 11 SNPs, siete sinónimos y cuatro no sinónimos que definen dos haplotipos. La funcionalidad está determinada por la base presente en el SNP929, de manera que G determina funcionalidad y T determina no funcionalidad debido a la presencia de Gly310 o Val310, respectivamente. Este cambio se encuentra dentro del módulo His4B de la proteína His4, por lo que afectaría a su actividad como fosforibosil-ATP pirofosfatasa
2. La generación de auxótrofos para histidina en estas cepas tras tratamiento con luz UV parece involucrar (1) recombinación mitótica entre alelos, seguida de la segregación del alelo no funcional dentro de la misma célula, (2) pérdida de una copia del Cr4 (donde se localiza *HIS4*), o (3) una combinación de ambos procesos
3. Hemos encontrado indicios de una frecuencia significativa de recombinación mitótica dentro de la ORF del gen *HIS4*, que puede haberse producido por recombinación intragénica entre los dos alelos existentes
4. El SNP929 se identificó también en la cepa 3153A que mantenemos en nuestro laboratorio, si bien esta cepa no originó auxótrofos para histidina debido a que contiene tres copias del Cr4. En cambio dicho SNP estuvo ausente en otras cepas comúnmente utilizadas en diferentes laboratorios como la 1001, 1006 y 4918. A diferencia de las cepas SC5314 y CAI4, estas tres cepas no originaron auxótrofos para histidina tras el tratamiento con luz UV
5. El análisis de la región promotora del gen *HIS4* de *C. albicans* identificó las secuencias de unión de algunos activadores transcripcionales, incluyendo los involucrados en el control transcripcional de la síntesis de aminoácidos en levaduras. Los dos alelos *HIS4* de la cepa CAI4 se expresan simultáneamente en la célula, aunque parece que el alelo inactivo se expresa en menor medida. La presencia de un SNP (posición -146; G alelo 1, A alelo 2) en la región promotora del gen *HIS4* podría explicar este resultado. Además, la presencia o ausencia de histidina en el medio no afecta significativamente el nivel relativo de expresión del alelo activo

CONCLUSIONES

6. Los mutantes *rad52* de *C. albicans* mantienen los dos alelos *HIS4* presentes en el linaje de la cepa SC5314
7. Los mutantes *rad52* de *C. albicans* exhiben una frecuencia media de LOH (determinada por la aparición de auxotrofos para histidina) al menos 100 veces mayor que la cepa parental CA14, siendo la pérdida de cromosoma el evento más común que la origina. La ausencia de clones recombinantes entre los clones *HIS4* obtenidos de estos mutantes sugiere que la recombinación mitótica está disminuida respecto a la observada en los parentales SC5314 y CA14
8. Las cepas nulas *rad52*, así como sus derivados His⁻, exhibieron también una alta frecuencia de mutación puntual dentro de ORF *HIS4*. Esta frecuencia de mutación puede ser la responsable de la alta frecuencia de reversión que sufren los derivados His⁻, aunque este proceso es independiente de la restauración de Gly310
9. Finalmente, las cepas *rad52* His⁻ muestran alta frecuencia de fragmentación de cromosomas que no está relacionada con la adquisición de la auxotrofia. Además, parece que tras la pérdida o rotura de un cromosoma tiene lugar una duplicación del homólogo residual o del homólogo no truncado, respectivamente. Las roturas que originan los cromosomas truncados en estas cepas parecen ser reparadas mediante la adición de telómero *de novo*. Estos cromosomas truncados se mantienen razonablemente estables a lo largo de varias generaciones
10. Hemos sugerido que la inestabilidad genética tan acentuada que presentan las cepas *rad52* His⁻ es debida a una mutación adicional ocurrida en el parental *rad52*, como consecuencia del fenotipo mutador de este mutante. La nueva mutación podría afectar a componentes clave de la maquinaria de replicación

AGRADECIMIENTOS



**Grupo de Investigación:
“Recombinación Homóloga y
Morfogénesis en *C. albicans*”**

Raymundo Rosas

Belén Naranjo

Leocadia Franco

Belén Hermosa



Richard Calderone



Anna Selmeki

Judith Berman

Beatrice Magee

Anja Forche



Rosana Torremocha

Maribel García

Tomás Aparicio



**Trabajo realizado gracias a la financiación por
parte de los NIH (grant R01.AI51949)**