

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



ESTUDIO PROTEÓMICO DE LA SUPERFICIE CELULAR DE  
*Candida* spp: APLICACIONES BIOMÉDICAS

TESIS DOCTORAL DE:

**CLAUDIA MARCELA PARRA GIRALDO**

DIRIGIDA POR:

**CONCHA GIL GARCÍA  
LUCÍA MONTEOLIVA DÍAZ**

Madrid, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II**

**ESTUDIO PROTEÓMICO DE LA SUPERFICIE CELULAR DE  
*Candida* spp: APLICACIONES BIOMÉDICAS**



Memoria presentada para optar al Grado de Doctor

CLAUDIA MARCELA PARRA GIRALDO

Directoras

CONCHA GIL GARCIA  
LUCIA MONTEOLIVA DÍAZ

Madrid, 2013.



**D<sup>a</sup>. CONCHA GIL GARCÍA, Directora del Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid**

CERTIFICA: Que D<sup>a</sup>. **CLAUDIA MARCELA PARRA GIRALDO** ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de las doctoras **CONCHA GIL GARCIA y LUCIA MONTEOLIVA**, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor con el título: "ESTUDIO PROTEÓMICO DE LA SUPERFICIE CELULAR DE *Candida* spp: APLICACIONES BIOMÉDICAS".

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Madrid, 2013

Fdo. Catedrática. D<sup>a</sup> Concha Gil García



**Este trabajo ha sido financiado por:**

- *Proyecto: Interacción Candida albicans-hospedador. Aproximaciones proteómicas globales para el diagnóstico, tratamiento e inmunoprevención de las candidiasis invasivas.* Ministerio de Investigación e Innovación. BIO2009-07654
- *Proyecto Red española de investigación en patología infecciosa (REIPI).* (FIS). RD06/0008
- *Proyecto: Proteómica y fosfoproteómica de la interacción Candida albicans-macrófago: Caracterización de factores de virulencia y respuesta inmunitaria de valor en diagnóstico y protección frente a infecciones.* Ministerio de Investigación e Innovación. BIO2006-01989

**La doctoranda ha sido financiada por:**

- Programa de formación del profesor, de la Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá Colombia, 2008-2012.
- Beca Estudios en el Exterior de COLCIENCIAS-LASPAU (2006) UNIVERSIDAD DE HARVARD, 2008-2010.
- Cátedra de Proteómica y Genómica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, 2011-2012.







*A Celso, mi amado e incondicional esposo*

*A mi ilusión mis hijas, María Antonia y Ana Manuela*

*A mis adorados padres y hermano.*



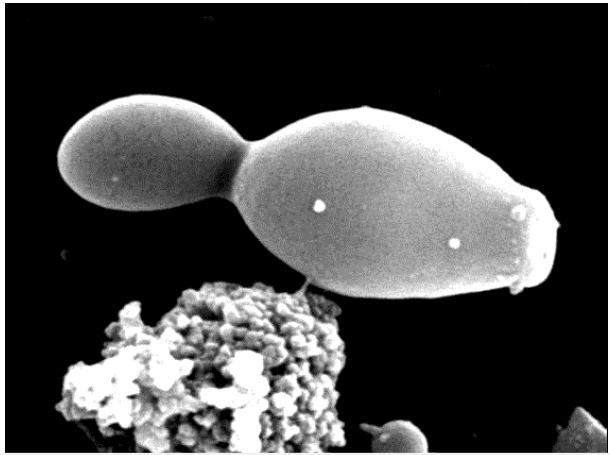




*La capacidad de la ciencia es limitada, porque por muchas cosas que encuentre, no puede encontrarlas todas; por muchas que demuestre, no podrá demostrarlas todas.*

*Antoine de Saint-Exupéry*





## ÍNDICE



## ÍNDICE

<b>1. ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY .....</b>	<b>5</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. BIOLOGÍA DE <i>Candida albicans</i> _____</b>	<b>11</b>
<b>3.2. LA PARED CELULAR DE <i>C. albicans</i> _____</b>	<b>13</b>
3.2.1. ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR DE <i>C. albicans</i> .....	13
3.2.2. PAPEL DE LA PARED CELULAR DE <i>C. albicans</i> EN LA INTERACCIÓN CON EL HOSPEDADOR .....	18
<b>3.3. PROCESO INFECCIOSO DE <i>C. albicans</i> ¿COMENSAL O PATÓGENO? _</b>	<b>20</b>
3.3.1. MECANISMOS MOLECULARES DE LA ADHERENCIA DE <i>C. albicans</i> ....	21
3.3.2. MECANISMOS MOLECULARES DE LA INVASIÓN TISULAR MEDIADOS POR ENZIMAS .....	22
3.3.3. TRANSICIÓN DIMÓRFICA .....	24
3.3.4. "SWITCHING" FENOTÍPICO Y ADAPTACIÓN A DIFERENTES NICHOS .	24
3.3.5. RESPUESTA ADAPTATIVA AL ESTRÉS Y EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE 26	26
<b>3.4. RESPUESTA INMUNE A <i>C. albicans</i> _____</b>	<b>27</b>
3.4.1. RESPUESTA INMUNE INNATA.....	28
3.4.2. RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA.....	30
<b>3.5. PRESENTACIONES CLÍNICAS DEL GÉNERO <i>Candida</i> _____</b>	<b>32</b>
<b>3.6. EPIDEMIOLOGIA DE LAS CANDIDIASIS INVASIVAS _____</b>	<b>34</b>
<b>3.7. PARTICIPACIÓN DE otras especies de <i>Candida no-albicans</i> COMO Agentes PATÓGENOS. _____</b>	<b>35</b>
<b>3.8. DIAGNÓSTICO DE LA CANDIDIASIS INVASIVA _____</b>	<b>36</b>
3.8.1. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS .....	37
3.8.2. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS.....	39
3.8.3. DETECCIÓN DE DNA .....	41
<b>3.9. ANTIFUNGICOS _____</b>	<b>42</b>

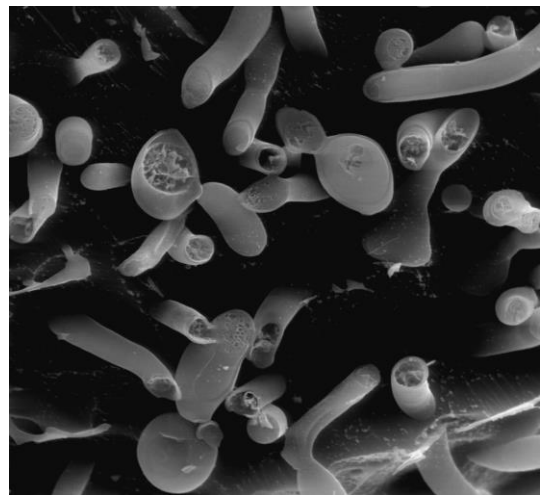
3.9.1. ANTI FÚNGICOS QUE INHIBEN LA BIOSÍNTESIS DE LA PARED CELULAR: .....	44
<b>3.10. ESTRATEGIAS PROFILÁCTICAS Y TERAPÉUTICAS EN CANDIDIASIS.....</b>	<b>45</b>
<b>3.11. RESISTENCIA A AGENTES ANTIFÚNGICOS EN LEVADURAS _____</b>	<b>48</b>
<b>3.12. EVOLUCIÓN DE LOS ESTUDIOS PROTEÓMICOS EN EL CONOCIMIENTO DE <i>C. albicans</i> _____</b>	<b>50</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
<b>5.1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS _____</b>	<b>61</b>
<b>5.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO _____</b>	<b>61</b>
5.2.1. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO .....	62
5.2.2. INDUCCIÓN DE FASE FILAMENTOSA EN <i>C. albicans</i> PARA EL ESTUDIO DE LA TRANSICIÓN DIMÓRFICA .....	63
5.2.3. CRECIMIENTO DE LEVADURAS.....	63
5.2.4. MEDIDA DE LA VIABILIDAD CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO ...	63
5.2.5. OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS .....	64
5.2.6. EVALUACIÓN DE LA FRAGILIDAD OSMÓTICA DE PROTOPLASTOS EN PROCESO DE REGENERACIÓN.....	64
<b>5.3. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA _____</b>	<b>65</b>
5.3.1. MICROSCOPIA ÓPTICA.....	65
5.3.2. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y CONTRASTE DE FASES .....	66
5.3.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO .....	66
5.3.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO POR CRIOFRACTURA .....	67
<b>5.4. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DEL DNA _____</b>	<b>67</b>
5.4.1. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE <i>C. albicans</i> .....	67
5.4.2. ANÁLISIS DE RESTRICIÓN DE DNA Y LIGACIONES .....	68
5.4.3. GELES DE AGAROSA.....	68
5.4.4. TRANSFORMACIÓN DE DNA.....	68
5.4.5. REACCIÓN EN CADENA DE las POLÍMERASa (PCR).....	68

<b>5.5. SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.</b>	<b>70</b>
5.5.1. <i>Pichia pastoris</i> , "PICHIA EXPRESSION KIT" DE INVITROGEN	70
5.5.2. RTS 500 PROTEOMASTER KIT PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN UN SISTEMA LIBRE DE CÉLULAS	71
<b>5.6. SISTEMAS DE PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS</b>	<b>72</b>
5.6.1. INMUNOPRECIPITACIÓN	72
5.6.2. HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)	73
5.6.3. FPLC (FAST PROTEIN LIQUID CHROMATOGRAPHY)	74
<b>5.7. METODOLOGÍAS DE ANALISIS DE PROTEÍNAS</b>	<b>75</b>
5.7.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	75
5.7.2. SDS-PAGE y METODOLOGÍAS DE DetEcción DE PROTEÍNAS	75
<b>5.8. TÉCNICAS PROTEÓMICAS</b>	<b>77</b>
5.8.1. OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS TRÍPTICOS	77
5.8.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR FRAGMENTACIÓN DE PÉPTIDOS EN TRAMPA IÓNICA	78
5.8.3. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTOMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF/TOF	79
<b>5.9. BASES DE DATOS Y HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS</b>	<b>80</b>
5.9.1. BASES DE DATOS	80
5.9.2. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS:	81
5.9.3. MOTORES DE BÚSQUEDA	81
<b>5.10. MODELO MURINO PARA LA EVALUACIÓN DE VACUNAS</b>	<b>82</b>
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>85</b>
<b>6.1. ESTUDIO DEL SURFOMA DE <i>C. albicans</i> DURANTE LA TRANSICIÓN DIMÓRFICA</b>	<b>85</b>
6.1.1. EVALUACIÓN GLOBAL DEL PROTEOMA SUPERFICIAL DE LEVADURAS E HIFAS DE <i>C. albicans</i>	85
6.1.2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS PROTEÍNAS DEL SURFOMA DE <i>C. albicans</i> EN LEVADURAS, HIFAS E HIFAS INDUCIDAS CON SUERO HUMANO	94
6.1.3. PERFIL PROTEÓMICO DE LA SUPERFICIE DE LEVADURAS, HIFAS E HIFAS inducidas con suero humano DE <i>C. albicans</i>	98

6.1.4. ANÁLISIS COMPARATIVO DE PROTEÍNAS SUPERFICIALES Y DE PROTEÍNAS DE EXTRACTOS TOTALES DE LEVADURAS E HIFAS DE <i>C. albicans</i> .....	105
6.1.5. PROTEÍNAS HUMANAS IDENTIFICADAS EN LA SUPERFICIE CELULAR DE <i>C. albicans</i> .....	109
<b>6.2. PERFIL PROTEÓMICO DE LA SUPERFICIE DE <i>C. parapsilosis</i>, <i>C. tropicalis</i> y <i>C. glabrata</i> .....</b>	<b>114</b>
<b>6.3. ESTUDIO DE LA UTILIDAD CLÍNICA DE LAS PROTEINAS DE LA PARED CELULAR DE <i>C. albicans</i> Ecm33 Y Bgl2 .....</b>	<b>124</b>
6.3.1. ESTUDIO DE LA UTILIDAD CLÍNICA DE LA PROTEÍNA Ecm33 de <i>C. albicans</i> .....	124
6.3.2. ESTUDIO DE LA UTILIDAD CLÍNICA DE LA PROTEÍNA $\beta$ -1,3-GLUCOSILTRANSFERASA (Bglp) DE <i>C. albicans</i> .....	134
<b>7. DISCUSION .....</b>	<b>143</b>
<b>7.1. PROTEINAS CON ANCLAJE GPI QUE DEFINEN EL PERFIL PROTÉICO DE LA SUPERFICIE CELULAR DE LEVADURAS E HIFAS DE <i>C. albicans</i> .....</b>	<b>144</b>
7.1.1. PROTEÍNAS GPI IDENTIFICADAS EN LEVADURAS .....	146
7.1.2. PROTEÍNAS GPI DONDE SU ABUNDANCIA ES INDEPENDIENTE DE LA MORFOLOGÍA CELULAR .....	148
7.1.3. PROTEÍNAS CON ANCLAJE GPI PRESENTES EN LAS HIFAS .....	150
<b>7.2. PROTEÍNAS CON ANCLAJE GPI IDENTIFICADAS POR PRIMERA VEZ POR MÉTODOS PROTEÓMICOS .....</b>	<b>151</b>
<b>7.3. PROTEÍNAS SIN ANCLAJE GPI EN LA SUPERFICIE CELULAR DE HIFAS ESTIMULADAS CON SUERO HUMANO .....</b>	<b>152</b>
<b>7.4. PROTEÍNAS MULTIFUNCIONALES DE LA SUPERFICIE CELULAR DE HIFAS DE <i>C. albicans</i> ESTIMULADAS CON SUERO HUMANO .....</b>	<b>155</b>
<b>7.5. PROTEÍNAS relacionadas con TRÁFICO vesicular EN LA SUPERFICIE DE HIFAS DE <i>C. albicans</i> .....</b>	<b>157</b>
<b>7.6. PROTEÍNAS DE <i>C. albicans</i> CANDIDATAS A ESTUDIOS en APLICACIONES BIOMÉDICAS .....</b>	<b>158</b>
<b>7.7. PROTEINAS HUMANAS IDENTIFICADAS EN LA SUPERFICIE CELULAR DE HIFAS .....</b>	<b>159</b>
<b>7.8. APLICACIONES BIOMÉDICAS .....</b>	<b>162</b>

7.8.1. DIAGNÓSTICO .....	162
7.8.2. VACUNAS .....	164
<b>7.9. LA PROTEÍNA Ecm33 ESTÁ IMPLICADA EN LA BIOGÉNESIS DE LA PARED CELULAR .....</b>	<b>165</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>169</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>173</b>





**ABREVIATURAS**



## 1. ABREVIATURAS

**A:** Amperios

**AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico

**ATP:** Adenosín trifosfato

**cm:** Centímetro

**CGD:** Candida Genome Database

**CWP:** Cell Wall Protein

**Da:** Daltons

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**D.O.:** Densidad óptica

**DTE:** Ditioneritrol

**DTT:** Ditioneritol

**EDTA:** Ácido etiléndiaminotetracético

**et al.:** y colaboradores

**GDP:** Guanosín difosfato

**GO:** Gene Ontology

**GPI:** Glicosilfosfatidil inositol

**GTP:** Guanosín trifosfato

**IEF:** Isoelectroenfoque

**IPG:** Gradiente de pH inmovilizado

**Igs:** Inmunoglobulinas

**Kb:** Kilopares de bases

**KDa:** Kilodaltons

**kVh:** Kilovoltios hora

**l:** Litro

**M:** Molar

**mA:** Miliamperios

Abreviaturas

**MALDI-TOF:** Matriz Assisted Laser Desorption Ionization-Time of flight

**MAP:** Mitogen Activated Protein

**MAPK:** Quinasa de tipo MAP

**mg:** Miligramo

**mM:** Milimolar

**mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero

**MS:** Espectrometría de masas

**MTL:** Mating Type-Like Locus

**nm:** Nanómetro

**°C:** Grado centígrado

**ORF:** Open Reading Frame

**Pb:** Pares de bases

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**pI:** Punto isoelectrico

**PIR:** Protein with Internal Repeats

**PMSF:** Fluoruro de metil fenil sulfonato

**r.p.m:** Revoluciones por minuto

**RT-PCR:** Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

**SDS:** Dodecil sulfato sódico

**TBS:** Tris borato salino

**TFA:** Trifluoroacetic acid

**WT:** Wild Type

**UV:** Ultravioleta

**www:** World Wide Web

**YPD:** Yeast Extract Peptone Dextrose

**Δ:** Delección

**μl:** Microlitro

**2D-PAGE:** Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida



# SUMMARY



## 2. SUMMARY

### **Introduction:**

The yeast *Candida albicans* is the most important opportunistic fungi causing invasive infections in critical patients worldwide and the diagnosis of the invasive candidiasis is difficult due to the absence of specific signs or symptoms of infection. The management of the candidiasis is usually based on three different approaches: (1) **the prevention** of the invasive candidiasis in patients in risk is based on the *a priori* treatment with fluconazole, since there is not a vaccine used in clinical trial yet; (2) **the microbiological diagnosis** is made by blood culture, in spite of a 60% of sensitivity; (3) and **the treatment** is based on a small group of antifungal drugs with problems like the appearance of antifungal resistance.

### **Objectives:**

The aim of this study was to find proteins which could be good diagnostic markers, potential vaccines or therapeutic targets by implementing a gel-free proteomic strategy based on the tryptic digestion of living cells. This technique was used to obtain peptides from the surface proteins of *C. albicans*, either from the yeast or the filamentous cells, in the presence or absence of human serum, as well as from other *Candida* species of clinical importance.

### **Results:**

This strategy accomplished the identification of the highest number of surface proteins described to date, 938 proteins included in a variety of functional groups. Out of them, 78 were closely related to the structure and function of the cell wall: 31 GPI-anchored proteins and 47 proteins involved in the biogenesis and/or maintenance of the cell wall. The other identified proteins were included in the following groups: cell surface proteins, immunogenic proteins, proteins specific from fungi, proteins related to the antifungal response, proteins related to pathogenic mechanisms, proteins related to the formation of "biofilms", proteins associated with response to stress conditions, proteins related with the actin cytoskeleton and other proteins. Furthermore, this was the first time that the surface proteins from hyphae stimulated with human serum were analysed. One hundred thirty nine human serum proteins were detected attached to the *C.*

## Abreviaturas

*albicans* surface. These serum proteins included plasminogen, laminin, proteins from the complement cascade and apolipoproteins.

Two abundant *C. albicans* cell surface proteins were selected to evaluate their putative interest as diagnostic markers or to develop new vaccines against *C. albicans*: Ecm33 and Bgl2. **Ecm33** is a cell wall protein with a GPI anchor involved in virulence and **Bgl2** is an antigenic  $\beta$ -1, 3-glucosyltransferase involved in cell wall biogenesis and virulence.

**Ecm33** and **Bgl2** were expressed in a cell-free system and analysed with a small number of sera from patients with invasive candidiasis. However, the results from these assays indicate that additional optimization of them is needed in future. The potential utility of Ecm33 and Bgl2 as vaccines candidates was also tested in a mouse model of invasive candidiasis. Interestingly, Bgl2 expressed in *Pichia pastoris* was able to protect 25% of the mouse from a subsequent *C. albicans* infection, which makes this protein a promising candidate for the development of a vaccine. Furthermore, in the trial of vaccination with 3  $\mu$ g of Ecm33, a delay of between 3 and 5 days in the death of the vaccinated mice *versus* non-vaccinated mice was observed.

On the other hand, we observed a significant implication of Ecm33 in the cell wall biogenesis, since 33% protoplasts from *C. albicans*  $\Delta$ *ecm33* could regenerate their cell walls, opposite to the wild type strain. Finally, after the global analysis of the identified proteins (938), their abundance (measured by the amount of identified peptides) and their presence or absence in hyphae stimulated with human serum, a group of potential interesting proteins for future biomedical applications was chosen.

## Conclusions:

Trypsinization on the living cells and subsequent identification of peptides in a mass spectrometer Orbitrap is a useful strategy to analyze the proteome of the surface or "surfome" of yeast and hyphae forms of *C. albicans*.

This proteomic strategy allowed the detection of a high number of changes in the proteome of the yeast cell surface with respect to the hyphae. The most significant changes were detected in proteins with a GPI anchor and involved in the biogenesis and maintenance of the cell wall: Hyr1 and Sod5 were only detected on hyphae. Furthermore, the proteomic analysis of the surface proteins from *C. albicans* hyphae stimulated with human serum allowed the identification of *C. albicans*

## Summary

proteins not detected in other conditions as phospholipase Plb5, as well as interesting serum proteins involved in the immune response against this fungus.

*C. albicans* Bgl2 expressed in *P. pastoris* used in mouse model immunization assays showed a 25% of protection against *C. albicans* infection, being a good candidate for future studies with new immunization protocols.





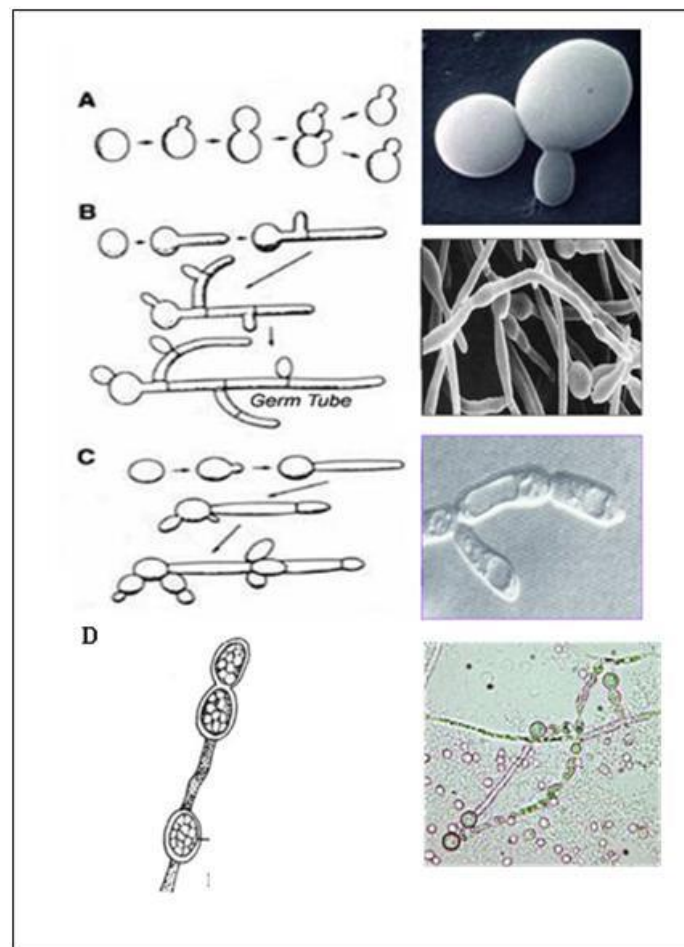
# INTRODUCCIÓN



### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. BIOLOGÍA DE *Candida albicans*

Se ha descrito a *C. albicans* como un hemiascomiceto que divergió de *Saccharomyces cerevisiae* hace entre 100 y 600 millones de años (Hedges 2002). Es un hongo levaduriforme diploide que presenta polimorfismo (Figura 1), convive en relaciones de comensalismo con mamíferos, incluido el hombre. A nivel clínico es el hongo más importante en infecciones de tipo oportunista en pacientes en estado crítico (Calderone, Odds *et al.* 2009).



**Figura 1.** Polimorfismo de *C. albicans*. **a.** Levadura, **b.** Hifa, **c.** Pseudohifa **d.** Clamidosporas, Tomado de: [www.overcomingcandida.com/candida\\_albicans](http://www.overcomingcandida.com/candida_albicans)

Taxonómicamente pertenece al **Dominio** Eukaryota; **Reino:** *Fungi*; **Subreino:** *Dikarya*; **Filum:** *Ascomycota*; **Subfilum:** *Saccharomycotina*; **Clase:** *Saccharomycetes*; **Orden:** *Saccharomycetales*; *mitosporic Saccharomycetales*; **Género:** *Candida*. Existen alrededor de 150 levaduras en el género *Candida*, y sólo

## Introducción

un reducido grupo de ellas ha sido descrito como patógenos oportunistas en humanos. *C. albicans* es la especie más representativa de este grupo en el que también destacan, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* y *C. krusei*. Otras especies se pueden encontrar en sitios geográficos restringidos y en una proporción mucho menor (Merenstein, Hu *et al.* 2013).

Los estudios acerca de la genética de *C. albicans* han sido relativamente lentos comparados con los realizados en otros microorganismos, ya que al tener un genoma diploide y al carecer de un ciclo sexual completo se dificulta la realización de aproximaciones genéticas convencionales. Uno de los hechos más interesantes dentro del genoma de esta levadura, es la presencia de reorganizaciones de los cromosomas en número y estructura, generando polimorfismos, translocaciones, deleciones y trisomías (Noble and Johnson 2007). El Stanford Genome Technology Center inició la secuenciación del genoma de la cepa SC5314 en Octubre de 1996 y culminó 10 años después con la anotación completa. A partir de este trabajo se describió la secuencia del genoma diploide completo (Jones, Federspiel *et al.* 2004), en donde se observó la presencia de un ciclo sexual y la diploidía con cromosomas homólogos que presentan una alta divergencia (Nantel 2006). Durante más de un siglo, *C. albicans* fue descrito como un hongo imperfecto o asexual debido a la imposibilidad de obtener formas de apareamiento ("mating forms") en el laboratorio. Esta idea fue cuestionada en el momento en que se reconoció una región de DNA, el Mating Type-Like Locus (MTL) a partir de la secuenciación del genoma (Bennett and Johnson 2005). Este *locus* existe como dos alelos,  $\alpha$  y  $a$ , involucrados en el cambio entre un fenotipo blanco y otro opaco, lo que se ha asociado con un rasgo de virulencia (Noble and Johnson 2007).

El genoma de *C. albicans* es de aproximadamente 13.4 Mb repartido en 8 cromosomas (Braun, van Het Hoog *et al.* 2005; Butler, Rasmussen *et al.* 2009) que poseen 6202 ORFs, de los cuales: 4589 ORFs, el 73.99%, no están caracterizados; 1461 ORFs, el 23.56%, están verificados (se ha comprobado su función biológicamente); y 152 ORFs, el 2.45%, son dudosos (hay datos controvertidos) (<http://www.candidagenome.org/> (Mayo 2012)). Así mismo se conoce que la mayoría de especies de *Candida* de importancia clínica están relacionadas y se agrupan en un clado único, compartiendo características como por ejemplo, un código genético alterado, en el que el codón CUG es traducido a leucina en lugar de serina (Santos and Tuite 1995).

### 3.2. LA PARED CELULAR DE *C. albicans*

La pared celular es la parte más externa del hongo y actúa de barrera permeable protegiendo a la célula de daños tanto físicos como osmóticos y confiriendo la forma. Además cumple una importante función nutricional, ya que media la interacción entre el microorganismo y el entorno que le rodea.

La pared celular de las levaduras presenta un gran dinamismo degradándose y sintetizándose constantemente, sufriendo modificaciones importantes, en forma y en composición. Estos cambios son producidos a lo largo del ciclo celular, como respuesta a distintos estímulos entre los que se encuentran emergencia y crecimiento de la yema, formación del septo, separación celular y transición dimórfica (Klis, Sosinska *et al.* 2009).

La pared celular de *C. albicans* está formada principalmente por polisacáridos como beta-glucanos, quitina y en una menor proporción por manoproteínas (Figura. 2), presentando un modelo molecular similar al descrito para *S. cerevisiae*, del que se diferencia principalmente por la cantidad de  $\beta$ -1,6-glucano, superior en la pared celular de *C. albicans* y en la cantidad de manoproteínas, superior en la pared celular de *S. cerevisiae*. La mayoría de los componentes de la pared celular son polisacáridos (80-90%), mientras que las proteínas representan únicamente entre el 5 y el 20%, siendo los lípidos el componente minoritario con solo un 1-7%.

La motivación principal para estudiar la pared celular de *C. albicans* radica en que muchas de las funciones biológicas relacionadas con la patogenicidad residen en ella. Otras motivaciones importantes son la identificación de dianas potenciales para el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos, así como el hallazgo de epítomos inmunogénicos para el desarrollo de vacunas y de anticuerpos monoclonales que son útiles en protocolos de profilaxis (Cassone 2008; Klis, Sosinska *et al.* 2009).

---

#### 3.2.1. ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR DE *C. albicans*

---

##### 3.2.1.1. POLISACÁRIDOS DE LA PARED CELULAR DE *C. albicans*

###### A. El glucano

Es un polisacárido mayoritario que se encuentra distribuido de manera uniforme a lo largo de la superficie externa de la célula formando la matriz esencial de la pared celular, de la cual es el principal componente. Está formado por la unión de

moléculas de  $\beta$ -D-glucosa pudiéndose distinguir entre  $\beta$ -1,3-glucano y  $\beta$ -1,6-glucano en función del tipo de enlace predominante (Ruiz-Herrera, Elorza *et al.* 2006).

- **El  $\beta$ -1,3-glucano:**

Es el polímero mayoritario y está formado por moléculas de D-glucosa enlazadas linealmente mediante enlaces  $\beta$ -1,3 y ramificados ocasionalmente mediante enlaces  $\beta$ -1,6 (Manners, Masson *et al.* 1973). Estas moléculas están formadas por 1500 residuos de glucosa aproximadamente (Boone, Sommer *et al.* 1990). Junto con la quitina, el  $\beta$ -1,3-glucano es responsable de la rigidez de la pared celular, presentando múltiples extremos reductores que le permiten funcionar como un aceptor de  $\beta$ -1,6-glucano y quitina, facilitando así la adhesión de los mismos a la pared celular. La síntesis de  $\beta$ -1,3-glucano tiene lugar en la membrana plasmática (Lipke and Ovalle 1998; Chauhan, Inglis *et al.* 2003).

- **El  $\beta$ -1,6-glucano:**

Es un polímero altamente ramificado y formado por uniones de tipo  $\beta$ -1,6 principalmente y uniones del tipo  $\beta$ -1,3 ocasionales. Presenta cadenas de aproximadamente 60 a 600 residuos de glucosa (Kollar, Reinhold *et al.* 1997). Su papel en la estructura de la pared es sumamente importante ya que actúa como interconector entre las cadenas tridimensionales de  $\beta$ -1,3-glucano y las proteínas unidas a la pared celular mediante el grupo GPI (glicosilfosfatidilinositol). La síntesis de  $\beta$ -1,6-glucano tiene lugar en la membrana plasmática de forma similar a la síntesis de  $\beta$ -1,3-glucano (Chauhan, Inglis *et al.* 2003).

Ambos tipos de glucano se encuentran unidos covalentemente a la quitina mediante un enlace glicosídico entre una molécula de glucosa del  $\beta$ -glucano y un residuo N-acetil-glucosamina de la cadena de quitina.

## **B. La quitina:**

Es uno de los componentes más característicos de la pared de los hongos dado que no existe en las paredes de bacterias ni plantas. En las células de *C. albicans* constituye el componente minoritario de la pared (0.6-9%) y puede llegar a ser hasta cuatro veces más abundante en la forma micelial que en la de levadura (Chattaway, Holmes *et al.* 1968). Se trata de un polímero lineal formado por moléculas de N-acetil-D glucosamina unidas por enlaces  $\beta$ -1,4. Las cadenas de quitina se disponen de forma antiparalela y se asocian mediante puentes de

hidrógeno formando una estructura fibrilar insoluble que confiere a la pared celular una gran resistencia (Bulawa 1993; Ruiz-Herrera, Mormeneo *et al.* 1994). La quitina está localizada en la capa más interna de la pared celular, pegada a la membrana plasmática (Figura 2).

### **C. El manano**

El manano forma parte de las manoproteínas localizadas en la parte externa de la pared celular. También llamado fosfomano proteína o complejo fosfopeptidomanano contiene homopolímeros de manosa (como componente principal), de 3 a 5% de proteínas y de 1 a 2% de fosfato. Este polímero es responsable de conferir hidrofobicidad a la superficie celular (Ruiz-Herrera, Elorza *et al.* 2006).

#### **3.2.1.2. PROTEÍNAS DE LA PARED CELULAR DE *C. albicans***

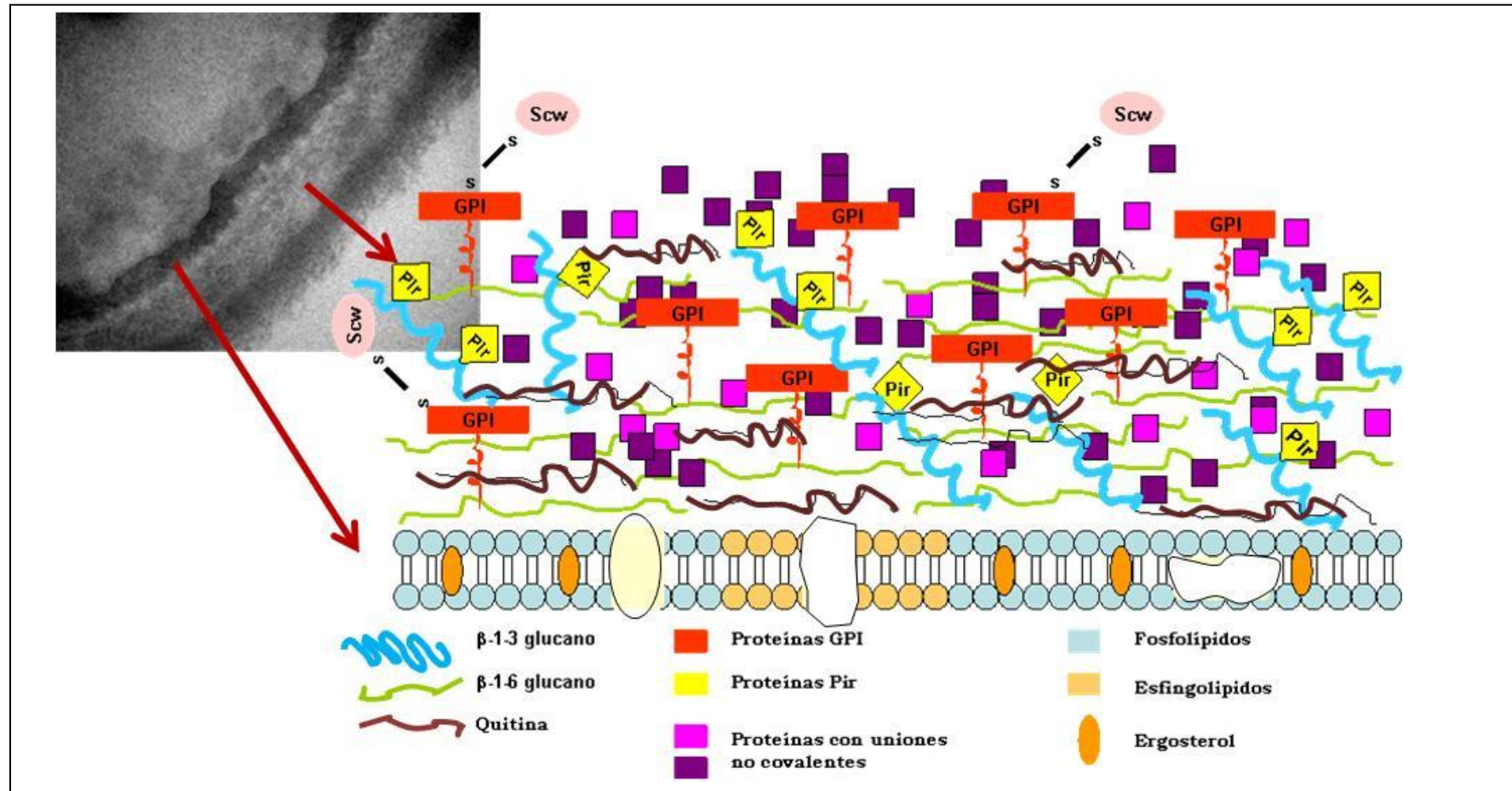
Las manoproteínas de la pared celular se encuentran ampliamente distribuidas, ya sean secretadas al espacio periplásmico o como componentes de la pared celular, donde se encuentran de una manera continua desde las capas más internas a las más externas predominando en las capas más superficiales (Chaffin 2008). Muchas de estas proteínas pueden estar unidas a la estructura de la pared celular de distintas maneras:

##### **A. Uniones débiles no covalentes:**

Este grupo de proteínas se extraen mediante tratamiento con SDS en caliente (Castillo, Calvo *et al.* 2008). Cabe destacar la presencia dentro de este grupo de proteínas glicolíticas típicamente citoplasmáticas (Eno1, Gadh, Pgc y Adh), pero cuya presencia real en la pared celular ha sido descrita mediante diferentes estudios proteómicos (Pitarch, Sanchez *et al.* 2002).

##### **B. Mediante puentes disulfuro:**

Algunas proteasas de la familia Sap y algunas glucanasas como Sun42, Scw1, entre otras se unen mediante puentes disulfuro. Estas proteínas son extraídas de paredes aisladas por tratamiento con agentes reductores de puentes disulfuro que las mantienen unidas a otras proteínas de la pared celular (Castillo, Martinez *et al.* 2003; Castillo, Calvo *et al.* 2008).



**Figura 2:** Representación esquemática de la pared celular de *C. albicans*.

### C. Anclaje tipo glicosilfosfatidilinositol (GPI):

El 88% de las proteínas unidas covalentemente a la pared celular son extraídas mediante tratamiento con  $\beta$ -1,6-glucanasas y su unión se lleva a cabo a través del grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI). A estas proteínas se les denomina proteínas GPI. Las proteínas GPI se encuentran ampliamente distribuidas entre los organismos eucariotas tanto inferiores como superiores (Eisenhaber, Bork *et al.* 2001). En hongos, las proteínas GPI pueden ser incorporadas covalentemente a la pared celular o bien permanecer unidas a la membrana plasmática. Las proteínas GPI pueden estar implicadas en la biosíntesis de la pared celular, en su remodelación, pueden determinar su hidrofobicidad o su antigenicidad y se piensa que poseen un papel importante en la adhesión y la virulencia (Sundstrom, Cutler *et al.* 2002; De Groot, de Boer *et al.* 2004). Aproximadamente el 90% de estas GPI-CWPs (*GPI-cell wall proteins*) están unidas al  $\beta$ -1,3-glucano a través del  $\beta$ -1,6-glucano. El resto se unen a la quitina a través del  $\beta$ -1,3-glucano. Un análisis *in-silico* del genoma completo de *S cerevisiae* ha permitido describir las características esenciales que presentan las proteínas GPI, las cuales son: presencia de péptido señal procesable, una región rica en treoninas (opcional), un dominio hidrofóbico en el extremo C-terminal y un extremo N-terminal, glicosilado (Caro, Tettelin *et al.* 1997). Otros estudios en *in-silico* ha predicho 104 GPI para *C. albicans* (De Groot, Hellingwerf *et al.* 2003).

### D. Proteínas Pir:

Aquellas proteínas de pared celular que están unidas directamente al  $\beta$ -1,3-glucano a través de un enlace sensible a álcali y sin interconexión con el  $\beta$ -1,6-glucano se denominan proteínas Pir (*Proteins with Internal Repeats*). Las proteínas de la familia Pir comparten varias características: presentan un péptido señal en el extremo N-terminal, contienen un punto de reconocimiento de la proteasa Kex2p tras los primeros 60-70 aminoácidos del extremo amino terminal, su secuencia presenta varias repeticiones internas y pueden ser extraídas de la pared celular por digestión con  $\beta$ -1,3-glucanasas o mediante un tratamiento suave con álcali. Estas proteínas fueron descritas inicialmente en *S. cerevisiae* donde la familia Pir se compone de 4 miembros: Pir1, Pir2/Hsp150, Pir3 y Pir4. Son proteínas muy O-glicosiladas pero a diferencia de las proteínas GPI no presentan una señal de anclaje a GPI. (Russo, Kalkkinen *et al.* 1992).

En *C. albicans*, se ha comprobado experimentalmente la presencia de una única proteína Pir, Pir1, identificada en extractos de paredes celulares tratadas con medio alcalino (NaOH) (De Groot, de Boer *et al.* 2004). Posteriormente, por un análisis *in-silico* usando las características comunes a las proteínas Pir de *S. cerevisiae*, se realizó una búsqueda en el genoma de *C. albicans* de posibles miembros de la familia Pir; en los cuales, además de Pirp1 sólo se encontró otro candidato, IPF7274.

### 3.2.2. PAPEL DE LA PARED CELULAR DE *C. albicans* EN LA INTERACCIÓN CON EL HOSPEDADOR

Se ha descrito que *C. albicans* es capaz de adherirse a distintos tipos celulares, a la matriz extracelular y a materiales inertes como prótesis, catéteres, etc. (Chaffin, Lopez-Ribot *et al.* 1998). Partiendo del hecho de que la pared celular es su estructura más externa, tanto las interacciones físico-químicas, como el reconocimiento por el sistema inmunológico del hospedador, se desarrollan a partir de las diferentes macro-moléculas presentes en la pared. Estas moléculas actúan a modo de receptor frente a ligandos específicos tanto de macrófagos, como de células epiteliales y endoteliales. Los receptores fúngicos de proteínas humanas están compuestos principalmente por péptidos y mezclas de mananos y péptidos. Se ha descrito con anterioridad la heterogeneidad de los sitios anatómicos que *C. albicans* puede invadir, esto refleja la variedad de moléculas que pueden mediar en el proceso de adhesión de *C. albicans* (Calderone 1993; Chaffin 2008).

Dentro de la pared celular de *C. albicans* podemos distinguir diferentes moléculas implicadas en el proceso de adhesión:

#### **A. Ligandos no proteicos.**

Existen moléculas en la superficie de la célula que son capaces de unirse a receptores glicosídicos (glicoproteínas o glicolípidos) de manera parecida a las lectinas descrita en muchos mecanismos de adhesión de bacterias (Fukazawa and Kagaya 1997; Chaffin 2008). Este tipo de interacción, parece ser de gran importancia en la adhesión a células epiteliales. En *C. albicans* se han descrito varias de estas moléculas parecidas a las lectinas que pueden unirse a L-fucosa, N-acetilgalactosamina, o glicósidos que contienen N - acetilglucosamina (GlcNAC) de las células epiteliales favoreciendo la interacción con el microorganismo.

## **B. Ligandos proteicos.**

Las proteínas de la superficie de *C. albicans* capaces de unir ligandos con motivos RGD (Arginina-Glicina-Aspártico) pueden ser consideradas análogos a integrinas (Hostetter 1999). Dichos motivos RGD están presentes en proteínas de la matriz extracelular, fragmento C3 del complemento y fibrinógeno, favoreciendo la adhesión de *C. albicans* a dichos compuestos. La superficie de *C. albicans* también puede unir factores regulatorios del complemento como el factor H y el FHL-1 y regular la ruta alternativa del complemento en su superficie. (Losse, Zipfel *et al.* 2010).

Las adhesinas más estudiadas son las pertenecientes a la familia Als. Estas proteínas poseen varios dominios y debido a su localización en la pared celular, estos dominios adoptan una arquitectura especial y se organizan de una forma estándar. Contienen una región N-terminal con un péptido señal, después dominios para la unión de ligandos, un centro opcional rico en treonina, dominios altamente glicosilados que facilitan las interacciones célula-célula, los tallos N- y O-glicosilados que elevan los dominios de unión a la superficie celular y, finalmente, las regiones C- terminales que median el anclaje con la matriz a la pared celular, por unión covalente a través del glycoylphosphatidylinositol (GPI) (Dranginis, Rauceo *et al.* 2007).

En *C. albicans* de las proteínas de la familia Als, son capaces de adherirse a diferentes ligandos del hospedador, laminina, fibronectina o colágeno entre otros, probablemente mediante reconocimiento de secuencias de patrones de aminoácidos uno de los cuales podría ser: treonina, serina o alanina (Gaur, Smith *et al.* 2002; Dranginis, Rauceo *et al.* 2007; Chaffin 2008).

La proteína Hwp1 es una adhesina que se descubrió originalmente como un gen de expresión diferencial durante la formación del tubo germinativo y de la hifa (Sundstrom, Cutler *et al.* 2002). La secuencia aminoterminal de la proteína (rica en prolina y glutamina) es sustrato de la transglutaminasa epitelial, lo que contribuye al anclaje de las células fúngicas a las células epiteliales a través de un enlace covalente muy estable. Diversos estudios en modelos murinos confirman el papel de esta proteína en la adhesión y virulencia de *C. albicans* (Staab, Bradway *et al.* 1999). La proteína Eap1p es otra adhesina que media unión al plástico. El genoma de *C. glabrata* especialmente es rico en genes de la familia de las Eap (Li and Palecek 2003).

### **3.3. PROCESO INFECCIOSO DE *C. albicans* ¿COMENSAL O PATÓGENO?**

Se ha descrito a *C. albicans* como el hongo que con mayor éxito ha establecido relaciones de comensalismo con organismos superiores, principalmente mamíferos, de hecho es difícil aislarlo del medio ambiente. Estudios epidemiológicos en diferentes zonas geográficas del mundo describen que aproximadamente el 60% de la población se encuentra colonizada por esta levadura (Mavor, Thewes *et al.* 2005; Calderone, Odds *et al.* 2009). Los nichos que coloniza son la cavidad oral, el tracto gastrointestinal y el tracto genito-urinario. En individuos inmunocompetentes es capaz de invadir los epitelios vaginal y oral, y en individuos con inmunocompromiso severo puede diseminarse por torrente sanguíneo y crecer en diversos órganos internos, siendo la causa de la muerte del individuo. Estos nichos se diferencian por diversos aspectos, tales como pH, nutrientes y componentes del sistema inmunológico a los que se adapta *C. albicans* gracias a su plasticidad genética y a la compleja regulación de sus genes que hace posible que se comporte como comensal y como patógeno (Brown, Odds *et al.* 2007).

Con el fin de establecer una infección, los microorganismos patógenos oportunistas como *C. albicans* deben aprovechar las deficiencias del sistema inmune para sobrevivir y multiplicarse en los sitios anatómicos que normalmente han colonizado y, adicionalmente, tener la capacidad de diseminarse y establecerse en nuevos nichos donde afectan de forma grave la homeostasis del hospedador. Algunos genes involucrados en estos procesos son expresados diferencialmente para adaptarse a diferentes condiciones de pH, mantener la integridad de la pared celular y/o garantizar la transición dimórfica que es un proceso esencial en el paso de comensal a patógeno (Yang 2003).

Los rasgos de virulencia de los microorganismos pueden ser agrupados según la etapa del proceso infeccioso en la que son utilizados. En un primer grupo se encontrarían aquellos que los facultan para sobrevivir y colonizar a su hospedador y en el segundo estarían agrupados los rasgos o factores de virulencia que los facultan para invadir y producir la sintomatología clínica infecciosa. Los rasgos de virulencia del primer grupo constituyen las características mínimas o innatas que el microorganismo tiene para sobrevivir dentro de un organismo superior. El más relevante es la adaptación a la temperatura fisiológica de 37°C y en general a todas las condiciones medioambientales del nicho que "colonizan"; siendo esta colonización la primera etapa del proceso infeccioso. Estos rasgos innatos los

poseen todos los microorganismos que forman la microbiota del ser humano, incluida *C. albicans*. El sistema inmune cumple una función esencial en el control de estos microorganismos; sin embargo, si este sistema falla, los microorganismos como *C. albicans* se convierten en patógenos expresando los rasgos de virulencia del segundo grupo que los facultan para diseminarse e invadir nichos diferentes y en ocasiones matar a su hospedador. La patogenicidad de *C. albicans* es un proceso multifactorial regulado por más de un determinante de virulencia entre los que se incluyen: capacidad de adhesión, producción de hidrolasas extracelulares, transición morfológica e intercambio fenotípico (Calderone and Fonzi 2001).

---

### 3.3.1. MECANISMOS MOLECULARES DE LA ADHERENCIA DE *C. albicans*

El primer paso para que se establezca la infección es la adherencia (Fu, Meng *et al.* 2008). Tanto *C. albicans* como otras *Candida spp* de importancia clínica tienen la capacidad de adherirse no solo a las células del hospedador, sino a dispositivos médicos por medio de la formación de biofilms (Yang 2003). Se han descrito diferentes proteínas como las Als (*Agglutinin-like sequence*), Hwp1, Int1 y Mnt1, que se unen a varios receptores en la matriz extracelular entre los que se encuentran fibronectina, laminina, fibrinógeno y colágeno tipo I y IV (Rauceo, De Armond *et al.* 2006). La familia Als incluye al menos 9 genes que codifican para glicoproteínas con anclaje tipo GPI y su expresión está regulada por los cambios en el ambiente, la morfología y las diferentes fases de crecimiento de la levadura (Hoyer 2001). Estudios con RT-PCR mostraron su expresión diferencial en respuesta a estímulos específicos *in-vitro*, por ejemplo durante la morfogénesis de hifas, donde se detecta enriquecimiento en Als3 (Murad, Leng *et al.* 2001; Johnson, Cano *et al.* 2005; Kadosh and Johnson 2005; Sorgo, Heilmann *et al.* 2010; Sosinska, de Koning *et al.* 2011). Todos los genes *ALS* se expresaron tanto en muestras clínicas como en los modelos de infección y pruebas *in vitro*; sin embargo, parece que *ALS6* y *ALS7* se expresan en niveles más bajos con relación *ALS4* en muestras vaginales. Estos resultados junto a los estudios *in-vitro* apoyan la idea de que los genes *ALS* podrían estar diferencialmente regulados de un modo nicho específico (Gow, van de Veerdonk *et al.* 2012).

Por otra parte, la adhesina codificada por el gen *HWP1* contiene un dominio N-terminal expuesto en la superficie de la célula que promueve fuertes interacciones entre *C. albicans* y las células del hospedador, además de estar implicada en la formación del tubo germinativo garantizando que la unión con las células epiteliales sea estable y no reversible (Staab, Bradway *et al.* 1999; Ene and Bennett 2009).

Hwp1 se expresa durante el desarrollo de las hifas y se ha descrito como una proteína especialmente expresada en las hifas (Staab and Sundstrom 1998). La producción de Hwp1 ha sido confirmada por inmunohistoquímica en el modelo de ratón de infección sistémica (Sundstrom 2002). Por otro lado, la proteína Int1 juega un papel importante en la inducción de cambios morfológicos en respuesta a señales extracelulares, lo que ha sido comprobado por medio de mutantes carentes de esta proteína que disminuyen su adhesión a las células epiteliales en un 40% (Gale, Bendel *et al.* 1998; Kinneberg, Bendel *et al.* 1999). Además, se conoce que en el proceso de adherencia Mnt1, proteína de membrana que se requiere para la síntesis del manano en la pared celular, se expresa abundantemente, (Yang 2003). Todas estas proteínas estarían relacionadas con el éxito de *C. albicans* en la colonización de mucosas y piel y con su capacidad de comportarse como un patógeno oportunista (Ghoneum, Grewal *et al.* 2003).

### 3.3.2. MECANISMOS MOLECULARES DE LA INVASIÓN TISULAR MEDIADOS POR ENZIMAS

Se han descrito enzimas extracelulares como proteasas, fosfolipasas y lipasas, que cumplen una función importante en la nutrición, el daño al tejido, la invasión y diseminación, la adquisición de hierro o la evasión de la respuesta inmune durante la etapa de invasión tisular (Karkowska-Kuleta, Rapala-Kozik *et al.* 2009). Con el objetivo de comprender los mecanismos de invasión, se han realizado diversos estudios en modelos tanto *ex vivo* como *in vivo* donde se examina la respuesta transcripcional en distintos modelos biológicos como:

- La fagocitosis por neutrófilos (Rubin-Bejerano, Fraser *et al.* 2003) y por macrófagos (Lorenz, Bender *et al.* 2004).
- La exposición a sangre humana (Andes, Lepak *et al.* 2005) y fracciones de sangre (Fradin, De Groot *et al.* 2005).
- La invasión en tejido epitelial humano reconstituido en hígado y riñones de cerdo perfundidos (Andes, Lepak *et al.* 2005; Thewes, Kretschmar *et al.* 2007).
- Infecciones peritoneales en ratón (Thewes, Kretschmar *et al.* 2007).

Estos estudios han puesto de manifiesto la importancia de la regulación de la expresión génica asociada a la adaptación a los distintos micro-ambientes durante el proceso infectivo; demostrando que *C. albicans* tiene la capacidad de alterar su transcriptoma y su proteoma, tanto para adaptarse a distintos niveles metabólicos

como para inducir la expresión de enzimas y proteínas necesarias para la invasión tisular.

Dentro de **las proteasas** se han descrito las **aspartil proteinasas secretadas (Saps)** como unas de las más importantes, pues degradan un amplio espectro de proteínas entre las que se encuentran la albúmina, la hemoglobina, la queratina y la inmunoglobulina A (Yang 2003). La familia de genes Sap incluye al menos 10 genes (Sap1-Sap10) que codifican enzimas similares en función pero diferentes en propiedades como masa molecular, punto isoeléctrico y pH óptimo de actividad (Parra-Ortega, Cruz-Torres *et al.* 2009). Estudios *in-vitro* han demostrado que Sap1, 2 y 3 son expresadas solo en la fase levaduriforme, mientras que Sap4, 5 y 6 se expresan en la fase de transición hacia hifa. También se ha detectado un orden secuencial de expresión de estos genes en modelos de epidermis humana: primero se expresan Sap1 y Sap2 durante la invasión temprana, seguidas por Sap8 que se expresa en la penetración extensiva y finalmente Sap6 que aparece en el crecimiento extensivo de la hifa. En modelos **ex-vivo**, e **in-vivo** se ha visto que *SAP1*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP7* y *SAP8* se correlacionan con candidiasis mucocutánea oral, mientras que la expresión *SAP1*, *SAP3* y *SAP8* se asocia con infección vaginal (Naglik, Rodgers *et al.* 2003) Por otra parte, la expresión de *SAP7* no ha sido detectada *in-vitro*, pero si se ha visto en asilamientos clínicos. Por lo tanto, la expresión génica de estas proteasas sugiere que los diversos miembros de la familia se expresan en etapas y nichos específicos (Schaller, Schafer *et al.* 1998; Staib, Kretschmar *et al.* 1999; Naglik, Rodgers *et al.* 2003; Taylor, Staib *et al.* 2005). La expresión diferencial de los miembros de la familia *SAP* podría deberse a la diversidad de los sustratos disponibles propios de cada microambiente. Además, se cree que la expresión de algunos genes de estas proteasas pueden ser regulados indirectamente a través de la actividad proteolítica de los miembros de la familia (Hube, Monod *et al.* 1994; Naglik, Challacombe *et al.* 2003; Castillo, MacCallum *et al.* 2011; Gow, van de Veerdonk *et al.* 2012).

**Las Fosfolipasas (PI)** son otras enzimas hidrolíticas secretadas que también se han relacionado con los procesos de patogénesis de *C. albicans*. Su actividad es muy elevada durante el proceso de invasión de tejidos, ya que estas enzimas son las responsables de hidrolizar las uniones éster de los glicerolfosfolípidos que se encuentran en la membrana celular. Se han identificado 4 fosfolipasas: A, B, C y D, de las cuales sólo la fosfolipasa B (Plb) ha demostrado ser necesaria para la virulencia, debido a su actividad de hidrolasa y lisofosfolipasa-transacilasa (Karkowska-Kuleta, Rapala-Kozik *et al.* 2009). La fosfolipasa B Se ha detectado

inmunológicamente en la mucosa gastrointestinal en modelos de infección sistémica en ratones (Schaller, Borelli *et al.* 2005). Adicionalmente, el uso de RT-PCR mostró que existe una expresión diferencial de *PLB1* y *PLB2* en muestras de infecciones humanas en mucosa oral y vaginal (Naglik, Challacombe *et al.* 2003). *C. albicans* también expresa al menos 10 lipasas (Lip1-Lip10) que hidrolizan uniones ester de mono, di y triacil-gliceroles (Schaller, Borelli *et al.* 2005). En un modelo de peritonitis por *C. albicans* en ratones se detectaron Lip5, Lip6, Lip8, y Lip9 (Hube, Stehr *et al.* 2000).

---

### 3.3.3. TRANSICIÓN DIMÓRFICA

La habilidad que tiene *C. albicans* de cambiar de morfología celular pasando de levadura a forma filamentosa de manera reversible dentro del hospedador es uno de los rasgos esenciales para su paso de comensal a patógeno (Yang 2003). El crecimiento de formas filamentosas tiene ventajas en la penetración del tejido, debido a que en su punta se encuentra el sitio de secreción de enzimas facilitando dicha penetración. En general, el estado levaduriforme predomina durante la colonización en el hospedador sano, mientras que la hifa emerge cuando disminuyen las defensas y se presentan otros factores entre ellos cambios nutricionales y hormonales (Jacobsen, Wilson *et al.* 2012).

Se han publicados varios hallazgos que sustentan la hipótesis de que la producción de filamentos es requerida para la virulencia. El primero y más representativo es que una cepa mutante para el gen *EFG1*, incapaz de producir filamentos, es avirulenta en un modelo de ratones (Lo, Kohler *et al.* 1997). Otras observaciones que refuerzan la hipótesis son que la formación de filamentos se estimula en condiciones de crecimiento en el hospedador 37°C en suero con pH neutro, que los tubos germinales tienen una capacidad de adhesión mayor que las levaduras y que las levaduras capturadas por macrófagos son capaces de producir filamentos y lisar estas células, lo cual es una forma de evadir la respuesta inmune (Gow 2002).

---

### 3.3.4. “SWITCHING” FENOTÍPICO Y ADAPTACIÓN A DIFERENTES NICHOS

Otra característica visible de ***C. albicans*** es que **sus colonias pueden variar su fenotipo con una alta frecuencia** (entre  $10^{-4}$  a  $10^{-1}$ ). Estos cambios incluyen colonias lisas, rugosas, estrelladas, aterciopeladas, aracniformes, con bordes irregulares, etc., siendo el cambio de colonia blanca y lisa a opaca y rugosa el fenotipo que se ha relacionado con patogenicidad (Soll 2009). La regulación génica que dirige este cambio aún no se conoce, sin embargo algunos estudios indican que

las colonias opacas tiene una capacidad mayor de colonizar pero son menos virulentas que las células pertenecientes a colonias blancas de *C. albicans*. Algunos de los genes que se expresan en las células de fenotipo opaco son las proteasas Sap1 y Sap3 (Yang 2003; Soll 2009).

Otra de las condiciones que varía ampliamente en los distintos nichos ecológicos de *C. albicans* es el **pH** y la familia de genes PHR codifica para diferentes glicoproteínas que son regulados por esta condición. La expresión del gen *PHR1* es inducido cuando el pH del medio es mayor a 5.5 y es reprimido cuando los valores de éste son menores, mientras que el *PHR2* actúa de forma similar pero en pH ácido (Fonzi 1999; Calderon, Zavrel *et al.* 2010).

Además del pH, factores como la temperatura, la densidad celular y la concentración de glucosa regulan la expresión de diferentes genes involucrados en los procesos de adaptación y morfogénesis que le permiten al hongo comportarse como comensal y/o patógeno según el microambiente en el que este (Ernst 2000).

Por otra parte, *C. albicans* debe asimilar nutrientes para multiplicarse, colonizar y/o invadir tejidos y así desarrollar un proceso infeccioso. Estudios con la tecnología de "microarrays" sugieren que hay **cambios significativos en los programas metabólicos relacionados con el carbono**. Así, las levaduras en interacción con macrófagos o neutrófilos utilizan preferencialmente las vías de beta-oxidación de ácidos grasos y la vía del glioxilato, en lugar de la ruta glicolítica. Por el contrario, las células de *C. albicans* en interacción con plasma o tejidos utilizan la glucólisis y el ciclo de Krebs. (Fradin, De Groot *et al.* 2005; Thewes, Kretschmar *et al.* 2007). Estas observaciones globales se ven reforzadas por estudios de conjuntos de genes de *C. albicans* y de mutantes que carecen de los genes individuales (revisado en (Gow, van de Veerdonk *et al.* 2012).

También existen cambios importantes en el metabolismo de **nitrógeno**. Al parecer, la interacción con neutrófilos o la formación de bio-películas induce la biosíntesis de aminoácidos de forma simultánea al aumento de la secreción de diversas SAPs, posiblemente por su contribución al catabolismo de proteínas. Sin embargo, la activación de la biosíntesis de aminoácidos no se observa en la invasión tisular, lo que sería coherente con la observación de que la inanición de aminoácidos no atenúa la virulencia de *C. albicans* (Brand, MacCallum *et al.* 2004).

Los genes implicados en la captura y asimilación de hierro y de fósforo son activados durante el desarrollo de invasión tisular. (Fradin, Kretschmar *et al.* 2003;

Fradin, De Groot *et al.* 2005). Tanto los sensores de pH, como proteínas implicadas en la asimilación del hierro se consideran necesarios para la capacidad patogénica de *C. albicans* (De Bernardis, Muhlschlegel *et al.* 1998; Ramanan and Wang 2000).

### 3.3.5. RESPUESTA ADAPTATIVA AL ESTRÉS Y EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

En condiciones de desequilibrio del sistema inmunológico del hospedador, *C. albicans* también es capaz de contrarrestar las células fagocitarias mediante **respuestas adaptativas al estrés**, por ejemplo se ha observado que la capacidad patogénica de *C. albicans* se atenúa por inactivación de los genes que codifican para las enzimas catalasa, superóxido dismutasa o flavohemoglobina. Estas enzimas están implicadas en la desintoxicación de radicales libres de oxígeno que se producen en el fagosoma (Wysong, Christin *et al.* 1998; Martchenko, Alarco *et al.* 2004). Igualmente se ha observado que si se interrumpe *HOG1*, que codifica una proteína quinasa activada por estrés osmótico y responsable de la resistencia al estrés oxidativo, se disminuye la capacidad patogénica de *C. albicans*. Estos hechos muestran que la capacidad de adaptación a condiciones de estrés es un rasgo de virulencia esencial (Smith, Nicholls *et al.* 2004).

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios enfocados en la búsqueda de rasgos de virulencia de *C. albicans* han dilucidado funciones específicas de proteínas presentes en la pared celular relacionadas con su capacidad de evadir la respuesta inmunitaria del hospedador tanto a nivel celular como a nivel humoral (los detalles de esta respuesta inmunitaria se describen en el apartado siguiente). Se ha descrito que proteínas de la superficie celular de *C. albicans* como **Gpm1** y **Pra1** son capaces de unir elementos reguladores de la cascada del complemento como el Factor H (Poltermann, Kunert *et al.* 2007). Igualmente se ha descrito la integrina **Int1** como receptor para la fracción B de C3 (Hostetter 2008). En otros estudios se ha observado que la respuesta inmune frente a las proteínas **Als3** y **Hgc1** activa la producción de citoquinas anti-inflamatorias (Phan, Myers *et al.* 2007, Wilson and Hube 2010). También se ha descrito que gracias al fenómeno de la transición dimórfica *C. albicans* es capaz de resistir a la muerte dentro de los fagocitos siendo capaz de lizarlos con el ápice de la hifas (Schaller, Borelli *et al.* 2005). Estos son algunos ejemplos de las adaptaciones moleculares de *C. albicans* para explicar su capacidad de convertirse en patógeno oportunista.

Asimismo, estudios de filogenia molecular de *C. albicans*, documentados principalmente a través de la técnica MLST, revelan que esta levadura como otros microorganismo comensales no posee una distribución clonal. Esta característica,

unida al hecho de la variedad de nichos que coloniza y al despliegue génico que requiere para la adaptación a cada ambiente, hizo que en los años 70 se planteara la existencia de biotipos; sin embargo, hasta la fecha no se han descrito características que definan estos biotipos (Bougnoux, Tavanti *et al.* 2003; Odds, Bougnoux *et al.* 2007). De acuerdo con esto, se puede definir a *C. albicans* como un microorganismo experto en la colonización de distintas mucosas humanas, gracias a una gran plasticidad génica que la faculta para producir cuadros infecciosos generalizados y profundos comprometiendo la supervivencia de pacientes en estado crítico.

En resumen, el proceso invasivo de *C. albicans* se inicia cuando las levaduras son capaces de alcanzar al torrente sanguíneo y a continuación adherirse a células endoteliales de la vasculatura (Klotz and Smith 1992; Clemons, Calich *et al.* 2000), posteriormente invaden dichas células induciendo su propia endocitosis (Clemons, Calich *et al.* 2000) y, una vez dentro de ellas, *C. albicans* las daña hasta llegar a producir su muerte (Fratti, Belanger *et al.* 1998). La lesión de las células endoteliales ocasiona la pérdida de integridad del revestimiento vascular permitiendo que el patógeno pueda invadir los tejidos profundos (Clemons, Calich *et al.* 2000). Por otra parte, las células endoteliales responden sintetizando una variedad de citoquinas pro-inflamatorias y la expresión de moléculas de adhesión típicas en leucocitos (Orozco, Zhou *et al.* 2000). Estos mediadores pro-inflamatorios reclutan leucocitos en el sitio de la invasión amplificando las señales pro-inflamatorias y produciendo enfermedades graves que comprometen severamente la vida del hospedador (Clemons, Calich *et al.* 2000).

#### **3.4. RESPUESTA INMUNE A *C. albicans***

La contribución de la inmunidad celular al control de las micosis es esencial. Esta característica se hace evidente principalmente por las siguientes observaciones: (1) el estado neutropénico es un factor predisponente para una micosis sistémica, (2) en todos los estudios histopatológicos de la invasión tisular de hongos donde hay resolución de la infección siempre se observa inflamación granulomatosa y (3) la presencia de micosis mucocutánea en pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (Blanco and Garcia 2008).

Mientras que la importancia de la inmunidad celular es evidente, el papel de la inmunidad humoral ha estado sujeta a controversia (Polonelli, Casadevall *et al.* 2000); de hecho, hasta hace pocos años se consideraba que la inmunidad humoral no tenía una participación relevante en la defensa contra hongos. Sin embargo, actualmente existen varios estudios que han contribuido al conocimiento a nivel molecular de la respuesta humoral frente a antígenos fúngicos y a la función y aporte individual de varias de las proteínas implicadas en la respuesta inmune innata y adaptativa frente a los hongos; siendo la levadura *C. albicans* el modelo de estudio en muchos casos (Carvalho, Cunha *et al.* 2012).

---

#### 3.4.1. RESPUESTA INMUNE INNATA

La respuesta innata del sistema inmune del hospedador, se caracteriza por ser una respuesta constante y repetitiva además de inespecífica, compleja y normalmente muy eficiente en la eliminación de los microorganismos. La inmunidad innata es la primera línea de defensa, por lo cual su activación es inmediata e irremplazable. Los componentes efectores de esta respuesta principalmente son tres: células que responden de forma inespecífica a microorganismos esencialmente fagocitándolos, el sistema del complemento y los péptidos antimicrobianos (Medzhitov and Janeway 1997; Romani 2004).

En la inmunidad innata mediada por células los neutrófilos desempeñan un papel central en la respuesta inmune frente a hongos. Estos fagocitos ejecutan mecanismos de defensa tales como la fagocitosis, su principal efecto, además de producir péptidos antimicrobianos, proteínas de la fase aguda de la inflamación y sustancias quimiotácticas que amplifican la señal proinflamatoria, para destruir al microorganismo (Losse, Zipfel *et al.* 2010; Collette and Lorenz 2011). De hecho, un marcador clínico decisivo para el inicio de una terapia empírica antifúngica es la permanencia en estado neutropénico por más de 5 días (Lionakis and Netea 2013). Igualmente, se ha descrito que en pacientes que tienen deficiencia de adhesión de los granulocitos, por la ausencia de  $\beta 2$ -integrinas, presentan una alta susceptibilidad a las infecciones fúngicas (Soloviev, Fonzi *et al.* 2007). Otras células esenciales en la respuesta innata son los macrófagos, los cuales además de fagocitar ejercen funciones de células presentadoras de antígeno, siendo el vínculo entre la inmunidad innata y la específica (Romani 2004).

Ha sido descrito que *C. albicans* presenta patrones moleculares asociados a patógeno, PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*), los cuales son

reconocidos por los monocitos y subsecuentemente por los macrófagos. Este reconocimiento está mediado por al menos 4 sistemas caracterizados: (1) El receptor de manosa (RM) que reconoce los residuos de manosa de las manoproteínas, (2) Los Receptores Toll, especialmente TLR4 que reconoce esencialmente O-mananos, (3) el complejo Dectina-1/TLR2, que reconoce  $\beta$ -glucanos y (4) el complejo Galectina-3/TLR2 que reconoce  $\beta$ -1,2-manósidos. Además, *C. albicans* puede unirse a TLR9, Dectina-2, Mincle, SCARF1/CD36 y NLRP3 los cuales no tienen bien definido el PAMP al que se unen. La unión a los receptores TLR4 y TLR2 pueden inducir señales pro-inflamatorias, para iniciar una respuesta tipo Th1 (Ferwerda, Netea *et al.* 2010; Saijo and Iwakura 2011). La unión de  $\beta$ -glucanos a TLR2 puede en algunas ocasiones estimular la producción de IL10 y TGF $\beta$  por parte de los Linfocitos T reguladores e iniciar su expansión clonal, pero también es capaz de inducir citoquinas pro-inflamatorias como TNF $\alpha$  o IL-6 en otras sub-poblaciones de linfocitos T. El efecto pro-inflamatorio de TLR2 puede ser amplificado por Dectina-1 y por Galectina-3. Además, las señales generadas por la activación de Dectina-1 inducen IL-2, IL-10 y producen una respuesta Th17, independiente de su interacción con TLR2; y el receptor de la manosa induce un efecto pro-inflamatorio (Gow, van de Veerdonk *et al.* 2012).

Otras rutas menos caracterizadas incluyen la producción de citoquinas inflamatorias a través de Dectina-2 (reconoce estructuras con varias manosas), Mincle (PAMP desconocida) y CDC36/SCARF (reconoce  $\beta$ -1,3-glucano). El reconocimiento de *C. albicans* por los macrófagos causa, por tanto, una transducción de señales que tiene como consecuencia la producción de mediadores de la inflamación, la sobreexpresión de moléculas de adhesión de la superficie celular, la fagocitosis y la producción de compuestos tóxicos como las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Gil and Gozalbo 2009; Bourgeois, Majer *et al.* 2010; Netea, Gow *et al.* 2010).

El sistema del complemento agrupa un número importante de proteínas plasmáticas y de membrana que desempeñan papeles muy importantes en la respuesta inmune inespecífica temprana; después de su activación, se generan péptidos con notable actividad pro-inflamatoria y opsonizante, además de la formación del complejo de ataque a membrana con acción lítica directa principalmente en bacterias Gram negativas (Janeway and Medzhitov 2002). Además se ha descrito actividad antimicrobiana en péptidos generados a partir de la fracción C3a (Sonesson, Ringstad *et al.* 2007).

## Introducción

El sistema del complemento se activa espontáneamente y constantemente en presencia de lectinas, paredes celulares de microorganismos y/o anticuerpos. Esta activación puede con llevar a la muerte del microorganismo por ataque directo con el complejo de la membrana celular. Una vez activada esta cascada de 9 proteínas, sus diferentes dominios y factores de activación pueden ejercer diversas funciones desde opsonización, quimiotaxis, vasodilatación y actividad antimicrobiana, entre otros, hasta la lisis de la célula. En *C. albicans* se sabe que se activa la vía del complemento, tanto por la vía clásica por unión de C1q a la fracción CH3 de las inmunoglobulinas IgG e IgM unidas a la superficie del hongo, como por la vía alternativa, por la activación directa de C3, por unión directa con la pared celular del hongo. Sin embargo, no se ha observado la producción del poro en la membrana celular del hongo. Varios autores lo explican basándose en la posible protección estérica que ejerce la pared celular; sin embargo, como se menciona en otros apartados, el complemento tendría una función antifúngica más importante a nivel de opsonizar al patógeno y producir péptidos antimicrobianos (Medzhitov and Janeway 2002).

La producción de péptidos antimicrobianos por parte de la inmunidad innata es un mecanismo importante que continúa siendo motivo de estudio. Estos péptidos muestran un amplio rango de actividad antimicrobiana, frente a virus, bacterias y hongos. El mecanismo de acción directo de estos péptidos es atacar las membranas de los microorganismos alterando su permeabilidad selectiva y rompiendo la homeostasis celular lo que causa la muerte celular. También se cree que tienen efecto inmunomodulador siendo partículas quimiotácticas para células fagocíticas (Aerts, Francois *et al.* 2008; Hirsch, Jacobsen *et al.* 2008; Steinstraesser, Koehler *et al.* 2008). Hasta la fecha se desconocen receptores específicos que dirijan respuestas concretas, sin embargo se ha detectado la inducción de la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IFN $\gamma$ , citoquinas de la fase aguda de la inflamación (Ganz 2002). Aunque se han realizado muchos progresos en los últimos años, la base molecular completa del modo de acción antimicrobiana, para estos péptidos debe desentrañarse. Un ejemplo es el péptido LL37 producido por neutrófilos (Aerts, Francois *et al.* 2008).

---

### 3.4.2. RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

Una vez que *C. albicans* es fagocitada, procesada y presentada, acciones realizadas por células presentadoras de antígeno (CPA), tanto por macrófagos como por células dendríticas, se desencadena la respuesta de tipo adaptativo. Esta

respuesta depende de las señales que envíen las CPA a los linfocitos T,  $LTCD4^+$ , lo cual definirá el proceso de maduración de la respuesta adaptativa. Una respuesta celular específica temprana tipo Th1 se correlaciona con una respuesta protectora, en la que se promueve la respuesta de tipo celular, que asegura la eliminación de la levadura. Más recientemente, también se ha visto la importancia de una respuesta Th17 en este desenlace positivo. Ésta respuesta conduce a un proceso inflamatorio agudo que involucra directamente a los neutrófilos entre otras células. La respuesta Th17 al parecer, en el caso de *Candida spp*, debe darse casi simultáneamente a la Th1. Una respuesta temprana dirigida por un perfil Th2 se asocia a una respuesta disfuncional frente a este patógeno (Gauglitz, Callenberg *et al.* 2012).

Por otro lado y contrario a la apreciación inicial acerca de la contribución positiva de la inmunidad mediada por anticuerpos en la candidiasis, hoy en día se ha demostrado que esta respuesta, aunque no es capaz por sí misma eliminar a los hongos, entre ellos a *C. albicans*, sí que puede proteger contra la infección, esto sujeto a: si los anticuerpos son "protectores" y si estos están en suficiente cantidad para atacar al hongo. Un anticuerpo es protector cuando cumple por lo menos alguna de las siguientes funciones biológicas: la prevención de la adhesión, la neutralización de toxinas, la opsonización mediada por anticuerpo o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por células Natural Killer (NK) (Bikandi, Moragues *et al.* 2000). Estos hallazgos han sido apoyados por la experiencia actual de la inmunización pasiva con anticuerpos anti-Hsp90 de *C. albicans*, los cuales mejoran el pronóstico del paciente con candidiasis invasiva (Raska, Belakova *et al.* 2008). Actualmente la inmunoterapia con estos anticuerpos está en fase 2 de ensayos clínicos, para ser utilizada de forma rutinaria en pacientes. Las explicaciones de los resultados negativos obtenidos históricamente en ensayos de inmunización pasiva con sueros policlonales se argumenta con: cantidades inadecuadas de anticuerpos protectores, la presencia de anticuerpos no protectores o de baja especificidad y/o la presencia de anticuerpo de un isotipo no protector (Polonelli 2000). La eficacia protectora de los anticuerpos contra los hongos depende directamente de la composición relativa y la proporción de anticuerpos protectores y no protectores, además de la cantidad, la especificidad el isotipo y el idiotipo de los anticuerpos (Parra, Gonzalez *et al.* 2005; Torres, May *et al.* 2005).

El sistema inmune funciona como un todo y cada uno de sus componentes contribuye a la defensa del hospedador. Algunos componentes contribuyen más que otros en determinadas circunstancias, pero todos son importantes para la respuesta protectora contra la infección. El tipo de inmunidad mediada por células es crítico

en la determinación la resistencia o susceptibilidad a la infección por hongos. En general, respuesta celular de tipo Th1 y Th17 son esenciales para la eliminación de los hongos, mientras que una respuesta inicial mediada por Th2 por lo general se traduce en susceptibilidad a la infección o a una respuesta alérgica (Hemmann, Blaser *et al.* 1997; Noverr, Phare *et al.* 2001).

### **3.5. PRESENTACIONES CLÍNICAS DEL GÉNERO *Candida***

Las levaduras del género *Candida* pueden estar implicadas en diversos cuadros clínicos y en diversas localizaciones anatómicas describiéndose diferentes formas clínicas de la infección: localizadas, diseminadas-profundas, invasivas y alérgicas. La infección localizada puede darse tanto en las mucosas (bucal, digestiva, genital y pulmonar), como en la superficie de la piel en la zona interdigital, uñas, zona del pañal y folículos pilosos. Dentro de las formas diseminadas-profundas pueden observarse candidiasis mucocutánea crónica o formas granulomatosas en los órganos infectados. Las presentaciones clínicas invasivas pueden alcanzar diferentes sistemas como el aparato genito-urinario y los riñones, el sistema circulatorio y el corazón y el sistema nervioso central, pudiendo llegar a todos ellos complicándose con septicemia. También se han descrito formas alérgicas en Candidídes, eccema y episodios asmáticos (Calderone, Odds *et al.* 2009).

Dentro de estos cuadros clínicos la candidiasis de la mucosa vulvovaginal es la micosis más común en la población inmunocompetente. Se presenta en el 60% de las mujeres en edad fértil y alrededor de un 80% en mujeres embarazadas (Pfaller, Messer *et al.* 1998; Andrews, Fleener *et al.* 2007; Pfaller, Castanheira *et al.* 2010), mientras que la candidiasis invasiva aguda es la presentación clínica más común en los pacientes críticos con inmunocompromiso y es en la que se centrará este trabajo. En la forma aguda normalmente no hay una sintomatología definida, se desarrolla principalmente durante el periodo de neutropenia y se relaciona con la positividad de los hemocultivos y el hallazgo del órgano interno infectado (van der Meer, van de Veerdonk *et al.* 2010).

Existen factores de riesgo inherentes al individuo que favorecen la aparición de la candidiasis invasiva, entre estos se encuentran estados en los cuales existe inmunocompromiso, como en el caso de pacientes con tumores sólidos, síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA), disfunciones endocrinas como la diabetes, defectos en función o número de linfocitos, neutropenia y/o anomalías en fagocitosis. Además existen otros factores externos al individuo como los mecánicos

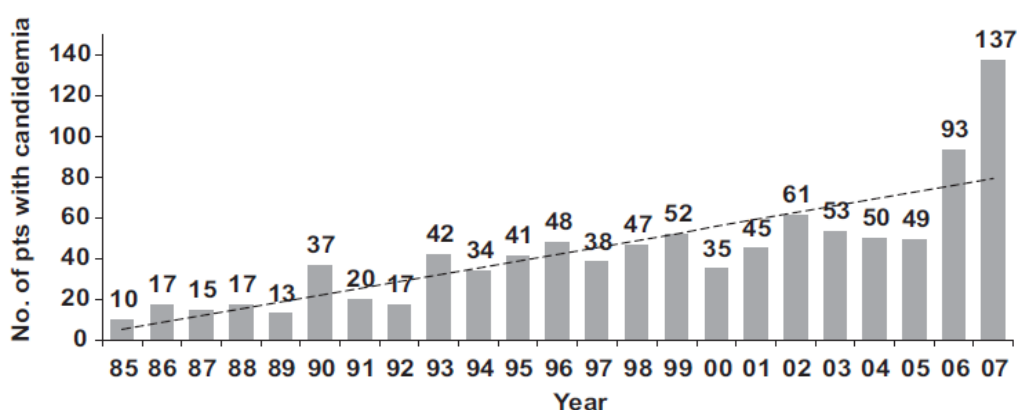
que incluyen traumatismos, quemaduras y heridas, factores iatrogénicos como tratamientos con antibióticos, procesos quirúrgicos a gran escala, trasplantes de órganos sólidos y/o largas hospitalizaciones en unidades de cuidados intensivos que incluyen normalmente uso de catéteres en procedimientos de cateterización venosa central y nutrición parenteral (Pappas 2006).

La mayoría de candidiasis invasivas se originan por la invasión de *Candida spp* del epitelio gastrointestinal y su paso al torrente sanguíneo (Magill, Swoboda *et al.* 2009). Esto significaría que la infección es precedida por la colonización, lo que es apoyado por varios trabajos donde se destaca que la colonización por *Candida* es un factor de riesgo de candidiasis invasiva (Pappas 2006; Calderone, Odds *et al.* 2009; Arendrup 2010; Merenstein, Hu *et al.* 2013). Otro de los mecanismos de transmisión estudiados es la infección cruzada entre pacientes de las unidades de cuidado intensivo, que ha sido atribuida al transporte de las levaduras en las manos de los profesionales de la salud. En un estudio realizado en una unidad de cuidados intensivos para neonatos se determinó que el tiempo de estancia de hospitalización fue el único factor determinante para la colonización por *C. albicans*. Las observaciones indicaron que si en la sala hay bebés colonizados, a los 21 días de hospitalización el neonato que ingresaba sin estar colonizado terminaba siendo colonizado (Orozco, Cortes *et al.* 2009). En este y otros trabajos, la levadura que con mayor frecuencia se aisló de las manos de los profesionales sanitarios fue *C. parapsilosis*, que es la misma que se ha descrito en diferentes brotes nosocomiales (Saiman, Ludington *et al.* 2001).

### 3.6. EPIDEMIOLOGIA DE LAS CANDIDIASIS INVASIVAS

La incidencia de la candidemia en la población general oscila entre 1,7 y 10 episodios por cada 100.000 habitantes y es una de las diez causas principales de infecciones del torrente sanguíneo tanto en Europa y Estados Unidos (Eloy, Marque *et al.* 2006; Pappas 2006; Pappas, Andes *et al.* 2006), cómo en Latinoamérica (Nucci, Queiroz-Telles *et al.* 2010). Se estima que entre el 33 y el 55% de todos los episodios de candidemia se producen en unidades de cuidados intensivos (UCI) y se asocian con tasas altas de mortalidad que oscilan entre el 5% al 71% (Pappas 2006). Aunque *C. albicans* es la levadura que se aísla con mayor frecuencia, en los últimos años hay una creciente proporción de episodios de candidemia causadas por *Candida no-albicans* (Hachem, Hanna *et al.* 2008; Sobel 2008; Patel, Erlandsen *et al.* 2012).

Un estudio que muestra la evolución de la candidemia durante un período de más de 20 años en una sola institución en Madrid (Figura 3) (Almirante, Colmenero *et al.* 2008; Bouza and Munoz 2008) atribuye esta evolución de los datos al aumento de la población en riesgo; ya que hay una mayor supervivencia en pacientes con enfermedades graves y se utilizan con mayor frecuencia las intervenciones quirúrgicas agresivas, al igual que terapias inmunosupresoras y los agentes antibacterianos de amplio espectro (Dupont, Lortholary *et al.* 2009; Glockner 2011; Tripathi, Watt *et al.* 2012).



**Figura 3:** Evolución de los episodios de candidemia en el Hospital Gregorio Marañón, Madrid 1985 – 2007 (Almirante, Colmenero *et al.* 2008).

Estudios latinoamericanos muestran un comportamiento similar a los anteriormente mencionados; aunque las diferencias en las tasas de incidencia no son directamente comparables, si se sugieren unas tasas más altas. Las razones para la alta

incidencia de la candidemia en estas poblaciones no son claras pero pueden estar relacionadas con una combinación de factores, incluyendo las diferencias de los recursos disponibles para la atención médica y/o dificultades en la aplicación de programas para el control de infecciones en los hospitales (Nucci, Queiroz-Telles *et al.* 2010).

En cuanto a la distribución epidemiológica de las especies del género *Candida*, podemos decir que de forma global la más frecuente es *C. albicans*, la cual sólo se encuentra como endo-saprófito del tubo digestivo de mamíferos y aves, siendo difícil su aislamiento a partir de muestras medioambientales. En seres humanos varias especies del género *Candida* son comensales en diferentes mucosas, en la cavidad bucal se aísla el 75% de *C. albicans*, el 8% de *C. tropicalis* y entre el 3-6% de *C. krusei*; en el tubo digestivo se aísla el 50% *C. albicans*, el 35% de *C. glabrata* y un 15% *C. tropicalis*; y en la mucosa vaginal se aísla el 70% de *C. albicans*, el 20% de *C. glabrata*, el 5% de *C. tropicalis* y el 2% de *C. parapsilosis* (Nucci, Queiroz-Telles *et al.* 2010).

El desenlace de casi la mitad de los pacientes con candidemia podría mejorar disminuyendo su alta mortalidad, mediante la utilización de estrategias más eficaces de prevención, diagnóstico y tratamiento. En los tres aspectos se está trabajando y cada uno tiene retos separados por superar. En cuanto a prevención, el 50% de la población ya está colonizada, continúa en debate el uso de antifúngicos como profilácticos, lo cual abre otras complicaciones en cuanto a resistencia; además, se investiga el uso de vacunas, también en debate. En cuanto al diagnóstico, en la rutina a nivel mundial se realiza por hemocultivo, presentando un 70% de sensibilidad y con el cual solo se obtiene un diagnóstico tardío (Gomez, Garcia-Vazquez *et al.* 2010).

### **3.7. PARTICIPACIÓN DE OTRAS ESPECIES DE *Candida no-albicans* COMO AGENTES PATÓGENOS.**

La diversidad en el rango de especies de *Candida* como patógenos humanos se asocia, esencialmente, al cambio en protocolos de tratamiento de las micosis y al mayor tiempo de vida de pacientes en estado crítico. Las especies de *Candida no-albicans* por lo general no son patógenas o presentan niveles más bajos de patogenicidad que *C. albicans* y se presentan solamente en personas con inmunocompromiso severo y/o con enfermedades subyacentes graves. Biológicamente las diferencias más importantes entre *C. albicans* y las otras

especies radican en rasgos de virulencia y los perfiles de susceptibilidad a los antifúngicos (Filler and Feber 2002; Brunke and Hube 2012).

Las candidemias debidas a especies no-*albicans* han aumentado en frecuencia en la última década. Weinberg y colaboradores publicaron un estudio donde analizaron predictores asociados a mortalidad, encontrando que el 55% de pacientes con *C. albicans* presentaban un ratio de alta mortalidad que frecuentemente estaba asociado al uso de terapia inmunosupresiva. En el 16% de pacientes se aisló *C. tropicalis* asociada con neutropenia severa, leucemia aguda o trasplante de medula ósea. *C. glabrata* se aisló en un 10% de los casos, asociada con edad avanzada y enfermedades crónicas y *Candida krusei* en el 2% de los pacientes, asociada a terapia con fluconazol. En general la mortalidad fue de un 36% y los predictores de muerte, a los que se les realizaron estudios de multivariantes, mostraron que la infección por especies de *Candida* distintas de *C. albicans* no presentaba una tasa mayor de mortalidad (Weinberger, Leibovici *et al.* 2005).

En cuanto a su distribución en la participación en candidemias, podemos decir que en Estados Unidos y Europa las más relevantes son *C. albicans* y *C. glabrata*, seguidas de *C. parapsilosis* (Weinberger, Leibovici *et al.* 2005), a diferencia de Latinoamérica donde la segunda más importante es *C. tropicalis* y en tercer lugar se encuentra *C. parapsilosis*, situándose en último lugar *C. glabrata*. También se ha descrito una distribución ligada a la edad de los pacientes, siendo *C. parapsilosis* más importante en neonatos, y a medida que aumenta la edad va cobrando importancia *C. glabrata*. En general, *C. parapsilosis* se asocia con brotes nosocomiales (Nucci, Queiroz-Telles *et al.* 2010).

### **3.8. DIAGNÓSTICO DE LA CANDIDIASIS INVASIVA**

El diagnóstico del laboratorio de la candidiasis invasiva es difícil porque no hay signos ni síntomas específicos de la infección, además de ser complicado diferenciar la infección de la colonización por *Candida*. Su diagnóstico rutinario se basa en la demostración de la levadura por tres estrategias diferentes: (1) histopatológicos (la invasión tisular), (2) microbiológicos (el cultivo del hongo) y (3) microscópicos y/o radiológicos (presencia en localizaciones corporales habitualmente estériles). Estas pruebas diagnósticas presentan una baja sensibilidad. Actualmente se han ido incorporando ensayos diagnósticos basados en la detección de una serie de marcadores biológicos que incluyen la detección de distintos anticuerpos,

de antígenos como el manano y el  $\beta$ -1,3-glucano y la detección de DNA genómico de la levadura. Sin embargo, la incorporación de la detección de los marcadores actualmente disponibles aún no han mostrado efectos en la disminución de los índices de mortalidad de esta enfermedad, ya que el diagnóstico sigue siendo en una fase tardía de la infección (Ponton 2009).

### 3.8.1. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS

- **Detección de manano:** los escasos estudios que se han realizado sobre la detección de manano en pacientes con candidiasis invasiva han utilizado con la prueba Platelia Candida Ag® BIO RAD. esta prueba es un ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) que utiliza el anticuerpo monoclonal EBCA 1, que reconoce los residuos  $\beta$ -1,3 del manano, antígeno mayoritario e inmunodominante de la pared celular de *Candida*. Su capacidad para inducir anticuerpos es tan grande que los anticuerpos antimanano están presentes en prácticamente todas las personas y forman complejos con el manano cuando *Candida* pasa a sangre. La liberación del manano de los inmunocomplejos que forma con los anticuerpos es probablemente el paso más crítico de la prueba de detección y, junto con la transitoriedad de la mananemia, son la causa de la baja sensibilidad de la prueba, que suele estar entre el 40 y el 60%. La prueba se realiza normalmente en suero. Existe un segundo estuche diagnóstico denominado Inmunoanálisis unimedi candida monotest (unitica ltda. Japón), el cual muestra una mayor sensibilidad que el *Candida Ag*, sobre todo en la infección por *C. parapsilosis* (Fujita, Takamura *et al.* 2006).
- **Detección de beta-1,3-D-glucano:** este compuesto forma parte de la pared celular de los hongos, se libera durante la infección y puede detectarse en los líquidos biológicos, principalmente en suero de pacientes con diferentes tipos de micosis invasivas tales como candidiasis, aspergilosis, neumocistosis y en algunos casos de cryptococosis, siendo negativo en las micosis por zigomicetes. Por lo tanto, una prueba positiva puede utilizarse como marcador de infección fúngica, pero no permite identificar la especie (Del Palacio, Cuetara *et al.* 2010). Actualmente hay varias pruebas comercializadas para detectar el beta-1,3-glucano: Fungintec G Test MK (seikagaku kogyo co. ltd.), WAKO-WB003 (wako pure chemical industries) y B-G STAR (maruha

corporation), producidas en Japón y Fungitell® (laboratorios viracor-ibt) producido en Estados Unidos. Cada una de estas pruebas presenta diferencia en su reactividad con el polisacárido y por tanto son necesarios puntos de corte diferentes para cada una de ellas. En la Tabla 1 se muestran las características de cada prueba (Del Palacio, Cuetara *et al.* 2010).

**Tabla 1** Comparación de 4 pruebas comerciales para la detección de Beta 1,3-glucano (Obayashi, Negishi *et al.* 2008; Ponton 2009)

	FUNGINTEC G	WAKO	B-G STAR	FUNGITELL
<b>Año de aprobación</b>	1995	1996	2001	2004
<b>Método de ensayo</b>	Cinético cromogénico	Cinético turbidométrico	Punto final cromogénico	Cinético Cromogénico
<b>Muestra</b>	Suero o plasma	Suero o plasma	Suero o Plasma	Suero
<b>Pre tratamiento</b>	Álcali	Dilución y calentamiento	Dilución y calentamiento	Álcali
<b>Origen del lisado</b>	<i>Tachypleus tridentatus</i>	<i>Limulus polyphemus</i>	<i>Tachypleus tridentatus</i>	<i>Limulus polyphemus</i>
<b>Punto de corte en pg/mL</b>	20	11	11	60 o 80
<b>Rango de medida pg/mL</b>	3.9 - 500	6.0 - 600	1.2- 120	25- 500
<b>Tiempo de realización en min</b>	30	90	30	40

Los resultados publicados recientemente indican que la detección de  $\beta$ -1,3-D-glucano es un buen marcador de enfermedad fúngica invasiva y la prueba es positiva en un gran número de pacientes con candidiasis invasiva (Tabla 2).

**TABLA 2:** Utilidad diagnóstica de la detección de  $\beta$  1,3 D glucano en pacientes con candidiasis invasiva (Obayashi, Negishi *et al.* 2008; Ponton 2009)

Prueba	Pacientes	Corte (pg/mL)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Referencia
Fungitell	Candidiasis probada		77.6	92.4	(Ostrosky-Zeichner, Alexander <i>et al.</i> 2005)-
	Candidemia	$\geq 80$	93.3	77.2	(Pickering, Sant <i>et al.</i> 2005)
			47	100	(Alam, Mustafa <i>et al.</i> 2007)
	Candidiasis invasiva, neutropénicos	$\geq 120$	83.3	89.6	(Pazos, <i>et al.</i> 2005)
Wako	Candidemia	$\geq 11$	95	84	(Fujita, <i>et al.</i> 2006)
	Candidiasis invasiva, neutropénicos	$\geq 7$	59	96	(Hossain, <i>et al.</i> 1997)

La detección de  $\beta$ -1,3-glucano en la mayoría de los pacientes se comporta como un marcador temprano que precede a la fiebre, al diagnóstico clínico radiológico y dirige el inicio del tratamiento antifúngico. Sin embargo se ha visto que en casos de bacteriemia su especificidad disminuye considerablemente (Pickering, Sant *et al.* 2005).

### 3.8.2. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS

Existen pruebas que detectan anticuerpos anti-micelio y frente a otros antígenos recombinantes de *C. albicans*. La prueba *C. albicans* IFA IgG®Vircell microbiologist ha conseguido el diagnóstico de la candidiasis invasiva con una sensibilidad del 84.4% y una especificidad del 94.7%. Esta prueba detecta anticuerpos que se expresan mayoritariamente en la fase micelial y que se asocian a la invasión tisular (Moragues, Ortiz *et al.* 2004). Siguiendo la misma directriz, Laín y Cols desarrollaron un ELISA para detectar anticuerpos contra el extremo aminoterminal de la proteína Hwp1, teniendo resultados de sensibilidad y especificidad similares al IFA IgG (Lain, Elguezabal *et al.* 2007).

Existen otros trabajos de investigación que son fundamentales en la aportación de directrices para la producción de nuevos sistemas comerciales

## Introducción

para el diagnóstico temprano de la candidiasis invasiva. En estudios de nuestro laboratorio, con productos de secreción de protoplastos de *C. albicans* y con el uso de la inmunoproteómica, se encontraron 7 proteínas candidatas a marcadores diagnósticos de candidiasis invasivas, Bgl2, Pgk1, Eno1, Met6, Gap1, Fba1 y Tpi1. Los resultados globales muestran que los niveles de anticuerpos IgG frente a estas proteínas diferencian los pacientes sanos de los pacientes con Candidiasis invasiva. Adicionalmente se observó que los niveles de IgG frente a la glucano 1,3-beta-glucosidasa (Bgl2) y frente a la fosfoglicerato quinasa (Pgk1) se comportaban como predictores biológicos independientes para la candidiasis invasiva. Además, los anticuerpos contra la enolasa (Eno1) asociada a la pared celular de *C. albicans* presentaron valor diagnóstico y valor pronóstico de la enfermedad (Pitarch, Jimenez *et al.* 2006).

En otro estudio publicado por Pitarch y colaboradores, en el 2007, se expresó y purificó Met6 para implementar un ELISA de captura y para pruebas de western blott, con el objetivo de evaluar el valor diagnóstico de los niveles de anticuerpos anti-Met6. Con este sistema es posible discriminar individuos sanos de individuos con candidiasis invasiva y estratificar el riesgo del paciente con esta micosis. En el 2008, estos mismos autores realizaron un estudio similar al anterior, esta vez con la proteína Eno1. De igual manera, comprobaron el valor diagnóstico y pronóstico de esta proteína para la candidiasis invasiva (Pitarch, Jimenez *et al.* 2008).

Por otra parte, un estudio en el que se realizaron análisis estadísticos profundos de los niveles de IgG de individuos con candidiasis invasiva frente a proteínas del secretoma de protoplastos de *C. albicans* describe diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes que resolvían la infección y los que no lo hacían. Para su validación biológica, se expresaron y purificaron las 5 proteínas que presentaban un patrón diferente entre pacientes con buen o mal pronóstico y, en este caso, los pacientes con buen pronóstico tenían niveles altos de anticuerpos frente a Met6, Pgk1 y Hsp90 y los de mal pronóstico presentaban niveles altos de anticuerpos frente a Gap1 y Ssb1. Los resultados obtenidos validaron los resultados obtenidos por los análisis estadísticos aplicados (Pitarch, Nombela *et al.* 2011)

Otros trabajos, muestran que con un ELISA que evaluaba simultáneamente 15 proteínas (Bgl2, Muc1-1, Muc1-2, Eno1, Fba1, Gap1, Pgk1-1, Pgk2, Not5, Met6-1, Met6-2, Car1, Rbt4, Set1 e Ipf9162) se obtenía una media de anticuerpos IgG significativamente más alta frente a los 15 antígenos en los pacientes con candidiasis invasiva que en los individuos sanos; obteniéndose una sensibilidad del 96.6% y una especificidad del 95.6%. Este panel de 15 proteínas se redujo a 4 proteínas, manteniéndose los niveles de especificidad y sensibilidad, siendo por tanto suficientes las proteínas, Set1, Eno1, Pgk1-2 y Muc1-2 para el diagnóstico de la candidiasis invasiva (Clancy, Nguyen *et al.* 2008).

Otra estrategia evaluada fue un micro-array de proteínas en el que identificaron 33 anticuerpos con niveles diferentes entre individuos colonizados y con candidiasis invasiva aguda. La mayoría de las proteínas frente a las que reaccionaron los anticuerpos se relacionaron con estrés oxidativo y con resistencia a anti-fúngicos. Es de destacar que en el grupo de pacientes en estado convaleciente existía un enriquecimiento de proteínas inmunoreactivas relacionadas con la adquisición del hierro. Sin embargo, en este estudio no lograron diferenciar poblaciones de enfermos, colonizados e individuos sanos (Mochon, Jin *et al.* 2010).

---

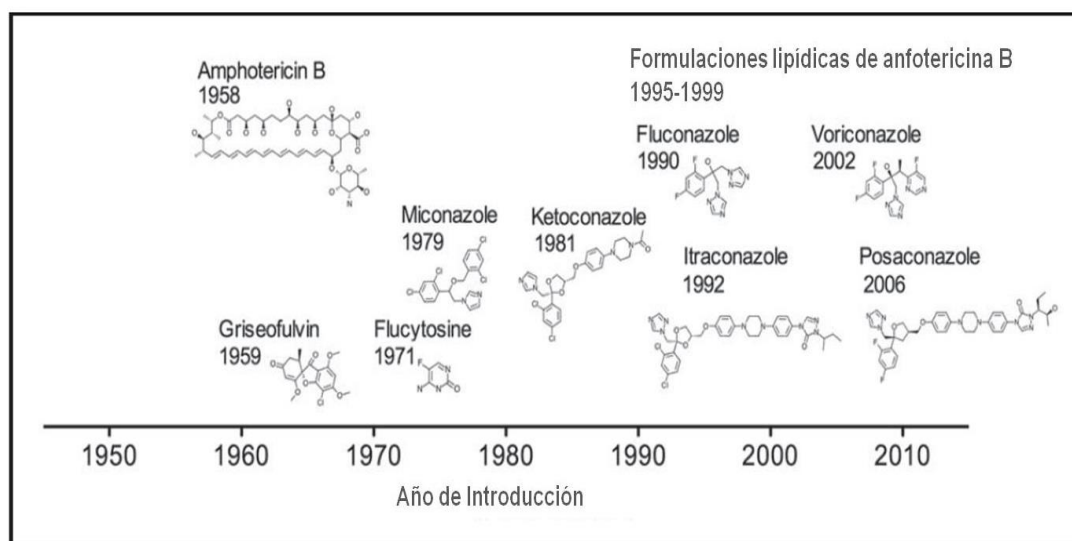
### 3.8.3. DETECCIÓN DE DNA

En el diagnóstico de las candidiasis invasivas, los avances logrados en este campo son muy modestos comparados con los alcanzados en los casos de virus y bacterias, aunque son muy prometedores. Unos de los puntos débiles es que la mayoría de las publicaciones utilizan técnicas desarrolladas individualmente en diferentes laboratorios y no hay pruebas comercializadas. Hay una serie de problemas por resolver. Por ejemplo: la muestra óptima, el método de extracción de DNA, la especificidad de los cebadores, el formato de la PCR, la detección y la identificación de varias especies simultáneamente. La introducción de la PCR en tiempo real y los métodos de DNA de extracción han solucionado algunos de los problemas asociados con la contaminación de la muestra. Varios trabajos publicados recientemente coinciden en que pruebas basadas en biología molecular tienen mejor rendimiento diagnóstico comparadas con las pruebas basadas en serología, sin embargo faltan trabajos multi-céntricos que apoyen estos resultados, por lo cual no hay suficientes evidencias (Arancia, Carattoli *et*

*al.* 2006; Colom, Jover *et al.* 2006; Nguyen, Wissel *et al.* 2012; Schell, Benton *et al.* 2012).

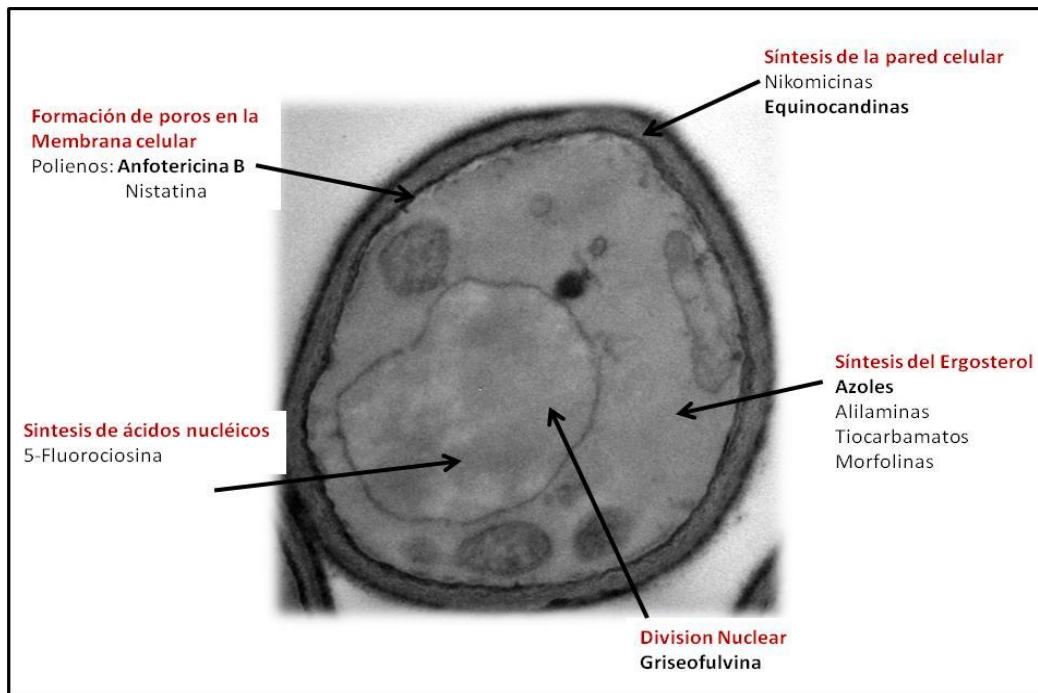
### 3.9. ANTIFUNGICOS

Se han descubierto muy pocos compuestos con actividad antifúngica, en comparación a la cantidad de compuestos antibacterianos disponibles actualmente. En la Figura 4 se muestra la aparición cronológica de estos. La actividad de los antifúngicos pueden ser fungistática o fungicida según inhiban el crecimiento o produzca lisis de las células fúngicas.



**Figura 4** Cronología de la aparición de fármacos con actividad antifúngica de administración parenteral (Lewis 2011).

Existen diversos mecanismos de acción de los antifúngicos (Figura 5); sin embargo solo un grupo reducido tiene formulación parenteral, característica indispensable para el tratamiento de micosis invasivas. En los casos de candidiasis invasivas, los más utilizados son, el fluconazol y derivados del grupo de triazólico, algunas equinocandinas, como las caspofungina y anidulofungina y en casos refractarios se utiliza la anfotericina B. Es importante resaltar que la anfotericina B es nefrotóxica y que aunque existen diferentes formulaciones lipídicas menos tóxicas son muy costosas. (Georgopapadakou and Walsh 1996; Lewis 2011).



**Figura 5:** Mecanismos de acción de los agentes antifúngicos.

De los derivados azólicos los más utilizados son: voriconazol, posaconazol (Schering-Plough), ravuconazol (Bristol Myers Squibb Eisai) y, el más nuevo, albaconazol (Uriach). Entre las equinocandinas, las más utilizadas son: micafungina (Fujisawa) y anidulafungina (Vicuron). El icofungipen es el anitimicótico más nuevo. Se trata de un derivado sintético de una sustancia natural, la cispentacina, que es un beta aminoácido que actúa sobre la isoleucil-tRNA sintetasa (Petraitiene, Petraitis *et al.* 2005).

Este conjunto reducido de antifúngicos es debido básicamente a que los hongos son organismos complejos que comparten muchas dianas bioquímicas con otras células eucarióticas y, hasta la fecha, el número de dianas selectivas identificadas que sean claramente diferentes entre las células eucarióticas fúngicas y las de mamífero es limitado. Sin embargo, la pared celular de los hongos, ausente en células eucariotas superiores, cumple con las características para una correcta toxicidad selectiva. A pesar de que hay fármacos que actúan a nivel de la síntesis de  $\beta$ -glucanos como las equinocandinas, continúa el reto de la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas relacionadas con la pared celular. A continuación profundizaremos en los mecanismos de acción de los antifúngicos con diana terapéutica en la pared celular

---

### 3.9.1. ANTI FÚNGICOS QUE INHIBEN LA BIOSÍNTESIS DE LA PARED CELULAR:

---

#### 3.9.1.1. LAS NIKOMICINAS Y POLIOXINAS

Las nikomicinas y polioxinas producidas por el género *Streptomyces* son muy específicas inhibiendo las quitínsintasas responsables de la síntesis de las cadenas de quitina. Estos compuestos son análogos estructurales al sustrato de las quitínsintasas (UDP-GlcNAc), actuando como inhibidores competitivos de dichas enzimas probablemente por unión al centro activo de las mismas. Poseen una baja permeabilidad y por ello una farmacocinética poco predecible y una variabilidad de espectro frente a las especies fúngicas muy alto, lo cual los hace de difícil manejo.

---

#### 3.9.1.2. LAS EQUINOCANDINAS

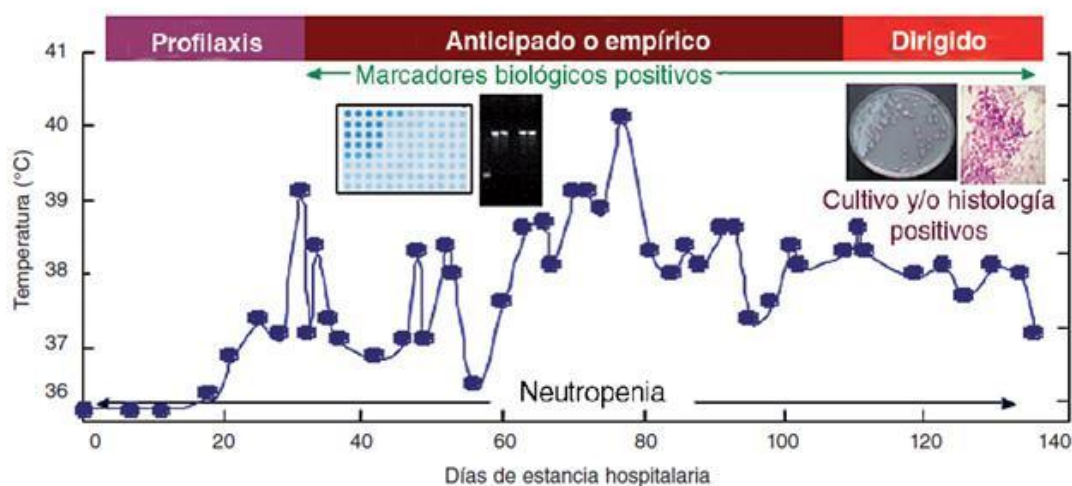
Las equinocandinas inhiben la síntesis del  $\beta$ -1,3 glucano por medio de la inhibición del complejo glucánsintasa situado en la membrana plasmática. El primer antifúngico aprobado para su uso clínico de este grupo fue la caspofungina. Su uso está especialmente indicado en aspergilosis invasivas que no responden a otros tratamientos, así como en pacientes con candidiasis hematógena diseminada (Gupta and Tomas 2003).

Actualmente, a nivel de uso cotidiano en clínica, no contamos con antifúngicos que inhiban el entrecruzamiento de los componentes de la pared celular. A nivel de investigación, aunque se sabe poco de las enzimas que catalizan tales reacciones, parecen existir transglutaminasas capaces de promover enlaces pseudopeptídicos entre diferentes proteínas de la pared celular contribuyendo a la correcta formación de la misma (Ruiz-Herrera, Iranzo *et al.* 1995). Así mismo, la enzima  $\beta$ -1,3-glucosiltransferasa (Bgl2p) y las proteínas GPI Phr1p y Phr2p (también con actividad  $\beta$ -1,3-glucanosiltransferasa) requeridas para el entrecruzamiento de las cadenas de  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 glucano, constituyen buenas dianas terapéuticas. Igualmente, como las proteínas de anclaje a GPI de la pared celular se han relacionado tanto con la integridad de la pared celular como con las interacciones célula-célula, enzimas que modifiquen la unión a GPI representan igualmente posibles dianas de antifúngicos. Un componente derivado de isoquinolina (1-(4-butilbenzil)-isoquinolina) es capaz de inhibir la localización de proteínas GPI en la

pared celular de *S. cerevisiae*. Se ha demostrado además que este compuesto es capaz de reducir la adherencia de las células de *C. albicans* a los tejidos humanos. Se ha visto que la diana molecular de este compuesto podría ser el producto del gen *GWT1*, una proteína requerida para la localización de las proteínas GPI en la pared celular (Tsukahara, Hata *et al.* 2003).

### 3.10. ESTRATEGIAS PROFILÁCTICAS Y TERAPÉUTICAS EN CANDIDIASIS.

Los protocolos para el tratamiento de la candidiasis invasivas a nivel global se han diseñado con el fin de ser instaurados de forma temprana, para reducir la alta mortalidad de esta micosis. Existen diversas estrategias terapéuticas que incluyen: profilaxis, tratamiento anticipado o empírico y tratamiento dirigido (Figura 6).



**Figura 6** Estrategias terapéuticas utilizadas en el tratamiento de la candidiasis invasiva en un paciente con neutropenia grave prolongada que presenta periodos febriles (Ponton 2009).

El objetivo del diagnóstico en una fase temprana de la infección, es instaurar un tratamiento anticipado. Este se basa en la administración de anti-fúngicos después del diagnóstico para-clínico con una serie de pruebas microbiológicas, serológicas y de imagen, que anteceden a la aparición de los síntomas de la infección fúngica invasiva. Lamentablemente, aún no hay ensayos diagnósticos empleados de forma global que ofrezcan un diagnóstico temprano, solo se utilizan en algunos laboratorios. Este es el

## Introducción

motivo por el cual en las recomendaciones terapéuticas no se incluye el diagnóstico temprano y el tratamiento empleado comúnmente es el profiláctico y el empírico (Ponton 2009).

En el documento: "Recomendaciones sobre el tratamiento de la candidiasis invasiva y otras infecciones por levaduras de la sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica (SEIMC)", actualización 2011. Se ofrecen protocolos detallados del uso de anti-fúngicos, en dos etapas del paciente (Aguado, Ruiz-Camps *et al.* 2011).

Tratamientos profilácticos basados en la administración de fluconazol, se recomienda en los grupos de pacientes: hemato-oncológicos, aspirantes a trasplante de órganos sólidos (a excepción de trasplante renal y cardiaco), pacientes en estado crítico, neonatos, pediátricos y candidiasis de localización única (oftálmica, vías urinarias, cardiaca etc.)(Aguado, Ruiz-Camps *et al.* 2011).

Por otra parte, con los resultados obtenidos de investigación hoy en día existen protocolos alternativos de profilaxis, esencialmente a nivel de inmunomodulación en lo que se modifican las interacciones hongo-hospedador por la introducción pasiva de anticuerpos, células, o la vacunación con diferentes inmunógenos entrando a la era de la inmunoterapia. Algunas de ellas se encuentran en uso en otros hongos, como el uso de anticuerpos frente al glucoronoxilomanano de *C. neoformans* en pacientes con SIDA (Casadevall and Pirofski 2001). En esta línea, el diseño de anticuerpos monoclonales específicos contra proteínas reconocidas como factores de virulencia asociadas a la pared celular constituiría el punto clave. De esta manera, un bloqueo de la función de algunos de los factores de virulencia asociados a la pared celular conllevaría una mejora en la evolución de la infección. A mediados de los años 80, surgieron una serie de observaciones interesantes del laboratorio de Matthews y colaboradores (Matthews, Burnie *et al.* 1991). Se conoció una correlación entre pacientes que se recuperaron de una candidiasis y la presencia en su suero de anticuerpos (Acs) específicos frente a una proteína de 47 kDa (kiloDalton) de *C. albicans*. Esta proteína es un producto de degradación de la proteína Hsp90 (*heat shock protein 90*) de *C. albicans*. Acs humanos anti-Hsp90 protegieron a ratones frente a una candidiasis sistémica y Acs monoclonales murinos dirigidos frente a esta proteína

también fueron protectores en ratones con candidiasis invasiva. Estos Acs protectores van dirigidos frente a un epítipo conservado de la proteína Hsp90 (LKVIRK) (Matthews, Hodgetts *et al.* 1995; Matthews and Burnie 1996). Parece ser que la unión de anticuerpo a la proteína Hsp90 podría inhibir la unión de dicha proteína de *C. albicans* a las proteínas del suero. Durante la década pasada, se llevaron a cabo ensayos en humanos con candidiasis invasivas, con un anticuerpo modificado genéticamente frente a la proteína Hsp90 del hongo (Mycograb), el cual ha mostrado eficacia frente a un amplio rango de especies de levaduras, produciendo una mejoría significativa en un modelo de candidiasis murina y la completa resolución de la infección en combinación con anfotericina B (Matthews, Rigg *et al.* 2003).

Anticuerpos capaces de inhibir la transición dimórfica levadura-micelio del hongo son interesantes como inmunoterapéuticos, ya que el dimorfismo es un factor de virulencia esencial en el proceso de invasión. Fragmentos de la fracción variable de los anticuerpos (Fab) obtenidos de un anticuerpo monoclonal frente a una manoproteína estructural de los tubos germinativos de *C. albicans* de 260kD fueron capaces de inhibir la formación de hifas *in vitro*. Estos estudios son de gran interés, aunque aún no se ha ensayado el uso de dichos anticuerpos como inmunoterapéuticos (Casanova, Martinez *et al.* 1990). Recientemente se ha publicado la transferencia pasiva de linfocitos B, proveniente de ratas en las que se indujo candidiasis vulvovaginal, a ratas nativas, en las cuales disminuye en un 50% la carga fúngica. (De Bernardis, Santoni *et al.* 2010). En la Tabla 3 se muestra un resumen de los diferentes antígenos y anticuerpos utilizados en inmunizaciones pasivas y activas (Cassone 2008). Aunque, actualmente, ninguno de estos antígenos y/o anticuerpos ha logrado llegar al uso clínico cotidiano en los hospitales, la caracterización de anticuerpos y/o células que reconocen a dichas proteínas deben seguir representando un área de gran interés en lo concerniente a inmunoterapia frente a micosis causadas por *C. albicans*. Todas estas estrategias solo utilizadas en modelos animales, a diferencia de Mycograb, el cual ha sido incluido en protocolos de tratamiento en humanos.

**Tabla 3** Antígenos y anticuerpos utilizados en inmunizaciones pasivas y activas frente a *C. albicans*, modificado de Cassone, 2008.

Antígeno	Denominación	Tipo de inmunidad que activa
Extractos celulares cepas inactivadas	Cepa CA2 viva-atenuada	Celular Th1
	Fracción de ribosomas celulares WO-1	Celular y humoral
	Células completas inactivadas WO-1	Indefinida
	Cepa <i>C. albicans</i> $\Delta/\Delta$ <i>ecm33</i> viva	Indefinida
Células pulsadas con Antígeno	Linfocitos T	Celular
	Linfocitos B	
	Células dendríticas	
Glicoconjugados y subunidades	Secuencia tipo lectinas	Celular
	Proteinasa aspartica secretada (Secreted aspartic proteinase 2-Sap-2)	Anticuerpos citotóxicos
	Manoproteína 65Kd (Mp65)	Humoral
	Als1, Als2, Als3.	Indefinida
	$\beta$ -1-3 glucanos $\beta$ -1-2 manósidos	Humoral Humoral
Idiotipos y mimotopes	Anticuerpo monoclonal neutralizante Toxina killer 4 (mAbnKT4)	Anticuerpos fungicidas
Anticuerpos	Mycrograb*, anti-HSP90	Inhibición del Crecimiento
	Anti- $\beta$ -1-3 glucanos 2G8	Candidacida
	mAb C7 ( manoproteína de estrés)	Neutralización de la enzima
	Cadena sencilla del fragmento variable de anticuerpos anti-idiotipo.	Inhibición de la glucan sintasa.
	Anti-manan mAb C6	
	Anticuerpos contra los dominios de Sap2 y MP65	Opsoninas Indefinido

### 3.11. RESISTENCIA A AGENTES ANTIFÚNGICOS EN LEVADURAS

En los últimos años se aíslan cada vez con mayor frecuencia cepas de levaduras con susceptibilidad disminuida o resistentes a los antifúngicos (Farahyar, Zaini *et al.* 2013). La resistencia a antifúngicos puede ser clínica o *in vitro*, siendo la primera consecuencia fundamental del bajo nivel del fármaco en el tejido y/o sangre, debido a una interacción entre fármacos o al severo grado de inmunosupresión del paciente. La resistencia *in vitro* puede ser primaria, donde la levadura es naturalmente resistente, siendo el mejor ejemplo la resistencia intrínseca que

presenta *C. krusei* frente a fluconazol, o puede ser secundaria, donde cepas susceptibles se transforman en organismos resistentes debido al contacto previo con el antimicótico. Este último tipo de resistencia, inusual en el pasado, es hoy el más frecuente y se observa principalmente en cepas de *C. glabrata* (Sardi, Scorzoni *et al.* 2013). El consenso es que la resistencia antifúngica depende de la interacción entre el hospedador, el fármaco y el hongo; sin embargo, los factores del paciente son con frecuencia los más relevantes para definir resistencia (Arendse and Orth 2008; Silva, Negri *et al.* 2012).

Con la introducción del fluconazol las candidemias por *C. albicans* y *C. tropicalis* disminuyeron. Sin embargo, las causadas por *C. krusei* y principalmente por *C. glabrata* experimentaron un aumento significativo. La mayoría de los datos de resistencia en levaduras se refieren al fluconazol, en cepas aisladas de pacientes con SIDA (Ablordeppey, Fan *et al.* 1999; Badiee, Alborzi *et al.* 2011).

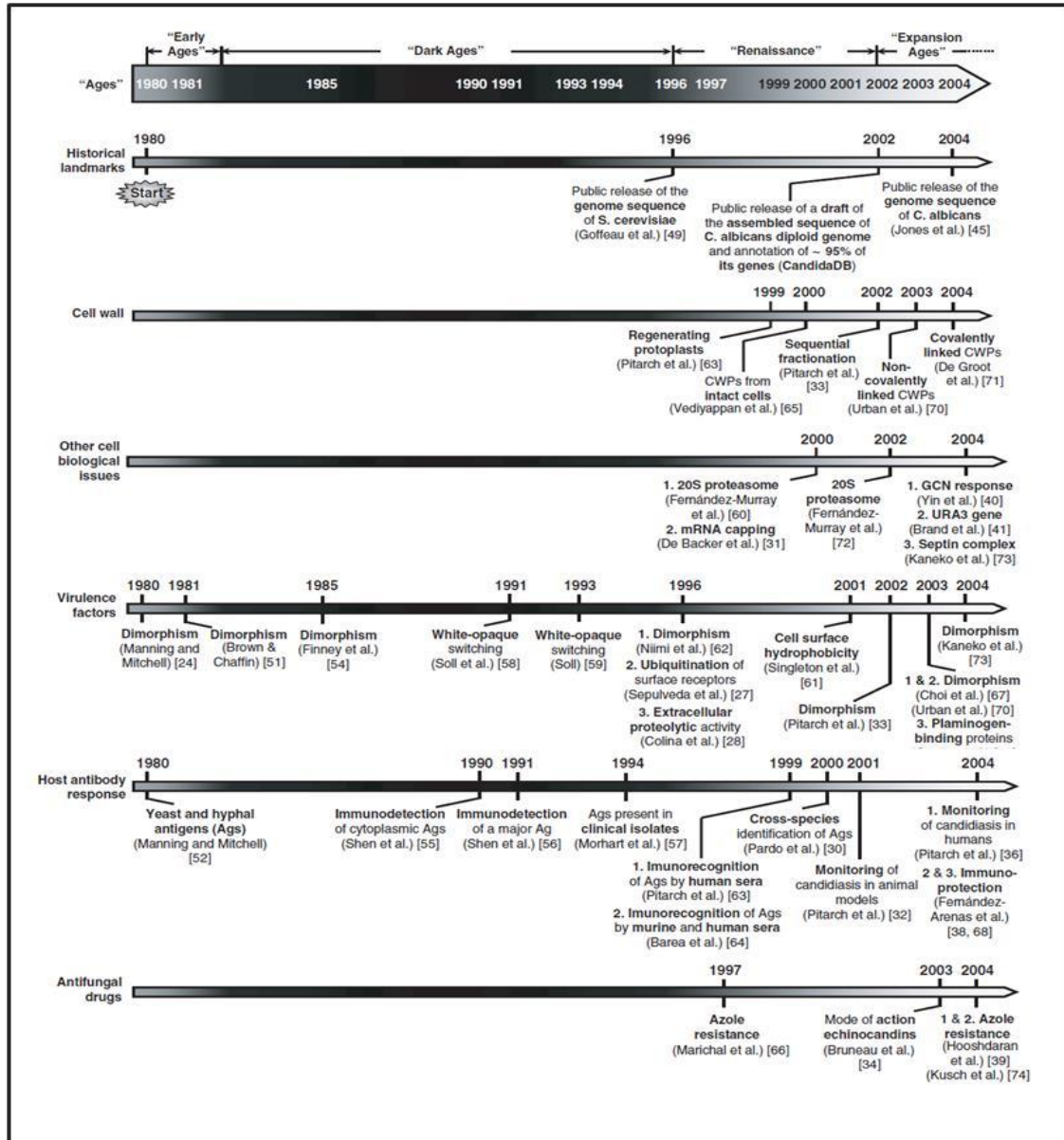
A partir de 1.579 cepas aisladas de candidemias entre 1992 y 1998 en EEUU, se verificó que la resistencia en *C. albicans* fluctuaba entre 0 y 3,3% con una media de 1,4%, siendo estos valores inferiores a los observados en cepas de *Candida non-albicans*, cuyos rangos de resistencia fueron de 1,6 a 5,7% con una media de 3,3%. La primera cepa de *Candida* resistente a fluconazol aislada en un paciente no infectado por VIH presentó co-resistencia a otros azoles (Badiee, Alborzi *et al.* 2011). Este fenómeno se ha detectado principalmente en *C. krusei* y *C. glabrata*. Recientemente, según datos de vigilancia epidemiológicos en Canadá entre 1996 y 1998 (período en el cual aislaron 442 cepas de *Candida* de infecciones invasoras a partir de 51 hospitales), el 10% de los pacientes presentó tratamiento previo con azoles y la frecuencia de *Candida non-albicans* fue significativamente superior. Del total de cepas, se detectó el 3% de resistencia a anfotericina B, siendo estas cepas de *Candida non-albicans*. Para itraconazol y fluconazol los porcentajes de resistencia variaron ampliamente según la especie, sobresaliendo *C. glabrata* que presentó 13 y 9% de resistencia frente a cada antifúngico respectivamente. *C. parapsilosis* Mostró 7 y 13% de resistencia a estos fármacos, respectivamente (Sanglard and Odds 2002; Sanguinetti, Posteraro *et al.* 2005). Los mecanismos de resistencia propuestos son: disminución de la permeabilidad de la membrana citoplasmática, sobreexpresión de enzimas y mutaciones de compensación. Sin embargo, los mecanismos demostrados son cambios en la  $\alpha$ -lanosterol demetilasa, cambios en la D5-6, esterol-desaturasa y su bomba de eflujo (Sanguinetti, Posteraro *et al.* 2005; Espinel-Ingroff 2008). Aunque actualmente la resistencia frente a antifúngicos no constituye una problemática comparable con la resistencia bacteriana a los

antibióticos, es importante realizar programas de vigilancia epidemiológica que permitan la recolección y análisis de datos. Paralelamente a esto se debe continuar con la búsqueda de nuevos antifúngicos teniendo en cuenta que el conjunto de estos fármacos disponible es bastante limitado.

### **3.12. EVOLUCIÓN DE LOS ESTUDIOS PROTEÓMICOS EN EL CONOCIMIENTO DE *C. albicans***

En 1980 se publicó el primer estudio de *C. albicans* utilizando técnicas proteómicas, en el que se compararon extractos citoplasmáticos de hifas y levaduras mediante geles de 2D (Manning and Mitchell 1980). Sin embargo, no fue hasta el año 2000 cuando se publicaron los primeros trabajos en los que fue posible la identificación de proteínas por espectrometría de masas y solo hasta el año 2004 se tuvo acceso a la secuencia completa anotada del genoma de *C. albicans* en la base de datos "Candida DataBase" lo cual aumentó considerablemente el número de proteínas identificadas. En la Figura 7, se muestra la evolución de los trabajos publicados hasta el año 2004 (Pitarch, Nombela *et al.* 2006) A partir de este momento múltiples estudios (aproximadamente 80 publicaciones) han aplicado diversas estrategias proteómicas, tanto cualitativas como cuantitativas, con el objetivo de caracterizar el proteoma de esta levadura. Estas investigaciones han analizado sus resultados desde diferentes perspectivas y objetivos, como por ejemplo: el estudio de la estructura, la composición y la remodelación de la pared celular (Klis, de Groot *et al.* 2001; Pitarch, Sanchez *et al.* 2002; De Groot, Hellingwerf *et al.* 2003; Castillo, Calvo *et al.* 2008; Ene, Cheng *et al.* 2013), el estudio del secretoma (Thomas, Lopez-Ribot *et al.* 2009; Ene, Heilmann *et al.* 2012), la determinación de factores de virulencia (Martinez-Lopez, Monteoliva *et al.* 2004), el estudio de la transición levadura-hifa (Hernandez, Nombela *et al.* 2004; Monteoliva, Martinez-Lopez *et al.* 2011; Vialas, Perumal *et al.* 2012), el estudio de la resistencia a antifúngicos y respuesta del hospedador (Reales-Calderon, Martinez-Solano *et al.* 2012), los procesos de ubiquitinación y sumolización (Leach, Stead *et al.* 2011; Leach, Stead *et al.* 2011) o la identificación de hongos por espectrometría de masas (Putignani, Del Chierico *et al.* 2011; Rosenvinge, Dzajic *et al.* 2012). Para realizar todos estos estudios ha sido necesaria la puesta a punto de diferentes metodologías que permitan obtener extractos de proteínas provenientes de distintas localizaciones celulares, entre ellas la pared celular o la membrana plasmática

(Insenser, Nombela *et al.* 2006; Castillo, Calvo *et al.* 2008; Cabezón, Llama-Palacios *et al.* 2009; Premisler, Zahedi *et al.* 2009).



**Figura 7** Cronología del análisis del proteoma de *C. albicans*. Los períodos y acontecimientos significativos en la historia de la proteómica de *C. albicans*, Los colaboradores se indican entre paréntesis y referencias entre corchetes. Abreviaturas: CWPs, proteínas pared celular GCN, control general de aminoácidos Ag, antígeno (Pitarch, Nombela *et al.* 2006).

El estudio de proteínas estructurales tanto de membrana como de pared celular es difícil y hay que comenzar por realizar procedimientos para el fraccionamiento subcelular. Las proteínas de la pared celular poseen particularidades como su carácter hidrofóbico, la presencia de cambios post-transcripcionales y secuencias pepticas especiales con las que se localizan en pared y con las que se anclan al esqueleto de polisacáridos. Todas estas particularidades hacen que su extracción requiera de procedimientos largos y complejos que incluyen el uso de agentes desnaturizantes como SDS,  $\beta$ -mercaptoetanol, álcalis fuertes y DTT, así como el uso de enzimas como las glucanasas y quitinasas. Para su análisis mediante técnicas proteómicas clásicas basadas en geles tras su extracción se requiere su posterior separación y visualización en geles de electroforesis de dos dimensiones (2D-PAGE) y su identificación por espectrometría de masas. Estas aproximaciones tienen limitaciones importantes en la separación y visualización de proteínas debido a sus características intrínsecas (altamente hidrofóbicas, glicosiladas y de alto peso molecular) (Pitarch, Sanchez *et al.* 2002) por lo que posteriormente se han utilizado otras estrategias sin geles, basadas en cromatografía líquida y espectrometría de masas (Castillo, Calvo *et al.* 2008; Hernaez, Ximenez-Embun *et al.* 2010; Vialas, Perumal *et al.* 2012).

En el año 2006, se publicó una estrategia proteómica libre de geles para facilitar el estudio de las proteínas expuestas en la superficie celular de bacterias patógenas utilizando en ese primer trabajo *Streptococcus* del grupo A (Rodríguez-Ortega, Norais *et al.* 2006).

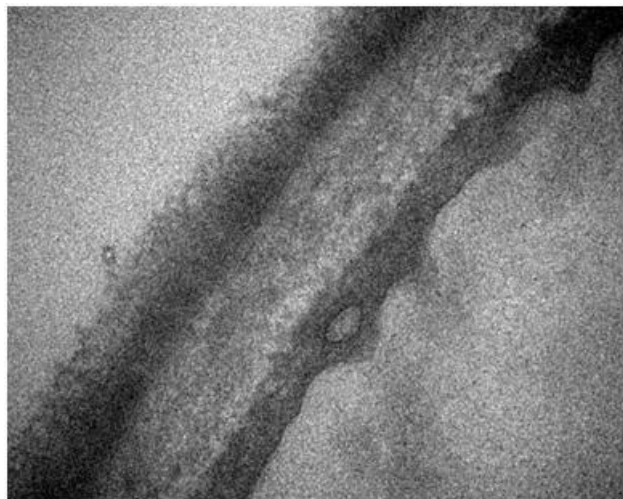
Hernández y colaboradores implementaron esta estrategia para ser utilizadas en levaduras: células enteras y vivas se tratan con tripsina y con DTT (un agente reductor) con el objetivo de digerir las proteínas localizadas en la capa más externa de la pared celular e identificar los péptidos obtenidos mediante espectrometría de masas (Hernaez, Ximenez-Embun *et al.* 2010).

Tanto en los estudios que han utilizado geles 2D, como en los que han realizado aproximaciones libres de gel, han descrito dos grupos de proteínas: uno de proteínas clásicas de pared celular con péptido señal necesario para su transporte a través de la ruta de secreción, sitios potenciales para la *O* y *N*-glicosilación y señales de anclajes tipo GPI, y otro grupo de proteínas atípicas que carecen de estas señales en su secuencia. El grupo de proteínas atípicas incluye enzimas ampliamente estudiadas e implicadas tanto en rutas metabólicas de carbohidratos (Eno1, Tdh3, Pdc11) y de aminoácidos (Met6). A estas proteínas se les han

denominado, proteínas multifuncionales (Nombela, Gil *et al.* 2006), de las cuales se conoce el papel que desempeñan en la pared celular, pero que su hallazgo constante en aproximaciones proteómicas por diferentes grupos de investigación indica que se encuentran presentes en esta estructura. Chaffin, en el 2008 publicó una exhaustiva revisión de cada una de las publicaciones cuyo objetivo era la identificación de proteínas de la pared célula en los distintos fenotipo celulares que presenta *C. albicans* (levadura o célula planctónica, hifa y biofilms) y los protocolos de extracción para cada una de las proteínas identificadas (Chaffin 2008).



Objetivos



**OBJETIVOS**



## 4. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es realizar un estudio global de las proteínas de la superficie celular de *C. albicans* y de otras especies de *Candida*, además de profundizar en el estudio de algunas de estas proteínas como marcadores de diagnóstico de las candidiasis invasivas o como posibles vacunas. Para ello se plantearon los objetivos específicos que se exponen a continuación:

**I.** Estudio del proteoma de la superficie celular de *C. albicans* durante la transición dimórfica, así como del proteoma de la superficie de otras especies de *Candida non-albicans*, mediante la estrategia proteómica basada en la digestión trípica en células vivas y posterior identificación de proteínas mediante espectrometría de masas y análisis bioinformático.

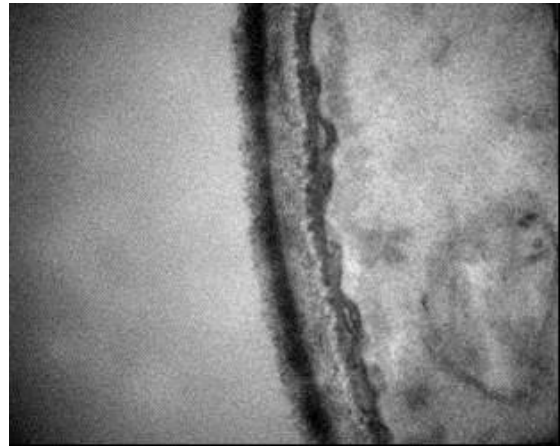
**II.** Expresión y purificación de dos proteínas de la pared celular de *C. albicans*: Ecm33 y Bgl2.

**III.** Estudio de la capacidad de Ecm33 y Bgl2 de proteger frente a una infección sistémica de *Candida albicans* en un modelo murino.

**IV.** Evaluación de la utilidad de Ecm33 y Bgl2 como marcadores biológicos para el diagnóstico de la candidiasis invasiva en un grupo piloto de sueros de pacientes con candidemia.

**V.** Profundización en el estudio de la implicación de la proteína Ecm33p en la biogénesis de la pared celular de *C. albicans*.





# MATERIALES Y METODOS



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Las cepas de *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *C. albicans* y *Candidas no-albicans* empleadas en este trabajo se detallan en la Tabla 4.

**Tabla 4:** Microorganismos Utilizados en este trabajo

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$ F'	<i>K12 <math>\Delta</math>(lacZYA-argF)<sub>u169</sub> supE44 thi-1 recA1 endA1 hsdR17 gyrA relA1 (<math>\phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15)F'</i>	(Hanahan 1983)
<i>P. pastoris</i>		
<b>GS115</b>	<i>his4</i>	Invitrogen
<i>C. albicans</i>		
<b>SC5314</b>	Cepa silvestre.	(Gillum, Tsay <i>et al.</i> 1984)
<b>RML2U</b>	<i>ura3<math>\Delta</math>::imm434/ura3<math>\Delta</math>::imm434::URA3 ecm33<math>\Delta</math>::hisG/ecm33<math>\Delta</math>::hisG</i>	(Martinez-Lopez, Park <i>et al.</i> 2006)
<i>C. glabrata</i>		
<b>CBS138</b>	Cepa silvestre.	(Koszul, Malpertuy <i>et al.</i> 2003)
<i>C. parapsilosis</i>		
<b>CDC317</b>	Cepa silvestre.	(Wang, Shen <i>et al.</i> 2012)
<i>C. tropicalis</i>		
<b>CBS 94</b>	Cepa silvestre.	(Veser, Geywitz <i>et al.</i> 1979)

### 5.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Los medios de cultivo se prepararon utilizando agua desionizada mediante sistemas de purificación Millipore. Para la obtención de medios de cultivo sólidos se añadió bacto-agar a una concentración final de 20 g/L. La esterilización se llevó a cabo en autoclave a 121°C durante 20 min. La composición de cada medio se detalla en la Tabla 5.

**Tabla 5:** Medios de cultivo Utilizados en este trabajo.

Medio de cultivo	Composición	Utilidad
YPD YEPD	20 g/L glucosa, 20 g/L peptona, 10 g/L extracto de levadura.	Crecimiento de levaduras
Medio Mínimo o SD	2% glucosa; 0,5% sulfato amónico; 0,17% base nitrogenada sin aminoácidos (yeast nitrogen base, Pronadisa); 0,192% mezcla de aminoácidos ura- (synthetic complete (kaiser) drop-out: -ura, Formedium); 0,01% uracilo (sigma).	Crecimiento de levaduras
Medio Lee pH6.7/pH4.2	(Lee <i>et al.</i> , 1975). 0,2 g/l sulfato magnésico, 2,5 g/l fosfato dipotásico, 5,0 g/l cloruro sódico y 5 g/l sulfato amónico y por último los siguientes aminoácidos 0,5 g/l L-alanina, 1,3 g/l L-leucina, 1,0 g/l L-lisina, 0,1 g/l L-metionina, 0,07 g/l L-ornitina, 0,5 g/l L-fenilalanina, 0,5 g/l L-prolina, 0,5 g/l L-treonina 25 mL/l glucosa 50% y 1 mL/l biotina 0,1%.	Inducción de filamentación pH: básico, levaduras pH: ácido.
LB	10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L cloruro sódico	Crecimiento de <i>E. coli</i>
BMGY	1% extracto de levadura, 2% peptona, 100mM fosfato de potasio, pH6.0, 1.34% YNB**, $4 \times 10^{-5}$ % Biotina, 1% glicerol	Crecimiento de <i>P. pastoris</i>
BMG/BMM	100mM fosfato de potasio, pH6.0, 1.34% YNB**, $4 \times 10^{-5}$ % Biotina, 1% glicerol / 0.5% metanol	Crecimiento de <i>P. pastoris</i> / Inducción de expresión de Bgl2

Los componentes en azul, fueron filtrados para su esterilización.

### 5.2.1. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO

El crecimiento de los cultivos se determinó mediante medida de la densidad óptica de los mismos, midiendo la absorbancia a 600nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640. Antes de la determinación, las muestras se diluyeron convenientemente con el fin de que su absorbancia se encontrara en un intervalo de valores tal que existiera linealidad entre la lectura de la densidad óptica y el número de células del cultivo.

Para aquellos ensayos en los que se requería una determinada concentración de células en suspensión, se llevaron a cabo recuentos en cámara de Neubauer mediante observación directa en un microscopio Nikon Optiphot.

---

### 5.2.2. INDUCCIÓN DE FASE FILAMENTOSA EN *C. albicans* PARA EL ESTUDIO DE LA TRANSICIÓN DIMÓRFICA

Para los ensayos de filamentación, las cepas de *C. albicans* crecieron durante la noche en YPD líquido a 30°C. Posteriormente, el cultivo fue transferido e incubado a 37°C en Medio Lee pH 6.7 durante 6 horas con y sin suplemento del 10% de suero humano proveniente de donantes sanos. En una concentración inicial de aproximadamente  $5 \times 10^6$  células por mL.

---

### 5.2.3. CRECIMIENTO DE LEVADURAS

Las cepas de *C. albicans* fueron cultivadas en placas o medio líquido de YPD a 30°C. Para el estudio del surfoma crecieron durante la noche en YPD líquido a 30°C, de este cultivo se tomaron 10mL en fase logarítmica, se lavaron 3 veces con PBS. Posteriormente, el cultivo se transfirió e incubó a 37°C en Medio Lee pH 4.2 durante 6 horas en una concentración inicial de  $5 \times 10^6$  células por mL.

En el caso de *Candida no-albicans*, las levaduras se tomaron de un pre-inóculo de 4 horas y se ajustó el cultivo en medio mínimo a una densidad óptica de tal forma que tras la incubación a 37°C durante toda la noche esta estuvieran en fase logarítmica en el momento del análisis.

Para los experimentos de vacunación se utilizó *C. albicans* de un cultivo en placa de 24horas en agar YPD.

La cepa de *P. pastoris* fue cultivada en placas o medio líquido de YPD a 30°C. Luego en cada uno de los medios indicados para la expresión de proteínas.

---

### 5.2.4. MEDIDA DE LA VIABILIDAD CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para la determinación de la permeabilidad selectiva de la membrana celular se utilizó el método basado en la incorporación de yoduro de propidio. Para ello se llevaron a una concentración  $1 \times 10^6$ /mL células, Estas fueron marcadas con 10 $\mu$ l de yoduro de propidio 5mM, y se analizó con FACScan citómetro de flujo, y se determinó el porcentaje de muerte de las células. Se realizó en el Centro de Citometría de Flujo de la Universidad Complutense de Madrid.

---

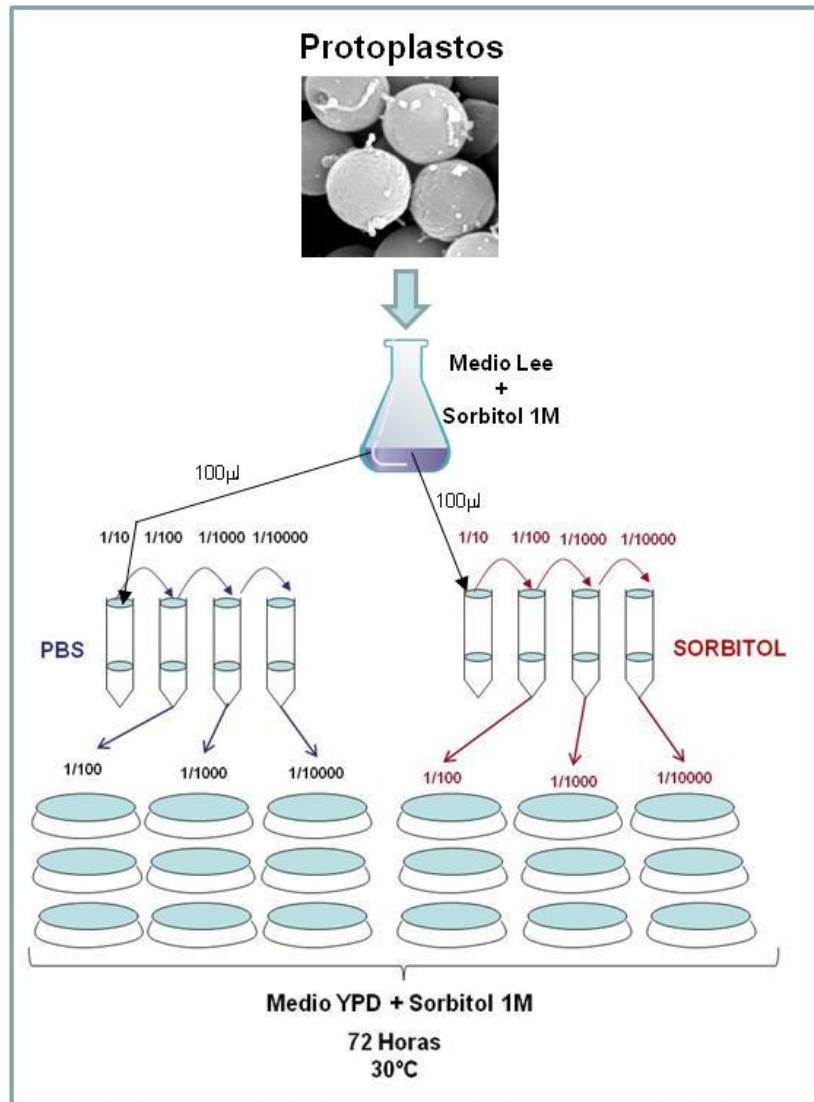
#### 5.2.5. OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS

Para la obtención de protoplastos de *C. albicans* de la cepa silvestre SC5314 y de la cepa mutante RMLU2 ( $\Delta\text{ecm33}$ ). Las células fueron cultivadas en 200mL de medio YPD hasta alcanzar una densidad óptica de 1.2 a 600nm, mediante centrifugación se recogieron 100mL de cultivo a 3500rpm y se lavaron dos veces con PBS. Se resuspendieron en un volumen final 200 mL, de una solución de pre-tratamiento (10 mM Tris-HCl, pH 9,5mM EDTA, 1% v/v 2-mercaptoetanol) en la cual se incubaron a 30°C y 80rpm durante 30min. Posteriormente las células se lavaron dos veces con una solución de sorbitol 1M, ajustando a una concentración de  $5 \times 10^8$  células/mL y se resuspendieron, en un volumen final de 100mL de sorbitol 1M, a esta solución se le añadió 30 $\mu$ L de Glusulasa (Du Pont®) por mL de cultivo. Estas se incubaron a 30°C a 80rpm hasta conseguir la formación de más del 90% de protoplastos lo que se evaluó en microscopio de luz, agregando agua y observando la lisis de los protoplastos ya formados (Nombela, Pomes *et al.* 1987; Pardo, Monteoliva *et al.* 1999). A continuación los protoplastos se lavaron cinco veces se resuspendieron en sorbitol 1M y se centrifugaron a 800rpm. La regeneración de los protoplastos se realizó en medio Lee con sorbitol 1M.

---

#### 5.2.6. EVALUACIÓN DE LA FRAGILIDAD OSMÓTICA DE PROTOPLASTOS EN PROCESO DE REGENERACIÓN

Se utilizó la metodología propuesta por (Nishiyama, Aoki *et al.* 1995) con modificaciones. Para la evaluación de la capacidad de regeneración de la pared celular de los protoplastos de *C. albicans* tanto de la cepa silvestre SC5314 como la cepa mutante RML2U, se evaluó la fragilidad osmótica de las células en diferentes tiempos de regeneración 0, 3 y 24horas, para lo cual se realizaron 3 réplicas biológicas, los protoplastos obtenidos en cada uno de los tiempos de regeneración fueron puestos en contacto a 2 condiciones independientes, unos en PBS y otros en una solución 1M de sorbitol, durante 3min posteriormente se realizaron 4 diluciones en serie, de las cuales se sembraron las últimas 3 de forma masiva en la superficie de placas que contenían YPD suplementado con 1M de SORBITOL, incubados a 30°C, cada dilución fue sembrada por triplicado. Para obtener datos de fragilidad osmótica se realizaron recuentos de unidades formadoras de colonias hasta 72 horas después de sembrados los medios (Figura 8).



**Figura 8** Diseño metodológico para la evaluación de la fragilidad osmótica de protoplastos a diferentes tiempos de regeneración de las cepas de SC5314 y RMLU2. Los protoplastos fueron sometidos a cambios osmóticos poniéndolos en contacto con el PBS y Sorbitol 1M y posteriormente sembrados en medio YPD suplementado con sorbitol 1M.

### 5.3. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

#### 5.3.1. MICROSCOPIA ÓPTICA

La observación de las muestras biológicas se llevó a cabo en un microscopio Olympus BH-2. Las fotografías se tomaron utilizando una cámara Panasonic CCD acoplada al microscopio, utilizando el programa informático Capture 6.0 X para la captación de las imágenes.

---

### 5.3.2. MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA Y CONTRASTE DE FASES

Para la evaluación de la unión de la fracción del complemento C3 sobre la superficie de filamentos inducidos con suero humano, se colocó una gota de cultivo de hifas sobre porta-objetos sensibilizados previamente con poli-L-Lisina (SIGMA), esta fue incubada durante 45min a temperatura ambiente, posteriormente se colocó suero policlonal, anti-C3 (100 $\mu$ l de una dilución 1:100) 45min a 30°C, luego se lavó 5 veces con PBS, al cabo de los lavados se marcó con 100 $\mu$ l de una dilución 1: 2.500 de anti-IgG de conejo conjugado con fluorocromo verde (800 $\lambda$  de LICOR®), se incubó 30min a 30°C. Para su posterior análisis en el microscopio de fluorescencia, se colocó un cubre-objetos con anti-fading (DABCO™). Las imágenes fueron obtenidas utilizando el microscopio Nikon Optiphot, equipado con lámpara halógena de Nikon y filtros de longitudes de onda adecuados. Las fotografías se realizaron en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-U, acoplado a una cámara Hamamatsu Orca-ER. El software empleado para la captación y procesamiento de las imágenes fue CAPTURE 6.0.

---

### 5.3.3. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La preparación de las muestras para microscopía electrónica se llevó a cabo siguiendo el método descrito por (Nishiyama, Aoki *et al.* 1995) con ligeras modificaciones. Un volumen de 1mL por cada muestra fue recogido por centrifugación y lavado con PBS dos veces para eliminar los restos de medio, se añadió una solución de fijación (formaldehído 2%, glutaraldehído 1% y cacodilato sódico 0,1M: pH 7,4, Sorbitol 1M) dejándose actuar durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, lavar 3 veces 10min con Tampón Cacodilato + Sorbitol 1M, y Post-fijar con 2% OsO<sub>4</sub> en Cacodilato, durante toda la noche en oscuridad a 4°C, lavar 3x con Cacodilato, se deshidrataron con diferentes concentraciones de etanol en serie creciente de etanol (20%, 30%, 50% 70%, 90%, 96%, y 4 veces 100% absoluto) de 10min en cada una, inmediatamente se llevaron las muestras en etanol al servicio de microscopía donde se realizó el punto crítico donde se intercambié etanol con CO<sub>2</sub> líquido en un equipo BALZERS CPD 030. Posteriormente se realizó una evaporación de grafito sobre las muestras en un equipo MED 010 BALZERS UNION que más tarde se recubrieron con oro en un equipo EMITECH SCD 004. Las muestras fueron examinadas en un microscopio de barrido JEOL JSM-6400 (Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid).

#### 5.3.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO POR CRIOFRACTURA

Se realizó en el Centro de Servicios de Microscopía del CSIC en el Instituto de Ciencias Agrarias, basado en la técnica propuesta por Branton, D. en 1966. Las levaduras suspendidas en PBS se colocaron en porta-muestras de bronce bajo la lupa, luego se congelaron por inmersión manual en nitrógeno líquido y se procesaron para criofractura. En este método, las muestras congeladas fueron fracturadas en alto vacío posteriormente fueron separadas del porta muestras, el cual actúa como un molde, posteriormente las muestras se recubrieron por una capa de carbono y otra de platino. El análisis se realizó en el microscopio SEM Zeiss 960 equipado con un sistema de microanálisis por energía dispersiva de rayos X Link ISIS (Oxford) y de un detector de retrodispersados de cuatro diodos de KE Developments. El SEM está equipado con su sistema de para la observación de muestras congeladas Cryotrans CT-1500 de Oxford.

#### 5.4. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DEL DNA

Los métodos de manipulación de DNA que se han utilizado en este trabajo son los convencionales y se realizaron según se describen en los manuales clásicos de Biología Molecular (Ausubel *et al.*, 1993; Sambrook *et al.*, 1989). Dichos protocolos se siguieron para:

##### 5.4.1. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE *C. albicans*

Se realizó por el método descrito por (Chu, Magee *et al.* 1993), 10mL de un cultivo de *C. albicans* en medio YPD en fase logarítmica, se centrifugaron 5 min a 5000 rpm, posteriormente se resuspendieron las células en 640µl de una solución de pretratamiento (128µl de EDTA 0.5M + 0.9µl de β-mercaptoetanol, y 511µl de Sorbitol 1M), se incubaron en esta solución durante 1hora a 37°C a 800rpm, posteriormente se le añadieron a la mezcla anterior 5µl de zimoliasa (21mg/mL), y se incubaron nuevamente a 37°C en movimiento giratorio hasta que se formaron los protoplastos. Se centrifugaron a 2000rpm 10min y el precipitado se resuspendió con 640mL de TE+32µl de SDS al 10% y se incubó a 65°C durante 1hora, a esta mezcla añadir 160µl de Acetato de potasio 5M el cual se incubó en hielo durante 1h, posteriormente se centrifugó 25 min a 10.000rpm y se eliminó el precipitado. Al sobrenadante se le agregó 0.6 volúmenes de isoporpanol lentamente y se mezcló suavemente hasta que se observaron las hebras de DNA, luego se centrifugó 15min

a 10.000 rpm y se lavó con etanol al 75% frío, finalmente se eliminó el etanol y se resuspendió en 100µl de TE.

#### 5.4.2. ANÁLISIS DE RESTRICIÓN DE DNA Y LIGACIONES

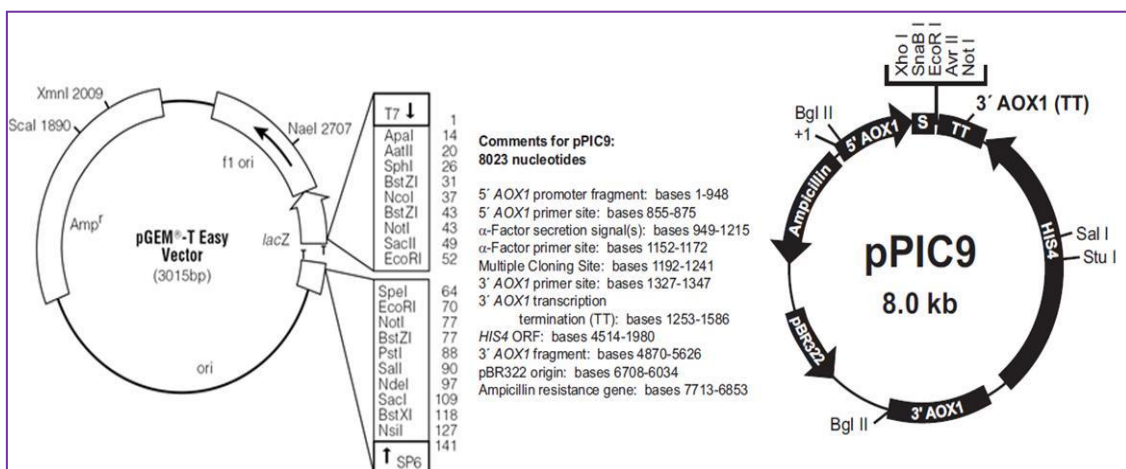
Tanto las enzimas de restricción como las enzimas de DNA ligasa, DNA fosfatasa y Klenow procedían de Boehringer-Mannheim y fueron utilizadas de acuerdo con los manuales de las casas comerciales.

#### 5.4.3. GELES DE AGAROSA

La concentración de agarosa varió desde 0,8% hasta 2% según el tamaño de la banda a analizar. Los patrones de pesos moleculares también procedían de Boehringer-Mannheim. Para la elución de DNA a partir de los geles de agarosa se utilizó el sistema comercial "QIAquick Gel Extraction Kit Protocol".

#### 5.4.4. TRANSFORMACIÓN DE DNA

La transformación rutinaria de plásmidos (Figura 9) y ligaciones se realizó por el método de Hanahan (Hanahan, 1983).



**Figura 9** Esquemas de los plásmidos utilizados en ese trabajo pGEMT easy y pPIC9.

#### 5.4.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLÍMERASA (PCR)

Los protocolos básicos utilizados en las amplificaciones por PCR pueden encontrarse tanto en los manuales clásicos de Biología Molecular (Ausubel *et al.*, 1993), como en libros más específicos (Erlich 1989). Se utilizó un termociclador "PTC-150 MiniCyclerTM" (MJ Research). Los desoxinucleótidos fueron proporcionados por la

casa comercial Boehringer Mannheim. En las amplificaciones exclusivamente de comprobación, se utilizó la enzima Taq polimerasa, los tampones y el MgCl<sub>2</sub> de Perkin Elmer/Roche. En las demás amplificaciones se utilizó la polimerasa, MgCl<sub>2</sub> y tampones del sistema "Expand High Fidelity PCR Sistem" (Boehringer- Mannheim) que introduce muy pocos errores.

Las condiciones de cada PCR se adaptaron a las necesidades de cada experimento. La temperatura de hibridación de los oligonucleótidos en cada amplificación fue calculada mediante el programa informático OLIGO 5,0 (Medprobe) y adaptada empíricamente. El volumen total de cada PCR fue de 100µl cuando se trataba de una PCR preparativa y de 50µl en el caso de PCR analíticas, en las que sólo interesaba la aparición o no de una determinada banda. La secuencia detallada de los oligonucleótidos utilizados en el transcurso del trabajo se muestra en la Tabla 6. El diseño de los oligonucleótidos para que se cumplieran las condiciones requeridas, tanto para la secuenciación como para las amplificaciones por PCR, se realizó mediante el programa informático OLIGO 5,0 (Medprobe).

**Tablas 6:** Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Cepa	Secuencia	Utilidad
Bgl2 up	5'GCT ACT GCG GAG GAA GGA CC 3'	Clonación en pGEM-T
Bgl2 down	3' CTC GTT CAC TTT GAC TTT GCC 3'	Clonación en pGEM-T
pPic-XhoI	5'CTC GAG AAA AGA GAA ATG GGT GAT TTG GCT TTC 3'	Clonación en pPIC9
pPic-NotI	5' GTA GTA GCG GCC GCC TTA GTT GAA TTT ACA GTC 3'	Clonación en pPIC9
5'-AOXI	5'GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC 3'	Expresión en <i>P. pastoris</i>
3'-AOXI	5'GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC 3'	Expresión en <i>P. pastoris</i>
C terminal H tag up	5'-CTTTAAGAAGGAGATATACC + ATG	Proteomaster
C terminal H tag up	5'-ATCGTATGGGTAGCTGGTCCC	Proteomaster

## 5.5. SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.

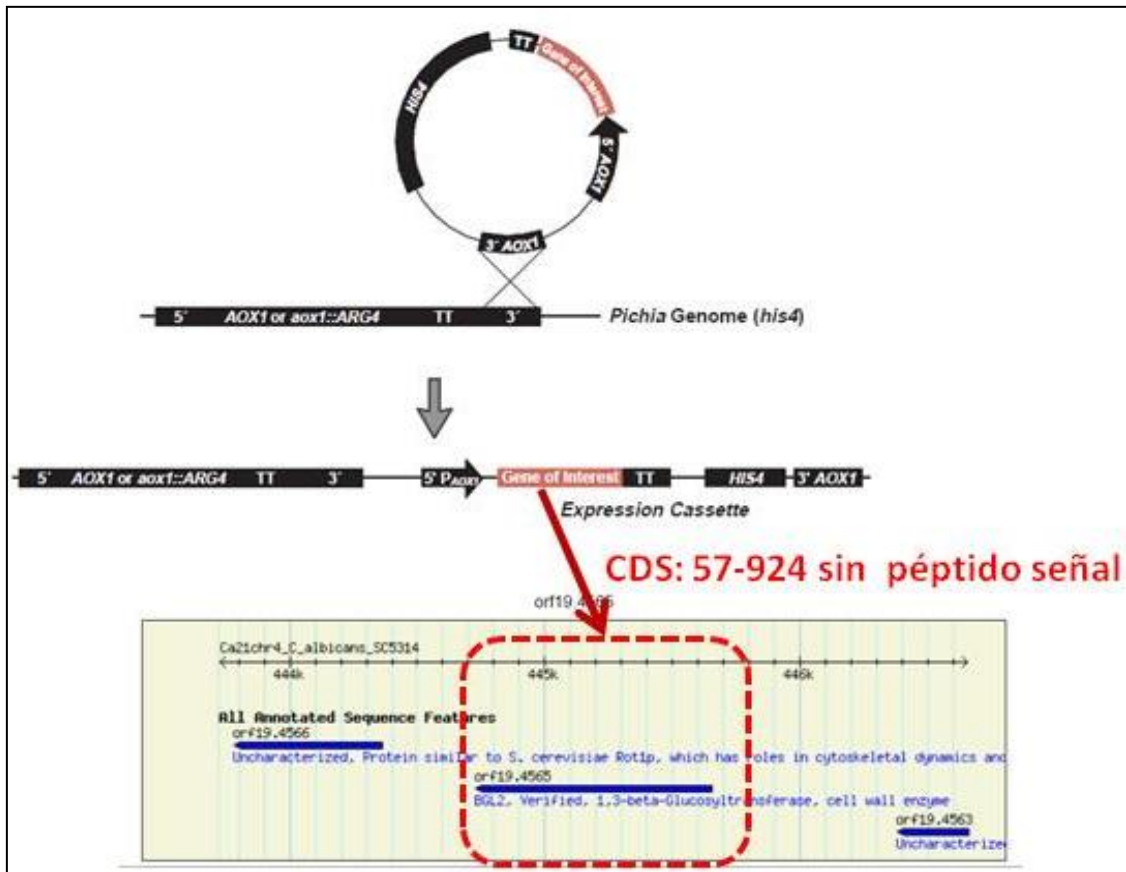
### 5.5.1. *Pichia pastoris*, “PICHIA EXPRESSION KIT” DE INVITROGEN

Para la expresión de Bgl2 se utilizó, la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (cepa GS115) capaz de metabolizar metanol como única fuente de carbono mediante la enzima alcohol oxidasa y el plásmido pPIC9 de Invitrogen Corporation (San Diego Ca., USA). En este sistema se utiliza el promotor que regula la producción del alcohol oxidasa (*AOX1* y *AOX2*) para dirigir la expresión de proteínas heterólogas.

El gen *BGL2* de *C. albicans* que codifica para la 1,3-beta-glucosiltransferasa se amplificó por PCR sobre el DNA genómico de *C. albicans* y se clonó en el vector pGEM-Teasy. Sobre uno de los clones obtenidos (comprobados por secuenciación) se amplificó un fragmento que contenía: las dianas *XhoI* y *NotI* (para clonarlo en pPIC9 (vector necesario para la expresión de proteínas en la levadura *P. pastoris*), se había eliminado el péptido señal de la proteína Bgl2 y se había añadido la señal de corte para que suceda la secreción de la proteína expresada. El fragmento amplificado se clonó en pGEM-T easy y se secuenció para su comprobación. Este clon se digirió con las enzimas *XhoI* y *NotI*, y se ligó con el vector pPIC9 dando lugar al nuevo plásmido pPIC9-BGL2 de 8.840 pb (Figura 10). Para comprobar que la secuencia de *bgl2* estaba clonada en fase con el marco de lectura abierta de la secuencia de corte para la secreción de la proteína se diseñaron los oligos 5' AOXI y 3' AOXI indicados en la Tabla 6 y se llevó a cabo la secuenciación de algunos clones seleccionados. La construcción de cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras del gen *BGL2* de *C. albicans*, se efectuó mediante la transformación por la técnica de electroporación de la cepa GS115 de *P. pastoris* con el vector construido pPIC9-BGL2 previamente linearizado con la enzima *BglII*.

Las células transformadas se seleccionaron por auxotrofia para histidina (transformantes GS115 His+), y las cepas recombinantes que se obtuvieron (His<sup>+</sup>Mut<sup>+</sup> e His<sup>+</sup>Muts) se analizaron: su fenotipo mediante crecimiento en medio selectivo, su genotipo mediante PCR y por su fenotipo mediante crecimiento en placa de cultivo cinéticas de crecimiento, detección de transcritos de Bgl2, análisis de proteínas por western blot de Bgl2 e identificación de la proteína por espectrometría de masas, de cepas cultivadas bajo condiciones de inducción del gen heterólogo clonado. Esta caracterización genotípica se realizó determinando por PCR la presencia del gen *AOX1* y el gen heterólogo en el genoma de cada cepa. El fenotipo Mut<sup>+</sup> de una de las cepas seleccionadas se analizó a través de la

capacidad de utilizar el metanol como única fuente de carbono, determinando la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación de la cepa cultivada con inducción de metanol. Las condiciones en las que se obtuvo la mayor cantidad de proteína expresada fueron: Inducción con 0.5 de metanol durante 4 días, en agitación a 250 rpm a 28°C.



**Figura 10:** Esquema de la construcción genética del plásmido pPIC9BGL2.

### 5.5.2. RTS 500 PROTEOMASTER KIT PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN UN SISTEMA LIBRE DE CÉLULAS

El sistema libre de células comercializado por industrias ROCHE. Está basado en un estrategia metodológica descrita desde 1961 por (Nirenberg, Matthaei *et al.* 1963) y se fundamenta en el uso de un lisado celular de *E. coli* el cual contiene los ribosomas y la maquinaria suficiente para la traducción y transcripción de proteínas y que a pesar de que no se obtienen cambios post-traduccionales como las glicosilaciones. Con esta estrategia se expresaron tanto Bgl2 como ecm33.

### **- Bgl2,1,3-beta-glucosiltransferasa:**

Para expresar Bgl2, se partió del clon de *E. coli* que tenía la inserción del gen de *BGL2* (utilizado para la expresión en *Pichia pastoris*). A esta construcción se le realizaron dos inserciones, una el promotor T7 y una etiqueta de hemoaglutinina en el carbono termina (Figura 11).

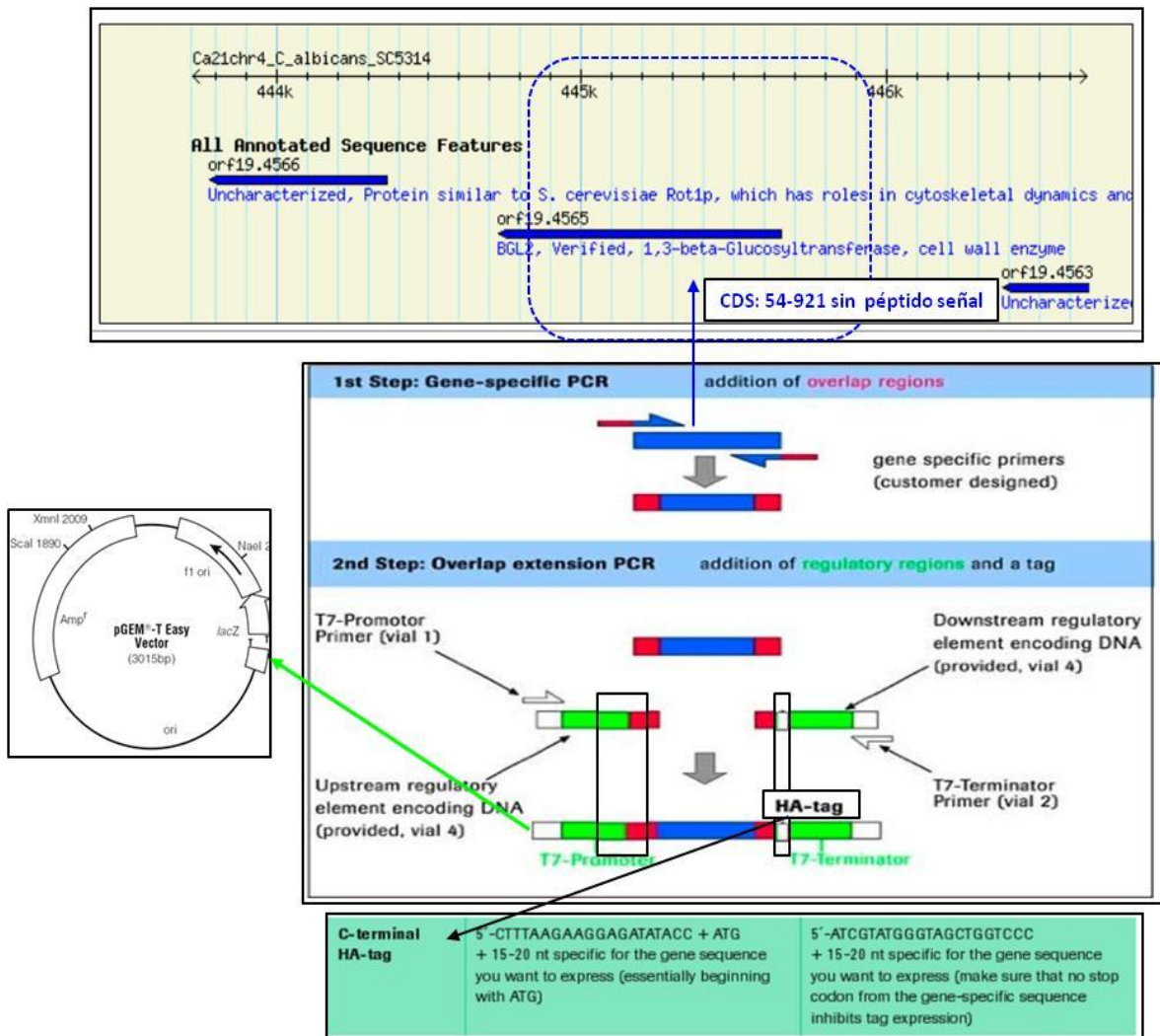
### **- Ecm33:**

Llevamos a cabo la producción de proteína Ecm33p por medio del proteomaster. Para ello, y siguiendo las instrucciones de aparato, realizamos una construcción en la que situamos nuestra proteína (a la que hemos eliminado el péptido señal) con el promotor y terminador T7 necesarios para la obtención de proteína en proteomaster. Además le añadimos una cola de polihistidinas en el extremo C-Terminal. Una vez obtuvimos la proteína en el ensayo que hacemos utilizando el kit RTS100 pasamos a clonar la construcción en Pgem-T Easy y obtener la proteína a gran escala en el Proteomaster.

## **5.6. SISTEMAS DE PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

### **5.6.1. INMUNOPRECIPITACIÓN**

La proteína Bgl2 expresada en el sistema libre de células del proteomaster se expresó con una etiqueta de hemoaglutinina (HA) en el C-terminal, Se purificó por inmunoprecipitación con el uso de Dynabeads® Pan Mouse IgG de Invitrogen, las cuales se sensibilizaron con el anticuerpo monoclonal anti HA.11 clon 16B-12. de COVANCE. Las condiciones en cuanto a proporciones de Dynabeads® más Ac anti-HA, y posteriormente Dynabeads®-Ac anti-HA más extracto crudo de Bgl2, fueron titulados por separado, con el objetivo de optimizar los resultados. Las condiciones más adecuadas son descritas a continuación: 250µl de Dynabeads®, se sensibilizan con 5ul de Ac anti-HA durante 3 horas a 4°C en rueda, en una solución de PBS, EDTA 0.05mM, 1% de BSA. Posteriormente se lavan 3 veces, uniéndolas cada vez, al magneto DynaMag™, con el buffer inicialmente utilizado. Posteriormente se añaden 50ul del extracto crudo de Bgl2 (proteomaster) y se deja incubando toda la noche a 4°C en una rueda. Se repite el proceso de lavado 10 veces y se procede a eluir con 250 µl de buffer desnaturante (tris-EDTA 0.5M PH 6.8 0.8mL, SDS 10% 1mL, DTT 1M 200µl, PBS 0.5mL). Se lleva a ebullición a 99°C durante 5min se retiran las dynabeads con el uso del magneto, se transfiere el eluído a otro tubo tipo eppendorf y se congela a -80°C.



**Figura 11:** Esquematación de la construcción génica para la expresión de Bgl2 en el sistema libre de células RTS ROCHE®.

### 5.6.2. HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)

La proteína recombinante Ecm33 se expresó con una cola de histidinas con el fin de purificarla mediante una cromatografía de afinidad a níquel, ya que los anillos de imidazol de las histidinas poseen una alta afinidad al catión Ni<sup>2+</sup> que se encuentra covalentemente unido a la matriz de la columna. Este tipo de cromatografías de selectividad tan elevada facilita la purificación de las proteínas, pudiéndose conseguir altos grados de pureza. Con este propósito, se diluyó la proteína expresada en el sistema de proteomaster (1mL) en 14mL 1:15, de buffer fosfato pH 7.4 con inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets ROCHE®) (0.1M) y se solubilizó agregando al volumen total de 15mL de extracto proteico, 250µl de SDS 10%, posteriormente se centrifugó la muestra a 4°C (30min, 3800rpm) para comprobar que no quedaba proteína insoluble y se filtró

(diámetro de poro 0.45 $\mu$ m; Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Con el extracto proteico solubilizado y filtrado se inició el procedimiento de purificación por el sistema de HPLC donde se acopló una columna de níquel-sefarosa (volumen de 1mL; His Trap HT LG) inicialmente la columna se equilibró con buffer fosfato.

El sistema de HPLC Ettam™ LC, se encuentra ubicado en la Unidad de Proteómica de la UCM y coordinado por el Dr. Felipe Clemente Velarde. Una vez equilibrada la columna se inició con inyecciones de 0.8mL de extracto proteico cada 10min, se realizó un lavado entre cada inyección de muestra. Cuando se terminó de inyectar los 15 mL de muestra se lavó la columna con 20 volúmenes de tampón 1 (Buffer fosfato pH 7.4) con 0.5% de tampón b (Imidazol 1M Sigma Aldrich) para limpiarla de las proteínas que no se unían, para eluir las proteínas que se unían de forma inespecífica. Posteriormente se realizó una curva de elución que iba a partir de 5% de tampón B (Imidazol 1M) hasta el 100% de tampón B en 10 min. La proteína se consiguió eluir en el primer ciclo entre el 40 y el 60% de tampón B. Los pasos de la purificación se verificaron mediante una electroforesis en un gel SDS-PAGE y Western Blot frente a un suero policlonal obtenido previamente, la proteína purificada se congeló a -80°C.

---

### 5.6.3. FPLC (FAST PROTEIN LIQUID CHROMATOGRAPHY)

La proteína recombinante Bgl2 se expresó sin etiqueta, con el objeto de tener la proteína lo más parecida a su forma nativa y que no perdiera características inmunogénicas. Para purificarla se procedió de la siguiente forma: en un paso previo se utilizó una columna monoQ (de intercambio iónico), para posteriormente, los picos seleccionados en este paso, separarlos mediante FPLC (columna de intercambio iónico). La selección de los picos que contenían la proteína de interés (proteína recombinante Bgl2) se hizo mediante la técnica de inmunoblot. Este procedimiento fue realizado por la Dra. Arancha Llama en el Departamento de Biotecnología de la E.T.S. Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid, siguiendo el protocolo descrito por (Sheehan 1996).

## 5.7. METODOLOGÍAS DE ANALISIS DE PROTEÍNAS

### 5.7.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

**-Método de Bradford:** La cantidad de proteína en las muestras se determinó siguiendo el método de Bradford (Bradford 1976). Para realizar la recta patrón se utilizó una solución de albumina sérica bovina de concentración conocida (2.5 mg/mL) y se realizaron diluciones entre 0.75 y 25 µg/mL. El reactivo de Bradford fue suministrado por la casa Bio-Rad.

**-Método espectrofotométrico:** En ocasiones la estimación de la concentración de la proteína de una muestra se llevó a cabo midiendo su absorbancia a 280nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640, considerando que 1 unidad de absorbancia a dicha longitud de onda corresponde aproximadamente a una concentración de 1mg/mL de proteína.

### 5.7.2. SDS-PAGE Y METODOLOGÍAS DE DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

**- Electroforesis SDS-PAGE:** Los geles se realizaron siguiendo el sistema descrito en (Laemmli 1970). Utilizando el sistema Mini Protean II (Bio-Rad) se prepararon geles de poliacrilamida de 1.75 mm de grosor con el separador al 10% y 12% y el concentrador de 1cm y se utilizaron peines de 10 pocillos y 15 pocillos según el caso.

Las muestras de proteínas que fueron separadas por electroforesis de 1D SDS-PAGE, Se colocaron en buffer de carga (Tris HCl pH 6.8 100 mM; SDS 4%; Glicerol 20%; Azul de bromofenol 0.2%; DTT 200 mM). Las muestras se llevaron a ebullición durante 10 min a 99°C y se centrifugaron a 13.000 rpm 5 min.

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo en geles de poliacrilamida, según el método descrito en (Laemmli 1970) a 150V durante 1hora. Se utilizó el sistema Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell (Bio-Rad), cargando hasta 45µl de proteína de cada muestra y el patrón de pesos moleculares BenchMark Prestained Protein Ladder (Invitrogen) y utilizando como tampón de electroforesis: Tris 25 mM; Glicina 250 mM; SDS 0.1%.

**-Transferencias:** Para realizar las transferencias se utilizaron membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) y tampón de transferencia (Metanol 20%; tampón 10X (Tris 48 mM; Glicina 39 mM; SDS 0.46 g/l)) (Towbin, Staehelin *et al.*

1979). Para los geles 1D-PAGE se utilizó el sistema Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) y se llevó a cabo a 100 V durante 1:15 hora. Se comprobó la eficacia de la transferencia de las proteínas del gel a la membrana usando una solución de rojo de Ponceau (rojo de Ponceau 0.2%, ácido acético 10%) y lavando con PBS hasta ver las manchas proteicas claramente.

**-Western blot o inmunoblot:** La técnica de inmunoblot se llevó a cabo siguiendo protocolos standard (Ausubel *et al.*, 1993). En primer lugar se bloqueó la membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham), a la cual se habían transferido todas las proteínas, con leche al 5% en TTBS (Tris-HCl 100mM, pH 7.5, NaCl 50mM, Tween-20 0.05%), durante toda la noche. Posteriormente se procedió al lavado de la membrana con TTBS, durante 8 min, 5 veces. A continuación se realiza la hibridación de los anticuerpos presentes en los diferentes sueros obtenidos de los pacientes con candidiasis o individuos sanos o sueros policlonales obtenidos de conejo, en una dilución 1:100 en TTBS al 0.5% de leche desnatada en polvo para minimizar las uniones inespecíficas y acida de sodio al 0.01% y se deja incubando 2 horas en agitación. Se procedió posteriormente al lavado de la membrana con TTBST, durante 10min, 5 veces. Los anticuerpos secundarios utilizados son anti-IgG marcados con fluorocromos IRDye que se leen o a 800CW(verde) o a 680CW(rojo) LI-COR Biosciences anti-ratón, anti-conejo o anti-humano según el caso, todos se utilizaron en una dilución 1:10.000 disueltos en la misma solución que el primero, y se deja incubando 2 horas en agitación, finalmente se realizan lavados con TTBS durante 10 min, 5 veces, se dejás en TTBS y posteriormente se escanea en el equipo de LI-COR Biosciences, con el software de odyssey. Agradecimiento para el Dr. Fernando Vivanco, jefe asociado del Departamento de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz, por la producción de los sueros policlonales para las proteínas recombinantes Bgl2 y Ecm33.

**-Tinción de geles con plata:** Se empleó el Kit Bio-Rad "Silver Stain". Siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la electroforesis de SDS-PAGE 1D, los geles fueron lavados en agua desionizada durante 5min. A continuación se incubaron en etanol: ácido acético: agua (40:10:50) durante 1hora, como mínimo. Los geles se lavaron entonces con agua 1 vez se colocaron con el agente oxidante durante 5min. Posteriormente se lavaron con agua milli-Q en un tiempo máximo de 15min. Luego se tiñeron con el reactivo de plata durante 20min en agitación constante, se realiza un único lavado rápido no mayor a 30 segundos con abundante agua milli-Q y se procede a revelar. El proceso de revelado debe hacerse en agitación y retirando el revelador en el que aparezca un precipitado marrón,

cambiándolo por nueva solución reveladora, este proceso se realiza tantas veces sea necesario hasta que observe la muestra que está tiñendo, finalmente se retira y se lava 1 vez con agua milli-Q y se deja en una solución de ácido acético al 5%, se puede dejar en esta, o a la hora cambiarla por agua milli-Q. Todos los pasos han sido realizados con agitación en un orbital a 50rpm.

**-Tinción con coomasie coloidal:** Para realizar la tinción con Coomassie coloidal compatible con espectrometría de masas, los geles se colocaron con solución de fijación (Etanol 50%, Ácido fosfórico 2%) toda la noche. Al día siguiente se hicieron tres lavados con agua Mili-Q de 10min cada uno para eliminar la solución de fijación, los geles se dejaron agitándose en una solución de sulfato amónico 17%, ácido fosfórico 3% y metanol 33% durante una hora, tras este tiempo se les añadió una solución de 5mL de Coomassie Blue G-250 6,6% (Bio-Rad) en etanol y se dejó en agitación durante toda la noche, posteriormente se destiñeron con sucesivos lavados con agua Mili-Q hasta que quedaran visibles las manchas proteicas y poco fondo.

## 5.8. TÉCNICAS PROTEÓMICAS

### 5.8.1. OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS TRÍPTICOS

Para la identificación de proteínas de la superficie celular de *C. albicans* y otras especies de *Candidas* se utilizó el método descrito por (Hernaiz, Ximenez-Embun *et al.* 2010) y se realizó en la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense y el Parque Científico de Madrid. En el que en levaduras o hifas vivas se llevó a cabo una digestión leve con tripsina de la superficie celular, para ello las células en pellet, se resuspendieron en 800 $\mu$ l de Bicarbonato amónico 25mM, se adicionó 5 $\mu$ g de Tripsina y DTT 0.1mM a una concentración final, se dejó actuar 5 min a 37°C y 600rpm para el caso de levadura e hifas obtenidos en medio lee, y en el caso de hifas inducidas con suero humano , se realizó con 10 $\mu$ g de tripsina durante 30min el resto de parámetros fueron los mismos. La reacción de la tripsina se paró con la adición de 100 $\mu$ l de ácido trifluoroacético (TFA) al 1%. Posteriormente se centrifugo 3 min a 10.000rpm, se pasó el sobrenadante por un filtro millipore de 0.22 $\mu$ m. y se concentró la muestra en "speed-vac", hasta obtenerse la muestra en un volumen de alrededor 2 $\mu$ l, el cual se resuspendió en 10 $\mu$ l de TFA 0.1%.

## 5.8.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR FRAGMENTACIÓN DE PÉPTIDOS EN TRAMPA IÓNICA

### a. Cromatografía de fase reversa en microcolumna (R2).

Antes del análisis por espectrometría de masas, con el objetivo de eliminar sales y concentrar la muestra, se pasó por una microcolumna con el material PorosR2@ (PerSeptive Biosystems), que se acopló manualmente en una punta amarilla. Ésta se acondicionó con acetonitrilo al 80% y se equilibró con TFA al 0.5%, tras lo cual se pasó la muestra por la columna. Se lavó la columna 3 veces con TFA al 0.1%, se procedió a eluir los péptidos con 50µl de acetonitrilo 80%, en un eppendorf, se secó la muestra en speed-vac y finalmente se resuspendió en 20µl de ácido fórmico al 5%. Luego se procedió al análisis de los péptidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés High Performance Liquid Chromatography) de fase reversa (RP, del inglés *reverse phase*) acoplada a una trampa de iones lineal con ionización por electrospray HPLC-ESI-LTQ o ORBITRAP VELOZ

### b. Linear Trap Quadrupole, (Thermo Electron):

Los péptidos fueron analizados utilizando cromatografía líquida/MS-MS (LC/MS-MS) en un espectrómetro de masas de tipo LTQ (Linear Trap Quadrupole, Thermo Electron San Jose, CA, USA). Posteriormente fueron separados en una columna C 18 (DIONEX), aplicando una velocidad de flujo de 250µl/min. Se utilizaron agua al 98% y acetonitrilo al 80% con 0,1% de ácido fórmico como disolventes A y B, respectivamente. El gradiente, empezó y se mantuvo durante 5 min al 5% de B, después subió al 70% de B durante 130min, y por último subió al 98% de B donde se mantuvo otros 5min. El espectrómetro de masas operó en el modo data-dependent adquiriendo automáticamente en MS y MS/MS. Los parámetros de scanning fueron los siguientes: Full scan MS (400-1800 m/z) con 12 de scan Zoom y MS/MS (isolation with 0,5 m/z), y energía de colisión normalizada 35%. El scanning se realizó usando una lista de exclusión dinámica (45s, tamaño de lista de exclusión de 500)

### c. Velos Orbitrap LTQ (Thermo Scientific):

Los péptidos se cargaron en una columna C18-A1 ASY-2 cm pre-columna (Thermo Scientific) y después se eluyó en una columna de Biosfera C18 (C18 diámetro, interior 75µm, 15cm de largo, 3µm tamaño de partícula) (Nano/separación) y se separaron usando un gradiente de 140min (110 min 0 a 40% de tampón B, Tampón A: 0,1% de ácido fórmico, 2% de ACN; tampón B: 0,1% de ácido fórmico

en ACN) a una velocidad de flujo de 250nl/min en un HPLC nanoEasy (Proxeon) acoplado a una fuente de iones nanoelectrospray (Proxeon). Los espectros de masas se adquirieron en la Velos Orbitrap LTQ-(Thermo Scientific) en el modo de iones positivos. De exploración completa espectros de MS (m/z 400 hasta 1400) se adquirieron en la Orbitrap con un valor objetivo de 1.000.000 a una resolución de 60.000 a m/z 400 y los 15 iones más intensos se seleccionaron para disociación inducida por colisión (CID) fragmentación en el LTQ con un valor objetivo de 10.000 y energía de colisión normalizada del 38%. Precursor ion cargo de detección y selección de estado precursor monoisotópico fueron habilitadas. Los iones de una sola carga y no asignados de carga fueron rechazados. El scanning se realizó usando una lista de exclusión dinámica (30s, tamaño de lista de exclusión de 450).

Se consideraron proteínas identificadas aquellas cuyos péptidos superaban los siguientes parámetros: probabilidad de péptido de  $10^{-3}$ , X-Corr de 2,0 (+2), 2,5 (+3). Los valores calculados para los FDR se encontraban entre 0,4 y 1,2%. Cada muestra se ionizó 2 veces. Para las búsquedas de proteínas en los programas informáticos (ver herramientas bioinformáticas 3.9), se utilizaron los péptidos detectados, en las dos ionizaciones. Finalmente, se tuvieron en cuenta las proteínas que se identificaron por 1 péptido en 3 experimentos, por 2 péptidos en por lo menos 2 experimentos y/o con más de 3 péptidos en 1 experimento.

### 5.8.3. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTOMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF/TOF

En el caso de la identificación de bandas de proteínas procedentes de los geles SDS PAGE, teñidos con Azul de coomasie coloidal, las bandas fueron cortadas manualmente con hojas de bisturí y transferidas a un tubo tipo eppendorff con 50µl de agua Milli-Q para su posterior digestión e identificación en la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense y el Parque Científico de Madrid. La identificación se realizó mediante huella peptídica o mediante fragmentación de péptidos utilizando un espectrómetro de masas de tipo MALDI-TOF/TOF (*MALDI-tandem time-of-flight mass spectrometer 4800 Proteomics Analyzer*). Se recurrió a la fragmentación de péptidos en los casos en los que la huella peptídica no conducía a una identificación clara de la proteína. Las identificaciones de proteínas se llevaron a cabo utilizando como motor de búsqueda MASCOT (MatrixScience (<http://www.matrixscience.com>)) en una base de datos no redundante de *Candida*: *Candida Genome Database* (CGD21) o NCBI.

## 5.9. BASES DE DATOS Y HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

Durante la realización de la tesis doctoral se han consultado diferentes bases de datos disponibles en Internet así como distintas herramientas bioinformáticas. Las más utilizadas se listan a continuación:

### 5.9.1. BASES DE DATOS

Las proteínas obtenidas se clasificaron de acuerdo a su función biológica basándose en las siguientes bases de datos:

- SWISS-PROT <http://us.expasy.org/sprot/>
- CGD <http://www.candidagenomedatabase.org/>

Con el fin de interpretar biológicamente los datos generados, los resultados obtenidos se analizaron con diferentes herramientas bioinformáticas de anotación funcional. Estas herramientas permiten integrar la información biológica de cada proteína recogida en las diferentes fuentes públicas (por ejemplo NCBI, SWISS-PROT, GO), de forma que se puedan estudiar los datos de un modo más analítico y global. Las proteínas son analizadas y clasificadas en función de sus características (función biológica, propiedades bioquímicas, localización). Para la integración de los datos y anotación funcional se emplearon las siguientes direcciones:

- Funspec: <http://funspec.med.utoronto.ca/>
- GoTermfinder: <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder>
- Proteopathogen: <http://proteopathogen.dacya.ucm.es/>

**Pubmed.** Base de datos de revistas científicas de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>.

Candida albicans Genome Sequence Project: Base de datos del Stanford Genome

---

## 5.9.2. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS:

---

### 5.9.2.1. ANÁLISIS DE SECUENCIAS

SignalP V1.1, World Wide Web Prediction Server. Permite el análisis de secuencias para la búsqueda de secuencias señales ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)) (Nielsen, Engelbrecht *et al.* 1997). Big PI-Predictor GPI Modification Site Prediction Programa que localiza los potenciales anclajes a GPI de una secuencia. (<http://mendel.imp.univie.ac.at/gpi>) (Eisenhaber, Bork *et al.* 1998) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Enfrenta secuencias tanto aminoacídicas como nucleotídicas con todas las existentes en las bases de datos proporcionando un listado de todas aquellas secuencias con homología a la secuencia en estudio.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

---

### 5.9.3. MOTORES DE BÚSQUEDA

Para la identificación de proteínas a partir de los espectros obtenidos se creó un listado de valores que correspondían con los iones de cada péptido detectado. Los péptidos obtenidos, se compararon con péptidos teóricos de las proteínas existentes en las bases de datos, en este caso se utilizaron 2 motores de búsqueda:

#### **Software Proteome Discoverer versión 1.2.0.208 (Thermo).**

usa para la búsqueda la "Candida DataBase". los parámetros de búsqueda que utiliza son:

Tolerancia de péptidos: 300ppm

Tolerancia del fragmento del ion: 0.6 Da

Sitios de corte: 1

El punto de corte que utiliza, para filtrar a partir de la puntuación "score" (X-Corr) dada es de 2.0 (+2), 2.5 (+3).

#### **MASCOT 2.3.0**

Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes:

- Metionina oxidada Como modificación variable
- Tolerancia de masas para péptidos de 600 ppm.

- 2 ausencias de sitios de corte de tripsina
- Tolerancia para los fragmentos de MS/MS de 0,8 Da.

Como filtro se aplicó "peptide confidence high".

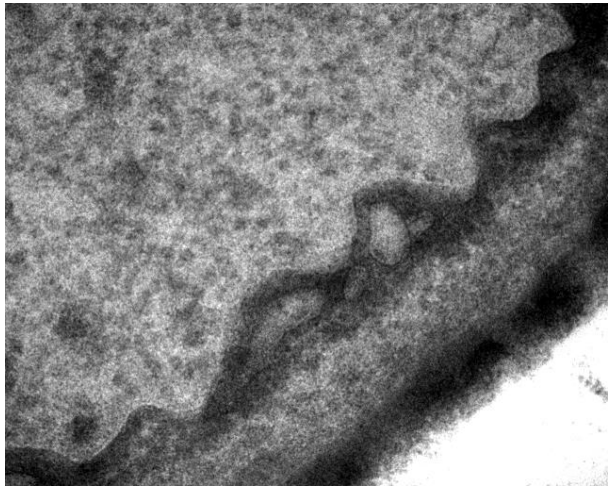
#### **5.10. MODELO MURINO PARA LA EVALUACIÓN DE VACUNAS**

Para los ensayos de inmunización se utilizó el modelo de infección sistémica de *C. albicans* descrito por Spellberg, B. J., *et al.* 2006. En este trabajo se utilizó la cepa de ratón BALB/c que presenta una baja susceptibilidad a la infección con *C. albicans*. Se trata de una cepa consanguínea proporcionada por los laboratorios Harlan France (Sarl, Francia). Y mantenidos en condiciones asépticas en el animalario de la Facultad de Medicina de la UCM. Siempre se utilizaron hembras de entre 13 y 16 semanas de edad y un peso de aproximadamente 20 gramos.

Para realizar la infección (Spellberg, Ibrahim *et al.* 2006) de peso, se ensayaron 5 concentraciones de proteína Bgl2 (0.003, 0.03 0.3, 3 y 30 $\mu$ g) y 2 grupos control (sin vacunar y con solo adyuvante). El protocolo de inmunización que se utilizó fue: administración por vía intraperitoneal con dos dosis. La primera de ellas se administró con adyuvante completo de Freud y la segunda con adyuvante incompleto. Las dosis se administraron con 15 días de diferencia. A los 30 días de la segunda inmunización se sacrificaron 2 ratones de cada grupo de concentración de proteína, los ratones restantes se infectaron con 5x10<sup>5</sup> células por mL de *C. albicans* por vía intravenosa. Los ratones fueron supervisados diariamente y se registró la supervivencia hasta el día 30 pos-infección.

Para la evaluación de ecm33 como vacuna, se tomaron 5 grupos (n=5) de ratones hembras BALB/c de 20 gramos de peso, se ensayaron 3 dosis de proteína ecm33 (0.3, 3 y 30 $\mu$ g) y 2 grupos control (sin vacunar y con adyuvante completo de Freud). El protocolo de inmunización que se utilizó fue: el mismo descrito para la inmunización con Bgl2

Todos los animales fueron tratados de acuerdo con las normas éticas dictadas por la Comunidad Europea.



**RESULTADOS**



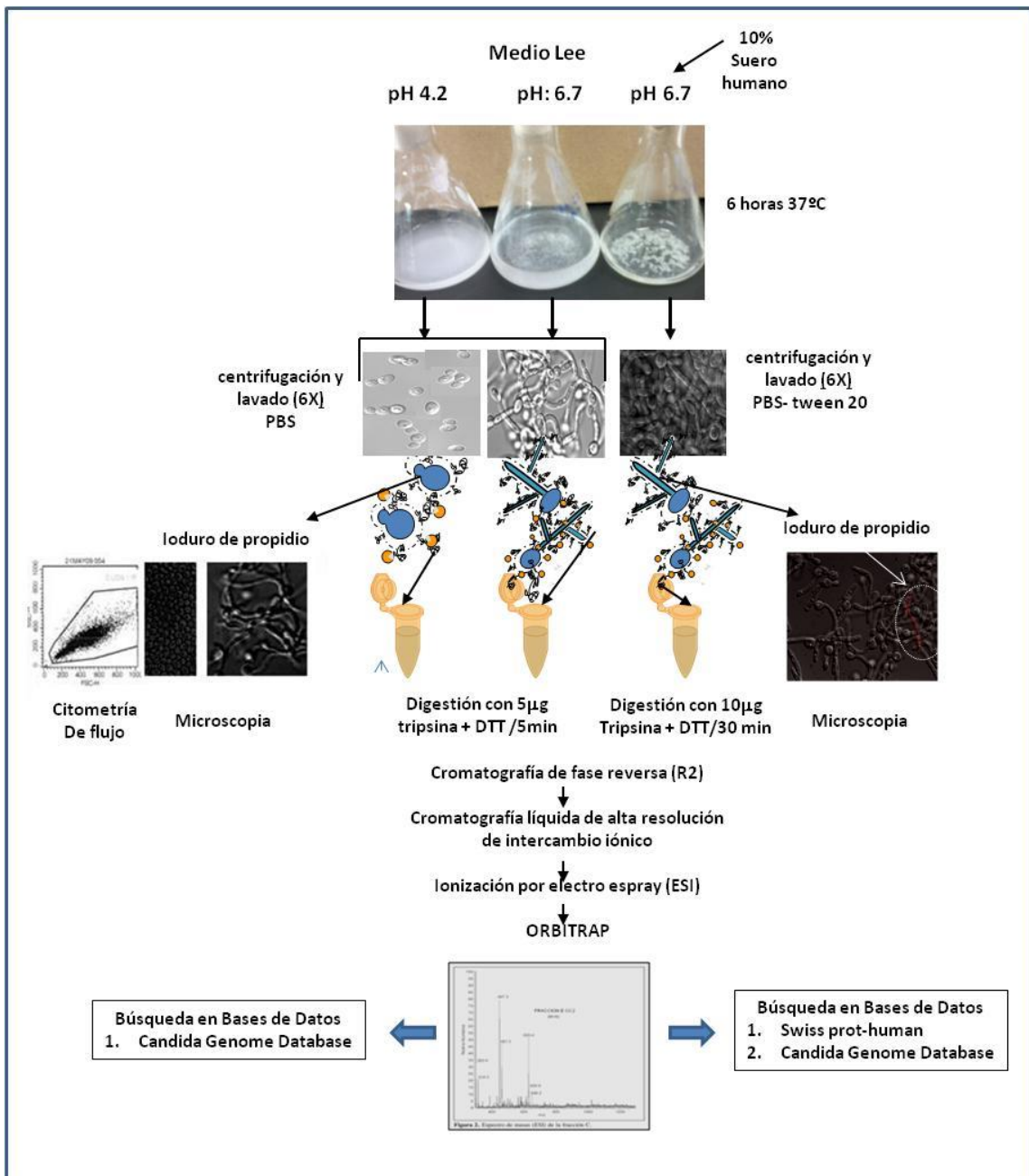
## 6. RESULTADOS

### 6.1. ESTUDIO DEL SURFOMA DE *C. albicans* DURANTE LA TRANSICIÓN DIMÓRFICA

#### 6.1.1. EVALUACIÓN GLOBAL DEL PROTEOMA SUPERFICIAL DE LEVADURAS E HIFAS DE *C. albicans*

En este trabajo se han estudiado las proteínas de la superficie de *C. albicans* en levadura, hifas, e hifas inducidas con suero humano. Para ello se ha utilizado una estrategia proteómica sin gel basada en la digestión trípica de células vivas para obtener los péptidos de las proteínas superficiales (Figura 12). Esta estrategia había sido puesta a punto para *C. albicans* y *S. cerevisiae* en nuestro grupo de investigación (Insenser, Nombela *et al.* 2006; Hernaez, Ximenez-Embun *et al.* 2010). Este protocolo a diferencia de las aproximaciones proteómicas clásicas, no requiere fraccionamiento sub-celular y la posterior separación y visualización de las proteínas por electroforesis bidimensional (2D-PAGE) (Pitarch, Sanchez *et al.* 2002).

Para la obtención de los distintos tipos celulares involucrados en la transición dimórfica de *C. albicans* utilizamos el medio Lee, en el cual con la variación del pH se controla el tipo celular que presenta el hongo, a pH 4.2 las células permanecen como blastoconidias y a pH 6.7 se inicia el proceso de filamentación. Además se estimuló la conversión a hifas suplementando el medio Lee con 10% de suero humano, con el propósito de intentar simular las condiciones existentes en una candidemia (estas muestras se llamaron hifas 10% S). Se inició el experimento con la inoculación de los 3 medios mencionados anteriormente con células en fase logarítmica procedentes de un cultivo en medio YPD, donde se lavaron y ajustaron a  $5 \times 10^6$  células por mL. El cultivo fue realizado a 37°C durante 6 horas. A continuación se lavaron, en el caso de levaduras e hifas crecidas en Lee, únicamente con PBS frío y en el caso de hifas procedentes del medio Lee suplementado con 10% de suero humano, se realizó un primer lavado con PBS-Tween 20 0.01% y 6 lavados posteriores con PBS. Se recogieron las células y se mantuvieron en hielo y posteriormente se realizó el proceso de tripsinización, obtención y lavado de péptidos trípticos, separación por HPLC y análisis en un espectrómetro de masas Orbitrap, para finalmente identificar las proteínas del surfoma. Un esquema de todo el proceso se muestra en la Figura 12. Se realizaron 3 réplicas biológicas en levaduras e hifas 10%S y 4 réplicas biológicas en hifas. El número total de identificaciones en cada réplica de cada una de las muestras fue reproducible, Tabla 7.



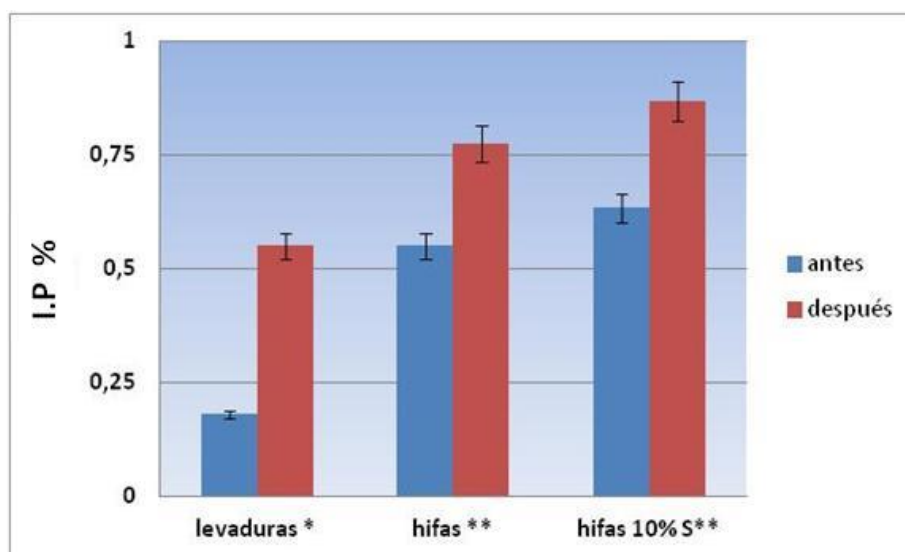
**Figura 12:** Estrategia proteómica utilizada para la caracterización del surfoma durante la transición dimórfica de *C. albicans*.

En el lado izquierdo se representa la obtención de péptidos trípticos e identificación de proteínas a partir de levaduras e hifas obtenidas en medio Lee y en el lado derecho la obtención de péptidos trípticos e identificación de proteínas de la superficie celular después de la inducción de filamentación de *C. albicans* con 10% de suero humano en medio Lee (hifas 10%S).

**Tabla 7:** Número de proteínas identificadas en cada experimento de levaduras e hifas de *C. albicans*.

Réplicas biológicas	Número de proteínas identificadas de <i>C. albicans</i>		
	Levaduras	Hifas	Hifas10% S
1	439	897	374
2	474	886	362
3	354	875	366
4	-	793	-

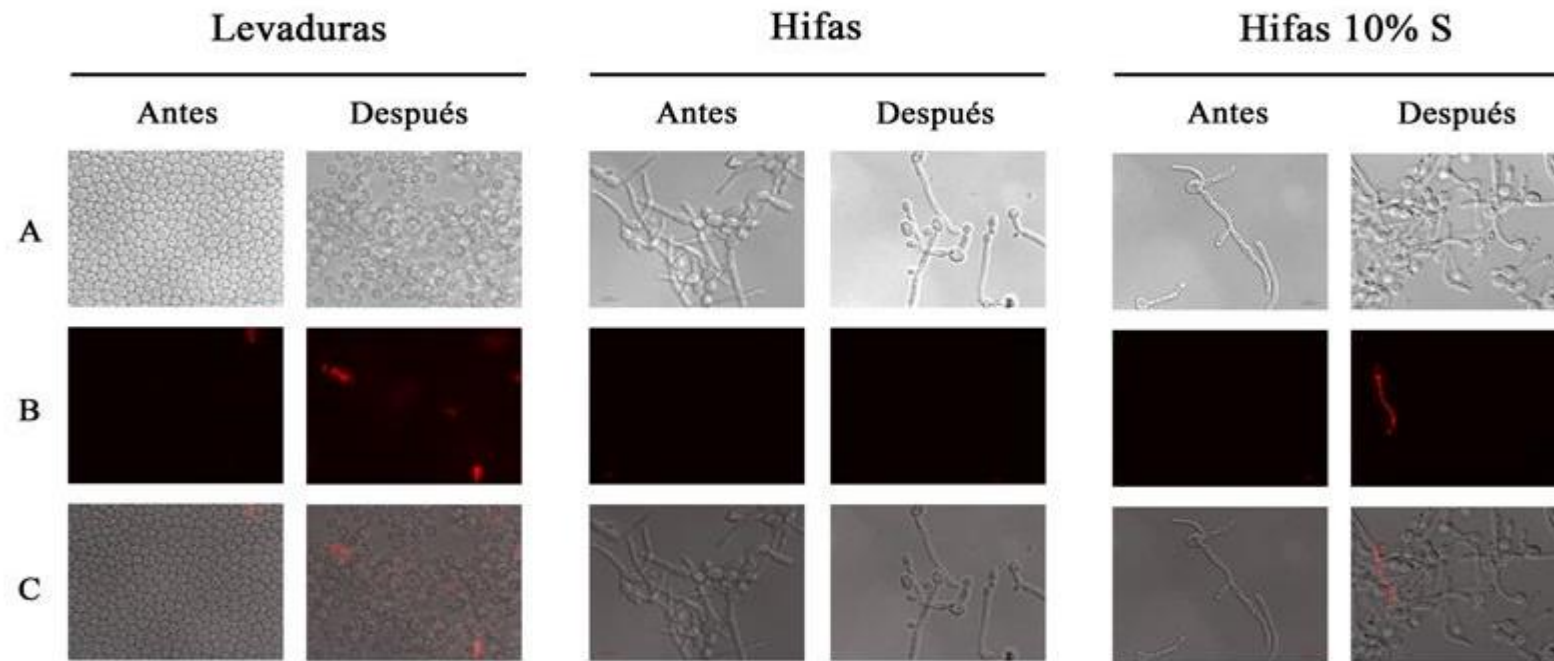
En esta aproximación proteómica es muy importante controlar la posible lisis celular después de la digestión con la tripsina. Por este motivo siempre se tomaron alícuotas de las células antes y después de tripsinizar, que se analizaron con la adición de yoduro de propidio y mediante citómetro de flujo en el caso de levaduras. En el caso de hifas se hizo un recuento en un microscopio de fluorescencia (Figuras 13 y 14). Por otro lado observamos la superficie celular, antes y después de tripsinizar, en un microscopio electrónico de barrido por criofractura, en el cual observamos una superficie celular rugosa después de la tripsinización a diferencia de la superficie lisa que se observó en células intactas (Figura 15)



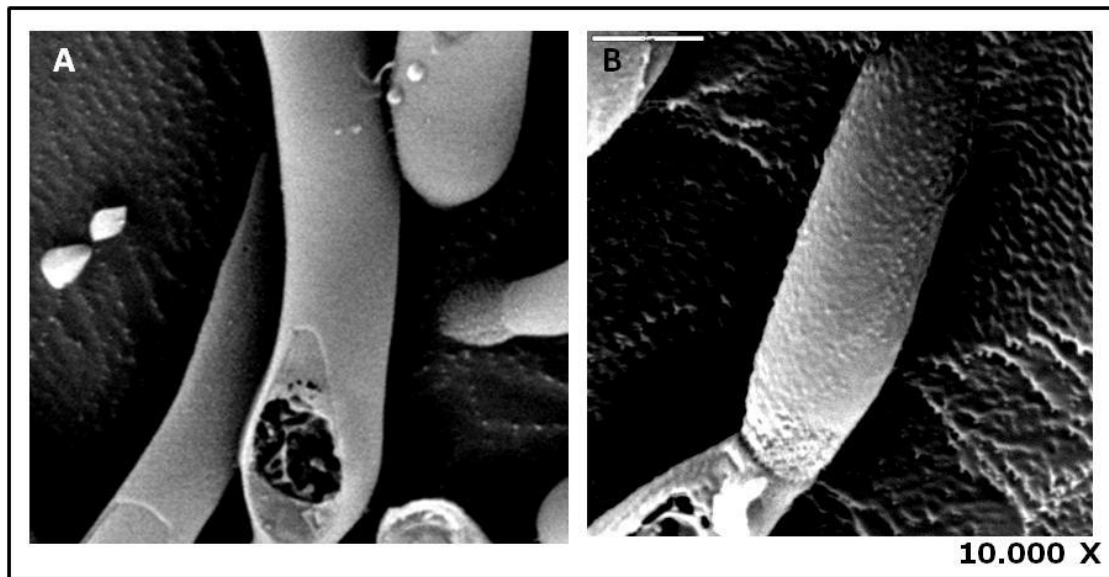
**Figura 13.** Porcentajes de células positivas para yoduro de propidio antes y después de realizar la digestión trípica de la superficie celular durante la transición dimórfica.

\*Células evaluadas mediante Citometría de flujo.

\*\*Células evaluadas mediante microscopía de fluorescencia.



**Figura 14:** Microscopia de las levaduras e hifas de *C. albicans* antes y después de la tripsinización A. Microscopia de luz visible, B. Microscopía de fluorescencia (tinción con yoduro de propidio). C. Imagen que combina microscopia de luz visible y microscopia de fluorescencia.



**Figura 15.** Microscopía electrónica de transmisión con criofractura de células de *C. albicans* antes (A) y después (B) de realizar la digestión con tripsina.

Para el análisis de las proteínas de las tres condiciones estudiadas: levaduras, hifas e hifas 10%S, se realizó una lista de proteínas para cada una de las condiciones experimentales (los resultados individuales de las proteínas identificadas en cada una de las réplicas biológicas se muestran en el material suplementario de la tesis). Para ello, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión: proteínas que hayan sido identificadas en al menos 3 réplicas biológicas, proteínas identificadas en dos réplicas biológicas con 2 o más péptidos y proteínas identificadas en una réplica biológica con 3 o más péptidos. Teniendo en cuenta estos parámetros se identificaron un total de 938 proteínas en el experimento de la transición dimórfica. Evaluando cada condición experimental por separado se identificaron 383 proteínas en levaduras, 914 proteínas en hifas y 303 proteínas de *C. albicans* en hifas 10% S. Además, en los análisis de las muestras obtenidas en medio suplementado con suero humano se identificaron 139 proteínas humanas en la superficie celular de las hifas de *C. albicans*. Para el análisis de las proteínas de *C. albicans* se realizó una clasificación en 11 categorías, estas fueron establecidas teniendo en cuenta su utilidad a la hora de proponer proteínas candidatas a dianas diagnósticas o terapéuticas (antifúngicos y/o vacunas), estas categorías son:

1. Proteínas con anclaje GPI
2. Proteína implicadas en la biogénesis y/o mantenimiento de la pared celular

## Resultados

3. Proteínas previamente identificadas en la superficie celular.
4. Proteínas inmunogénicas.
5. Proteínas específicas de hongos.
6. Proteínas relacionadas con la respuesta a antifúngicos.
7. Proteínas relacionadas con mecanismos de patogenicidad.
8. Proteínas relacionadas con la formación de "biofilms".
9. Proteínas relacionadas con la respuesta a condiciones de estrés.
10. Proteínas relacionadas con el citoesqueleto, esencialmente de actina.
11. Otras proteínas.

Esta clasificación se realizó teniendo en cuenta la descripción que se encuentra de cada proteína en la base de datos de *Candida*, CGD (Candida Genome Database), la cual se fundamenta tanto en hallazgos experimentales, como en estudios bioinformáticos.

La primera clasificación se realizó independientemente en cada uno de los listados de proteínas de levaduras, de hifas y de hifas 10%S y para cada una de las categorías, por lo que se puede encontrar la misma proteína en varias categorías (Tabla 8).

**Tabla 8.** Proteínas identificadas en la superficie de levaduras, hifas e hifas 10%S.

CATEGORIA*	LEVADURAS	HIFAS	HIFAS 10%S
Anclaje GPI	Als1, Als2, Als3, Cht2, Crh11, Eap1, Ecm33, Ecm331, lhd1, Pga4, Pga45, Pga53, Phr1, Phr2, Plb3, Plb4.5, Rbt1, Rbt5, Rhd3, Sap9, Ssr1, Utr2, Pga52, Rbt4, Sap10,	Als1, Als3, Cht2, Crh11, Dfg5, Eap1, Ecm33, Hyr1, lhd1, Pga4, Pga45, Pga53, Phr1, Phr2, Plb3, Plb4.5, Rbt1, Rbt5, Rhd3, Sap9, Sod5, Ssr1, Utr2, Pga52, Rbt4, Pga10, Pga63.	Als1, Als3, Cht2, Crh11, Ecm33, lhd1, Pga4, Pga45, Pga53, Phr1, Phr2, Plb3, Plb4.5, Rbt1, Rbt5, Rhd3, Sap9, Sod5, Ssr1, Utr2, Dfg5, Hyr1, Plb5, Pga10, Pga63, Sap10.
	25	27	26
Biogénesis y mantenimiento de la pared celular	Abg1, Atc1, Bgl2, Cht2, Cht3, Crh11, Csp37, Ecm33, Eng1, Gda1, Gfa1, Gpd2, Hex1, Mnn2, Mnt1, Mp65, Orf19.3414, Orf19.3683, Orf19.4246, Pga4, Phr1, Phr2, Pir1, Pmi1, Pmm1, Rbe1, Rho1, Scw11, Sim1, Slk19, Srb1, Sun41, Tma19, Utr2, Xyl2, Ywp1.	Arp2, Atc1, Bgl2, Bud7, Chs5, Cht2, Cht3, Crh11, Csp37, Cys4, Ecm17, Ecm33, Eng1, Frs1, Gal10, Gda1, Gfa1, Gna1, Gpd2, Gsc1, Hex1, Kre9, Mnn7, Mnt1, Mp65, Orf19.3414, Orf19.3683, Orf19.4246, Orf19.7124, Pga4, Phr1, Phr2, Pir1, Pmi1, Pmm1, Pmr1, Pmt1, Pmt2, Psa2, Rbe1, Rho1, Rvs167, Scw11, Sim1, Slk19, Smi1, Srb1, Sun41, Tma19, Uap1, Utr2, Xyl2, Ywp1.	Bgl2, Cht2, Crh11, Csp37, Ecm33, Eng1, Gda1, Gfa1, Gpd2, Mnn7, Mnt1, Mp65, Orf19.4246, Pga4, Phr1, Phr2, Pir1, Pmi1, Pmm1, Pmt2, Rho1, Scw11, Sim1, Slk19, Srb1, Tma19, Utr2, Ywp1.
	36	53	28
Superficie celular	Adh1, Als1, Als2, Als3, Ape2, Atc1, Atp1, Bgl2, Bmh1, Cdc19, Cef3, Cht2, Crh11, Csp37, Eap1, Ecm33, Ecm331, Egd2, Eno1, Gca1, Gda1, Gph1, Gpm1, Hem13, Hsp70, Hsp90, lhd1, Kar2, Mp65, Msb2, Orf19.2296, Orf19.251, Orf19.4886, Orf19.5126, Pdc11, Pga4, Pga45, Pga52, Pga53, Pgc1, Phr1, Pil1, Pir1, Plb3, Plb4.5, Rbe1, Rbt1, Rbt4, Rbt5, Rhd3, Rpl10, Rpl11, Rpl12, Rpl17b, Rpl18, Rpl19a, Rpl25, Rpl3, Rpl38, Rpl4b, Rpl5, Rpl6, Rps1, Rps10, Rps14b, Rps18, Rps21, Rps28b, Rps6a, Rps7a, Rps8a, Sam2, Sap10, Sap9, Scw11, Sim1, Slk19, Snz1, Srb1, Ssa2, Ssb1, Ssc1, Ssr1, Sun41, Tdh3, Tef1, Tkl1, Tma19, Tsa1, Ugp1, Utr2, Ywp1.	Adh1, Als1, Als3, Ape2, Atc1, Atp1, Bgl2, Bmh1, Cdc19, Cef3, Cht2, Crh11, Csp37, Dfg5, Eap1, Ecm17, Ecm33, Egd2, Eno1, Fre10, Gca1, Gda1, Gph1, Gpm1, Hem13, Hsp70, Hsp90, Hyr1, lhd1, Kar2, Mp65, Msb2, Orf19.2296, Orf19.251, Orf19.4886, Orf19.5126, Orf19.6082, Pdc11, Pga10, Pga4, Pga45, Pga52, Pga53, Pga63, Pgc1, Phr1, Pil1, Pir1, Plb3, Plb4.5, Pmt1, Rbe1, Rbt1, Rbt4, Rbt5, Rhd3, Rpl10, Rpl11, Rpl12, Rpl17b, Rpl18, Rpl19a, Rpl25, Rpl3, Rpl38, Rpl4b, Rpl5, Rpl6, Rps1, Rps10, Rps14b, Rps18, Rps21, Rps28b, Rps6a, Rps7a, Rps8a, Sam2, Sap9, Scw11, Sdh2, Sim1, Slk19, Snz1, Srb1, Ssa2, Ssb1, Ssc1, Ssr1, Sun41, Tdh3, Tef1, Tkl1, Tma19, Tsa1, Ugp1, Utr2, Vps1, Ywp1.	Adh1, Als1, Als3, Ape2, Bgl2, Bmh1, Cdc19, Cef3, Cht2, Crh11, Csp37, Dfg5, Ecm33, Egd2, Eno1, Gca1, Gda1, Gph1, Hem13, Hsp70, Hsp90, Hyr1, lhd1, Kar2, Mp65, Msb2, Orf19.2296, Orf19.251, Pdc11, Pga10, Pga4, Pga45, Pga53, Pga63, Pgc1, Phr1, Pil1, Pir1, Plb3, Plb4.5, Rbt1, Rbt5, Rhd3, Rpl10, Rpl11, Rpl12, Rpl17b, Rpl18, Rpl19a, Rpl25, Rpl3, Rpl38, Rpl4b, Rpl5, Rpl6, Rps1, Rps10, Rps14b, Rps18, Rps21, Rps28b, Rps6a, Rps7a, Rps8a, Sam2, Sap9, Scw11, Sim1, Slk19, Snz1, Srb1, Ssa2, Ssb1, Ssc1, Ssr1, Tdh3, Tef1, Tkl1, Tma19, Tsa1, Ugp1, Utr2, Ywp1.
	92	99	84
Inmunogénicas	Ach1, Aco1, Acs2, Ade17, Adh1, Ahp1, Atp1, Atp2, Bgl2, Cef3, Crh11, Ddr48, Efb1, Eft2, Eno1, Fba1, Gnd1, Gpm1, Gre3, Grp2, Hem13, Hsp70, Hxk2, Ilv5, Ino1, Ipp1, Lpd1, Mdh1, Met15, Met6, Mp65, Msi3, Orf19.1946, Pdc11, Pdi1, Pgi1, Pgc1, Pmm1, Qcr2, Rpl13, Rpp0, Sah1, Ssa2, Ssb1, Ssc1, Tdh3, Tif, Tkl1, Tos1, Tpi1, Tsa1, Xyl2, Yst1.	Ach1, Aco1, Acs2, Ade17, Adh1, Adh5, Ahp1, Atp1, Atp2, Bgl2, Cdc11, Cef3, Crh11, Cys4, Ddr48, Efb1, Eft2, Eno1, Fba1, Gnd1, Gpm1, Gre3, Grp2, Hem13, Hsp70, Hxk2, Ilv5, Imh3, Ino1, Ipp1, Leu1, Lpd1, Mdh1, Met15, Met6, Mp65, Msi3, Not5, Orf19.1946, Pdc11, Pdi1, Pgi1, Pgc1, Pmm1, Pol30, Por1, Qcr2, Rpl13, Rpp0, Sah1, Sec13, Shm2, Ssa2, Ssb1, Ssc1, Tdh3, Tif, Tkl1, Tos1, Tpi1, Tsa1, Xyl2, Yst1, Zwf1.	Acs2, Ade17, Adh1, Ahp1, Bgl2, Cef3, Crh11, Ddr48, Efb1, Eft2, Eno1, Fba1, Gnd1, Gre3, Grp2, Hem13, Hsp70, Hxk2, Ino1, Ipp1, Mdh1, Met15, Met6, Mp65, Msi3, Pdc11, Pdi1, Pgi1, Pgc1, Pmm1, Rpl13, Rpp0, Sah1, Shm2, Ssa2, Ssb1, Ssc1, Ssr1, Tdh3, Tif, Tkl1, Tos1, Tpi1, Tsa1, Yst1.
	53	64	44
Específicas de hongos	Abg1, Ade1, Adh2, Eng1, Fas1, Fmp27, His7, Lsp1, Lys1, Lys22, Mnt1, Pga4, Pil1, Plb3.	Ade1, Adh2, Aro1, Aro2, Aro7, Chs5, Dfg5, Eng1, Fas1, Gdh2, Gnp1, Gsc1, His7, Hom3, Leu42, Lsp1, Lys1, Lys22, Mca1, Mnt1, Nde1, Orf19.2269, Osm1, Pga4, Phm7, Pil1, Plb3, Pst3, Rgd3, Rib5, Sct1, Svf1, Tps2, Trr1, Ycp4.	Adh2, Dfg5, Eng1, Fas1, Lsp1, Lys1, Lys22, Mnt1, Pga4, Pil1, Plb3, Plb5, Pst3.
	14	35	13

Resultados

CATEGORIA*	LEVADURAS	HIFAS	HIFAS 10%S
<b>Relacionadas con respuesta a antifúngicos</b>	Aat1, Abp1, Acb1, Acc1, Ach1, Aco1, Adh1, Ado1, Ahp1, Ald5, Als2, Als3, Asr1, Atp1, Atp2, Atp5, Car2, Cdc60, Cht2, Crh11, Dag7, Dak2, Ddr48, Ecm33, Ecm331, Eft2, Eng1, Erg10, Erg13, Fas1, Fas2, Fba1, Fdh1, Fet3, Gdh3, Gis2, Glk1, Gph1, Gpm1, Grp2, Gua1, Hgt6, Hsp12, Hsp70, Hxk2, Ife2, Ils1, Ino1, Kre30, Lsc1, Lsp1, Lys22, Mbf1, Mir1, Mis11, Mp65, Msi3, Nhp6a, Nop1, Orf19.2286, Orf19.2296, Orf19.251, Orf19.2622, Orf19.3414, Orf19.3475, Orf19.3683, Orf19.3932, Orf19.4216, Orf19.5180, Orf19.6553, Orf19.7350, Orf19.822, Pck1, Pda1, Pdb1, Pdc11, Pet9, Pfk1, Pfk2, Pga45, Pga52, Phr2, Pir1, Plb3, Pma1, Rbt1, Rbt5, Rhd3, Rnr21, Rpl35, Sah1, Sap9, Scw11, Ssa2, Sun41, Tif, Tos1, Trx1, Tub2, Ura2, Vma2, Vma4, Xyl2, Ynk1, Zpr1.	Aat1, Abp1, Acb1, Acc1, Ach1, Aco1, Acs1, Ade5,7, Adh1, Adh5, Ado1, Ahp1, Ald5, Als3, Asr1, Atp1, Atp17, Atp2, Atp3, Atp5, Car2, Cat1, Cdc10, Cdc3, Cdc60, Cht2, Cla4, Cox13, Cox6, Cox9, Crh11, Crm1, Cys3, Dak2, Dap1, Dbp2, Ddr48, Def1, Dfg5, Ece1, Ecm33, Eft2, Eng1, Erg1, Erg10, Erg11, Erg13, Erg4, Erg6, Erg9, Fas1, Fas2, Fba1, Fdh1, Fre10, Frp3, Fum12, Gad1, Gal10, Gis2, Glk1, Gnp1, Gph1, Gpm1, Grp2, Grx3, Gsc1, Gua1, Hgt6, Hgt7, Hhf1, Hmg1, Hog1, Hom2, Hsp12, Hsp70, Hta1, Hxk2, Ife2, Ils1, Ino1, Kin3, Kre30, Lag1, Lsc1, Lsp1, Lys21, Lys22, Lys9, Mbf1, Mcr1, Met3, Mir1, Mis11, Mp65, Mrf1, Msi3, Mvd, Mxr1, Ncp1, Nde1, Nhp6a, Nmt1, Nop1, Ole1, Orf19.1902, Orf19.2286, Orf19.2296, Orf19.2452, Orf19.251, Orf19.2622, Orf19.3260, Orf19.337, Orf19.3414, Orf19.3475, Orf19.3683, Orf19.3932, Orf19.4216, Orf19.5095, Orf19.5180, Orf19.5517, Orf19.5947, Orf19.6014, Orf19.6553, Orf19.7034, Orf19.7160, Orf19.7310, Orf19.7350, Orf19.7368, Orf19.7384, Orf19.7522, Orf19.7531, Orf19.7602, Orf19.822, Orf19.951, Osm1, Pbs2, Pck1, Pda1, Pdb1, Pdc11, Pdx3, Pet9, Pfk1, Pfk2, Pga10, Pga45, Pga52, Pho88, Phr2, Pir1, Plb3, Pma1, Pol30, Por1, Pph21, Pyc2, Rbp1, Rbt1, Rbt5, Rck2, Rhd3, Rnr21, Rpl35, Rpn2, Rpt2, Sah1, Sap9, Scw11, Smi1, Snf1, Sod5, Ssa2, Sun41, Svf1, Tbp1, Tif, Tos1, Trx1, Tub2, Ubp6, Ura2, Ura7, Vma2, Vma4, Vma8, Vps34, Xyl2, Yck2, Ynk1, Zpr1, Zrt2, Zwf1.	Abp1, Acb1, Acc1, Adh1, Ado1, Ahp1, Als3, Car2, Cdc3, Cdc60, Cht2, Crh11, Cys3, Dak2, Ddr48, Dfg5, Ece1, Ecm33, Eft2, Eng1, Erg10, Erg13, Fas1, Fas2, Fba1, Gis2, Gph1, Grp2, Hgt6, Hsp12, Hsp70, Hta1, Hxk2, Ife2, Ino1, Lsp1, Lys22, Mp65, Msi3, Mxr1, Nhp6a, Orf19.2286, Orf19.2296, Orf19.251, Orf19.3475, Orf19.3499, Orf19.3932, Orf19.4216, Orf19.5885, Orf19.6553, Pck1, Pdc11, Pet9, Pfk1, Pfk2, Pga10, Pga45, Phr2, Pir1, Plb3, Plb5, Pma1, Pyc2, Rbp1, Rbt1, Rbt5, Rhd3, Rnr21, Rpl35, Sah1, Sap9, Scw11, Sod5, Ssa2, Tif, Tos1, Tub2.
	105	193	77
<b>Virulencia</b>	Als1, Asc1, Bgl2, Cdc42, Fas2, Hex1, Mnt1, Orf19.822, Phr1, Phr2, Ras1, Rbt1, Rbt4, Sap10, Slk19, Sod1, Wh11.	Ade5,7, Alo1, Als1, Arp2, Asc1, Bgl2, Cat1, Cdc10, Cdc11, Cdc3, Cdc42, Cla4, Csh3, Fas2, Gna1, Het1, Hex1, Kel1, Kex2, Mlt1, Mnt1, Orf19.2245, Orf19.2538, Orf19.3045, Orf19.4831, Orf19.589, Orf19.7124, Orf19.822, Phr1, Phr2, Pmt1, Ras1, Rbt1, Rbt4, Rsr1, Rvs167, Sep7, Slk19, Sod1, Srv2, Ssd1, Ssn6, Tps2, Ttr1, Vps34, Wh11, Yhb1.	Als1, Asc1, Bgl2, Cdc3, Fas2, Het1, Kex2, Mnt1, Phr1, Phr2, Plb5, Ras1, Rbt1, Sap5, Sap10, Slk19, Sod1, Wh11.
	17	47	18
<b>Formación de biofilms</b>	Ade12, Adh1, Adk1, Ahp1, Ald5, Als1, Als2, Als3, Car2, Cdc19, Cht3, Cit1, Cyp1, Dak2, Ddr48, Eap1, Egd1, Eng1, Eno1, Fba1, Gca1, Glt1, Gpm1, Guk1, Hem13, Hgt6, Hsp104, Hsp70, Hsp90, Hxk2, Ilv5, Ino1, Lsp1, Mdh1, Met15, Met6, Mp65, Msi3, Orf19.2286, Orf19.2296, Orf19.3053, Orf19.6559, Orf19.822, Pck1, Pdc11, Pfk1, Pfk2, Pga45, Pgi1, Pgi2, Pgm2, Pil1, Plb3, Rbe1, Rbt5, Rhr2, Rpp0, Sah1, Sam2, Sap9, Ssa2, Stf2, Sti1, Sun41, Tal1, Tdh3, Tpi1, Trx1, Tsa1, Tub1, Xyl2, Ynk1, Ywp1.	Acs1, Ade12, Adh1, Adh5, Adk1, Ahp1, Ald5, Als1, Als3, Arg4, Arg8, Car2, Cdc19, Cdr1, Cet1, Cht3, Cit1, Ctm1, Ctr1, Cyp1, Cys3, Cys4, Dak2, Ddr48, Dot5, Eap1, Ece1, Ecm17, Egd1, Elf1, Eng1, Eno1, Erg1, Erg11, Fba1, Gal10, Gca1, Gdh2, Glt1, Gnp1, Gpm1, Gsy1, Guk1, Hem13, Hgt6, Hgt7, Hom3, Hsp104, Hsp70, Hsp90, Hta2, Hxk2, Hyr1, Ilv5, Ino1, Lem3, Lsp1, Mcr1, Mdh1, Met10, Met15, Met3, Met6, Mp65, Msi3, Muq1, Nde1, Npl3, Orf19.2006.1, Orf19.2269, Orf19.2286, Orf19.2296, Orf19.3053, Orf19.409, Orf19.4450.1, Orf19.4928, Orf19.5620, Orf19.6090, Orf19.6559, Orf19.6696, Orf19.822, Orf19.951, Osm1, Pck1, Pdc11, Pfk1, Pfk2, Pga10, Pga45, Pgi1, Pgi2, Pgm2, Pho88, Pil1, Plb3, Pst1, Pst3, Put2, Rbe1, Rbt5, Rga2, Rhr2, Rpp0, Sah1, Sam2, Sap9, Sec14, Ser33, Shm2, Smi1, Sod3, Ssa2, Stf2, Sti1, Sun41, Tal1, Tdh3, Tpi1, Tps2, Tps3, Trp4, Trp5, Trx1, Tsa1, Tub1, Tup1, Xyl2, Ynk1, Ywp1.	Adh1, Adk1, Ahp1, Als1, Als3, Car2, Cdc19, Ctr1, Cyp1, Cys3, Dak2, Ddr48, Ece1, Egd1, Eng1, Eno1, Fba1, Gca1, Hem13, Hgt6, Hsp104, Hsp70, Hsp90, Hta2, Hxk2, Hyr1, Ino1, Lsp1, Mdh1, Met15, Met6, Mp65, Msi3, Orf19.2286, Orf19.2296, Orf19.3053, Pck1, Pdc11, Pfk1, Pfk2, Pga10, Pga45, Pgi1, Pgi2, Pgm2, Pgm3, Pil1, Plb3, Pst3, Rbt5, Rhr2, Rpp0, Sah1, Sam2, Sap9, Ser33, Shm2, Ssa2, Sti1, Tal1, Tdh3, Tpi1, Tsa1, Tub1, Ywp1.
	73	129	64

CATEGORIA*	LEVADURAS	HIFAS	HIFAS 10%S
<b>Relacionadas con el citoesqueleto, Actina</b>	Aat1, Abp1, Act1, Cdc42, Orf19.4633..	Aat1, Abp1, Act1, Cdc42, Myo2, Orf19.1236, Orf19.1444, Orf19.1796, Orf19.3235, Orf19.4633, Orf19.6534.2, Orf19.7124, Pan1, Rvs167, Sac6, Sla2, Wal1.	Abp1, Act1, Bzz1, Myo2, Orf19.1236, Sac6.
	5	17	6
<b>Condiciones de estrés</b>	Adh2, Ahp1, Asr1, Asr2, Asr3, Cpr6, Ddr48, Fdh3, Glk1, Gln1, Gpd2, Gre3, Grp2, Hgt6, Hsp104, Hsp12, Hsp60, Hsp90, Ifr2, Kre30, Msb2, Orf19.1862, Orf19.251, Orf19.4089, Orf19.4449, Orf19.6160, Orf19.7085, Orf19.822, Rhr2, Rip1, Sod1, Tal1, Tsa1, Xyl2	Adh2, Ahp1, Asr1, Asr2, Asr3, Cat1, Cip1, Cpr6, Ctm1, Cys3, Dap1, Dbp2, Ddr48, Ecm17, Fdh3, Gad1, Glk1, Gln1, Gpd2, Gre3, Grp2, Gsy1, Hgt6, Hog1, Hsp104, Hsp12, Hsp60, Hsp90, Ifr2, Imh3, Kre30, Mrf1, Msb2, Orf19.1862, Orf19.251, Orf19.3260, Orf19.4089, Orf19.4449, Orf19.6160, Orf19.7034, Orf19.7085, Orf19.7160, Orf19.7368, Orf19.7602, Orf19.822, Pbs2, Rck2, Rga2, Rhr2, Rip1, Rpt2, Sis1, Sod1, Sod3, Sod5, Tal1, Tps3, Trr1, Tsa1, Ubp6, Xyl2, Yck2, Ydj1, Zwf1.	Adh2, Ahp1, Asr3, Cip1, Cys3, Ddr48, Fdh3, Gln1, Gpd2, Gre3, Grp2, Hgt6, Hsp104, Hsp12, Hsp90, Msb2, Orf19.1862, Orf19.251, Orf19.3499, Orf19.6160, Orf19.7085, Rhr2, Sod1, Sod5, Tal1, Tsa1.
	34	64	26
<b>Resto de Proteínas</b>	146	504	107

\*Las categorías de agrupación, fueron realizadas basándose en la información de cada proteína depositada en la base de datos de Candida Genome Database (CGD) en esta clasificación cada proteína se ha agrupado en todos los grupos donde ha sido descrita.

Esta estrategia ha permitido obtener un conjunto heterogéneo de proteínas, la mayoría de las cuales están asociadas a la superficie celular. Es importante resaltar la identificación de más de 25 proteínas con **anclaje GPI**, en las distintas morfologías celulares de levaduras e hifas. **En biogénesis de la pared celular**, se identificaron 36, 53 y 28 proteínas en levaduras, hifas e hifas 10%S respectivamente. **En superficie celular**, se identificaron un promedio de 90 proteínas. Se identificaron aproximadamente 50 proteínas **inmunogénicas**. También se identificaron 14 y 13 proteínas **exclusivas de hongos** en levaduras e hifas 10% S respectivamente y 35 de estas proteínas en el caso de las hifas. De las proteínas relacionadas con **respuesta a antifúngicos**, en hifas se identificaron 193, en levaduras 105 y en hifas 10%S 77 proteínas. En el caso de proteínas **asociadas a la virulencia** del hongo en hifas se identificaron 47 proteínas, en levaduras 17 y 18 proteínas en hifas 10%S. Dentro de las proteínas relacionadas con la **producción de Biofilms** en hifas se identificaron 129 proteínas, en levaduras 34 y 26 proteínas en hifas 10%S. Y finalmente, relacionadas con procesos biológicos en los que está implicada **la actina**, se identificaron 17 proteínas en hifas, 5 en levaduras y 6 en hifas 10%S.

## Resultados

En la categoría de otras proteínas, se agruparon todas aquellas proteínas que no tenían características relacionadas con las anteriores, que solo en el caso de hifas supero el 50%, sin embargo en levaduras e hifas 10% S fue menor del 40% (Tabla 9).

### 6.1.2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS PROTEÍNAS DEL SURFOMA DE *C. albicans* EN LEVADURAS, HIFAS E HIFAS INDUCIDAS CON SUERO HUMANO

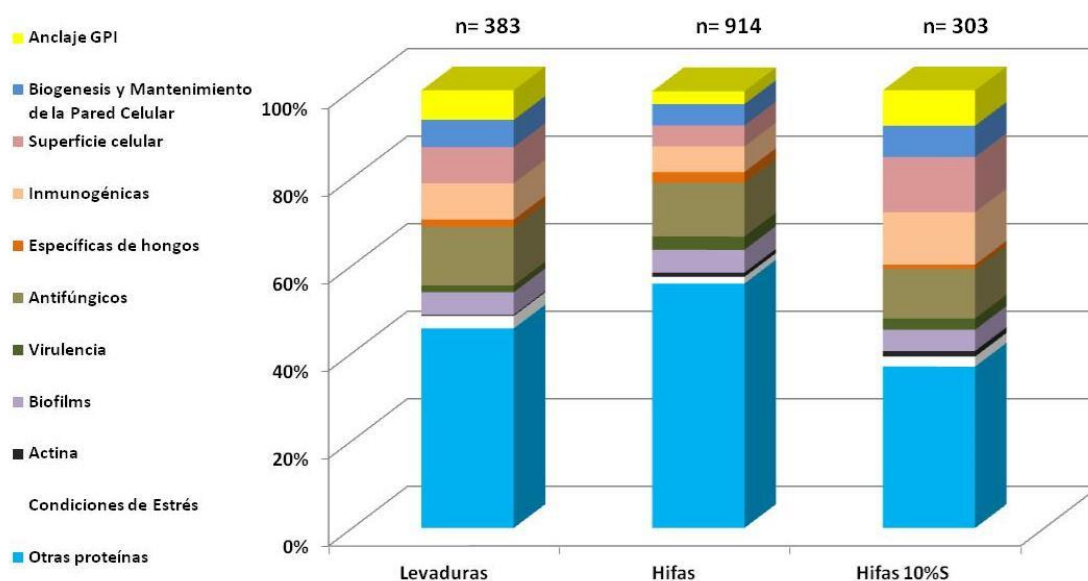
La clasificación anterior hace difícil el seguimiento individual de las proteínas, por este motivo los análisis posteriores se realizaron haciendo una jerarquía arbitraria de las categorías de clasificación anteriormente señaladas, considerando la categoría más importante para este trabajo la que incluye a las proteínas con anclaje GPI, por lo cual, la proteína que tenga esta característica se excluye de ser clasificada en otro grupo posterior, y así sucesivamente. En orden descendente de importancia de las categorías es el mismo que la tabla 9, son: proteínas con anclaje GPI, proteínas implicadas en la biogénesis y mantenimiento de la pared celular, proteínas identificadas anteriormente en superficie celular, proteínas inmunogénicas, proteínas específicas para hongos sin homólogo en mamíferos, proteínas relacionadas con rasgos de virulencia, proteínas relacionadas con la formación de biofilms, proteínas relacionadas con el citoesqueleto esencialmente de actina, proteínas que se expresan en condiciones de estrés y finalmente un grupo de otras proteínas que no entran en las anteriores categorías.

Con la clasificación de tipo jerárquico excluyente se determinó el porcentaje de proteínas presentes en cada grupo, comparando las 3 condiciones de crecimiento (Tabla 9 y Figura 16).

**Tabla 9: Categorías proteicas encontradas en el surfoma de levaduras e hifas de *C. albicans* .**

CATEGORIAS	LEVADURAS		HIFAS		HIFAS 10%S	
	Nº de proteínas	%	Nº de proteínas	%	Nº de proteínas	%
Anclaje GPI	27	6,0	28	2,6	27	7,6
Biogénesis y Mantenimiento de la Pared Celular	29	8,1	48	5,3	23	7,6
Superficie celular	54	14,1	58	6,3	49	16,2
Inmunogénicas	33	8,6	41	4,5	27	8,9
Específicas de hongos	5	1,3	22	2,4	3	1,0
Antifúngicos	53	13,8	111	12,4	36	12,5
Virulencia	5	1,3	28	3,1	7	2,3
Biofilms	18	4,7	49	5,4	14	4,6
Actina	1	0,3	10	1,1	5	1,7
Condiciones de Estrés	14	3,7	17	1,9	7	2,3
Otras proteínas	146	38,1	504	55,1	107	35,3
<b>Total</b>	<b>383</b>	<b>100</b>	<b>914</b>	<b>100</b>	<b>303</b>	<b>100</b>

Los colores de las celdas cambian de acuerdo al número mas alto de proteínas identificadas acercandose al color rojo en el valor más alto.



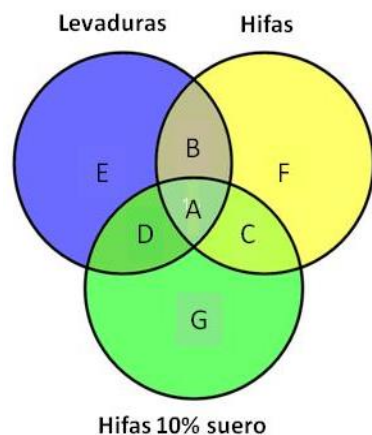
**Figura 16.** Distribución porcentual de las diferentes categorías proteicas encontradas en levaduras, hifas e hifas 10% de *C. albicans*.

Teniendo en cuenta estas categorías, se realizó una comparación en las 3 condiciones evaluadas según el porcentaje de cada una de las categorías presentes en levaduras, hifas e hifas suero 10% (Figura 16). En general podemos observar globalmente una distribución diferente en los 3 tipos celulares estudiados. En el caso de las proteínas

con anclaje GPI, podemos observar que el número de proteínas identificadas es muy similar, alrededor de 25 en los 3 casos. Al analizar la relación porcentual con el total de proteínas, en el experimento de hifas el porcentaje de proteínas con anclaje GPI es bajo, pero a su vez muy significativa a nivel biológico. En general podemos decir que en todas las categorías en las que se analizaron las proteínas en el experimento de hifas es donde mayor número de proteínas se identifican, debido a que el número de proteínas total del experimento casi triplica al número de proteínas de levaduras y de hifas suero 10%. Las categorías en las que es más significativo el aumento de número de proteínas son: **proteínas específicas de hongos, proteínas relacionadas con antifúngicos, proteínas implicadas en la formación de biofilms y proteínas relacionadas con el citoesqueleto**, en particular con la actina.

Una vez analizada la distribución porcentual de las categorías en los experimentos individuales, se realizaron análisis por diagramas de Venn, para encontrar aquellas proteínas que son compartidas en todas o en dos de las formas celulares y aquellas que se identifican únicamente en cada morfología celular (Tabla 10). Este análisis se hizo con las 938 proteínas identificadas en los experimentos de la transición dimórfica, que además fueron clasificadas de modo jerárquico y excluyente en las 11 categorías designadas. Los resultados muestran que de **treinta y una** proteínas con **anclaje GPI** 19 son comunes en las tres condiciones experimentales. **Cincuenta** proteínas están relacionadas con **biogénesis y mantenimiento de la pared celular**, de las cuales 21 son comunes a las tres condiciones y 17 se identificaron en hifas. **Cincuenta y ocho** proteínas han sido descritas anteriormente como proteínas **de superficie celular**, de las cuales 49 son comunes. **Cuarenta y una** proteínas han sido detectadas como **antigénicas**, ya sea en modelo de ratones o mediante el uso de sueros humanos, de las cuales 26 fueron identificadas en las 3 condiciones. **Veintitrés** proteínas son **específicas de hongos**, no tienen homólogo en mamíferos, de las cuales solo 2 son comunes a todas las condiciones y 17 se identificaron en hifas. **Ciento dieciséis** proteínas están relacionadas con respuesta frente a **antifúngicos**, de las cuales solo 28 están compartidas en las 3 formas celulares, 23 están presentes en levaduras e hifas y 53 solo en hifas. De las **veintinueve** proteínas relacionadas con **virulencia**, 21 están solo en hifas. Además se han identificado **cuarenta y nueve** proteínas relacionadas con la formación de **biofilms**, **once** relacionadas con la **actina** y un total de 516 proteínas que no están incluidas en las categorías anteriores.

**Tabla 10. Resultados del análisis por diagramas de Venn, de la distribución de las proteínas identificadas en la superficie de *C. albicans* en levaduras, hifas e hifas10%S**



CATEGORIAS	A	B	C	D	E	F	G	TOTAL
	LEVADURAS- HIFAS-HIFAS 10%S	LEVADURAS- HIFAS	HIFAS-HIFAS 10%S	LEVADURAS HIFAS 10%S	LEVADURAS	HIFAS	HIFAS 10%S	
Anclaje GPI	19	3	5	1	2	0	1	31
Biogénesis y Mantenimiento de la Pared Celular	19	8	2	0	2	17	0	48
Superficie celular	49	5	0	0	0	4	0	58
Inmunogénicas	26	7	1	0	0	7	0	41
Específicas de hongos	2	2	1	0	1	17	0	23
Antifúngicos	28	23	8	0	2	53	1	115
Virulencia	4	1	2	0	0	21	1	29
Biofilms	11	7	3	0	0	28	0	49
Actina	1	0	3	0	0	6	1	11
Condiciones de Estrés	6	8	1	0	0	2	0	17
Otras proteínas	83	55	20	0	8	346	4	516
Total	248	119	46	1	15	501	8	938

Los datos mostrados en la Tabla han sido obtenidos mediante el análisis de las listas de proteínas agrupadas en cada categoría, de cada experimento (levaduras, hifas e hifas 10% S), por diagramas de Venn. Cada línea representa un análisis independiente, donde el resultado del diagrama se corresponde a la letra que designa cada columna, la cual se correlaciona con el resultado de conjuntos del diagrama. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/Venny/index.html>

### 6.1.3. PERFIL PROTEÓMICO DE LA SUPERFICIE DE LEVADURAS, HIFAS E HIFAS INDUCIDAS CON SUERO HUMANO DE *C. albicans*

Con el objetivo de ver el perfil proteómico de la transición dimórfica de *C. albicans* se construyó la Tabla 9, la cual está basada en los datos obtenidos de la CGD y que han sido analizados con el uso de diagramas de Venn. Los resultados numéricos de este análisis se muestran en la Tabla 10, y en la Tabla 11 se muestra el nombre de cada una de las proteínas agrupadas en cada categoría. En la Tabla 11 podemos observar que la superficie celular de las levaduras, hifas e hifas 10%S, presentan un perfil proteico diferente. Si se analizan cada una de las categorías se observa:

1. **Proteínas con anclaje GPI:** De las 30 proteínas identificadas, 19 son comunes a los 3 tipos celulares, **Als1, Als3, Cht2, Crh11, Ecm33, Ihd1, Pga4, Phr1, Phr2, Pga45, Pga53, Plb3, Plb4.5, Rbt1, Rbt5, Rhd3, Sap9, Ssr1, Utr2**. Las proteínas **Eap1, Pga2 y Rbt4** se presentan en levaduras y en hifas. **Dfg5, Hyr1 Pga63 y Sod5** se comparten en hifas e hifas 10%S. **Sap10** es la única proteína en todo el experimento que se comparte entre levaduras e hifas 10%S. **Als2 y Ecm331** solo se han identificado en levaduras. No hay ninguna proteína que solo se haya identificado en hifa y finalmente en hifas 10%S se identifican las proteínas **Pga10 y Plb5**.
2. **Proteínas implicadas en la biogénesis y/o mantenimiento de la pared celular:** se identificaron 48 proteínas, de las cuales 21 están compartidas en los 3 tipos celulares, **Bgl2, Csp37, Eng1, Gda1, Gfa1, Gpd2, Mnt1, Mp65, Orf19.4246, Pir1, Pmi1, Pmm1, Rho1, Scw11, Sim1, Slk19, Srb1, Tma19, Ywp1**. En levaduras-hifas se identificaron: **Atc1, Cht3, Hex1, Rbe1, Sun41, Sur7, Xyl2 y Orf19.3683 (Gcs1)**. En hifas e hifas 10% S **Mnn7 y Pmt2**. Las proteínas identificadas en levaduras únicamente son **Abg1 y Mnn2** y solo en hifas **Arp2, Bud7, Chs5, Cys4, Ecm17, Frs1, Gal10, Gsc1, Gna1, Kre9, Orf19.7124, Pmr1, Pmt1, Psa2, Rvs167, Smi1 y Uap1**.
3. **Proteínas descritas en la superficie celular:** se identificaron 58 proteínas, de las cuales 49 están compartidas en los 3 tipos celulares estudiados, es interesante destacar que se identificó una cantidad importante de proteínas ribosomales que no se identificaron en un extracto total de células de *C. albicans*. Solo en el caso de las hifas se identificaron proteínas que no fueron detectadas en las otras morfologías.

4. **Proteínas inmunogénicas:** se identificaron 41 proteínas en total, de las cuales 26 están presentes en todas las condiciones evaluadas y solo en el caso de hifas hay proteínas identificadas que no se comparten con ninguna otro tipo de célula, estas son: **Adh5, Imh3, Leu1, Not5, Por1, Sec13 y Zwf1.**
5. **Proteínas específicas de hongos:** se identificaron en total 23 proteínas, de las que solo 2 se comparten en todas las condiciones **Adh2** y **Lys1.** 17 proteínas fueron identificadas únicamente en hifas.
6. **Proteínas relacionadas con la respuesta a antifúngicos:** Es interesante señalar que 23 proteínas correspondieron a ORFs- y en el caso de Hifa 10%S solo se identificó una proteína que no aparecía en otras condiciones **orf19.3499.**
7. **Proteínas relacionadas con mecanismos de patogenicidad:** Se identificaron 29 proteínas donde solo 4 están presentes en todas las condiciones evaluadas, **Asc1, Ras1, Sod1** y **Wh11.** en levadura e hifas se identificó a **Cdc42,** en hifas e hifas 10%S se identificaron **Het1 y Kex2,** en hifas hay 21 proteínas y en hifas 10%S únicamente se identificó **Sap5.**
8. **Proteínas relacionadas con la formación de biofilms:** se identificaron 49 proteínas de las cuales 11 se encontraron en las 3 condiciones y 28 solo se identificaron en hifas.
9. **Proteínas relacionadas con la respuesta a condiciones de estrés:** se identificaron 17 proteínas, de las cuales compartidas por las 3 condiciones estarían **Asr3, Fdh3, Gln1, Orf19.1862, Orf19.6160 y Orf19.7085.**
10. **Proteínas relacionadas con el citoesqueleto, esencialmente de actina:** Se identificaron 11 proteínas de las cuales solo la actina (**Act1**) está compartida en las 3 condiciones y 6 proteínas se han identificado en hifas, de las cuales 3 corresponden a ORFs.

El grupo de proteínas no identificadas anteriormente en superficie celular se detalla en la Tabla 12. En este grupo hay 516 proteínas y están clasificadas al igual que las anteriores con el uso de diagramas de Venn. Es muy interesante ver que 267 de estas proteínas son ORFs, y además que 210 de estas fueron identificados en hifas.

**Tabla 11: Perfil proteómico de la superficie de levaduras, hifas e hifas estimuladas con suero humano de *C. albicans***

CATEGORIAS	PROTEINAS COMUNES EN LEVADURAS-HIFAS-HIFAS 10% <sup>S</sup>	PROTEINAS COMUNES EN LEVADURAS-HIFAS	PROTEINAS COMUNES EN HIFAS-HIFAS 10% <sup>S</sup>	PROTEINAS COMUNES EN LEVADURAS HIFAS 10% <sup>S</sup>	PROTEINAS DE LEVADURAS	PROTEINAS DE HIFAS	PROTEINAS DE HIFAS 10% <sup>S</sup>	TOTAL
Anclaje GPI	19	3	5	1	2	0	2	31
	Als1, Als3, Cht2, Crh11, Ecm33, Ihd1, Pga4, Pga45, Pga53, Phr1, Phr2, Plb3, Plb4.5, Rbt1, Rbt5, Rhd3, Sap9 Ssr1, Utr2.	Eap1, Pga52, Rbt4.	Dfg5, Hyr1, Pga63, Sod5	Sap10	Als2, Ecm331.	-	Pga10, Plb5	
Biogénesis y Mantenimiento de la Pared Celular	19	8	2	0	2	17	0	48
	Bgl2, Csp37, Eng1, Gda1, Gfa1, Gpd2, Mnt1, Mp65, Orf19.4246, Pir1, Pmi1, Pmm1, Rho1, Scw11, Sim1, Slk19, Srb1, Tma19, Ywp1.	Atc1, Cht3, Hex1, Rbe1, Sun41, Sur7, Xyl2, Orf19.3683 (Gcs1).	Mnn7, Pmt2.	-	Abg1, Mnn2.	Arp2, Bud7, Chs5, Cys4, Ecm17, Frs1, Gal10, Gsc1, Gna1, Kre9, Orf19.7124, Pmr1, Pmt1, Psa2, Rvs167, Smi1, Uap1.		
Superficie celular	49	5	0	0	0	4	0	58
	Adh1, Ape2, Bmh1, Cdc19, Cef3, Eno1, Gca1, Gph1, Hem13, Hsp90, Hsp70, Kar2, Msb2, Orf19.2296, Orf19.251, Pdc11, Pkg1, Pil1, Rpl10, Rpl11, Rpl12, Rpl17b, Rpl18, Rpl19a, Rpl25, Rpl3, Rpl38, Rpl4b, Rpl5, Rpl6, Rps1, Rps10, Rps14b, Rps18, Rps21, Rps28b, Rps6a, Rps7a, Rps8a, Ssa2, Sam2, Snz1, Ssb1, Ssc1, Tdh3, Tef1, Tkl1, Tsa1, Ugp1.	Atc1, Atp1, Gpm1, Orf19.4886, Orf19.5126.	-	-	-	Fre10, Orf19.6082 Sdh2, Vps1.		
Inmunogénicas	26	7	1	0	0	7	0	41
	Acs2, Ade17, Ahp1, Ddr48, Efb1, Eft2, Fba1, Gnd1, Gre3, Grp2, Hxk2, Ino1, Ipp1, Mdh1, Met15, Met6, Msi3, Pdi1, Pgi1, Rpl13, Rpp0, Sah1, , Tif, Tos1, Tpi1, Yst1.	Ach1, Aco1, Atp2, Ilv5, Lpd1, Orf19.1946, Qcr2.	Shm2	-	-	Adh5, Imh3, Leu1, Not5, Por1, Sec13, Zwf1.		
Específicas de hongos	2	2	1	0	1	17	0	23
	Adh2, Lys1.	Ade1, His7.	Pst3.	-	Fmp27	Aro1, Aro2, Aro7, Gdh2, Gnp1, Hom3, Leu42, Mca1, Nde1, Orf19.2269, Osm1, Phm7, Rgd3, Rib5, Sct1, Svf1, Ycp4.		

CATEGORIAS	PROTEINAS COMPARTIDAS EN LEVADURAS-HIFAS-HIFAS 10%S	PROTEINAS COMPARTIDAS EN LEVADURAS-HIFAS	PROTEINAS COMPARTIDAS EN HIFAS-HIFAS 10%S	PROTEINAS COMPARTIDAS EN LEVADURAS HIFAS 10%S	PROTEINAS DE LEVADURAS	PROTEINAS DE HIFAS	PROTEINAS DE HIFAS 10%S	TOTAL
Relacionadas con respuesta a antifúngicos	28	23	9	0	2	53	1	116
	Abp1, Acb1, Acc1, Ado1, Car2, Cdc60, Dak2, Erg10, Erg13, Fas1, Fas2, Gis2, Hgt6, Hsp12, Ife2, Lsp1, Nhp6a, Orf19.3475, Orf19.3932, Orf19.4216, Orf19.6553, Pck1, Pet9, Pfk1, Pfk2, Pma1, Rnr21, Tub2.	Aat1, Ald5, Atp5, Fdh1, Glk1, Gua1, Ils1, Kre30, Lsc1, Mbf1, Mir1, Mis11, Nop1, Orf19.2622, Orf19.5180, Orf19.7350, Orf19.822, Pda1, Pdb1, Trx1, Vma2, Vma4, Zpr1.	Cdc3, Cys3, Ece1, Hta1, Lag1, Mxr1, Pyc2, Rbp1, Sod5.	-	Dag7, Fet3.	Acs1, Atp3, Cat1, Cox13, Crm1, Dap1, Dbp2, Def1, Erg1, Erg4, Erg6, Erg9, Erg11, Frp3, Fum12, Gad1, Grx3, Hgt7, Hhf1, Hmg1, Hog1, Lys21, Lys9, Met3, Mrf1, Mvd, Ncp1, Nmt1, Ole1, Orf19.1902, Orf19.2452, Orf19.3260, Orf19.337, Orf19.5517, Orf19.5947, Orf19.6014, Orf19.7034, Orf19.7160, Orf19.7310, Orf19.7368, Orf19.7384, Orf19.7531, Orf19.7602, Orf19.951, Pbs2, Pho88, Rck2, Rpt2, Snf1, Ubp6, Vma8, Yck2, Zrt2.	orf19.3499.	
Virulencia	4	1	2	0	0	21	1	29
	Asc1, Ras1, Sod1, Wh11.	Cdc42.	Het1, Kex2.	-	-	Ade5, Alo1, Cdc10, Cdc11, Cla4, Csh3, Kel1, Mlt1, Orf19.2245, Orf19.2538, Orf19.3045, Orf19.4831, Orf19.589, Rsr1, Ssn6, Srv2, Ssd1, Tps2, Ttr1, Vps34, Yhb1.	Sap5	
Formación de Biofilms	11	7	3	0	0	28	0	49
	Adk1, Cyp1, Egd1, Hsp104, Orf19.2286, Orf19.3053, Pgm2, Rhr2, Sti1, Tal1, Tub1.	Ade12, Cit1, Glt1, Guk1, orf19.6559, Stf2, Ynk1.	Ctr1, Hta2, Ser33.	-	-	Arg4, Arg8, Cdr1, Cet1, Ctm1, Dot5, Elf1, Gsy1, Lem3, Mcr1, Muq1, Npl3, Orf19.409, Orf19.2206.1, Orf19.4450.1, Orf19.4928, Orf19.5620, Orf19.6090, Orf19.6696, Pst1, Put2, Rga2, Sec14, Sod3, Tps3, Trp4, Trp5, Tup1.	-	
Condiciones de Estrés	6	8	1	0	0	2	0	17
	Asr3, Fdh3, Gln1, Orf19.1862, Orf19.6160, Orf19.7085	Asr1, Asr2, Cpr6, Hsp60, Ifr2, Orf19.4089, Orf19.4449, Rip1.	Cip1	-	-	Ydj1, Sis1.	-	
Actina	1	0	3	0	0	6	1	11
	Act1	-	Myo2, Orf19.1236, Sac6.	-	-	Orf19.1444, Orf19.3235, Orf19.6534.2, Pan1, Sla2, Wal1.	Bzz1	
Proteínas no reportadas anteriormente en superficie celular.	83	55	20	0	8	346	4	516
Total	248	119	46	1	15	501	8	938

\*\*Proteínas subrayadas, Dfg5, Mnn7: fueron identificadas con un solo péptido, revisado y validado, Identificados en Orbitrap.

**Tabla 12: Proteínas no descritas anteriormente en superficie celular de *C. albicans* que se identificaron en levaduras, hifas e hifas estimuladas con suero humano de *C. albicans***

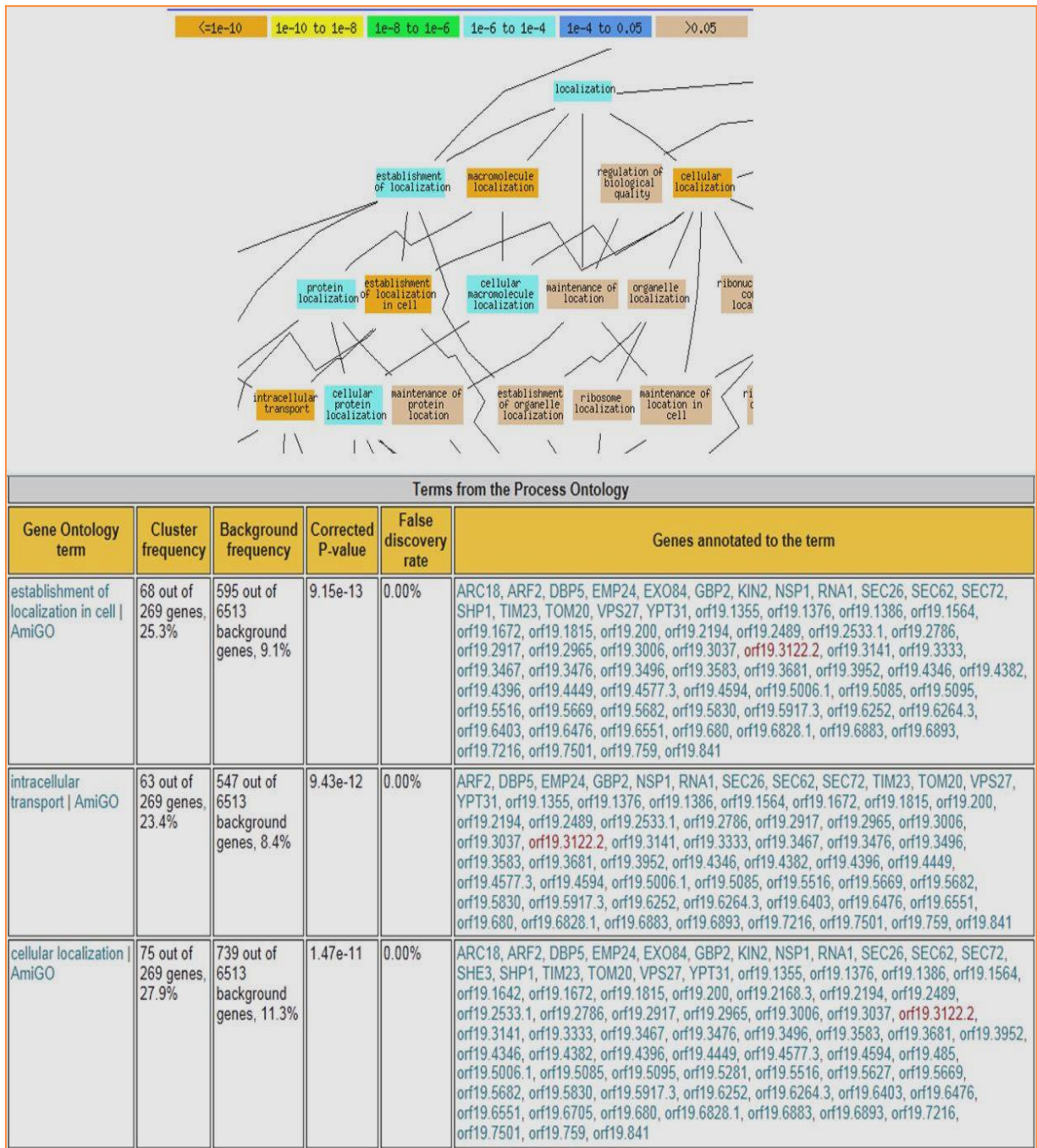
CATEGORIAS	PROTEINAS COMUNES EN LEVADURAS-HIFAS-HIFAS 10%S	PROTEINAS COMUNES LEVADURAS-HIFAS	PROTEINAS COMUNES EN HIFAS-HIFAS 10%S	PROTEINAS COMUNES EN LEVADURAS HIFAS 10%S	PROTEINAS DE HIFAS	PROTEINAS HIFAS 10%S	Total
	83	55	20	8	346	4	516
<b>Resto de proteínas</b>	Anb1, Arc1, Aro4, Aro8, Asn1, Cam1, Cam1-1, Cdc48, Cmd1, Cof1, Dps1-1, Emp46, Faa4, Grs1, Gsp1, Hom6, Idi1, Krs1, Mdh1-1, Mlc1, Nup, Pfy1, Sar1, Sbp1, Ses1, Sgt2, Skp1, Smt3, Thr4, Tom70, Tpm2, Uba1.	Ade13, Agm1, Aro3, Cox4, Cox5, Crd2, Erv25, Hrt2, Idh1, Ifr1, Kgd1, Lat1, Lsc2, Lys12, Nip1, Nop5Rax2, Rbt7, Ret2, Rli1, Sol3, Tif3, Tif4631, Tifs, Tys1, Ubi3, Ura2, Yps7, Ypt1, Yrb1, Zuo1.	Arg1, Bcy1, Cdc12, Eif4e, Glc7, Hmo1, Idp2, Ist2, Ntf2, Obpa, Rpl82, Sec4, Ssz1, Sub2, Sui2.	Gdh3, Pho112, Tfs1.	Aat21, Ade6, Ala1, Apm1, Ard, Arg5,6, Aro10, Atp14, Atp17, Atp4, Atp7, Bat22, Bdf1, Bem3, Bre1, Cbp1, Ccp1, Cct8, Cdc28, Cdc54, Cdc68, Cox19, Cox6, Cox9, Cta3, Cyc1, Cyt1, Dnm1, Doa1, Dpm1, Drg1, End3, Erf1, Erg12, Erg20, Erg5, Fad2, Fgr44, Flc2, Fre7, Frs2, Fun12, Gap4, Gcd11, Gcn1, Gea2, Gln4, Glo3, Gpa2, Gpx2, Gyp2, Hbr1, Hch1, Hcr1, Hem2, Hho1, His4, Hlj1, Hom2, Hpt1, Hts1, Idh2, Idp1, Ifu5, Ilv2, Kgd2, Kin3, Mam33, Mes1, Met10, Mrp8, Osm2, Pdx1, Pdx3, Pho85, Pob3, Pol30, Pph21, Pr26, Prd1, Pre9, Pro2, Pro3, Prt1, Ptp3, Rac1, Rad23, Rdi1, Rfa2, Rgd1, Rho3, Ria1, Rib3, Rpn1, Rpn2, Rpn6, Rpn7, Rpo21, Rpp1a, Rps23a, Rpt1, Rpt4, Rpt5, Rts1, Sam4, Sdh12, Sec18, Sec23, Sec24, Sec3, Sec61, Shm1, Sin3, Sou1, Spt5, Sui3, Sup35, Taf14, Tbp1, Tcp1, Tfg1, Thi13, Ths1, Tif11, Tif34, Tif35, Tom22, Trp2, Trp3, Tuf1, Ura7, Uso6, Vas1, Vps2, Wrs1, Yml6.	Gin1, Glk4,	216
<b>ORFs</b>	Orf19.1052, Orf19.200, Orf19.2478.1, Orf19.2769, Orf19.3037, Orf19.3061.1, Orf19.3354, Orf19.3572.3, Orf19.3690.2, Orf19.3799, Orf19.3915, Orf19.4149.1, Orf19.4609, Orf19.4622, Orf19.4799, Orf19.5281, Orf19.5773, Orf19.5943.1, Orf19.6220.4, Orf19.6403, Orf19.6415.1, Orf19.6882.1, Orf19.7239, Orf19.7392,	Orf19.1564, Orf19.1649, Orf19.1680, Orf19.2250, Orf19.2309.2, Orf19.2329.1, Orf19.2489, Orf19.2533.1, Orf19.2795, Orf19.2994.1, Orf19.4560, Orf19.4577.3, Orf19.4633, Orf19.4931.1, Orf19.5006, Orf19.5063, Orf19.754, Orf19.7569,	Orf19.1376, Orf19.3467, Orf19.3496, Orf19.6507, Orf19.6701,	Orf19.1533, Orf19.4150, Orf19.5572, Orf19.6630, Orf19.7196,	Orf19.1030, Orf19.1058, Orf19.1082.1, Orf19.1085, Orf19.1086, Orf19.1124.2, Orf19.117, Orf19.121, Orf19.1212, Orf19.1248, Orf19.1301, Orf19.1338, Orf19.1340, Orf19.135, Orf19.1355, Orf19.1361, Orf19.1372, Orf19.1374, Orf19.1386, Orf19.1389, Orf19.1402, Orf19.1409.1, Orf19.1414, Orf19.1478, Orf19.1578, Orf19.1626, Orf19.1630, Orf19.1642, Orf19.1658, Orf19.1661, Orf19.1672, Orf19.1697, Orf19.1710, Orf19.1738.1, Orf19.1750, Orf19.1754, Orf19.1777, Orf19.1796, Orf19.1801, Orf19.1815, Orf19.1833, Orf19.1840, Orf19.1866, Orf19.1970, Orf19.1993, Orf19.2125, Orf19.213, Orf19.2146, Orf19.2150, Orf19.2166, Orf19.2168.3, Orf19.2175, Orf19.2194, Orf19.2246, Orf19.2278, Orf19.2288, Orf19.2304, Orf19.2322.3, Orf19.2335, Orf19.2341, Orf19.239, Orf19.2549, Orf19.2570, Orf19.2639.1, Orf19.2710, Orf19.2720, Orf19.2786, Orf19.2829, Orf19.285, Orf19.287, Orf19.2917, Orf19.2928, Orf19.2930, Orf19.2953, Orf19.2965, Orf19.2973, Orf19.2974, Orf19.3003, Orf19.3004, Orf19.3006, Orf19.3031, Orf19.3060, Orf19.3122.2, Orf19.3126, Orf19.3129, Orf19.3141, Orf19.3206, Orf19.3230, Orf19.3290, Orf19.3295, Orf19.330.1, Orf19.3333, Orf19.3335, Orf19.3341, Orf19.3349, Orf19.338, Orf19.3430, Orf19.3476, Orf19.3481, Orf19.3561, Orf19.3583, Orf19.3681, Orf19.3687, Orf19.3792, Orf19.3836, Orf19.3859, Orf19.3872, Orf19.3952, Orf19.3977, Orf19.4004, Orf19.4164, Orf19.4180, Orf19.4283, Orf19.4346, Orf19.4382, Orf19.4396, Orf19.448, Orf19.4503, Orf19.4594, Orf19.4666, Orf19.4686, Orf19.4751, Orf19.4796, Orf19.485, Orf19.4864, Orf19.4931, Orf19.4953, Orf19.5006.1, Orf19.5030, Orf19.5085, Orf19.5095, Orf19.51, Orf19.512, Orf19.5194.1, Orf19.5195, Orf19.5242, Orf19.528, Orf19.5345, Orf19.5352, Orf19.5369, Orf19.5411, Orf19.543, Orf19.5459, Orf19.5484, Orf19.5516, Orf19.5522, Orf19.5525, Orf19.5595, Orf19.5627, Orf19.5669, Orf19.5682, Orf19.5711, Orf19.581, Orf19.5825, Orf19.5825, Orf19.5830, Orf19.5838, Orf19.590, Orf19.5917.3, Orf19.5921, Orf19.5956, Orf19.5964, Orf19.6031, Orf19.6079, Orf19.6250, Orf19.6252, Orf19.6264.3, Orf19.6264.4, Orf19.6293, Orf19.6358, Orf19.6476, Orf19.6539, Orf19.6551, Orf19.6599.1, Orf19.6705, Orf19.6796, Orf19.680, Orf19.6809, Orf19.6810, Orf19.6828.1, Orf19.6843, Orf19.6867, Orf19.6883, Orf19.6893, Orf19.6898.1, Orf19.7057, Orf19.7076, Orf19.7097, Orf19.7108, Orf19.7116, Orf19.7215.3, Orf19.7216, Orf19.7261, Orf19.7264, Orf19.7269, Orf19.7297, Orf19.7328, Orf19.7347, Orf19.74, Orf19.7501, Orf19.7502, Orf19.7510, Orf19.7522, Orf19.759, Orf19.7590, Orf19.809, Orf19.815, Orf19.841, Orf19.86, Orf19.900, Orf19.933,	Orf19.5885, Orf19.775.	267
<b>Proteínas ribosomales</b>	Rpl15a, Rpl20b, Rpl21a, Rpl23a, Rpl24a, Rpl27a, Rpl28, Rpl30, Rpl32, Rpl39, Rpl8b, Rpl9b, Rpp1b, Rpp2a, Rps12, Rps13, Rps15, Rps19a, Rps20, Rps21b, Rps24, Rps25b, Rps26a, Rps27, Rps3, Rps5, Rps9b	Rpg1a, Rpl10a, Rpl16a, Rpl37b, Rpl43a, Rps30,					33

Proteínas que se clasificaron en la categoría de otras proteínas.

Los resultados obtenidos hasta el momento nos muestran versatilidad de la estrategia proteómica utilizada. En el presente trabajo se consiguió la identificación de 78 proteínas clásicas de la pared celular agrupadas en las dos categorías con mayor nivel jerárquico, proteínas con anclaje GPI y proteínas implicadas en el mantenimiento y biogénesis de la pared celular. La presencia de proteínas de otras categorías en la superficie celular es aceptada, aunque no totalmente explicada hasta la fecha. Así, las proteínas multifuncionales o "moonlighting", aquellas que aunque presentan varias funciones biológicas y su función más estudiada no se relaciona con su presencia en la pared celular, poseen características importantes a la hora de proponer estrategias terapéuticas o diagnósticas de las candidiasis.

Del grupo de "otras proteínas" que corresponden en total a 516 proteínas, es interesante señalar que 269 son ORFs y 210 están presentes en el experimento de hifas en medio Lee. Al analizar estos ORFs utilizando la herramienta bioinformática del Gene Ontology de la CGD, el enriquecimiento proteico respecto a los procesos biológicos en los que con mayor probabilidad estén implicadas este grupo de proteínas indicó en primer lugar procesos relacionados con el establecimiento de localización celular, seguido por transporte celular y, en tercer lugar, localización celular (Figura 17).

Resultados



**Figura 17.** Evaluación de las proteínas correspondientes a 269 ORFs identificados en el experimento de transición dimórfica utilizando la herramienta de gene ontology finder (GO) en la CGD. Todas ellas agrupadas en el grupo otras proteínas.

#### 6.1.4. ANÁLISIS COMPARATIVO DE PROTEÍNAS SUPERFICIALES Y DE PROTEÍNAS DE EXTRACTOS TOTALES DE LEVADURAS E HIFAS DE *C. albicans*

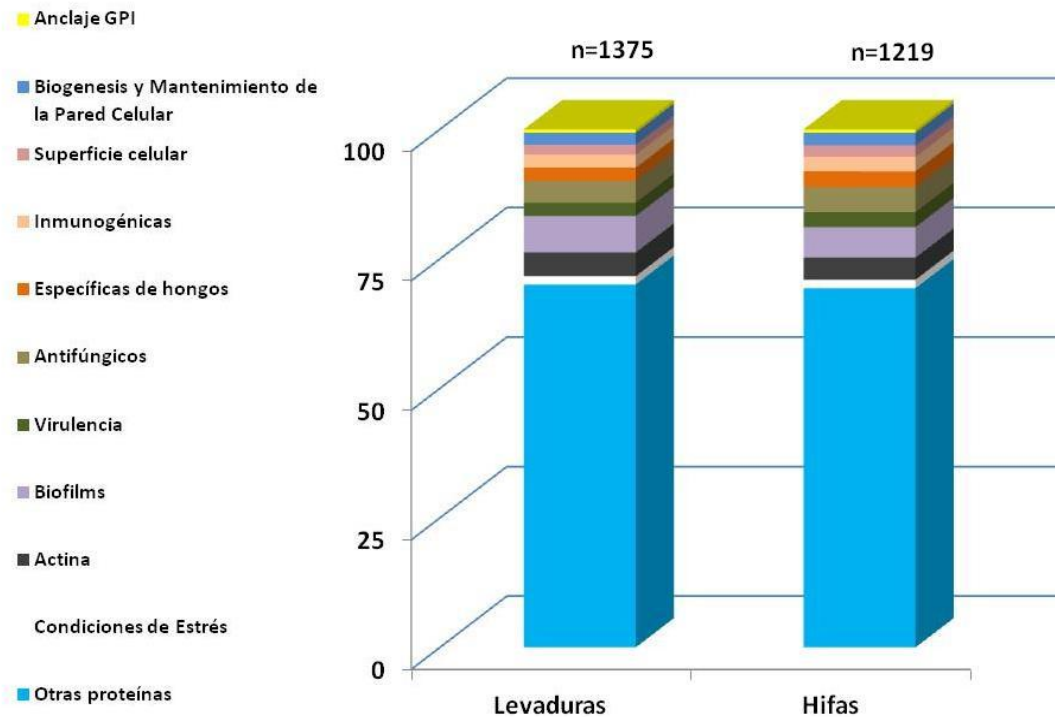
Con el objetivo de comparar el perfil proteico obtenido con la digestión trípica sobre células vivas y el perfil proteico de un extracto total de células de *C. albicans*, obtenido con la lisis de levadura e hifas, se analizaron con los mismos parámetros hasta ahora utilizados datos anteriores obtenidos por nuestro grupo de investigación. Para ello se tomaron los datos de un experimento de identificación de proteína de extractos totales de levaduras y de hifas mediante LC acoplada a Orbitrap, al igual que en los experimentos anteriores, donde se tuvieron en cuenta las proteínas identificadas por lo menos con dos péptidos. En todo el experimento se identificaron 1514 proteínas, de las cuales 1375 proteínas estaban presentes en levaduras y 1219 proteínas en hifas. Estas se agruparon en las 11 categorías anteriormente descritas y la clasificación se realizó de forma jerárquica y excluyente, con lo cual cada proteína se encuentra en una sola categoría. La distribución porcentual de las 11 categorías en levadura e hifas se muestran en la Tabla 13 y en la Figura 18.

**Tabla 13: Categorías proteicas encontradas en extracto total de levaduras e hifas de *C. albicans*.**

CATEGORIAS	LEVADURAS		HIFAS	
	Nº de proteínas	%	Nº de proteínas	%
<b>Anclaje GPI</b>	9	1	9	1
<b>Biogénesis y Mantenimiento de la Pared Celular</b>	32	2	30	2
<b>Superficie celular</b>	26	2	27	2
<b>Inmunogénicas</b>	35	3	34	3
<b>Específicas de hongos</b>	35	3	37	3
<b>Antifúngicos</b>	58	4	58	5
<b>Virulencia</b>	35	3	35	3
<b>Biofilms</b>	97	7	72	6
<b>Actina</b>	63	5	52	4
<b>Condiciones de Estrés</b>	22	2	20	2
<b>Otras proteínas</b>	963	70	845	69
<b>Total</b>	<b>1375</b>	<b>100</b>	<b>1219</b>	<b>100</b>

Los colores de las celdas cambian de acuerdo al número mas alto de proteínas identificadas acercandose al color rojo en el valor más alto.

## Resultados



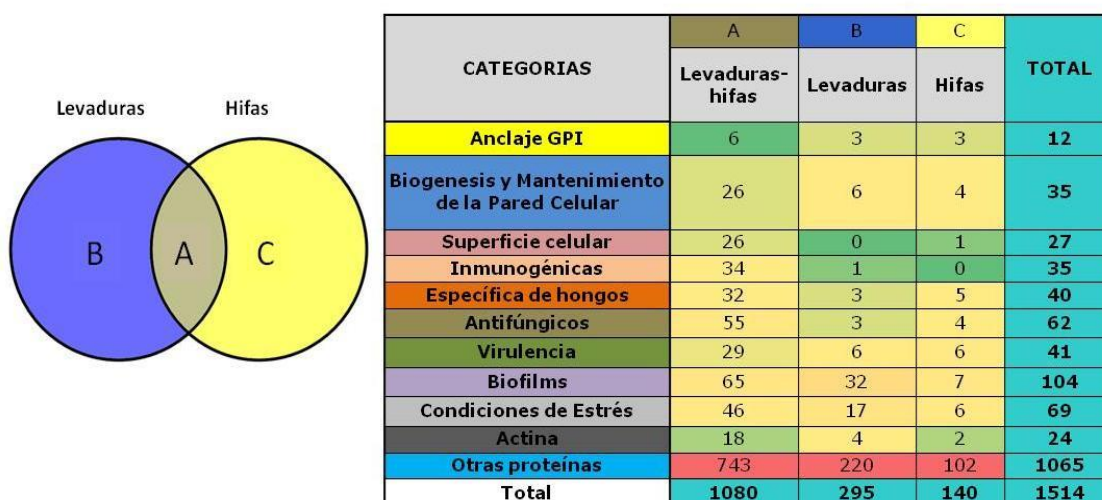
**Figura 18:** Distribución porcentual de las diferentes categorías en extractos totales de levaduras e hifas de *C. albicans*.

La clasificación de las proteínas en las diferentes categorías es jerárquica y excluyente por lo cual cada proteína se ha tenido en cuenta en una sola categoría

Podemos observar que solo el 30% de las proteínas identificadas tanto en levaduras como en hifas pudieron ser agrupadas en las categorías designadas en este trabajo. El 70% de proteínas quedaron en el resto de proteínas. Además se pudo observar una distribución porcentual casi idéntica entre hifas y levaduras en todas las categorías.

El paso siguiente fue analizar estos datos mediante diagramas de Venn (Tabla 14) y se encontró que 1080 proteínas son comunes en los dos tipos celulares, 295 están presentes solo en levaduras y 102 proteínas solo en hifas. La mayoría de proteínas en cada una de las categorías se encuentran dentro de las proteínas comunes entre levaduras e hifas. De la proteínas específicas de una de las dos morfologías se ha identificado un número similar en levaduras y en hifas en la mayoría de las categorías; sin embargo, dentro de las proteínas relacionadas con la formación de Biofilms y las relacionadas con respuesta a condiciones de estrés hay un número significativamente mayor de proteínas (32 y 17, respectivamente) en levaduras que en hifas (7 y 6, respectivamente).

**Tabla 14. Resultados del análisis mediante diagramas de Venn, de la distribución de las proteínas identificadas en extractos totales de *C. albicans*.**



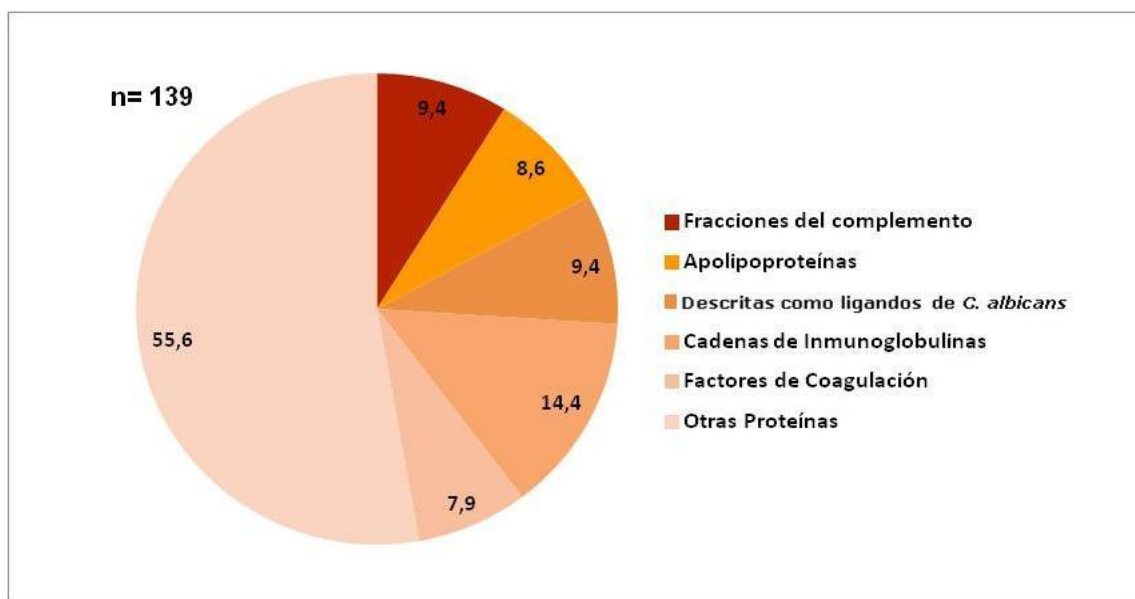
Los datos mostrados en la Tabla han sido obtenidos por el análisis de las listas de proteínas agrupadas en cada categoría, de cada experimento (levaduras e hifas) mediante diagramas de Venn. Cada línea representa un análisis independiente, donde el resultado del diagrama se corresponde a la letra que designa cada columna que se correlaciona con el resultado del diagrama de conjuntos. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/Venny/index.html>.

**Tabla 15: Perfil proteómico de extracto total de levaduras e hifas de *C. albicans***

CATEGORIAS	LEVADURAS E HIFAS	LEVADURAS	HIFAS	TOTAL
Anclaje GPI	6 Crh11, Ecm33, Pga4, Pga45, Pga63, Utr2.	3 Dcw1, Plb4.5, Sap9.	3 Als1, Als3 Rbt1.	12
Biogénesis y Mantenimiento de la Pared Celular	26 Age3, Ape2, Arp2, Bgl2, Chs5, Csp37, Ecm17, Frs1, Gda1, Gpd2, Lmo1, Mnt1, Orf19.4246, Orf19.969, Phr1, Pmi1, Pmm1, Pmr1, Pmt2, Rvs161, Rvs167, Slk19, Ssa2, Sur7, Tma19, Xyl2.	6 Bud7, Cbk1, Efg1, Mnn9, Orf19.1196, Phr2.	4 Chs4, Gal10, Mp65,	35
Superficie celular	26 Adh1, Atp1, Bmh1, Cdc19, Cef3, Csh1, Eno1, Gph1, Hem13, Hsp70, Hsp90, Orf19.6082, Pdc11, Pgc1, Pii1, Rps6a, Sam2, Sdh2, Srb1, Ssb1, Ssc1, Tdh3, Tef1, Tkl1, Tsa1, Ugp1.	0 -	1 Msb2.	27
Inmunogénicas	34 Ach1, Aco1, Acs2, Ade17, Adh5, Atp2, Cys4, Efb1, Eft2, Fba1, Gnd1, Gre3, Grp2, Hxk2, Ilv5, Imh3, Ipp1, Leu1, Lpd1, Mdh1, Met6, Orf19.1946, Pdi1, Pgi1, Qcr2, Rpl13, Rpp0, Sah1, Sec13, Shm2, Tif, Tpi1, Yst1, Zwf1.	1 Orf19.6396.	0 -	35
Específicas de hongos	32 Ade1, Aro1, Aro2, Aro7, Fas1, Gap6, Gdh2, His1, Hom3, Ilv6, Leu42, Lsp1, Lys1, Lys22, Mca1, Mss51, Mtr10, Nde1, Nma111, Orf19.2269, Orf19.5541, Osm1, Phm7, Pst3, Sla1, Svf1, Thr1, Trr1, Vid27, Vtc3, Ycp4, Yhm1.	3 Lig1, Sct1, Vtc4.	5 Cnh1, Orf19.4805, Rgd3, Rib5, Vcx1.	40
Relacionadas con respuesta a antifúngicos	55 Ahp1, Ald5, Cat1, Cdc60, Cdc68, Cyb5, Dak2, Erg10, Erg11, Erg3, Erg6, Erg9, Fas2, Fet34, Fma1, Glk1, Gnp1, Gpm1, Gsc1, Hgt6, Hgt7, Hhf22, Hmg1, Ife2, Lsc1, Lys21, Met3, Mir1, Mis11, Msi3, Mvd, Nmt1, Ole1, Orf19.2296, Orf19.251, Orf19.3475, Orf19.4216, Orf19.7459, Pck1, Pda1, Pdb1, Pfk1, Pfk2, Pma1, Por1, Prx1, Rct1, Rnr21, Rpl35, Sds24, Snf7, Tps2, Tub2, Vma8, Zpr1.	3 Glc3, Orf19.1691, Ucf1.	4 Cmp1, Ece1, Erg27, Erg4.	62
Virulencia	29 Ade2, Ade5, Alo1, Asc1, Cdc10, Cdc11, Cdc3, Cdc42, Het1, Mlt1, Mts1, Nth1, Orf19.3045, Orf19.3175, Orf19.39326, Pmt1, Ptc2, Ras1, Rsr1, Sod1, Srv2, Ssd1, Ssn6, Tps1, Ttr1, Vps21, Wh11, Yhb1, Ypt72.	6 Met2, Pho87, Pld1, Ptc5, Spa2, Tcc1.	6 Cla4, Cst20, Kex2, Not3, Rfx2, Sch9.	41
Formación de Biofilms	65 Acs1, Ade12, Ade8, Adk1, Bat21, Car1, Car2, Cat2, Cdr4, Cic1, Cit1, Ctr1, Cyp1, Cys3, Dqd1, Egd1, Elf1, Erg1, Gcy1, Glt1, Gly1, Gpd1, Gsy1, Guk1, Gut2, Hsp104, Hta2, Ilv1, Ilv3, Mcr1, Met15, Mrt4, Npi3, Orf19.1388, Orf19.1889, Orf19.2286, Orf19.3325, Orf19.394, Orf19.409, Orf19.5620, Orf19.6090, Orf19.6559, Orf19.7069, Orf19.7152, Orf19.7244, Pgm2, Pho88, Put2, Reg1, Rhr2, Rnr1, Rob1, Sec2, Ser33, Smi1, Sti1, Tal1, Tim9, Trp4, Trp5, Trx1, Tub1, Tup1, Ura1, Ynk1.	32 Abc1, Bub3, Cdc21, Cdr1, Cpa2, Dbp7, Dim1, Gpm2, Hal21, Hal22, Met10, Met14, Mls1, Mrpl33, Mss116, Muq1, Nce102, Orf19.1159, Orf19.6189, Pam16, Prb1, Ptr2, Pus7, Rnr22, Sda1, Sod3, Sof1, Stf2, Sys3, Tim22, Tps3, Yke2.	7 Aaf1, Cdr2, Ctm1, Fbp1, Orf19.3983, Pho84, Pst1.	104
Condiciones de Estrés	46 Adh2, Arx1, Asr2, Cpr6, Dbp2, Drs1, Ecm4, Ena2, Fdh3, Gad1, Gln1, Glr1, Gsh2, Hog1, Hsp12, Hsp60, Hsp78, Ifr2, Kem1, Kre30, Mak5, Mrf1, Mrpl3, Nmd5, Orf19.1862, Orf19.2782, Orf19.3260, Orf19.5239, Orf19.5517, Orf19.6596, Orf19.7085, Orf19.7160, Orf19.7368, Pbs2, Pwp1, Rpn3, Rpo41, Rpt2, Sba1, Sis1, Sod2, Sod5, Ubp6, Ycf1, Yck2, Ydj1.	17 Ebp1, Glo1, Mas1, Nmd3, Noc2, Nop4, Npr1, Orf19.2319, Orf19.3778, Orf19.6245, Orf19.6319, Orf19.6816, Orf19.813, Pho15, Prs5, Rck2, Utp18.	6 Dcp2, Ena21, Orf19.7023, Orf19.7034, Orf19.7602, Utp13.	69
Actina	18 Abp1, Act1, Aip2, Arc40, Arp3, Bzz1, Myo2, Orf19.1236, Orf19.1796, Orf19.3235, Orf19.3505, Orf19.4395, Orf19.4633, Orf19.5671, Orf19.6534.2, Pan1, Sac6, Sla2.	4 Orf19.1444, Orf19.2228, Orf19.4127, Orf19.730.	2 Myo5, Orf19.4597.	24
Otras Proteínas.	743	220	102	1065
Total	1080	295	139	1514

### 6.1.5. PROTEÍNAS HUMANAS IDENTIFICADAS EN LA SUPERFICIE CELULAR DE *C. albicans*

Una vez identificadas las proteínas pertenecientes a *C. albicans*, con el objetivo de evaluar las proteínas del suero humano que se hayan unido a la superficie celular de *C. albicans*, los espectros de masas obtenidos del análisis de las muestras con 10%S fueron cotejados con la base de datos Swiss Prot Human. Los criterios de selección de proteínas fueron los mismos que se utilizaron para las proteínas de *C. albicans*: que la proteína se hubiera identificada en 3 réplicas biológicas, en 2 réplicas biológicas con 2 o más péptidos o en 1 réplica biológica con 3 o más péptidos. Se identificaron un total de 139 proteínas, que se clasificaron según las descripciones de la base de datos en 6 grupos: Proteínas pertenecientes a la cascada del complemento, apolipoproteínas, proteínas descritas como ligando de *C. albicans*, cadenas de inmunoglobulinas, proteínas de la cascada de la coagulación y otras proteínas (Figura 19).



**Figura 19:** Clasificación de las proteínas identificadas en el surfoma de hifas obtenidas en medio lee con el suplemento del 10% de suero de humano.

Las identificaciones se realizaron basadas en la información de la base de datos Swiss Prot Human [http://web.expasy.org/docs/swiss-prot\\_guideline.html](http://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html).

El 9.4% de proteínas humanas identificadas en la superficie de hifas de *C. albicans* pertenecen al sistema del complemento, (Tabla 16) donde se identificaron 7 proteínas de las 9 que conforman los componentes propiamente dichos de éste. Es interesante ver que la proteína con la que mayor número de péptidos se identificó

Resultados

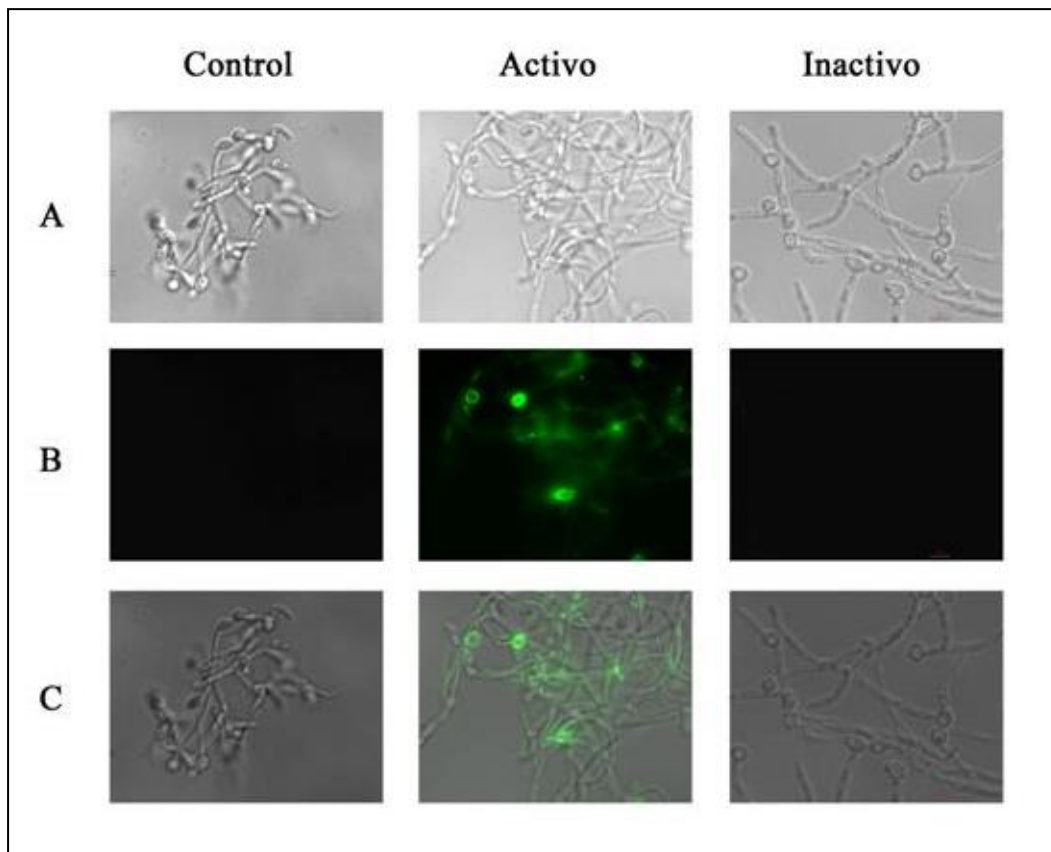
de este sistema fue **C3** con alrededor 100 péptidos, el resto de fracciones del complemento se identificaron en todos los casos con más de 3 péptidos.

**Tabla 16. Proteínas de la cascada del complemento, identificadas en la superficie celular hifas de *C. albicans* inducidas con el 10% de suero humano.**

PROTEINAS	EXPERIMENTOS		
	1	2	3
	Nº de péptidos		
<b>Complemento C3</b>	103	106	141
<b>Complemento C5</b>	34	23	21
<b>Complemento C4-A</b>	32	32	94
<b>Complemento C4-B</b>	32	33	95
<b>Fracción C6 del complemento</b>	20	18	4
<b>Fracción C9 del complemento</b>	17	15	17
<b>Cadena alfa de la fracción C8 del complemento.</b>	13	11	6
<b>Fracción C7 del complemento</b>	13	9	8
<b>Factor B del Complemento.</b>	8	3	8
<b>Fracción C8 del cadena gamma</b>	6	6	4
<b>Cadena beta de la fracción C8 del complemento</b>	5	6	16
<b>Cadena alfa de la fracción C4b del complemento.</b>	5	3	4

Las columnas 1, 2 y 3 corresponden a las tres réplicas biológicas del experimento y los datos del número de péptidos con el que se identificó cada proteína por ORBITRAP.

Con el objetivo de validar la unión de alguna de las proteínas de la cascada del complemento a la superficie de *C. albicans*, hifas inducidas con el 10% de suero humano, y tratadas en las mismas condiciones que las utilizadas para la digestión trípica, se fijaron en portaobjetos y se les realizó inmunotinción con suero policlonal anti-C3. En la Figura 20, se puede observar la inmunotinción positiva para las hifas inducidas con suero humano, los controles utilizados corresponden a hifas inducidas únicamente en medio Lee 6.7 y a hifas inducidas con suero humano inactivado por calor.



**Figura 20:** Microscopia de fluorescencia para la evaluación de la presencia de la fracción C3 del complemento humano, sobre la superficie de hifas inducidas con suero humano.

El otro grupo proteico interesante de este estudio corresponde a un 8.6% de proteínas séricas denominadas apolipoproteínas, las cuales se encuentran en una proporción similar a los componentes del complemento, tanto con respecto a su presencia como a su abundancia relativa. Se encuentran todas las apolipoproteínas esenciales en el metabolismo de los lípidos (Tabla 17). Apo B100 es la apolipoproteína que con mayor abundancia de péptidos se identifica, seguida por ApoAI ApoAIV y ApoE que se identifican con más de 10 péptidos, el resto de apolipoproteínas se identifican por lo menos 1 péptido en las 3 réplicas biológicas realizadas.

**Tabla 17. Apolipoproteínas identificadas en la superficie celular de las hifas de *C. albicans* inducidas con 10 % de suero humano.**

PROTEINAS	EXPERIMENTOS		
	1	2	3
	Nº de péptidos		
<b>Apolipoproteína B-100</b>	102	97	240
<b>Apolipoproteína A-I</b>	17	14	18
<b>Apolipoproteína A-IV</b>	17	13	7
<b>Apolipoproteína E</b>	13	13	17
<b>Apolipoproteína A-II</b>	4	1	7
<b>Apolipoproteína C-I</b>	2	3	1
<b>Apolipoproteína C-III</b>	1	1	3
<b>Apolipoproteína D</b>	1	1	1
<b>Apolipoproteína L1</b>	1	2	6
<b>Apolipoproteína C-IV</b>	1	1	3
<b>Apolipoproteína C-II</b>	1	0	3
<b>Apolipoproteína A-V</b>	3	2	0

Las columnas 1, 2 y 3 corresponden a las tres réplicas biológicas del experimento.

Otro grupo de proteínas interesantes para este trabajo está formado por proteínas en las que ha sido descrita su capacidad de unión a la superficie celular de *C. albicans*. De estas, las proteínas que se identifican con el mayor número de péptidos fueron: fibronectina, albúmina sérica, serotransferrina, diversas cadenas del fibrinógeno, galectina, vitronectina, proteína AMBP y gelsolina, entre otras. Tabla 18.

**Tabla 18. Proteínas descritas como ligandos de *C. albicans*, identificadas en la superficie celular hifas de *C. albicans* inducidas con 10% de suero humano.**

PROTEÍNAS	EXPERIMENTOS		
	1	2	3
	Nº de péptidos		
<b>Fibronectina</b>	60	62	15
<b>Albumina sérica</b>	52	54	27
<b>Serotransferrina</b>	29	26	2
<b>Fibrinógeno cadena alfa</b>	13	12	3
<b>Fibrinógeno cadena beta</b>	13	10	2
<b>Galectina-3</b>	10	12	5
<b>Vitronectina</b>	10	12	10
<b>Proteína AMBP</b>	9	7	5
<b>Gelsolina</b>	9	10	42
<b>Proteína de unión a LPS</b>	8	9	13
<b>Kalikreina plasmática</b>	7	8	2
<b>Fibrinógeno cadena gamma</b>	6	6	1
<b>Plasminógeno</b>	5	6	21

Las columnas 1, 2 y 3 corresponden a las tres réplicas biológicas del experimento.

El 14.4% de las proteínas humanas identificada en la superficie de *C. albicans* son cadenas de inmunoglobulinas, se identifican las cadenas pesadas de la región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM e IgD y la cadena ligera kappa. El 7.9% corresponden a diferentes factores y cofactores de la cascada de la coagulación, entre ellos los que con mayor número de péptidos se identifican son el factor Von Willebrand y la protombina. Finalmente el 55.6% de proteínas fueron agrupadas en "otras proteínas" (Anexo 2 de material suplementario).

Con el objetivo de determinar si la pared celular de *C. albicans* es capaz de activar la cascada del complemento, en un experimento preliminar se estimuló la inducción de filamentos tanto con suero humano como con suero inactivado con calor y se identificaron en paralelo las proteínas humanas unidas a la de superficie de las dos muestras de filamentos de *C. albicans* mediante digestión trípica. Las condiciones del experimento fueron idénticas a las de los experimentos anteriores sin embargo, en este caso la identificación se realizó con otro espectrómetro de masas, la trampa iónica (LTQ), la cual posee una menor sensibilidad que la Orbitrap. Con esta metodología fueron

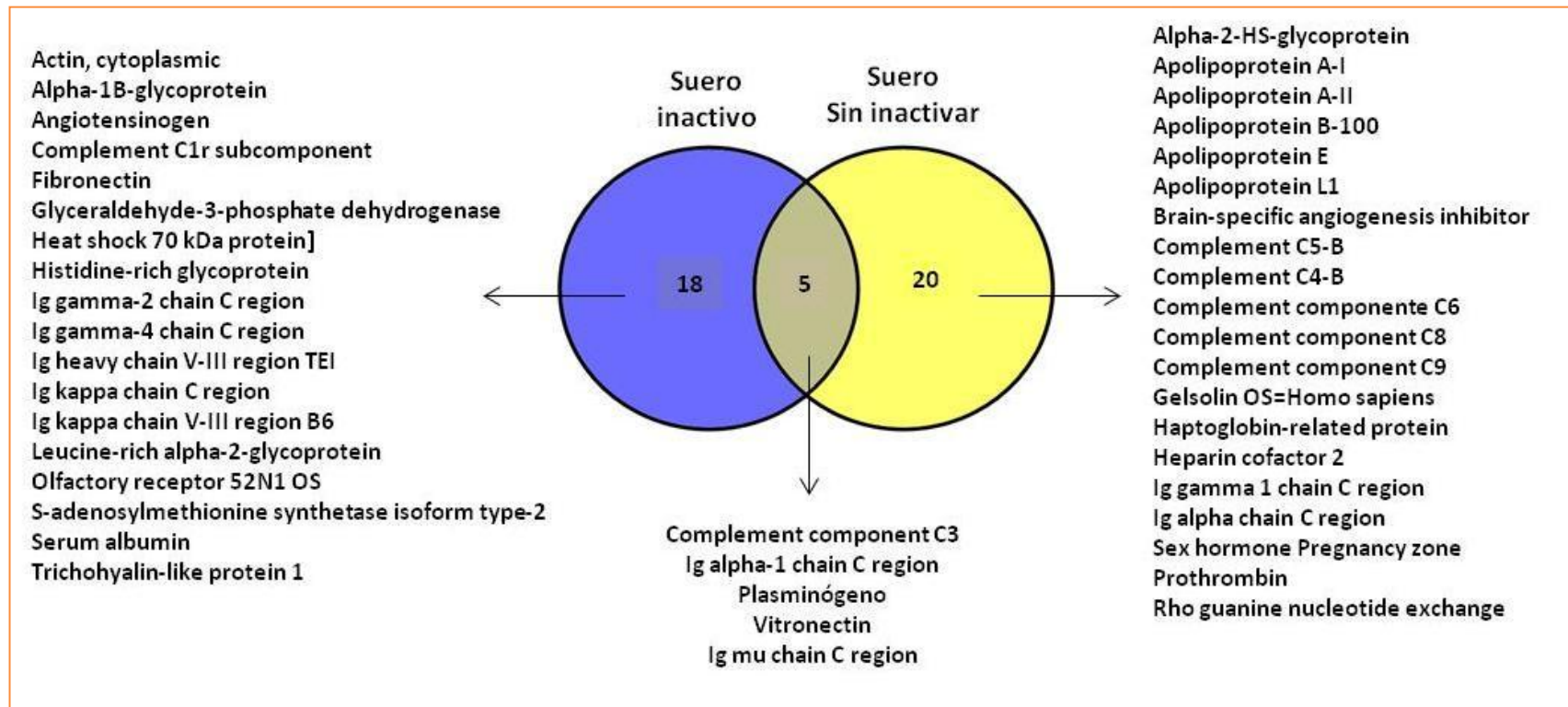
identificadas 23 proteínas en la superficie de hifas inducidas con suero humano y 25 proteínas en el suero control inactivado con calor (Figura 21). Estas proteínas se analizaron con el uso de diagramas de Venn que muestran que solo 5 proteínas son comunes en los dos experimentos, siendo C3 la única proteína del sistema del complemento que se ha podido detectar en ambas condiciones. . Del grupo de apolipoproteínas no se identifica ninguna proteína.

## **6.2. PERFIL PROTEÓMICO DE LA SUPERFICIE DE *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* Y *C. glabrata***

Además del interés por estudiar el surfoma de las células implicadas en la transición dimórfica de *C. albicans* como el principal agente etiológico de la candidiasis invasiva, también se estudiaron las proteínas de superficie de *Candida* no-*albicans*, las cuales debido a los avances tecnológicos en medicina cada vez cobran una mayor importancia como agentes etiológicos en paciente en estado crítico especialmente inmunocomprometidos.

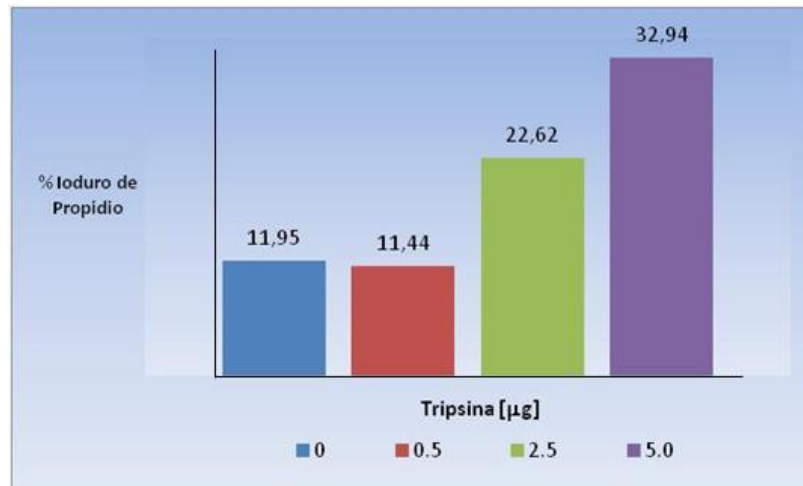
Por este motivo se utilizó la misma estrategia proteómica descrita para *C. albicans* en *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. Para ello las levaduras se cultivaron en medio mínimo a 37°C y se recogieron las células en fase logarítmica, se lavaron y se procedió a la tripsinización superficial. Como control de todo el proceso se evaluó la permeabilidad selectiva de las células por incorporación de yoduro de propidio (Figuras 22 y 23). Sin embargo, las 3 especies de *Candida* no-*albicans* estudiadas mostraron una mayor susceptibilidad a la digestión trípica, diferente entre sí y también diferente a la mostrada por *C. albicans*. Una de las principales diferencias radicó en el alto número de células con alteración de la permeabilidad selectiva antes y después de la tripsinización, mostrando una alta sensibilidad de las células a este procedimiento. La especie más susceptible a la digestión trípica fue *C. glabrata*, luego, *C. tropicalis* y finalmente *C. parapsilosis*. En conjunto, todas mostraron una mayor sensibilidad al proceso de tripsinización con respecto a *C. albicans*.

Para intentar disminuir la alteración en la permeabilidad selectiva se realizaron pruebas con diferentes concentraciones de tripsina conservando el tiempo de digestión (Figura 22). En ninguno de los casos se consiguió disminuir. En el caso *C. glabrata* los valores iniciales de células positivas para Yoduro de propidio fueron de aproximadamente el 10% y después de la digestión con 5.0 µg durante 5min y con DTT 0.01M llegaron hasta el 30%, mientras que en *C. albicans* nunca supera el 1% después de la digestión.



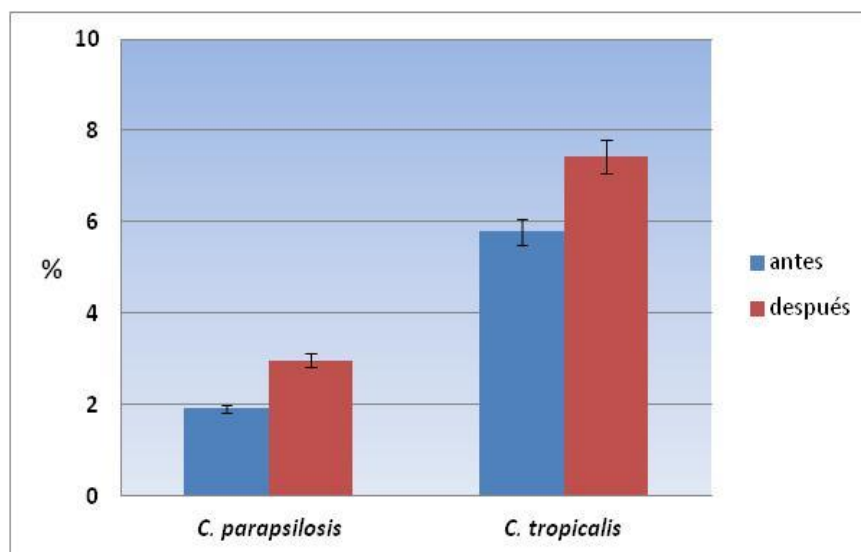
**Figura 21: Figura 22:** Comparación mediante diagramas de Venn del perfil proteómico de la superficie de hifas inducidas con suero humano. Activado y sin activar. La proteínas has sido identificadas utilizando LC acoplada a LTQ

## Resultados



**Figura 23:** Porcentajes de células de *C. glabrata* positivas para ioduro de propidio en diferentes concentraciones de tripsina.

Para el caso de *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, en los 3 experimentos realizados los porcentajes oscilaron entre antes y después de la digestión, de 1 a 3% y de 5 a 9%, respectivamente, (Figura 23).



**Figura 24:** Porcentajes de células positivas para ioduro de propidio antes y después de realizar la digestión trípica de la superficie celular de *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*.

Existe la posibilidad que la temperatura de incubación de los cultivos a 37°C pueda ser la causa de los altos niveles de células positivas para ioduro de propidio, teniendo en cuenta que las temperaturas óptimas de crecimiento para estas levaduras oscilan entre 24 y 30°C. Pero teniendo en cuenta que el objetivo es buscar proteínas que se expresen en condiciones fisiológicas del ser humano para fines diagnósticos y/o terapéuticos y

que la adaptación a esta temperatura exige una regulación génica importante en los microorganismos, se decidió no modificar este parámetro.

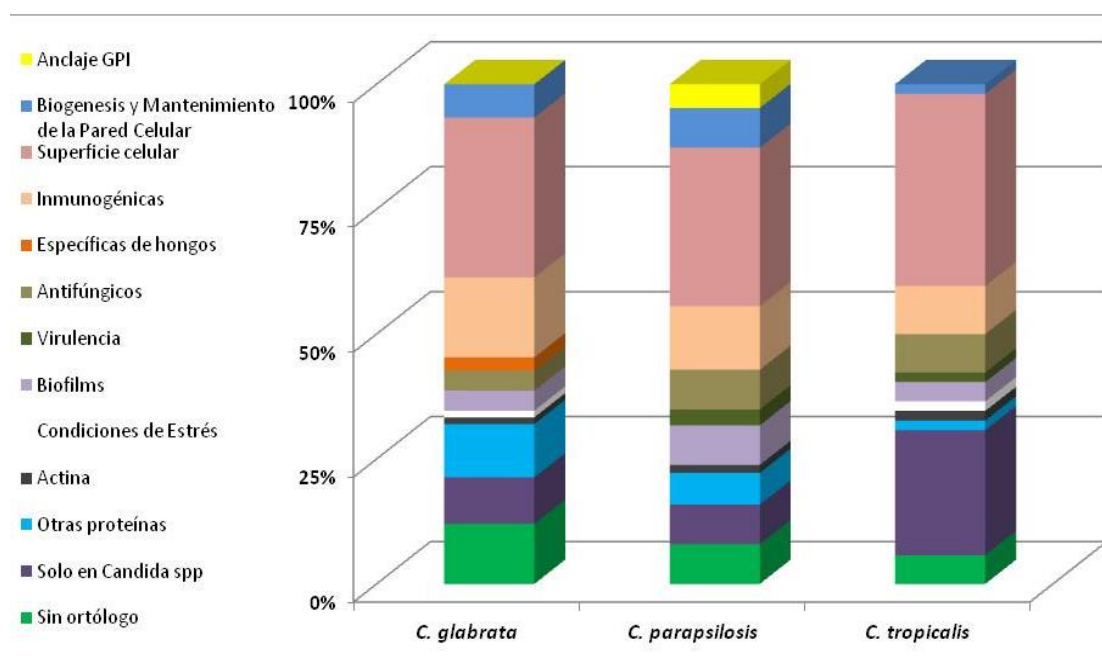
Para analizar las proteínas identificadas en las 3 cepas de *Candida no-albicans*, se buscaron los genes ortólogos en *C. albicans*, esta información se buscó con las herramientas bioinformáticas de las Bases de datos CGD para *C. parapsilosis* y *C. glabrata* y Swiss prot para *C. tropicalis*, en ellas se buscaron los ortólogos de las proteínas en *C. albicans*. Posteriormente se clasificaron de forma jerárquica en las mismas 11 categorías, utilizadas para el estudio de la transición dimórfica de *C. albicans*. A estas once categorías se adicionaron dos más, la primera: proteínas que a pesar de tener ortólogo solo se identificaron en la cepa no-*albicans* (morado), y la segunda, las proteínas que no tienen ortólogo en *C. albicans* (verde claro) (Figura 17).

Al analizar la distribución porcentual de las diferentes categorías en cada una de las especies de *Candida*, observamos que proteínas con anclaje GPI solo se identificaron en *C. parapsilosis*. Proteínas específicas de hongos, solo se identificaron en *C. glabrata* en la que no se identificaron proteínas relacionadas con virulencia. En *C. parapsilosis*, no se identificaron proteínas relacionadas con condiciones de estrés. Además observamos que el que mayor porcentaje de proteínas no identificadas en *C. albicans* está en *C. tropicalis* (Tabla 19 y Figura 24).

**Tabla 19: Clasificación de las proteínas identificadas surfoma de distintas especies de *Candida no-albicans***

CATEGORIAS	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
Anclaje GPI	0,0	4,8	0,0
Biogénesis y Mantenimiento de la Pared Celular	6,7	7,9	1,9
Superficie celular	32,0	31,7	38,5
Inmunogénicas	16,0	12,7	9,6
Específicas de hongos	2,7	0,0	0,0
Antifúngicos	4,0	7,9	7,7
Virulencia	0,0	3,2	1,9
Biofilms	4,0	7,9	3,8
Condiciones de Estrés	1,3	0,0	1,9
Actina	1,3	1,6	1,9
Otras proteínas	10,7	6,3	1,9
Identificadas solo en <i>Candida spp</i>	9,3	7,9	25,0
Sin ortólogo	12,0	7,9	5,8
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

## Resultados



**Figura 25:** Distribución porcentual de las diferentes categorías de las proteínas identificadas mediante digestión trípica sobre célula viva de levaduras de *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*.

En el caso de *C. glabrata* se identificaron en total 75 proteínas. Los datos obtenidos con las todas las variaciones de concentración de tripsina y el número péptidos con que se identificaron se muestran en la tabla 20. Adicionalmente dicha tabla muestra la correspondiente proteína ortóloga en *C. albicans*, información utilizada para la clasificación en las categorías que se muestran en todos los análisis realizados. Sólo se identificó una proteína con **anclaje GPI, CAGL0F01683g**, que no presenta ortólogo en *C. albicans* y cuyo análisis *in-silico* indica que posee dicho tipo de **anclaje GPI**. Se identificaron 5 proteínas relacionadas con biogénesis y mantenimiento de la pared celular: **Mp65, Pmm1, 2 proteínas ortólogas a Srb1 y Tma19**. En la categoría de proteínas relacionadas con la superficie celular está la proteína con mayor número de péptidos identificada que es la ortóloga a **Eno1**, seguida de **Pdc11, Pgk1 y Tdh3**. En la única categoría que no se identificó ninguna proteína ortóloga a *C. albicans* fue en la de proteínas relacionadas con virulencia. Por otra parte, solo 10 proteínas no fueron identificadas en los experimentos de la transición dimórfica de *C. albicans* y, además, es la especie en la que se identificó un mayor número de proteínas sin ortólogo en *C. albicans* (Tabla 21).

En cuanto a las 63 proteínas identificadas en *C. parapsilosis*, 3 de ellas son proteínas ortólogas a proteínas con **anclaje GPI** de *C. albicans*, **Cht2, Chr11 y Ecm33**. Éste fue

en la única especie en la que conseguimos identificar proteínas incluidas en esta categoría. De las proteínas relacionadas con biogénesis y mantenimiento de la pared celular se identificaron 5 proteínas: **Bgl2**, **Gpd2**, **Mp65**, **Pir1** y **Ywp1**. En superficie celular se identificaron 20 proteínas y es interesante destacar que las proteínas que con mayor número de péptidos se identificaron fueron las proteínas chaperonas Hsp90 y Ssa2, junto con la proteína de superficie celular Tdh3. Las únicas categorías en las que no se identificaron proteínas fueron: proteínas específicas de hongos y proteínas que únicamente estén relacionadas con adaptación a condiciones de estrés (Tabla 21).

De las 52 proteínas identificadas en *C. tropicalis*, 13 no fueron identificadas en los experimentos con *C. albicans*, de las cuales varias son proteínas ribosomales. La manoproteína **Mp65** fue la única proteína relacionada estrechamente con pared que fue identificada. Se identificaron 20 proteínas relacionadas con superficie celular, todas identificadas en *C. albicans*. No se identificaron proteínas que no tuviesen ortólogo en *C. albicans* ni con anclaje GPI, ni específicas para hongos (Tabla 22).

Podemos observar que aproximadamente el 80% de las proteínas de todas las identificadas en *Candida no-albicans*. Estas habían sido identificadas en el experimento de la transición dimórfica de *C. albicans*.

**Tabla 20. Perfil proteómico de la superficie de *C. glabrata* CBS 185**

ID CGD	ORTÓLOGO <i>C. albicans</i> SC5314	DESCRIPCIÓN	[ug] de tripsina			
			0	0,5	2,5	5
			Nº de Péptidos			
CAGL0K12694g	ACT1	ORF verificado; actina	-	2	2	3
CAGL0I07843g	ADH2	ORF verificado; alcohol 2 dehidrogenasa	-	1	3	4
CAGL0K11418g	ADK1	Adenilato quinasa	-	1	1	1
CAGL0M11704g	AHP1	Tiol-peroxiredoxina	-	1	2	5
CAGL0H10142g	ARO3	2-dehidro-3-deoxifosfoheptonato aldolasa	-	2	1	-
CAGL0I10648g	ASN1	ORF no-caracterizado; asparagina sintetasa	-	1	1	-
CAGL0L06270g	BMH1	ORF no-caracterizado; proteína con dominio 14-3-3	-	1	1	-
CAGL0L12056g	BMH1	ORF verificado; proteína con dominio 14-3-3	-	-	2	-
CAGL0M12034g	CDC19	ORF verificado; piruvato quinasa	-	1	5	5
CAGL0B03487g	CEF3	Factor 3 de elongación de la traducción	-	-	2	1
CAGL0E01177g	CIP1	ORF verificado; ciclofilina, peptidil-prolil-cis-trans isomerasa	-	2	1	1
CAGL0G02101g	ECM4	S-glutantion transferasa	-	-	1	1
CAGL0F08547g	EFB1	Factor de elongación de la traducción eF1β	2	4	2	2
CAGL0A03234g	EFT2	ORF no caracterizado; factor de elongación 2	-	4	4	6
CAGL0I02486g	ENO1	Enolasa I	-	14	14	10
CAGL0D00528g	FAS1	Sintasa de ácidos grasos	-	2	2	2
CAGL0L02497g	FBA1	ORF verificado; fructosa-bisfosfato aldolasa.	-	4	2	3
CAGL0F00605g	GLK1	ORF verificado; aldohexosa glucoquinasa	-	-	1	2
CAGL0C05137g	GPD1	Similar a glicerol-3-fosfato dehidrogenasa	-	1	1	1
CAGL0E06358g	GPM1	Fosfoglicerato mutasa	-	1	2	2
CAGL0K05973g	HSP60	ORF verificado; proteína de choque térmico HSP60	-	2	1	1
CAGL0L00495g	HSP90	ORF no-caracterizado; proteína de choque térmico	-	2	1	4
CAGL0B03047g	ILV5	reductocetoácido isomerasa	-	-	1	1
CAGL0I06050g	INO1	Inositol-1-fosfato sintasa.	-	1	3	3
CAGL0H09878g	IPP1	ORF verificado; pirofosfatasa	-	1	1	-
CAGL0G00308g	MP65	implicada en el metabolismo del glucano	-	1	1	-
CAGL0F01683g	No	ORF no caracterizado; proteína con anclaje GPI	-	-	1	1
CAGL0A03278g	No	ORF no caracterizado; Ortólogos localizados en la superficie celular	-	1	1	1
CAGL0G00154g	No	Ortólogos implicados en el procesamiento del rRNA	-	1	1	1
CAGL0I04356g	No	ORF Verificado; factor de iniciación de la translación eIF4A	-	1	1	1
CAGL0J06374g	No	Ortólogo a proteína ribosomal	-	1	1	1
CAGL0K09592g	No	Ortólogo a proteína de canal de transporte	1	1	1	-
CAGL0K03465g	No	Ortólogo a aceto-lactato sintasa	-	1	1	-
CAGL0M00880g	No	Posible ornitina-aminotransferasa	-	1	-	-
CAGL0M06237g	No	Ortólogo a alcohol O-butanoiltransferasa.	-	1	-	-
CAGL0G09130g	orf19.2478.1	Ortólogo a proteína ribosomal	-	-	2	2
CAGL0L11792g	orf19.3037	Ortólogo a proteína ribosomal	-	1	1	-
CAGL0F09031g	orf19.3354	Ortólogo a proteína ribosomal	-	2	1	2
CAGL0B01419g	orf19.410.3	implicado en la síntesis de rivo flavina	-	-	1	1
CAGL0J09878g	orf19.4601	Ortólogo a proteína de unión a DNA	-	-	1	1
CAGL0E00869g	orf19.5943.1	Ortólogo a proteína de unión a DNA	-	2	3	2
CAGL0K01683g	orf19.6147	Ortólogo a proteína de unión a DNA	-	1	1	1
CAGL0M07920g	PDC11	ORF verificado; piruvato decarboxilasa.	-	11	8	8
CAGL0H05445g	PGI1	ORF verificado; glucose-6-fosfato isomerasa	-	2	1	-
CAGL0L07722g	PGK1	Posible 3-fosfoglicerato quinasa	-	6	10	4
CAGL0L08932g	PIL1	Componente de eisosomas	-	1	-	1
CAGL0A00495g	PMA1	ORF no caracterizado; posible proteína de membrana plasmática	-	1	1	-
CAGL0K12848g	PMM1	ORF novcaracterizado; posible fosfomannomutasa	-	-	1	1
CAGL0K11858g	PST3	ORF verificado; Posible flavodoxina	-	2	3	3
CAGL0F02937g	RPL12	Ortólogo a proteína ribosomal	-	-	2	1
CAGL0E02013g	RPL18	ORF no caracterizado; ortólogo a proteína ribosomal	-	1	-	1
CAGL0G03575g	RPL23A	ORF no caracterizado; ortólogo a proteína ribosomal	-	-	1	1
CAGL0G02079g	RPL3	ORF no caracterizado; ortólogo a proteína ribosomal	-	2	-	1
CAGL0B04257g	RPL4B	Ortólogo a proteína ribosomal con localización en la superficie celular	-	1	1	1
CAGL0M02695g	RPL5	Ortólogo a proteína con union al RNA	-	-	1	2
CAGL0K06149g	RPS17B	Ortólogo a proteína ribosomal	-	1	-	1
CAGL0J11220g	RPS3	Ortólogo a proteína con actividad liasa.	1	1	2	2
CAGL0M06303g	RPS6A	Ortólogo a proteína ribosomal	-	2	2	2
CAGL0C02189g	SAH1	ORF no caracterizado; ortólogo localizado en el citosol	-	2	3	2
CAGL0B01122g	SAM2	ORF no caracterizado; S-adenosilmetionina sintetasa	-	1	2	2
CAGL0H04983g	SRB1	ORF no caracterizado; posible manosa-1-fosfato-guaniltransferasa	-	-	1	1
CAGL0D01034g	SRB1	GDP-manosa pirofosforilasa	-	1	2	1
CAGL0G03795g	SSA2	ORF Verificado; proteína de choque térmico, familia de HSP70	-	5	5	3
CAGL0C05379g	SSB1	ORF Verificado; proteína de choque térmico	-	3	4	3
CAGL0L10560g	SSZ1	Proteína de choque térmico	-	1	1	-
CAGL0B03069g	TAL1	ORF verificado; posible transaldolasa.	-	5	4	5
CAGL0G09383g	TDH3	ORF Verificado; gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa.	1	5	6	7
CAGL0D01188g	TEF1	ORF no caracterizado; factor de elongación de la traducción 1-α	-	6	8	7
CAGL0L12870g	TMA19	Ortólogo a proteína de la pared celular	-	1	1	-
CAGL0H08327g	TPI1	ORF verificado; posible triosa-fosfato isomerasa.	1	1	1	1
CAGL0M02849g	IST1	ORF no caracterizado; proteína ribosomal S2	-	1	2	2

Tabla 21. Perfil proteómico de la superficie de *C. parapsilosis* CDC 317.

ID CGD	ORTOLOGO <i>C. albicans</i> SC5314	DESCRIPCIÓN (Ortólogos)	Réplicas biológicas		
			1	2	3
			Nº de Péptidos		
CPAR2_205700	ACO1	Aconitato hidratasa	1	3	1
CPAR2_201570	ACT1	Actina	2	3	3
CPAR2_300430	ASC1	Proteína de unión a proteína G, subunidad alfa	1	4	1
CPAR2_105340	ATP1	ATP sintasa	2	2	2
CPAR2_402220	ATP2	ATP sintasa	1	3	5
CPAR2_401600	BGL2	1,3-β-glucanosiltransferasa	1	1	1
CPAR2_804190	CDC48	Posible ATPasa	-	2	2
CPAR2_501710	CEF3	Factor de elongación de la traducción 3	2	5	5
CPAR2_502140	CHT2	Quitinasa con alclaje a GPI	1	1	1
CPAR2_802010	CIT1	Citrato sintasa	-	2	2
CPAR2_400860	CRH11	Transglucosidasa de pared celular	-	1	-
CPAR2_702740	CYP1	Proteína de unión a ciclosporina A.	1	1	1
CPAR2_108560	ECM33	Implicada en la construcción de la pared celular	2	2	4
CPAR2_211630	EFT2	Factor de elongación 2	1	2	2
CPAR2_207210	ENO1	Enolasa	-	-	3
CPAR2_807400	FAS2	Sintasa de ácidos grasos, subunidad β	1	1	2
CPAR2_401230	FBA1	Actividad fructosa-bisfosfato aldolasa	-	3	2
CPAR2_601770	GPD2	Proteína de superficie similar a glicerol-3-fosfato dehidrogenasa	-	2	2
CPAR2_204330	HSP104	Proteína de choque térmico	2	2	1
CPAR2_101670	HSP12	Proteína de choque térmico	3	2	5
CPAR2_703150	HSP90	Proteína de choque térmico	6	5	10
CPAR2_213780	KAR2	Implicada en translocación de proteínas al retículo endoplásmico	-	1	3
CPAR2_805290	LAT1	Componente del complejo piruvato deshidrogenasa	1	1	1
CPAR2_104290	LSP1	Ensamblaje de eisomas	2	2	4
CPAR2_601800	MCR1	Actividad citocromo-b5 reductasa	1	1	1
CPAR2_407410	MP65	Implicada en el metabolismo del glucano	2	4	5
CPAR2_103750	MSI3	Unión a ATP	1	5	4
CPAR2_109660	no	1,3-beta-glucanosiltransferasa	2	6	7
CPAR2_405330	no	Localización citosólica	1	1	1
CPAR2_100830	no	Dominio con unión ácidos nucleicos	1	2	2
CPAR2_209380	no	Actividad en estructura de ribosomas	-	3	1
CPAR2_500930	no	Actividad en estructura de ribosomas	1	2	1
CPAR2_108950	orf19.3061.1	Localización citosólica	1	1	1
CPAR2_100850	orf19.3932	Localización citosólica	1	1	2
CPAR2_807420	orf19.5943.1	Dominio con unión a DNA	1	1	1
CPAR2_402950	PDB1	Posible piruvato deshidrogenasa	1	1	2
CPAR2_501020	PDC11	Piruvato decarboxilasa	1	3	4
CPAR2_602950	PGK1	Fosfoglicerato quinasa	3	3	3
CPAR2_105500	PIL1	Componente de eisomas	2	2	4
CPAR2_806490	PIR1	Proteína estructural de la pared celular	-	2	1
CPAR2_502950	PMA1	ATPasa de membrana plasmática	-	3	1
CPAR2_404890	RPL12	Proteína ribosomal	2	1	3
CPAR2_601830	RPL23A	Proteína ribosomal	1	1	2
CPAR2_700660	RPL4B	Proteína ribosomal localizada en superficie celular	2	2	3
CPAR2_702560	RPL5	Dominio con union a RNA	-	4	1
CPAR2_102840	RPL9B	Proteína ribosomal	1	3	-
CPAR2_210540	RPS17B	Proteína ribosomal	3	-	-
CPAR2_109250	RPS21	Proteína ribosomal	2	2	1
CPAR2_204080	RPS3	Dominio con union a DNA	1	2	2
CPAR2_302160	RPS6A	Proteína ribosomal	2	-	3
CPAR2_503730	RPS7A	Biogenesis de ribosomas	1	2	3
CPAR2_209730	RPS8A	Proteína ribosomal	1	2	1
CPAR2_207990	SAM2	Actividad metionina adenosiltransferasa.	1	1	1
CPAR2_106940	SSA2	Proteína de choque térmico, familia de HSP70	7	5	12
CPAR2_205670	SSB1	Proteína de choque térmico	4	5	7
CPAR2_105050	SSC1	Proteína de choque térmico	4	-	2
CPAR2_202600	TAL1	Posible transaldolasa	3	3	4
CPAR2_808670	TDH3	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	3	9	10
CPAR2_407690	TEF1	Factor de elongación 1-alpha	4	5	8
CPAR2_109150	TIF	Factor 4A de iniciación	1	1	2
CPAR2_206570	WH11	Proteína específica de la fase blanca	2	-	3
CPAR2_405680	YST1	Proteína ribosomal	1	1	1
CPAR2_806670	YWP1	Proteína de pared celular	2	1	1

**Tabla 22. Perfil proteómico de la superficie de *Candida tropicalis* MYA 3404.**

ID_UNIPROT	ORTOLÓGO <i>C. albicans</i> SC5314	DESCRIPCIÓN	Réplicas biológicas		
			1	2	3
			Nº de Péptidos		
CTRG_03051	ACO1	Actividad aconitato hidratasa	2	4	5
CTRG_03626	ACT1	Actina	3	4	4
CTRG_01329	ALD5/ ALD99	NAD-aldehído deshidrogenasa	2	2	2
CTRG_04856	ASC1	Subunidad ribosomal 40S	1	2	2
CTRG_04698	ATP1	ATP sintasa	1	1	2
CTRG_00125	ATP2	ATP sintasa	3	2	7
CTRG_01460	CDC19	Piruvato quinasa	4	5	5
CTRG_02678	CEF3/TEF3	Factor de elongación 3	3	2	4
CTRG_05018	CYP1	Peptidil-proilil cis-trans isomerasa	2	1	1
CTRG_01315	EFT2	Factor de elongación 2	5	10	0
CTRG_04184	ENO1	Enolasa 1	6	10	6
CTRG_02501	FAS2	Sintasa de ácidos grasos	2	1	4
CTRG_00211	FBA1	Fructosa-bisfosfato aldolasa	3	1	4
CTRG_03660	GND1	Posible 6-fosfogluconato dehidrogenasa	2	2	4
CTRG_00613	HSP60	Proteína de choque término 60K	1	1	3
CTRG_01722	HSP70	Proteína de choque término 70K	6	6	8
CTRG_05008	HSP90	Proteína de choque término 90K	10	6	7
CTRG_00414	HXK2	Hexokinasa II	1	1	3
CTRG_01890	LSP1	Componente de eisosomas	1	1	2
CTRG_00928	MET6	Homocisteína metiltransferasa	2	3	1
CTRG_02093	MP65	Manoproteína de 65K	3	7	4
CTRG_04273	MSI3	Proteína de choque término	2	1	2
CTRG_02289	NO	Proteína ribosomal	1	1	1
CTRG_02906	NO	Proteína ribosomal	1	1	1
CTRG_04344	NO	Proteína ribosomal	3	0	0
CTRG_02361	PDC11	Piruvato descarboxilasa	14	15	8
CTRG_02937	PGK1	Fosfoglicerato quinasa	4	7	1
CTRG_05722	PMA1	ATPasa de membrana plasmática	4	5	7
CTRG_04652	RPL10	Proteína ribosomal	1	2	1
CTRG_02392	RPL12	Proteína ribosomal	2	2	1
CTRG_02534	RPL18	Proteína ribosomal	3	2	0
CTRG_00197	RPL20B	Proteína ribosomal	1	1	1
CTRG_03686	RPL4B	Proteína ribosomal	5	3	3
CTRG_05035	RPL5	Proteína ribosomal	2	1	3
CTRG_02516	RPL8B	Proteína ribosomal	2	1	1
CTRG_04885	RPP0	Proteína ribosomal	1	4	2
RPS0	RPS0 / YST1	Proteína ribosomal	1	2	3
CTRG_04231	RPS23A	Proteína ribosomal	2	1	2
CTRG_00520	RPS3	Proteína ribosomal	2	5	1
CTRG_04461	RPS42	Proteína ribosomal	2	2	1
CTRG_02165	RPS7A	Proteína ribosomal	2	1	1
CTRG_01546	RPS8A	Proteína ribosomal	3	1	2
CTRG_06049	SAH1	Adenosilhomocisteinasa	3	2	2
CTRG_03109	SSB1	Proteína de choque térmico	4	3	10
CTRG_01722	SSC1	Proteína de choque térmico	3	2	5
CTRG_00726	TAL1	Transaldolasa	4	2	2
CTRG_05666	TDH3	Gliceraldehído-3 -fosfato dehidrogenasa	10	12	9
CTRG_01833	TEF2	Factor de elongación de la traducción 1-alfa	10	11	9
CTRG_04436	TIF1	Factor de iniciación	2	2	1
CTRG_03172	TKL1	Transcetolasa 1	3	2	5
CTRG_05608	TPI1	Triosa fosfato isomerasa	3	2	2
CTRG_05975	YNK1	Nucleosido difosfato quinasa	2	2	1

Los colores de las proteínas corresponden a la clasificación en categorías que se indica en la tabla 19.

Finalmente con el objetivo de analizar de manera global el experimento del surfoma de las especies *no-albicans* se construyó la Tabla 23 donde podemos observar las proteínas identificadas en las 3 especies en cada una de las categorías analizadas. (Tabla 23). El análisis de dicha tabla con el objetivo de seleccionar posibles candidatos de marcadores

panfúngicos reveló las siguientes proteínas de interés que han sido identificadas en todos los experimentos realizados en el presente trabajo: **Mp65, Cef3, Eno1, Hsp90, Pdc11, Pkg1, Rpl12, Rps7a, Ssb1, Tdh3, Yst1, Cyp1, Tal1** y **Act1** (señaladas en azul en la Tabla 23) y otras proteínas que fueron identificadas en por lo menos 2 de las 4 especies de *Candida* spp estudiadas en este trabajo (señaladas en rojo en la Tabla 23).

**Tabla 23. Perfil de la proteínas identificadas después de la digestión sobre célula viva de levaduras de *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*, en relación a las proteínas ortólogas en *C. albicans*.**

CATEGORÍAS	<i>C. glabrata</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	Nº de Proteínas	GENES ORTÓLOGOS EN <i>C. albicans</i> SC5314	Nº de Proteínas	GENES ORTÓLOGOS EN <i>C. albicans</i> SC5314	Nº de Proteínas	GENES ORTÓLOGOS EN <i>C. albicans</i> SC5314
Anclaje GPI	0	0	3	CHT2, CRH11*, ECM33.	0	0
Biogénesis y Mantenimiento de la Pared Celular	5	SRB1, PMM1, MP65, SRB1,TMA19.	5	BGL2, GPD2, MP65, PIR1, YWP1.	1	MP65
Superficie celular	24	BMH1.1, BMH1.2, CEF3, ENO1, GPM1, HSP90, INO1, PDC11, PGK1, PIL1, RPL12, RPL17B, RPL18, RPL3, RPL4B, RPL5, RPS1, RPS6A, RPS7A, RPS8A, SAM2, SSA2, SSB1, TDH3.	20	ATP1, CEF3, ENO1, HSP90, KAR2, PDC11, PGK1, PIL1, RPL12, RPL4B, RPL5, RPS21, RPS6A, RPS7A, RPS8A, SAM2, SSA2, SSB1, SSC1, TDH3.	20	ATP1, CDC19, CEF3, ENO1, GND1, HSP70, HSP90, MET6, MSI3, PDC11, PGK1, RPL10, RPL12, RPL18, RPL4B, RPS7A, SSB1, SSC1, TDH3, TKL1.
Inmunogénicas	12	ILV5, EFB1, IPP1, AHP1, EFT2, SAH1, TEF1, PGI1, TPI1, FBA1, YST1, CDC19.	8	ACO1, ATP2, EFT2, FBA1, MSI3, TEF1,TIF, YST1.	5	ACO1, EFT2, FBA1, RPS0, YST1, HXK2 .
Específicas de hongos	2	ADH2, PST3.	0	0	0	0
Antifúngicos	3	FAS1, GLK1, PMA1, .	5	FAS2, HSP12, LSP1, orf19.3932, PDB1 .	4	ALD5/ ALD99, FAS2, PMA1,TPI1,
Virulencia	0	0	2	ASC1, WH11.	1	ASC1
Biofilms	3	ADK1, CYP1, TAL1.	5	CIT1, CYP1, HSP104, MCR1, TAL1.	2	CYP1, TAL1.
Condiciones de Estrés	1	HSP60	0	0	1	HSP60
Actina	1	ACT1	1	ACT1	1	ACT1
Otras proteínas	8	ASN1, RPS3, SSZ1, orf19.3037, ARO3, orf19.2478.1, orf19.3354, orf19.5943.1.	4	LAT1, orf19.3061.1, RPL9B, RPS3.	1	TIF1
Solo identificadas en <i>Candida</i> spp	7	orf19.410.3, ECM4, RPL23A, orf19.4601, RPS17B, GPD1, orf19.6147.	5	CDC48, orf19.5943.1, PMA1, RPL23A, RPS17B.	13	TEF2, RPS8A, ATP2, SAH1, RPS23A, RPL8B, RPS3, RPS42, YNK1, RPL5, RPP0, RPL20B, LSP1.
Sin ortólogo	9	0	5	0	3	0
Total		75		63		52

Las proteínas en azul se encuentran en las 4 especies de *Candida*, incluyendo a *C. albicans*, y las que aparecen en rojo se encuentran en por lo menos 2 especies y *C. albicans*. Las proteínas naranja están compartidas en 2 especies de *Candida* spp \*CRH11, identificada con 1 péptido que fue validado.

### **6.3. ESTUDIO DE LA UTILIDAD CLÍNICA DE LAS PROTEÍNAS DE LA PARED CELULAR DE *C. albicans* Ecm33 Y Bgl2**

#### **6.3.1. ESTUDIO DE LA UTILIDAD CLÍNICA DE LA PROTEÍNA Ecm33 DE *C. albicans*.**

Al analizar las proteínas identificadas en el presente trabajo en la categoría con mayor jerarquía de nuestro estudio, la de proteínas con anclaje tipo GPI, se observa que Ecm33 se identifica en todas las condiciones experimentales, con varios péptidos, entre 3 y 7. Esta es una proteína que por sus características físico-químicas no es fácil detectarla en las aproximaciones proteómicas basadas en geles de 2D. Sin embargo en la estrategia desarrollada en el presente trabajo es reiterativamente identificada y, por lo tanto, una buena candidata para estudiar su posible utilidad en el diagnóstico y/o prevención de la candidiasis invasiva. Además, nuestro grupo de investigación es pionero en el estudio de su relevancia en la formación de la pared celular tanto en *C. albicans* como en *S. cerevisiae* y en la patogénesis de la candidiasis. Por ello, decidimos continuar el trabajo con esta proteína. Los aspectos estudiados de Ecm33 fueron: su papel en la biogénesis de la pared celular, su expresión de forma heteróloga y su posterior purificación para ser evaluada como posible vacuna y como diana diagnóstica.

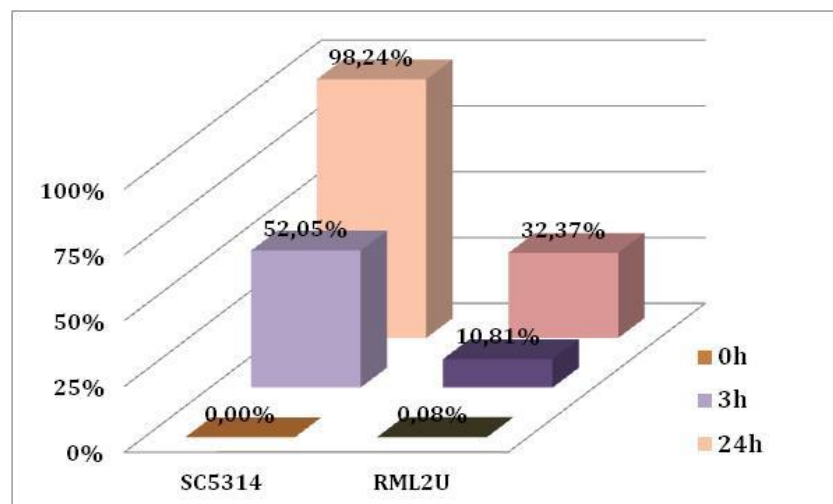
#### **6.3.1.1. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA Ecm33 EN LA BIOGÉNESIS DE LA PARED CELULAR**

En primer lugar se propuso estudiar la implicación de Ecm33p en la síntesis y organización de la pared celular, teniendo en cuenta que nuestro grupo ya había descrito su implicación en la arquitectura de la pared celular, lo que unido a la disminución de la capacidad patogénica del mutante (Martínez-López R; *et al* 2004) la convertiría en una buena candidata para el diseño de nuevos antifúngicos. Por estos motivos estudiamos la implicación de la proteína en la biogénesis de la pared celular, evaluando la capacidad de regeneración de la pared celular de protoplastos de la cepa mutante RMLU2 (*ecm33Δ/ecm33Δ*). Para ello, las paredes celulares fueron eliminadas mediante digestión con Glusulasa y los protoplastos obtenidos fueron incubados en medio Lee suplementado con aminoácidos y sorbitol 1M donde se evaluó el proceso de regeneración de la pared celular a tiempos de 0, 3 y 24 horas. Para realizar este estudio se utilizaron dos metodologías, en primer lugar se midió la fragilidad osmótica de los protoplastos en proceso de regeneración y en segundo lugar se utilizó la microscopia electrónica de barrido.

### A. Estudio de la fragilidad osmótica de protoplastos a diferentes tiempos de regeneración.

Se realizaron 3 experimentos independientes. Tras mantener los protoplastos de la cepa mutante y cepa control 3h y 24h en condiciones de regeneración, se comprobó su fragilidad osmótica resuspendiendo la mitad de la muestra en una solución de PBS y la otra mitad en una solución PBS-sorbitol 1M, como control del número de células. A continuación se sembraron los protoplastos en superficie de placas de YPD suplementadas con sorbitol 1M, se incubaron a 30°C, 48 horas y posteriormente se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonia para cada uno de los tiempos de regeneración.

Los resultados mostraron diferencias importantes entre ambas cepas a partir de las 3 horas de regeneración. A este tiempo se observó que la cepa silvestre ya había logrado regenerar la pared en un 52% mientras que la cepa mutante solo ha logrado regenerar en un 10.81% de células. A las 24 horas de regeneración continúa una diferencia importante en la capacidad regenerativa de las dos cepas de *C. albicans*: la cepa RML2U (mutante *ecm33Δ*) solo es capaz de regenerar su pared celular en un 32% de las células, en contraste a la cepa silvestre SC5314 en la cual un 98% de las células regeneran la pared celular (Figura 25). Estos resultados muestran una clara deficiencia de la cepa mutante *ecm33Δ* en la capacidad de la síntesis o ensamblaje de los componentes de la pared celular.



**Figura 26:** Capacidad de regeneración de la pared celular de protoplastos de *C. albicans* de las cepas SC5314 y RMLU2 (*ecm33Δ*).

## **B. Microscopia electrónica de barrido de protoplastos en regeneración.**

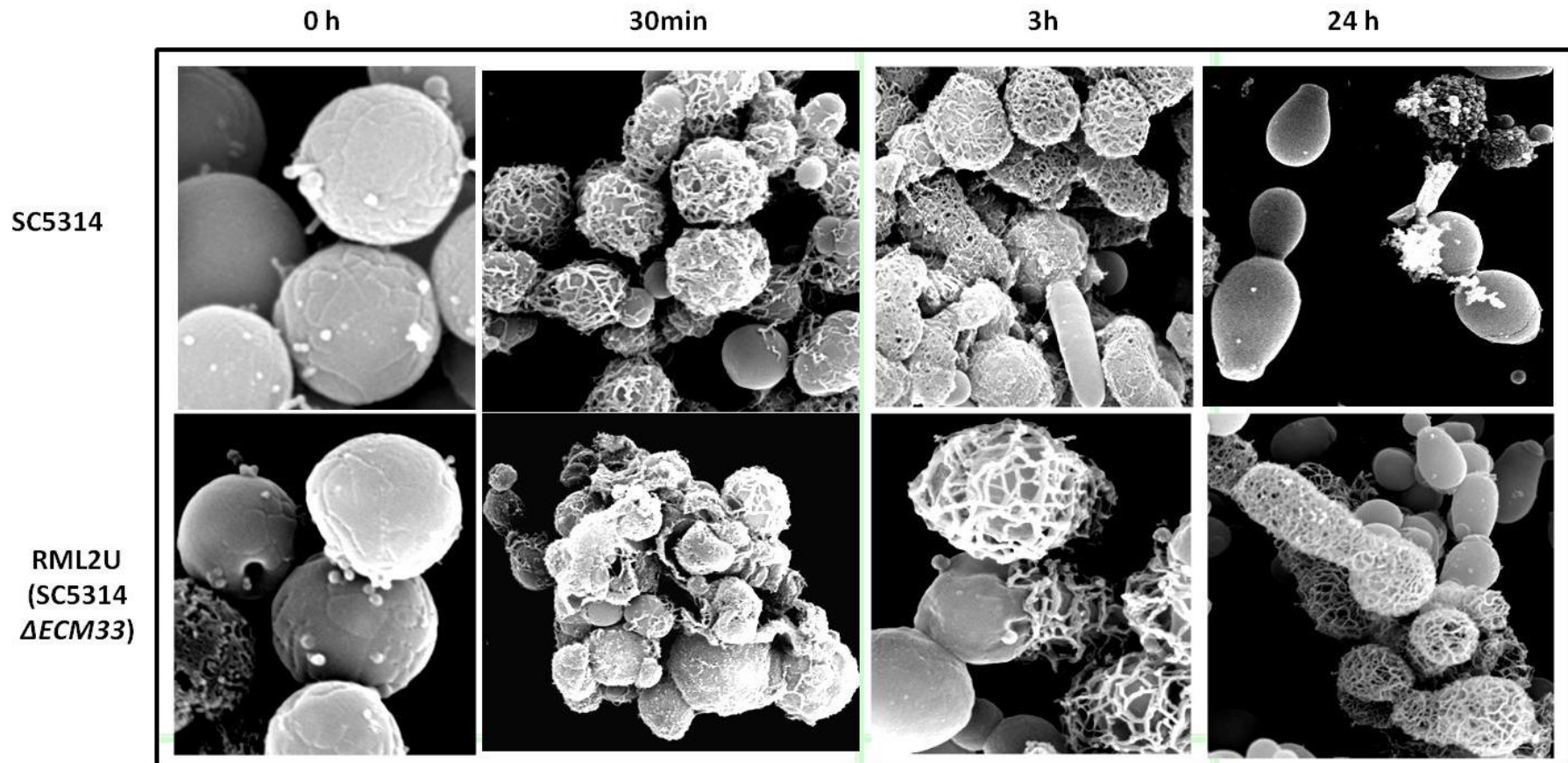
El proceso de regeneración de los protoplastos fue registrado en imágenes obtenidas por microscopia electrónica de barrido. Para ello se puso a punto un protocolo en que uno de los puntos importantes fue la utilización de un proceso de fijación: un primer paso con permanganato de potasio preparado en una solución con Sorbitol 1 M y un segundo paso con tetraóxido de osmio, todo esto con el fin de evitar que los protoplastos se rompieran en la obtención del punto crítico, en el cual se intercambia etanol al 100% por CO<sub>2</sub>.

Al observar el proceso de regeneración de la cepa silvestre SC5314, observamos que a los 30min de regeneración aproximadamente el 90% de protoplastos ya han iniciado el proceso de regeneración con la producción, posiblemente de las primeras fibras de  $\beta$ -1,3-glucano (Osumi 1998); a las 3 horas, en varias células ya se observa una pared celular íntegra, incluso se ha iniciado el proceso de producción de tubo germinal en algunas de ellas; y a las 24 horas de regeneración se observan células de forma ovoide típica de las levaduras y dependiente de la formación de la pared celular", incluso se observa que varias células ya han iniciado el ciclo de gemación obteniéndose células hijas posteriores al proceso de regeneración de la pared celular. También se observan polímeros extracelulares indicativos de que las células provienen de un proceso de regeneración de la pared que se ha descrito anteriormente como un proceso "sucio". La cepa mutante RMLU2 presenta importantes diferencias desde el inicio del proceso. En primer lugar, la obtención de los protoplastos no es homogénea, de hecho en ocasiones se encuentran células en las cuales aparentemente no se consigue la digestión completa de la pared celular. A los 30 min de regeneración es muy difícil encontrar células que aguanten el procesamiento necesario para la microscopia de barrido, y cuando se consigue observar células al microscopio corresponden a aglomeraciones celulares en las que no se distinguen bien los protoplastos de algunas células en las que se observan filamentos incipientes de  $\beta$ -1,3-glucano; a las 3 horas de regeneración se observan algunas células en las cuales es clara la formación de las fibras de  $\beta$ -1,3-glucano, lo que correspondería al proceso que se observa en la cepa silvestre a los 30 min de regeneración; y a las 24 horas de regeneración ya se observan algunas células que han conseguido la formación completa de la pared celular, y otras donde únicamente consiguieron la formación de las primeras fibras de  $\beta$ -1,3-glucano (Figura 26).

Estos resultados muestran que las células de la cepa mutante poseen un retraso de aproximadamente 3 horas, ya que en la cepa silvestre a los 30min ya se observa el inicio de la síntesis de las primeras fibras, posiblemente de  $\beta$ -1,3-glucano (Osumi 1998). Adicionalmente corroboran los datos obtenidos en la evaluación de la fragilidad osmótica que en los que en solo el 33% de células consiguen regenerar completamente la pared celular indicando la incapacidad de la cepa mutante de recuperarse y no lisarse en soluciones hipotónicas, lo que demuestra la no construcción o construcción incompleta de la pared celular.

Con los resultados obtenidos podemos decir que la ausencia de la proteína con anclaje tipo GPI Ecm33 impide la correcta formación de la pared celular.

.



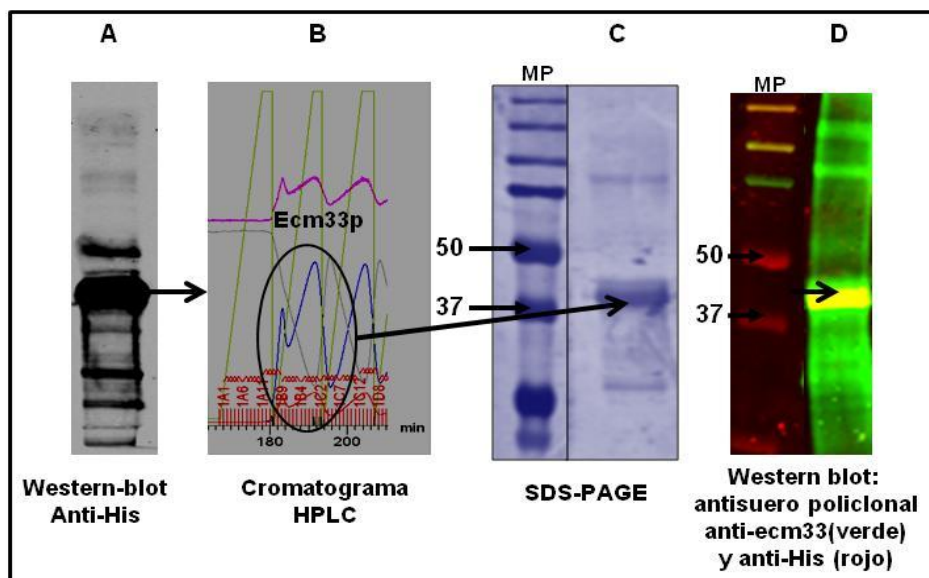
**Figura 27:** Fotos de microscopía electrónica de barrido de protoplastos de *C. albicans* de la cepa silvestre SC5314 y el mutante *ecm33* $\Delta$  en proceso de regeneración de la pared celular.

### 6.3.1.2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA ECM33P

#### A. Expresión de Ecm33p en un sistema libre de células:

Se utilizó el sistema libre de células RTS 500 proteomaster *E. coli* comercializado por ROCHE. Esta estrategia metodológica está descrita desde 1961 por (Nirenberg, Matthaei *et al.* 1963) y se fundamenta en el uso de un lisado celular de *E. coli* que contiene los ribosomas y la maquinaria suficiente para la traducción y transcripción de proteínas y, que a pesar de que no se obtienen modificaciones post-traduccionales como las glicosilaciones, es un sistema rápido y adecuado de expresión de proteínas.

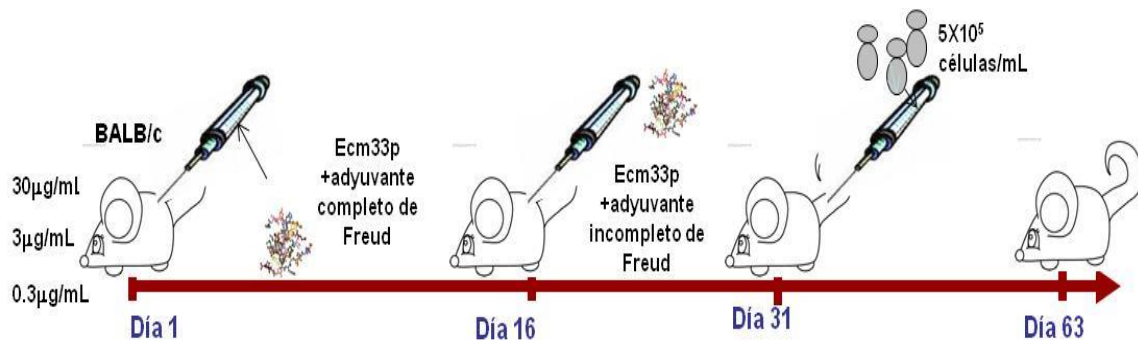
Se partió del DNA genómico de *C. albicans* SC5314 en el cual se amplificó la región correspondiente a Ecm33 que se clonó en pGEN-T easy. A esta construcción se le realizaron dos inserciones, una el promotor T7 y una etiqueta de histidinas en el amino terminal. Tras la expresión de la proteína *in-vitro* esta se purificó por medio de HPLC mediante el uso de columnas de níquel, se eluyó con un gradiente de imidazol del 0 al 100% y se comprobó que la proteína Ecm33 eluía en la zona del 40 y el 60% de imidazol (Figura 27). Con esta proteína y la ayuda del Dr. Fernando Vivanco se obtuvo un suero policlonal frente a Ecm33p. En la Figura 18 se muestra el gel del producto de la purificación y los respectivos western blot tanto con el anticuerpo anti-His, como con el suero policlonal anti-ecm33.



**Figura 27:** Análisis de la expresión de Ecm33 recombinante en un sistema libre de células y posterior purificación con el uso de columnas de níquel acopladas a un sistema de HPLC. **A.** Western blot frente al extracto crudo de la expresión de Ecm33. **B.** Cromatograma del HPLC. **C.** SDS-PAGE de Ecm33 purificada. **D.** Western blot frente a la proteína purificada.

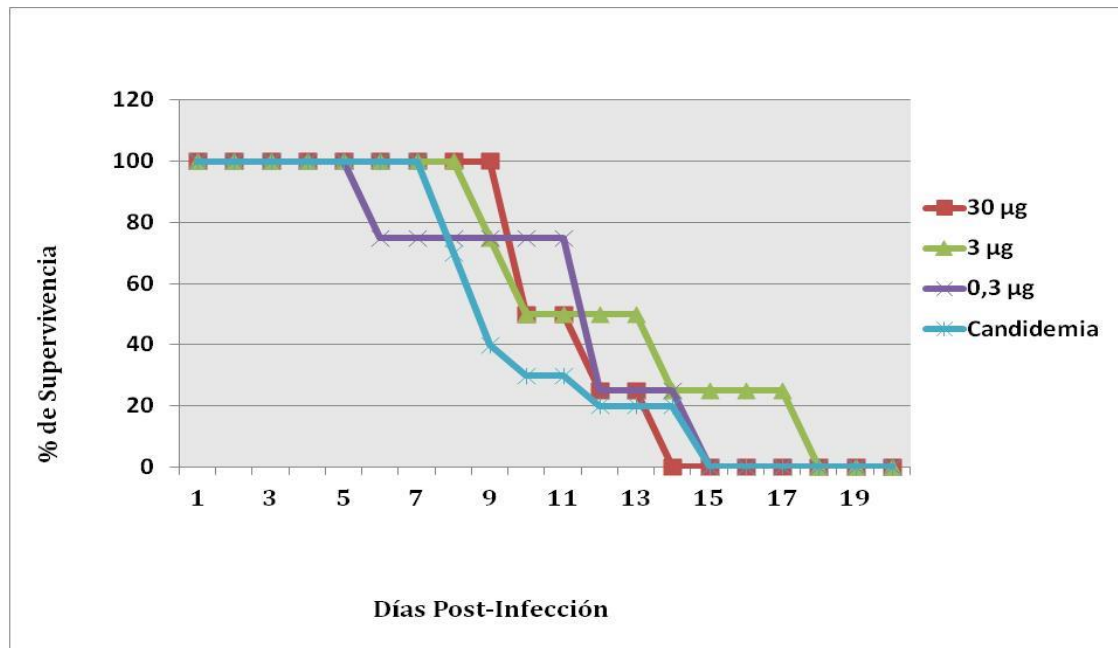
### 6.3.1.3. EVALUACIÓN DE Ecm33 COMO POSIBLE VACUNA CONTRA LA CANDIDIASIS SISTÉMICA

Para este estudio se utilizaron 4 grupos (n=4) de ratones hembras BALB/c de 25 gramos de peso en los que se ensayaron 3 dosis de proteína Ecm33p (0.3, 3 y 30 $\mu$ g). Cada una de las dosis fue administrada 2 veces con 15 días de diferencia por vía intraperitoneal. La primera dosis se administró con adyuvante completo de Freud y la segunda con adyuvante incompleto. A los 15 días de la segunda inmunización se inocularon en la vena de la cola 5x10<sup>5</sup> células por mL de *C. albicans* SC5314 (Figura 28).



**Figura 28:** Protocolo de vacunación con la proteína heteróloga Ecm33

Los ratones fueron supervisados diariamente y se registró la supervivencia hasta el día 30 post-infección. Los resultados obtenidos no muestran que la proteína ecm33 proteja contra la candidiasis invasiva ya que todos los ratones registraron signos de infección en sistema nervioso central (rigidez nuca). Sin embargo, los ratones vacunados con la dosis de 3 $\mu$ g sí que mostraron un retardo la muerte de entre 3 y 5 días frente a los ratones sin vacunar (Figura 29).



**Figura 29:** Porcentaje de supervivencia de ratones inmunizados con Ecm33p recombinante, posterior infección intravenosa con *C. albicans*.

#### 6.3.1.4. EVALUACIÓN DE Ecm33 COMO POSIBLE MARCADOR BIOLÓGICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA CANDIDIASIS SISTÉMICA

La proteína Ecm33 recombinante se evaluó como marcador diagnóstico de candidiasis invasiva en pacientes con hemocultivos positivos para levaduras del género *Candida*. Para ello se utilizó western-blot. Los 14 sueros provenientes de los pacientes con candidemia junto a 10 sueros de individuos sanos, se evaluaron frente a 10µg de Ecm33p y se normalizaron frente a la señal emitida con anti-his, se realizaron 3 experimentos con la totalidad de los sueros en una dilución 1/50, se analizaron con el programa Odyssey. A los datos obtenidos se les realizó promedio y desviación estándar (Tabla 22). Con los datos de la población de individuos sanos se obtuvo un punto de corte. Este se obtuvo con el promedio de toda la población +/- 3 desviaciones estándar. Con este método se estableció que este punto de corte para esta técnica es de 2.07-3.15 UA partir de este valor se establecieron los individuos que dieron positivos y negativos para el test (Tabla 24). Con estos datos se obtuvieron 6 valores diferentes que muestran el valor clínico del test. Estos valores fueron, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, Razón de verosimilitudes positiva, Razón de verosimilitudes negativa (Tabla 25). Con estos análisis obtuvimos una sensibilidad del 21%, una especificidad del 60%, un valor predictivo positivo del 42%, un valor predictivo del 35%. Una razón de verosimilitud positiva del 0.21, y una razón de verosimilitud

Resultados

negativa del 1.31. La población de estudio es pequeña y no tiene el valor estadístico para dar inferencias definitivas, sin embargo podemos observar un promedio de valores más altos en la población sana (Figura 30).

La medición de anticuerpos anti-Ecm33 no tiene capacidad resolutive para clasificar en sanos y enfermos a la población estudiada, siendo incapaz de separar las poblaciones. Es probable que al aplicar el test a una población estadísticamente representativa se consiguiese la separación de las poblaciones de individuos sanos y con candidemia.

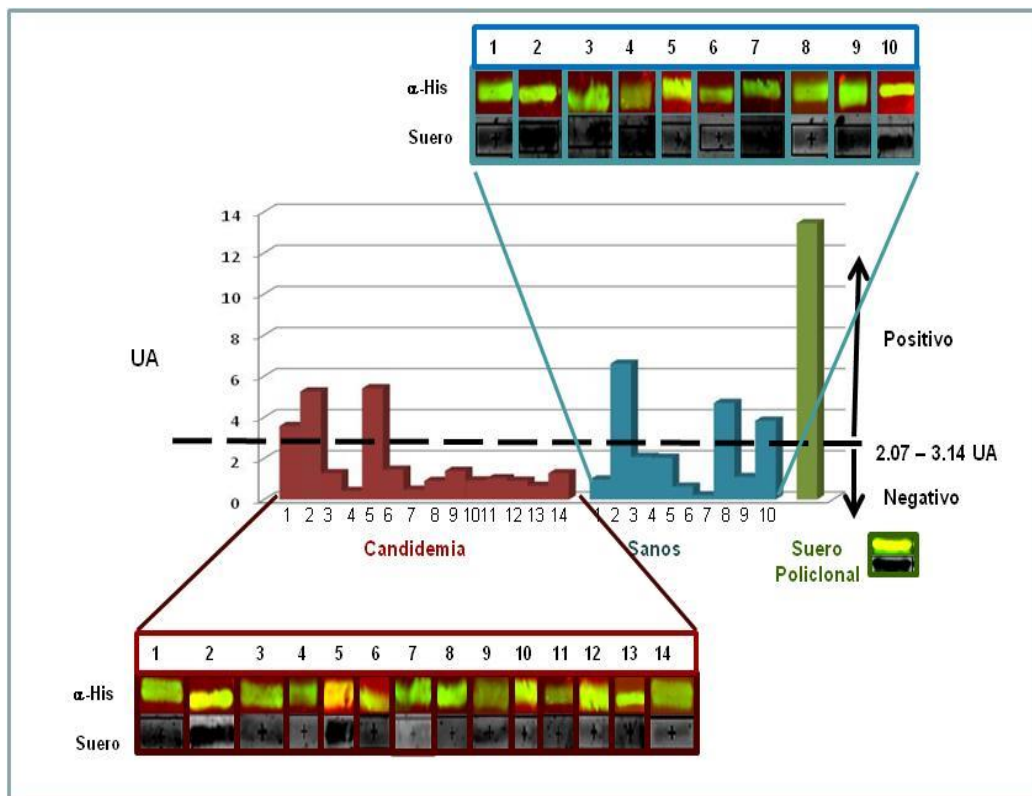
**Tabla 24: Resultados en Unidades Arbitrarias de la medición de anticuerpos anti-Ecm33 recombinante, mediante Western blot, en sueros de pacientes con candidemia e individuos sanos**

Candidemia	Experimentos			Promedio	Ds	Valoración Punto de corte = 2,07- 3,15
	1	2	3			
1	3,63	3,72	3,37	3,57	0,18	p
2	5,24	5,47	5,06	5,25	0,21	p
3	1,10	1,40	1,32	1,27	0,16	n
4	0,27	0,55	0,43	0,42	0,14	n
5	5,34	5,66	5,23	5,41	0,23	p
6	1,15	1,74	1,43	1,44	0,29	n
7	0,45	0,50	0,48	0,47	0,03	n
8	0,81	0,97	0,94	0,90	0,08	n
9	1,22	1,64	1,31	1,39	0,22	n
10	0,95	0,82	1,00	0,92	0,09	n
11	1,09	0,82	1,16	1,02	0,18	n
12	0,97	0,79	0,98	0,91	0,11	n
13	0,70	0,61	0,68	0,66	0,04	n
14	1,33	1,05	1,45	1,28	0,20	n
<b>Sanos</b>						
1	0,92	0,99	0,98	0,96	0,04	n
2	6,21	7,47	6,14	6,61	0,75	p
3	2,25	1,92	2,05	2,07	0,17	n
4	2,05	2,15	1,87	2,02	0,14	n
5	0,61	0,75	0,51	0,62	0,12	n
6	0,22	0,14	0,24	0,20	0,05	n
7	4,61	4,75	4,74	4,70	0,08	p
8	1,04	1,26	0,97	1,09	0,15	n
9	3,78	4,00	3,71	3,83	0,15	p
10	4,10	3,80	4,02	3,97	0,15	p
<b>Promedio</b>				2,61	0,18	

**Tabla 25: Distribución de resultados positivos y negativos del test para la medición de anticuerpos anti-Ecm33 en sueros de pacientes con candidemia e individuos sanos**

Resultado	Candidemia	Sanos	Total
<b>Anticuerpos anti-Ecm33</b>			
<b>Positivo</b>	3 (VP)	4 (FP)	7
<b>Negativo</b>	11 (FN)	6 (VN)	17
<b>Total</b>	14	10	24

**VP:** verdadero positivo, **FN:** falso negativo, **FP:** falso positivo, **VN:** verdadero negativo



**Figura 30.** Niveles de anticuerpos anti-Ecm33 en sueros de pacientes con candidemia y en individuos sanos. Valores de la intensidad de fluorescencia frente a Ecm33 normalizados frente al valor de fluorescencia obtenida con anticuerpos anti-His.

### 6.3.2. ESTUDIO DE LA UTILIDAD CLÍNICA DE LA PROTEÍNA

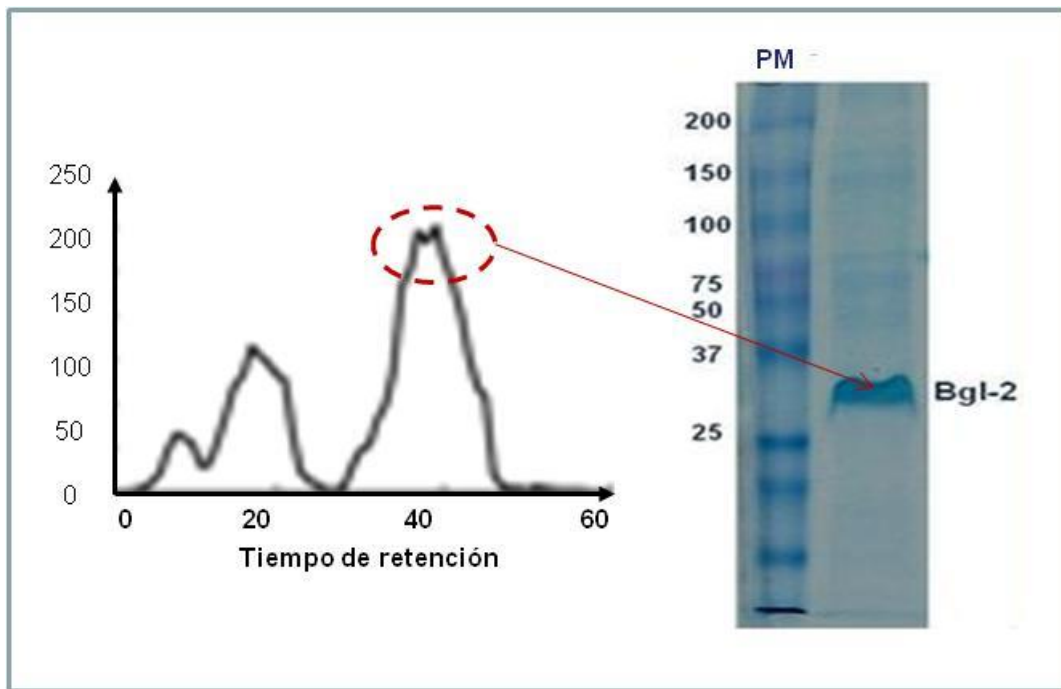
#### $\beta$ -1,3-GLUCOSILTRANSFERASA (BglP) DE *C. albicans*

Al analizar las proteínas identificadas en el estudio de las proteínas de la superficie de levaduras e hifas de *C. albicans* y en otras especies de *Candida* spp, la segunda categoría propuesta en este estudio fue la de proteínas implicadas en la biogénesis y mantenimiento de la pared celular. La  $\beta$ -1,3-gluconosiltransferasa Bgl2 se identificó en todas las condiciones experimentales, con entre 3 y 8 péptidos. Es una proteína que en estudios anteriores nuestro grupo utilizando productos de secreción de protoplastos ha sido identificada y relacionada con una alta inmunogenicidad al ser evaluada con sueros de pacientes con candidiasis invasivas (Pitarch *et al* 2006). Se decidió continuar el trabajo con esta proteína. Esta proteína se expresó y purificó mediante 2 sistemas diferentes y, posteriormente, se evaluó su utilidad como posible vacuna y como diana diagnóstica.

#### 6.3.2.1. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA PROTEÍNA Bgl2 EN LA LEVADURA

##### *Pichia pastoris*

Puesto que la forma nativa de Bgl2 tiene modificaciones post-traduccionales (N-glicosilación) se decidió utilizar la levadura *P. pastoris* como sistema de expresión. Esto implica que la proteína recombinante es secretada vía retículo endoplasmático y Golgi, lo cual permite que experimente modificaciones post-traduccionales y que el plegamiento sea más parecido al de la proteína nativa. Se diseñó un sistema de expresión en el cual la proteína recombinante se secretaba al medio de cultivo y que se realizó mediante los siguientes pasos: (1) clonación del gen *BGL2* en el vector de expresión pPic9; (2) transformación de la cepa GS515 consiguiendo la integración de la construcción pPic9Bgl-2 en el genoma de *P. pastoris*; (3) selección del clon4 mut<sup>+</sup> que expresa Bgl-2 bajo el promotor de la enzima alcohol oxidasa AOX1 mediante la evaluación de la expresión de Bgl2 en medio BY con la inducción con metanol (4) verificación genética que se realizó tanto comprobando la correcta inserción de *BGL2* en el genoma del clon4 mut<sup>+</sup>, como secuenciado el gen *BGL2* integrado para comprobar que su secuencia era correcta; (5) y determinación de las condiciones de cultivo para conseguir el mejor rendimiento de la expresión de Bgl2. Estas condiciones idóneas fueron: cultivo en medio BY, induciendo la expresión de la proteína con 0.8 mL de metanol diariamente durante 4 días. La purificación se realizó utilizando una columna de fase reversa que se eluyó mediante un gradiente de hidrofobicidad con acetonitrilo (Figura 31).



**Figura 31:** SDS-PAGE de Bgl2 recombinante expresada en *P. pastoris* y purificada utilizando FPLC.

El rendimiento de expresión que se obtuvo fue bajo. Aproximadamente de 6 litros de medio de cultivo se obtuvieron 300 $\mu$ g de proteína purificada en 1mL. Con esta proteína se obtuvo un suero policlonal en conejo en el laboratorio del Dr. Fernando Vivanco. Esta proteína fue la que se evaluó en el modelo de vacunación de los ratones con candidiasis invasiva.

#### 6.3.2.2. EVALUACIÓN DE Bgl2 COMO POSIBLE VACUNA CONTRA LA CANDIDIASIS SISTÉMICA

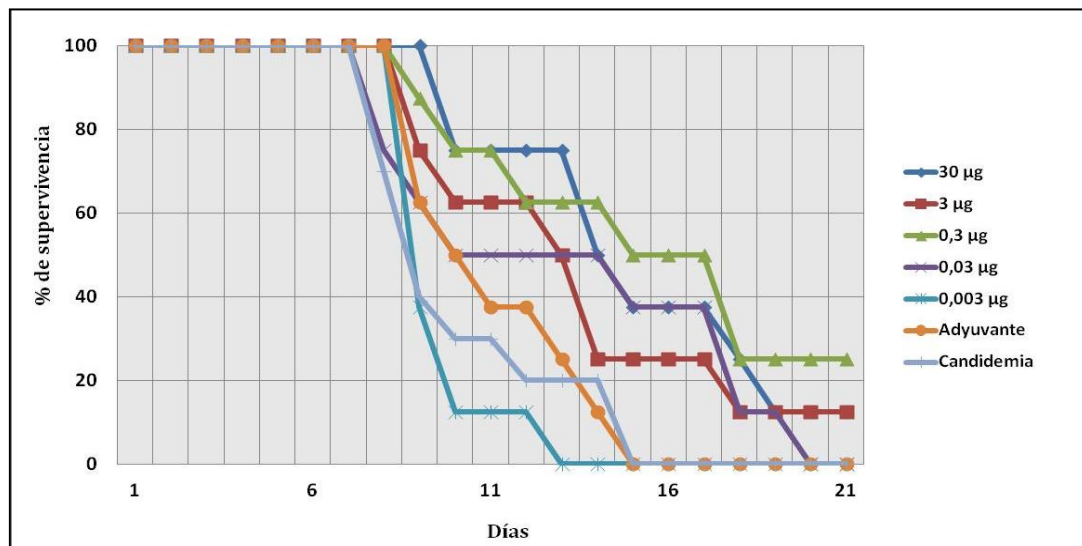
Para este estudio, se tomaron 7 grupos (n=10) de ratones hembras BALB/c de 25 gramos de peso, se ensayaron 5 dosis de proteína (0.003, 0.03, 0.3, 3 y 30 $\mu$ g) y 2 grupos control (candidemia y adyuvante). El protocolo de inmunización que se utilizó fue: administración por vía intraperitoneal con dos dosis. La primera inmunización se administró con adyuvante completo de Freund y la segunda con adyuvante incompleto. Las dosis se administraron con 15 días de diferencia. A los 15 días de la segunda inmunización se infectaron los ratones con 5x10<sup>5</sup> células en 0.5 mL de *C. albicans* en la vena central de la cola (Figura 32). Los ratones fueron supervisados diariamente y se registró la supervivencia hasta el día 30 post-infección. Los resultados obtenidos muestran que la proteína Bgl2 a la concentración de 0.3 $\mu$ g/mL protege al 25% de la población de ratones contra la

## Resultados

candidiasis invasiva (Figura 33). En la concentración de 3 mg también sobrevivió un ratón lo que corresponde a un 10%.

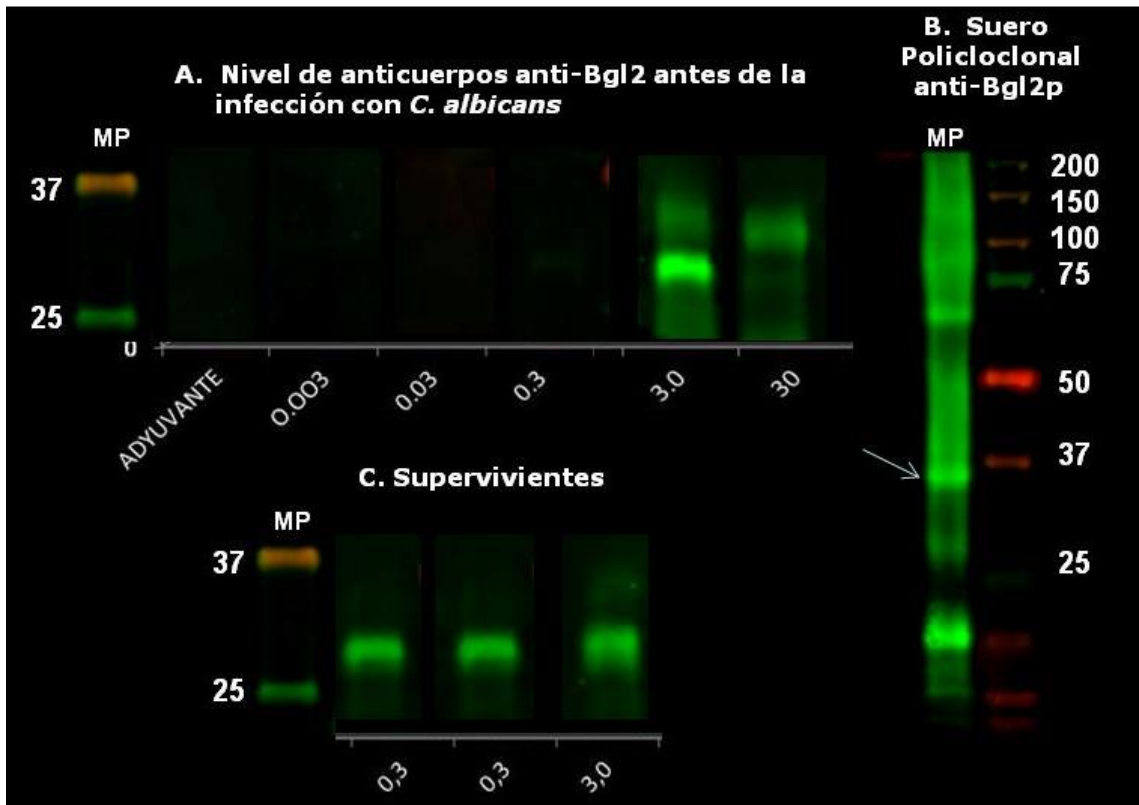


**Figura 32:** Protocolo de inmunización con Bgl2 heteróloga.



**Figura 33:** Porcentaje de supervivencia de ratones inmunizados con Bgl2 recombinante, pos-infección intravenosa con *C. albicans*

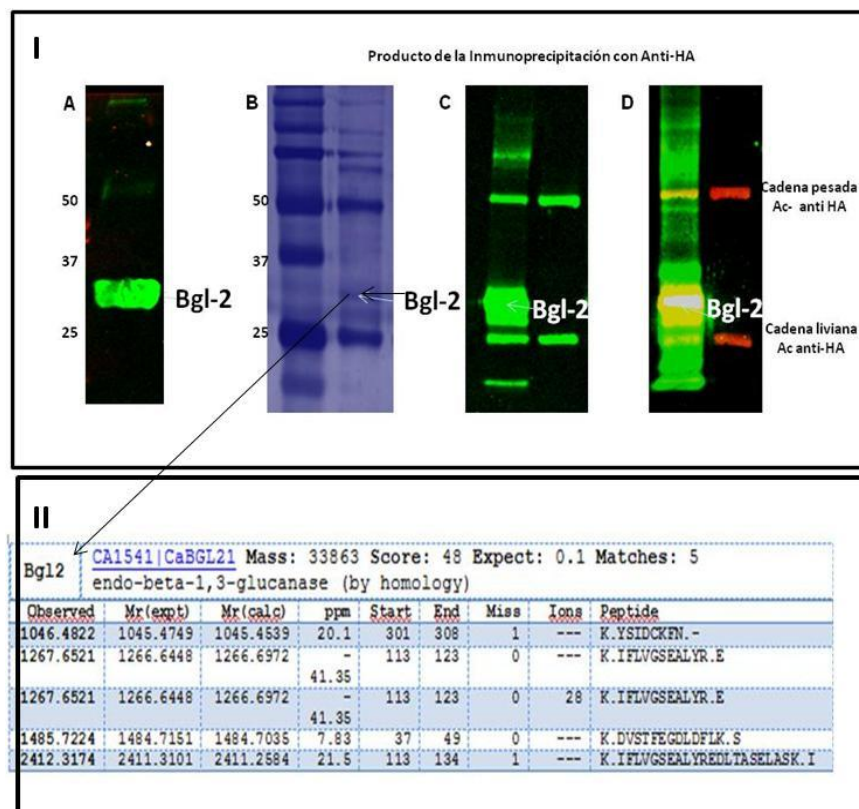
Al terminar el protocolo de vacunación, se sacrificaron 2 ratones de cada dosis de proteína, se realizaron pools de los sueros provenientes de cada dosis y se evaluaron por western-blot frente a Bgl2, utilizando la misma proteína expresada en *P. pastoris*. Los resultados mostraron un efecto dosis respuesta en los niveles de anticuerpos detectados; a medida que aumenta la dosis aumenta la cantidad de anticuerpos. Los ratones que sobrevivieron, se sacrificaron al día 45 post-infección para evaluar el nivel de anticuerpos, observándose que en estos ratones la intensidad de fluorescencia de los anticuerpos era mayor al resto de animales (Figura 34).



**Figura 34:** **A.** Western-blot del pool de 2 sueros de ratones obtenidos el día 31 después de iniciada la vacunación con cada una de las dosis de Bgl2 y sacrificados antes de la infección intravenosa con *C. albicans*. **B.** Western-blot de la proteína con suero policlonal anti Bgl2. **C.** Western blot de los sueros de los 3 ratones supervivientes a la infección de *C. albicans*

### 6.3.2.3. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Bgl2 EN UN SISTEMA COMERCIAL LIBRE DE CÉLULAS

Se utilizó el mismo sistema que en el caso de Ecm33p. Se partió del plásmido pGEM®T Easy\_Bgl2. A esta construcción se le añadió el promotor T7 y una etiqueta de hemoaglutinina en el extremo carboxi-terminal. Luego se evaluó la expresión con el kit RTS 100 proteomaster en pequeña escala en el termociclador, y tras comprobar su expresión, se utilizó el kit RTS 500 en el equipo Proteomaster. Posteriormente, se purificó por medio de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-HA unidos a bolitas magnéticas (Dynabeads®) (Figura 35). Todo el procedimiento fue estandarizado teniendo en cuenta la titulación de la cantidad de bolitas magnéticas utilizada con relación a la cantidad de anticuerpo y finalmente del volumen de extracto crudo de expresión a inmunoprecipitar. En la Figura 18, se muestra el gel con el producto de la purificación de Bgl2p y los respectivos western tanto con el anticuerpo anti-HA, como con el suero policlonal anti-Bgl2.



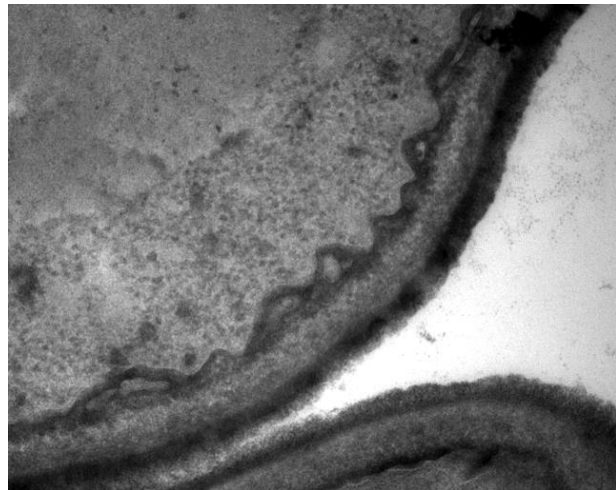
**Figura 35: I.** Análisis de la expresión y purificación de Bgl2 recombinante en un sistema libre de células. (a) Western-blot de 5µl de extracto crudo de la expresión de Bgl2, detectado con Ac anti-HA (verde). En b, c y d se utilizó el producto de la inmunoprecipitación con bolitas magnéticas recubiertas de Ac-anti-HA: (b) electroforesis SDS-PAGE, (c) western-blot revelado con anti-HA (verde) y (d) Western-blot revelado con anti-HA (verde) y suero policlonal anti-Bgl2 (rojo). **II.** Resultado de la identificación de Bgl2 mediante espectrometría de masas.

Mediante este sistema se obtuvieron 3 mg de proteína, su identidad se confirmó mediante western-blot con el uso del suero policlonal anti-Bgl2 y por medio de espectrometría de masas MALDI TOF-TOF. Posteriormente se purificó mediante inmunoprecipitación, pero se tuvieron dificultades a la hora de eluir la proteína del complejo inmune. Se evaluaron 6 tampones distintos: urea 8M, glicerol 2.5% pH 2.5, tampón fosfato pH:2.0, dietilamina 0.75M pH 10, SDS 10%, y solo se consiguió eluir con la utilización del tampón de carga de geles de proteínas SDS-PAGE con posterior ebullición durante 5min.

#### **3.3.2.4 Evaluación de Bgl2p como posible marcador biológico para el diagnóstico de la candidiasis sistémica.**

El producto de la inmunoprecipitación, el complejo inmune Bgl2-anti-HA, fue separado mediante SDS-PAGE y transferido a una membrana de nylon. Sobre esta membrana se pusieron a punto las condiciones óptimas de visualización de la Bgl2p con el suero policlonal anti-Bgl2 de conejo.. El paso siguiente fue evaluar los 14 sueros provenientes de pacientes con candidemia (en 4 diluciones independientes 1/100, 1/1000, 1/10.000, 1/100.000) y 10 sueros provenientes de individuos sanos, frente a 0.5µg de proteína. No se consiguió ver reacciones positivas de los sueros de enfermos con candidemia frente a la proteína. En todo los casos después de incubar con el suero problema y de tomar imágenes, se confirmó la presencia de la proteína con el anticuerpo anti-HA que siempre mostró un resultado positivo. Uno de los motivos más probables para la falta de señal frente a Bgl2 en los sueros evaluados es que la cantidad de proteína esté por debajo del límite de detección. Como se muestra en la Figura 35 en los paneles b y d, la banda correspondiente a Bgl2 es considerablemente menos intensa en el gel de SDS\_PAGE que las bandas correspondientes al anticuerpo con el que se inmunoprecipitó. Otras razones posibles también son consideradas y serán tratadas en la discusión.





## DISCUSIÓN



## 7. DISCUSION

Este trabajo se basa principalmente en la realización de un estudio global del proteoma superficial de *C. albicans* y la selección de algunas de las proteínas identificadas para comprobar su utilidad en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico o como vacunas para las candidiasis invasivas. Para la identificación de las proteínas de superficie, tanto de las levaduras como de las hifas de *C. albicans* inducidas en distintas condiciones de crecimiento (incluyendo condiciones que simulan las fisiológicas del ser humano al suplementar el medio con suero), se utilizó una aproximación proteómica que consiste en el afeitado de la superficie celular mediante la digestión de la célula entera con tripsina e identificación de los péptidos obtenidos mediante MS. De esta forma, se identificaron 938 posibles proteínas de la superficie celular de levaduras o hifas de *C. albicans*. Además, se realizó un estudio proteómico preliminar de la superficie celular desde otras especies de *Candida* con importancia clínica, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. De las proteínas identificadas en estas especies de *Candida*-no *albicans*, el 70% de son proteínas homólogas a las identificadas previamente en *C. albicans*. Esta aproximación es cualitativa, sin embargo el número de péptidos con el cual se identifica cada proteína está directamente relacionado tanto con su proporción relativa en la superficie de las células como con la accesibilidad de la tripsina a dicha proteína. Por este motivo, el número de péptidos identificados en cada proteína proporciona una idea de su abundancia relativa frente a otras de la superficie celular de *C. albicans*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que mientras los datos de número de péptidos obtenidos de la superficie de levaduras y de hifas obtenidas en medio Lee podrían ser comparables, los obtenidos de la superficie de hifas estimuladas con suero humano no lo son; ya que en esta última condición las proteínas del suero se unen a la superficie celular modificando tanto la proporción relativa de las distintas proteínas como la accesibilidad que éstas presentan a la tripsina. Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, en este trabajo se consideraron proteínas correctamente identificadas aquellas a las que se le asignaba 1 péptido en 3 réplicas biológicas, 2 péptidos en 2 réplicas biológicas o por lo menos 3 péptidos cuando solo se identificaron en una réplica biológica. Las proteínas identificadas con 3 o más péptidos en las 3 réplicas biológicas analizadas se consideraron abundantes. A continuación en los comentarios referentes a cada proteína identificada se relacionan las proporciones relativas de los péptidos con la abundancia de las proteínas identificadas en cada una de las condiciones estudiadas.

Finalmente, se seleccionaron dos de estas proteínas, Bgl2 y Ecm33, y se evaluó su posible eficacia tanto para su utilización como vacunas en un modelo de infección sistémica en ratón, como para su uso como marcadores de diagnóstico de candidiasis sistémica detectando la presencia de anticuerpos frente a ellas en sueros de pacientes con candidemia.

### **7.1. PROTEINAS CON ANCLAJE GPI QUE DEFINEN EL PERFIL PROTÉICO DE LA SUPERFICIE CELULAR DE LEVADURAS E HIFAS DE *C. albicans***

La adaptación morfológica que presenta *C. albicans* a las diferentes relaciones que establece con el hospedador, como de comensal o de patógeno oportunista, se ve reflejada en los cambios globales que sufre la célula durante la transición de levadura a hifa (Heilmann, Sorgo *et al.* 2011). Numerosos trabajos han descrito mecanismos moleculares por los cuales se rigen tales adaptaciones (Brown and Gow 1999; Lee, Jun *et al.* 2005; Ebanks, Chisholm *et al.* 2006; Martinez-Gomariz, Perumal *et al.* 2009; Han, Cannon *et al.* 2011; Monteoliva, Martinez-Lopez *et al.* 2011). En estudios recientes de la pared celular mediante abordajes proteómicos cuantitativos, se describen los perfiles proteómicos que diferencian las levaduras de las hifas y aquellas proteínas constitutivas de las dos formas celulares (Sosinska, de Koning *et al.* 2011; Heilmann, Sorgo *et al.* 2012). En el presente trabajo, detectamos los cambios en el perfil proteómico que presenta el hongo en la superficie celular de levaduras e hifas en medio sintético con mayor sensibilidad que los trabajos anteriores, además de analizar por primera vez la superficie de las hifas en contacto con suero humano.

En total se identificaron 938 posibles proteínas de la superficie celular en levaduras e hifas de *C. albicans*. Entre ellas se consiguió identificar 31 proteínas con anclaje GPI, además de otras 48 proteínas implicadas en la biogénesis y mantenimiento de la pared celular. Estos datos validan la aproximación proteómica empleada en este trabajo, teniendo en cuenta que corresponde al mayor número de proteínas con las características anteriormente descritas identificadas hasta la fecha, ya que trabajos similares muestran un rango de entre 19 a 25 proteínas con dichas características (Castillo, Calvo *et al.* 2008; Sorgo, Heilmann *et al.* 2010). No solo el número de proteínas es elevado, sino también la proporción de proteínas identificadas de cada familia de proteínas GPI con respecto a las todas las proteínas de estas familias existentes en el genoma de *C. albicans*. Esto se deduce de la comparación de

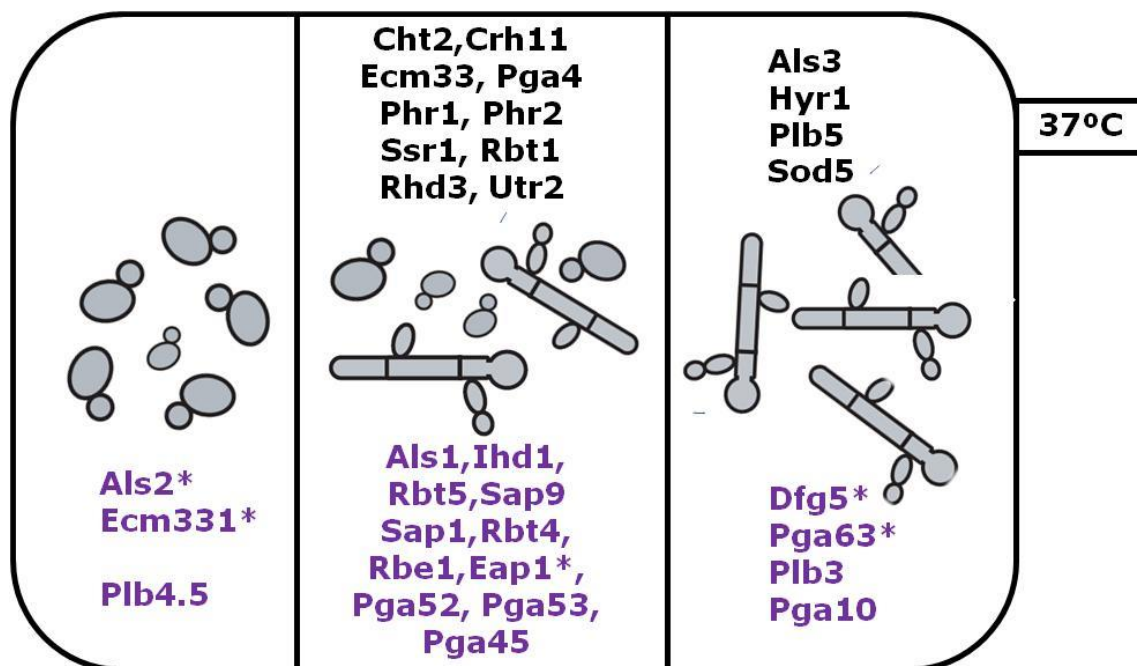
nuestros datos experimentales con los datos *in silico* (proteínas de cada una de las familias anotadas en la CGD) y que se muestra en la tabla 26.

**Tabla 26 Comparación de proteínas identificadas en este trabajo pertenecientes a distintas familias con anclaje GPI con las proteínas de dichas familias descritas en la base de datos Candida Genoma Database (CGD).**

Familias de Proteínas	CGD/GPI		Proteínas Identificadas en este trabajo				COBERTURA SURFOMA /CGD
	NC	V	Verificadas		No Caracterizadas		
ALS	0	8	3	Als 1,2 y 3	0	-	3/8
CHT	0	1	1	Cht2	0	-	1/1
CRH	0	2	1	Crh11/Csf4	0	-	1/2
DFG	0	1	1	Dfg5	0	-	1/1
EAP	0	1	1	Eap1	0	-	1/1
ECM	24	2	2	Ecm33, Ecm331	0	-	2/2
HYR	0	4	1	Hyr1	0	-	1/4
IHD	1	0	0	-	1	Ihd1 / Pga36	1/1
PHR	0	2	2	Phr1, Phr2	0	-	2/2
PGA	36	20	6	Pga4,3 10, 29, 45,47 (Eap1)52,53	2	Pga36y 63	10/20
PLB	0	4	3	Plb3, Plb4.5,Plb5	0	-	3/4
RBT	1	5	4	Rbt1,4*,5, Rbt51/Pga10	0	-	4/5
RHD	0	2	1	Rhd3/Pga29	0	-	1/2
SAP	2	2	2	Sap9, 10	0	-	2/2
UTR	0	1	1	Utr2	0	-	1/1
SSR	0	1	1	Ssr1	0	-	1/1
SOD5	1	2	1	Sod5/Pga3	0	-	1/3
RBE*	0	1	1	Rbe1/Pry2	0	-	1/1
							<b>31/57</b>

\*Proteínas de la nueva familia de proteína PRY, 3 miembros, relacionadas con patogenicidad. NC: no caracterizado, V: verificado. **CGD**: Candida genome data base, **GPI**, anclaje glicofastidilinositol.

Debido a la relevancia de estas proteínas con anclaje GPI en la pared celular fúngica en la figura 36 se muestra un resumen de las proteínas con anclaje a GPI relacionadas con cada una de las morfologías analizadas, tanto las descritas en la literatura como las identificadas en este trabajo.



**Figura 36 Proteínas con anclaje GPI identificadas en la superficie celular de levaduras e hifas y proteínas comunes de las dos morfologías de *C. albicans*.**

\*Proteínas por primera vez identificadas mediante métodos proteómicos. En letra negra, proteínas descritas en la literatura relacionadas con cada una de las morfologías (Sosinska, de Koning *et al.* 2011; Heilmann, Sorgo *et al.* 2012). En letra morada, proteínas propuestas por los resultados obtenidos en el presente trabajo.

A continuación se comentará la relevancia de las proteínas de pared celular de *C. albicans* identificadas en este trabajo relacionándolas no solo con la morfología celular sino también con su posible papel en la interacción con el hospedador.

#### 7.1.1. PROTEÍNAS GPI IDENTIFICADAS EN LEVADURAS

Heilmann y colaboradores proponen a las proteínas **Rhd3**, **Ywp1** y **Sod4** como indicativos de crecimiento de la levadura, de las cuales (Heilmann, Sorgo *et al.* 2012). En el presente trabajo se identificaron **Rhd3** y **Ywp1**. Sin embargo, la proteína **Rhd3** se ha identificado en la superficie tanto de levaduras como de hifas con un promedio de 3.5 péptidos sin mostrar variación de abundancia entre las diferentes morfologías al igual que en el trabajo publicado por Sosinska y colaboradores donde la identifican tanto en pH básico como ácido (Sosinska, de Koning *et al.* 2011). Para **Rhd3** no se ha descrito una función concreta, sin embargo se ha observado su implicación en la infección sistémica (de Boer, de Groot *et al.* 2010) y se ha descrito en la cepa mutante una disminución significativa

del  $\beta$ -1,3glucano lo que podría estar directamente relacionado con el desenmascaramiento de morfotipo. **Ywp1** no posee anclaje GPI, se ha descrito implicada en la dispersión en el hospedador y en la inducción de (Wheeler and Fink 2006; Wheeler, Kombe *et al.* 2008) biofilms (Granger, Flenniken *et al.* 2005; Heilmann, Sorgo *et al.* 2011). Adicionalmente, ha sido descrito un propéptido de Ywp1 que podría ser útil para fines de diagnóstico (Granger, Flenniken *et al.* 2005). **Ywp1** se ha identificado con un promedio de 3.5 péptidos en fase levaduriforme y con un solo péptido en forma de hifa. Lo cual apoyaría una presencia preferente en el surfoma celular de las levaduras. **Sod4** no fue identificada en nuestro estudio.

Es interesante la identificación de dos proteínas con anclaje GPI únicamente en la superficie celular de levaduras: **Em331** y **Als2**. Debido la forma de levadura es la que utiliza *Candida* para diseminarse por el cuerpo humano y a que las levaduras se obtuvieron a 37°C es posible que alguna de estas proteínas estén relacionadas con la capacidad de colonizar.

La proteína **Ecm331/Pst1**, toma este nombre de **Protoplast secreted protein** ya que su homóloga en *S. cerevisiae* fue identificada en un estudio proteómico pionero en la identificación de proteínas implicadas en la formación de la pared celular de levadura (Pardo, Monteoliva *et al.* 1999; Pardo, Ward *et al.* 2000). Dicho trabajo se basó en la separación por geles 2D de las proteínas secretadas al medio de cultivo por protoplastos en condiciones de regeneración de su pared celular. Pst1 es una proteína de la familia de Ecm33 que también es necesaria, tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans*, para la formación de una pared celular adecuada (Martinez-Lopez, Monteoliva *et al.* 2004; Pardo, Monteoliva *et al.* 2004) En *C. albicans* esta proteína ha sido detectada *in silico* (De Groot, Hellingwerf *et al.* 2003) y se ha estudiado la regulación de su expresión (está regulada negativamente por Bcr1p y Hog1 (Nobile and Mitchell 2005; Enjalbert, Smith *et al.* 2006) y su localización subcelular (se encuentra localizada tanto en la membrana como en la pared celular (Mao, Zhang *et al.* 2008). Este es el primer trabajo que identifica esta proteína de por espectrometría de masas en superficie celular y se detectó únicamente en la superficie de levadura, con un único péptido en todas las réplicas biológicas

**La proteína Als2**, también fue identificada únicamente en el surfoma de las levaduras *C. albicans* con un promedio de 3.3 péptidos. El gen *ALS2* ha sido descrito como un posible gen esencial, por la incapacidad de obtener un mutante homocigótico (Zhao, Oh *et al.* 2005). La expresión de Als2p no ha sido detectada bajo condiciones basales de crecimiento *in-vitro*, lo que sugiere que se requieren

señales *in-vivo* para su expresión (Hoyer, Payne *et al.* 1998). En nuestro trabajo, se detectó en forma levaduriforme, cultivada en medio Lee durante 6 horas a 37°C, lo cual podría ser la explicación del logro de su identificación. Otros trabajos transcriptómicos han observado, la inducción de su RNA con tratamiento con ketoconazol (Liu, Lee *et al.* 2005), en protoplastos en regeneración (Castillo, Martinez *et al.* 2006), en concentraciones bajas de hierro (Lan, Rodarte *et al.* 2004) y más recientemente se detectó una regulación positiva de la expresión de este gen en la formación de biofilms, tanto en micro placas de silicona como *in-vivo* en catéter subcutáneos en un modelo de ratas (Nobile, Schneider *et al.* 2008; Nailis, Vandenbosch *et al.* 2010).

La fosfolipasa **PLB4.5** no se identificó solamente en levaduras, pero si aparece mucho más abundante en esta morfología: se detectó con un promedio de 16.5 péptidos lo que supone casi el doble que en hifas en medio Lee donde se identificó con 9.5 péptidos. En hifas estimuladas con suero se detectaron 3 péptidos. En otros trabajos, se ha descrito el aumento de la transcripción de esta enzima lipolítica en la fase blanca en comparación con la fase opaca. Nuestra cepa presenta la fase blanca, lo que facilitaría su identificación (Lohse and Johnson 2010).

---

#### 7.1.2. PROTEÍNAS GPI DONDE SU ABUNDANCIA ES INDEPENDIENTE DE LA MORFOLOGÍA CELULAR

En el trabajo de Heilmann y colaboradores en el 2011, se han identificado una serie de proteínas tanto en levaduras como en hifas obtenidas con diferentes estímulos: **Cht2, Crh11, Ecm33, Pga4, Phr1, Phr2, Ssr1 Rbt1** y **Utr2**. Estas proteínas, en su mayoría, están implicadas en el mantenimiento y remodelación de la pared celular (De Groot, de Boer *et al.* 2004; Heilmann, Sorgo *et al.* 2011). En el presente trabajo además de dichas proteínas también se identificaron **Als1, Ihd1, Pga53, Pga45, Sap9, Sap10, Rbt4, Rbt5, Rbe1, Rhd3** (comentada en el apartado 5.3.1) y **Eap1** (comentada en el apartado 5.1). Este grupo de proteínas además de incluir muchas que están implicadas en la biogénesis de la pared celular, también incluye algunas que están estrechamente relacionadas con el proceso infeccioso de este hongo. Todas estas proteínas se identificaron con una abundancia relativa de péptidos estable entre las levaduras como en hifas. No obstante, se ha demostrado que el proteoma de la pared celular puede verse afectado significativamente por otros factores de estrés, o el tratamiento con azoles pudiendo variar la cantidad de algunas de estas proteínas según las condiciones (Sorgo, Heilmann *et al.* 2010). En la tabla 27 se describe un resumen de la función biológica de cada una de ellas.

**Tabla 27** Proteínas con anclaje GPI donde su abundancia es independiente de la morfología de *C. albicans*.

Proteína	Actividad Biológica	Función Biológica y/o Hallazgos experimentales	Referencias
<b>Cht2</b>	Mayor Quitinasa	Remodelación de la pared celular	(Dunkler, Walther <i>et al.</i> 2005)
<b>Crh11</b>	Transglicosidasas	Mutantes sensibles al rojo Congo, blanco de Calcoflúor y SDS	(Pardini, De Groot <i>et al.</i> 2006)
<b>Utr2</b>			
<b>Ecm33</b>	Función estructural	Implicada en el mantenimiento de la integridad de la pared celular	(Martinez-Lopez, Park <i>et al.</i> 2006)
		La vacunación con la cepa mutante protege a los ratones de las candidiasis invasiva	(Martinez-Lopez, Nombela <i>et al.</i> 2008)
<b>Pga4</b>	Glicosiltransferasa	No es regulada por el pH	(Popolo and Vai 1999)
		Identificada en estudios proteómicos en la pared celular de <i>C. albicans</i>	(Sosinska, de Koning <i>et al.</i> 2011).
		Identificada en estudios proteómicos en la membrana celular de <i>C. albicans</i>	(Castillo, Calvo <i>et al.</i> 2008)
			(Cabezón, Llama-Palacios <i>et al.</i> 2009)
<b>Phr1</b>		<b>pH alcalino</b>	(De Bernardis, Muhlschlegel <i>et al.</i> 1998).
		Entrecruzamiento de $\beta$ -1,3 y $\beta$ -1,6 glucanos	(Fonzi 1999).
		<b>Se presenta en forma filamentosa</b>	(Kadosh and Johnson 2005)
		Adhesión e invasión tisular	(Calderon, Zavrel <i>et al.</i> 2010)
<b>Phr2</b>		<b>pH ácido</b>	(De Bernardis, Muhlschlegel <i>et al.</i> 1998).
<b>Ssr1</b>	Función estructural	Asociada al $\beta$ -glucano	(Garcera, Martinez <i>et al.</i> 2003)
		Identificada anteriormente en trabajos proteómicos de la pared celular	(Castillo, Calvo <i>et al.</i> 2008) (Sorgo, Heilmann <i>et al.</i> 2011)
<b>Rbt1</b>		Similar a Hwp1 e <b>inducida en el cambio fenotípico de levadura a hifa</b>	(Braun and Johnson 2000).
		La cepa mutante heterocigota tiene virulencia atenuada	(Braun and Johnson 2000).
<b>Als1</b>	Adhesina constitutiva	Cepa mutante disminución en adherencia	(Zhao, Oh <i>et al.</i> 2004) (Green, Zhao <i>et al.</i> 2005)
		Biofilms	(O'Connor, Lahiff <i>et al.</i> 2005)
<b>Ihd1</b>		<b>Gen específico de hifas</b>	(Nantel, Dignard <i>et al.</i> 2002).
		Regulación positiva a pH alcalino	(Shareck and Belhumeur 2011)
<b>Pga52</b>		Posible gen esencial	(Nobile, Nett <i>et al.</i> 2009)
		Identificada en estudios proteómicos en la membrana celular de <i>C. albicans</i>	(Cabezón, Llama-Palacios <i>et al.</i> 2009)
<b>Pga45</b>		<b>Expresión en hifas</b>	(Song, Cheon <i>et al.</i> 2008)
		Expresión en biofilms	(Bonhomme, Chauvel <i>et al.</i> 2011)
<b>Pib3</b>	Fosfolipasa	Posible gen esencial	(Nobile and Mitchell 2009)
		Expresión en biofilms	(Bonhomme, Chauvel <i>et al.</i> 2011)
<b>Rbt5</b>		Dominio CFEM	(Perez, Pedros <i>et al.</i> 2006; Perez, Ramage <i>et al.</i> 2011)
		Actúa como receptor de hemoglobina	(Weissman, Shemer <i>et al.</i> 2008)
		Inducida por inanición de hierro	(Lan, Rodarte <i>et al.</i> 2004; Sosinska, de Groot <i>et al.</i> 2008)
		Expresión en la superficie celular proteína con GFP	(Weissman, Shemer <i>et al.</i> 2008)
<b>Sap9</b>	Asparil proteinasas secretadas	Mutantes muestran sensibilidad alterada al rojo Congo y al blanco de Calcoflúor.	(Monod, Hube <i>et al.</i> 1998; Hube and Naglik 2001)
<b>Sap10</b>			(Albrecht, Felk <i>et al.</i> 2006)
<b>Rbt4</b>		Familia CaPry	Reprimida por Tup1
<b>Rbe1</b>			Reprimida por Efg1p

Las proteínas señaladas en rojo, son discordantes con los datos de los trabajos referenciados.

### 7.1.3. PROTEÍNAS CON ANCLAJE GPI PRESENTES EN LAS HIFAS

La relación entre la forma filamentosa y el proceso patogénico de *C. albicans* ha sido ampliamente demostrada (Lo, Kohler *et al.* 1997; Gow, Brown *et al.* 2002), (Yang 2003; Mayer, Wilson *et al.* 2013). La expresión de las distintas adhesinas y enzimas líticas es una de las características que diferencian el proteoma de las levaduras y de las hifas. Estas se encuentran asociadas a la adhesión, invasión y al daño del tejido. En este trabajo se han identificado algunas adhesinas y enzimas líticas, así como otras proteínas asociadas con la virulencia, descritas anteriormente como proteínas asociadas a las hifas estas son **Als3**, **Hyr1**, **Pib5** y **Sod5**.

La adhesina **Als3** (Hoyer, Payne *et al.* 1998; Nobile and Mitchell 2005; Nobile, Andes *et al.* 2006; Argimon, Wishart *et al.* 2007; Sorgo, Heilmann *et al.* 2010), fue identificada con un promedio de 9.5 péptidos en la forma de hifa, mientras que en la forma de levadura, se identificó con un promedio de 1.33 péptidos (anexo1). La Exo- $\alpha$ -sialidasa **Hyr1** (Bailey, Feldmann *et al.* 1996) se identificó con un promedio de 5 péptidos, tanto en hifas obtenidas en Lee, como en las estimuladas con suero humano, y no se detectó en fase levaduriforme. Ha sido descrita su regulación por los factores de transcripción Rfg1p, Efg1p, Nrg1p, Tup1p, Cyr1p, Bcr1p, Hap43p y por otras proteínas implicadas en la transición dimórfica. (Kadosh and Johnson 2001; Leng, Lee *et al.* 2001; Sohn, Urban *et al.* 2003; Garcia-Sanchez, Mavor *et al.* 2005; Kadosh and Johnson 2005; Nobile, Andes *et al.* 2006) también ha sido descrita su inducción en la formación de biofilms, (Bonhomme, Chauvel *et al.* 2011). La fosfolipasa **Pib5** (Theiss, Ishdorj *et al.* 2006) únicamente fue identificada en hifas estimuladas con suero humano con 1 péptido en las 3 réplicas biológicas y la superóxido dismutasa **Sod5**, dependiente de cobre y zinc (Martchenko, Alarco *et al.* 2004; Fradin, De Groot *et al.* 2005), fue identificada en hifas en medio Lee con 1 péptido en todas las réplicas y en hifas estimuladas con suero humano con un promedio de 4 péptidos, mientras que en levaduras no se identificó. Anteriormente se ha descrito su regulación positiva en presencia de suero (Martchenko, Alarco *et al.* 2004). Teniendo en cuenta tanto los hallazgos de este trabajo como la literatura citada, **Als3**, **Hyr1**, **Pib5** y **Sod5** pueden considerarse como indicadores del crecimiento de hifas (Heilmann, Sorgo *et al.* 2012). Estas proteínas realizan diferentes funciones en el proceso infeccioso: **Als3** es capaz de realizar la inducción de endocitosis facilitada a través de las cadherinas (Phan, Myers *et al.* 2007), así como adquirir el hierro de la ferritina del hospedador (Almeida, Brunke *et al.* 2008); **Pib5** es capaz de producir la destrucción de tejido en órganos colonizados tal como se ha observado en estudios *in-vivo* (Theiss, Ishdorj *et al.* 2006) e **Hyr1** es capaz

de conferir resistencia frente a los mecanismo de muerte mediada por neutrófilos (Luo, Ibrahim *et al.* 2010), mientras que **Sod5** protege frente a las especies reactivas de oxígeno producidas en el interior del fagosoma, tanto en macrófagos como en células dendríticas (Frohner, Bourgeois *et al.* 2009). Todos estos hechos demuestran la relación entre la expresión de estas proteínas y su relación con el proceso infeccioso de *C. albicans*.

Otras proteínas GPI además de las anteriormente descritas que teniendo en cuenta la abundancia de péptidos con los que fueron identificadas son características del proteoma superficial de hifas son:

**La proteína Rbt51 (Rbt8, Pga10)** es una proteína manosilada con dominios CFEM (Perez, Pedros *et al.* 2006; Perez, Ramage *et al.* 2011) e implicada en la utilización del grupo hemo como fuente de hierro (Weissman and Kornitzer 2004). En nuestro trabajo fue identificada en hifas estimuladas con suero humano. Anteriormente también ha sido descrita en la fase filamentosa (Weissman and Kornitzer 2004).

Las proteínas **Rbt** del inglés "Repressed By TUP1" (Braun, Head *et al.* 2000), **Rbt1** se identificó en las 3 condiciones analizadas, en levaduras con un promedio de 5 péptidos, en hifas de 10 péptidos en medio Lee, y de 7 péptidos estimuladas en suero humano. Es similar a Hwp1 y es inducida en el cambio fenotípico de levadura a hifa (Braun, Head *et al.* 2000). Además por análisis con microarrays se comprobó que su expresión es dependiente de Rim101p a pH alcalino (Kadosh and Johnson 2001). La cepa mutante heterocigota tiene virulencia atenuada (Braun, Head *et al.* 2000) y la exposición a farnesol provoca un retraso en la inducción de RBT1 así como una reducción de su nivel de producción (Enjalbert and Whiteway 2005).

## 7.2. PROTEÍNAS CON ANCLAJE GPI IDENTIFICADAS POR PRIMERA VEZ POR MÉTODOS PROTEÓMICOS

Es de destacar que dentro de las 31 proteínas con anclaje GPI identificadas en el surfoma de *C. albicans*, cinco proteínas: **Pga63**, **Eap1**, **Ecm331**, **Als2** y **Dfg5**, no habían sido identificadas anteriormente mediante espectrometría de masas. De estas **Als2** y **Ecm331** serán comentadas en el apartado 5.3.1.

La proteína **Pga63**, ha sido identificada con un promedios de 13.5 péptidos en hifas crecidas en Lee y con 6 péptidos en hifas estimuladas con suero humano. Es una proteína con función desconocida y es por análisis *in silico* se ha descrito como

ortóloga a proteínas involucradas en el transporte intracelular mediado por vacuolas (CGD, 2010).

El nombre de las proteínas **Eap** proviene del inglés "Enhanced Adherence to Polystyrene" (Li and Palecek 2005). **Eap1** se ha descrito como una proteína con anclaje GPI, regulada por Efg1 e involucrada en la formación de Biofilms (Li and Palecek 2005; Li, Svarovsky *et al.* 2007). En el presente trabajo se identificó **Eap1**, en la superficie tanto de levaduras como de hifas, con un promedio de 1.5 péptidos. No se observa un enriquecimiento que diferencie entre levaduras e hifas.

La proteína **Dfg5**, Manoproteína con N-glicosilaciones, se ha identificado únicamente en la superficie celular de hifas, tanto en las obtenidas en medio Lee, como en las estimuladas con suero humano. En todos los experimentos se identificó únicamente con 1 péptido, de hecho, en hifas en medio Lee solo se identificó en uno de cuatro experimentos con 1 péptido. En estudios previos realizados con un mutante en esta proteína se observaron defectos en la formación de filamentos inducidos por pH alcalino (Spreghini, Davis *et al.* 2003), por lo tanto parece ser una proteína existente en los filamentos de *C. albicans* independientemente de las condiciones que hayan inducido la filamentación. También ha sido descrito que la expresión de **Dfg5** requiere la expresión de Hwp1 (Spreghini, Davis *et al.* 2003), sin embargo esta proteína no fue identificada en nuestro trabajo.

### 7.3. PROTEÍNAS SIN ANCLAJE GPI EN LA SUPERFICIE CELULAR DE HIFAS ESTIMULADAS CON SUERO HUMANO

En el presente trabajo se han identificado 48 proteínas implicadas en el mantenimiento y biogénesis de la pared celular que están presentes en las distintas morfologías analizadas: a) 19 de ellas son proteínas comunes a todas las condiciones estudiadas (**Bgl2, Csp37, Eng1, Gda1, Gfa1, Gpd2, Mnt1, Mp65, Orf19.4246, Pir1, Pmi1, Pmm1, Rho1, Scw11, Sim1, Slk19, Srb1, Tma19, Ywp1**); b) 8 son proteínas comunes a levaduras e hifas obtenidas en medio Lee (**Atc1, Cht3, Hex1, Rbe1, Sun41, Sur7, Xyl2, Orf19.3683 (Gcs1)**); c) 2 son proteínas identificadas en hifas, tanto en medio de Lee como estimuladas con suero humano (**Mnn7, Pmt2**); d) 2 proteínas fueron identificadas únicamente en levaduras (**Abg1, Mnn2**); y e) 17 proteínas fueron detectadas solamente en hifas obtenidas en medio Lee (**Arp2, Bud7, Chs5, Cys4, Ecm17, Frs1, Gal10, Gsc1, Gna1, Kre9, Orf19.7124, Pmr1, Pmt1, Psa2, Rvs167, Smi1, Uap1**).

Teniendo en cuenta el objetivo de buscar proteínas con potencial para ser utilizadas en la mejora del diagnóstico y/o el tratamiento de las candidiasis invasivas, la proteínas que presentan mayor interés son las proteínas identificadas en la superficie de hifas estimuladas con suero humano presentes en todas las réplicas biológicas con un promedio de por lo menos 3 péptidos. Este criterio nos da una idea relativa de la abundancia de la proteína, lo que es esencial para cualquiera de los estudios posteriores. Las proteínas que cumplen estos criterios son: **Bgl2, Eng1, Gda1, Mp65, Pmm1, Rho1 y Srb1** (anexo2).

**Bgl2,  $\beta$  1,3-Glucosiltransferasa:** se encuentra íntimamente relacionada con la biosíntesis de la pared celular. Esta codificada por uno de los 4 genes descritos en *C. albicans* con esta función: *BGL2 BGL22, BGL97 y BGL98* y es el único de los productos génicos verificado experimentalmente. La cepa mutante presenta defectos en el crecimiento y disminuye su virulencia en ratones, pero no el contenido de  $\beta$ -1-3 glucano de la pared celular (Sarchy, McGonigal *et al.* 1997). Debido a que en estudios con abordajes inmunoproteómicos ha sido descrita su capacidad antigénica en individuos con candidiasis invasiva (Pitarch, Jimenez *et al.* 2006), esta proteína fue elegida en el presente trabajo para evaluar su uso tanto como marcador diagnóstico como para vacuna.

**Eng1, Endo-  $\beta$  1,3-glucanasa:** en el genoma de *C. albicans* hay descritos 2 genes cuyos productos presentan esta actividad enzimática, pero solo la proteína **Eng1** se encuentra verificada experimentalmente. **Eng1** es ortóloga a **Dse4p** de *S. cerevisiae*, organismo en el que se ha descrito su participación en la citocinesis de la célula hija después de la gemación (Esteban, Rios *et al.* 2005). No posee ortólogo en mamíferos (Braun, van Het Hoog *et al.* 2005) y su expresión es regulada negativamente por caspofungina y por fluconazol (Liu, Lee *et al.* 2005; Sorgo, Heilmann *et al.* 2010; Sorgo, Heilmann *et al.* 2011) y positivamente durante la formación de biofilms (Bonhomme, Chauvel *et al.* 2011).

**Gda1, GDPasa de membrana de Golgi:** es la única proteína con esta función anotada en el genoma de *C. albicans*. Está involucrado en el proceso de O-manosilación, no siendo así para la N-glicosilación. El gen que *GDA1* se induce durante para el proceso de filamentación durante el cual es necesario. No se necesita, sin embargo, para la adherencia en células Hela. Es un homólogo funcional de Gda1p en *S. cerevisiae* (Herrero, Uccelletti *et al.* 2002).

**Mp65, Manoproteína de la superficie celular 65K:** esta manoproteína ha sido descrita como un antígeno predominante en *C. albicans* que se induce a 37°C

(Gomez, Torosantucci *et al.* 1996; La Valle, Sandini *et al.* 2000);. Su expresión génica se induce en protoplastos (Castillo, Martinez *et al.* 2006) y la cepa mutante presenta defectos en la transición a filamentos tanto *in-vivo* como *in-vitro* y tiene defectos en la capacidad de adherencia a pocillos de poliestireno. Además su virulencia está atenuada en los modelos de infección sistémica en ratones y de infección en la mucosa vaginal en ratas (De Bernardis, Liu *et al.* 2007). Se ha demostrado su capacidad antigénica, en ensayos *in-vitro* donde Mp65 heteróloga es capaz de inducir la activación de células mononucleares totales de sangre humana a linfocitos T (Gomez, Torosantucci *et al.* 1996). También se ha descrito la estimulación a células dendríticas, induciendo la producción de citoquinas del perfil Th1 e incrementando la maduración de la respuesta, por el aumento de moléculas coestimuladoras (Pietrella, Bistoni *et al.* 2006). En el presente trabajo esta fue la única proteína de la pared celular identificada en todas las especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*). **Mp65** está establecida como una proteína inmunodominante y como biomarcador diagnóstico (Bromuro, Torosantucci *et al.* 1994; Gomez, Torosantucci *et al.* 1996).

**Pmm1, Fosfomanomutasa 1:** es una enzima que cataliza la formación de O- y N-enlaces glicosídicos en reacciones de manosilaciones; interconvierte entre manosa-6-fosfato y manosa-1-fosfato; es un homólogo funcional de *S. cerevisiae* Sec53p (Smith, Cooper *et al.* 1992). Ha sido descrito como antigénica en infección sistémica en ratones (Fernandez-Arenas, Molero *et al.* 2004).

**Rho1, GTPasa:** es miembro de la familia de Rho GTPasas y está involucrada en el mantenimiento de la integridad de la pared celular, regulando la síntesis de  $\beta$ -1,3-glucano. Es homólogo funcional de Rho1 de *S. cerevisiae*, e interactúa directamente con la subunidad catalítica de la beta-1,3-glucan-sintasa Gsc1actuando como la subunidad reguladora de esta enzima (Kondoh, Tachibana *et al.* 1997; Smith, Csank *et al.* 2002). Debido a que Gsc1 es la glucan sintasa más importante en la síntesis de la pared celular *RHO1* es un gen esencial (Smith, Csank *et al.* 2002). Rho1 está localizada en la membrana celular y ha sido identificada mediante aproximaciones proteómicas (Cabezón, Llama-Palacios *et al.* 2009). La expresión de *RHO1* es inducida por caspofungina (Hoehamer, Cummings *et al.* 2010).

**Srb1, GDP-manosa pirofosforilasa:** es una proteína esencial en la síntesis de GDP-manosa fosforilasa (Ohta, Chibana *et al.* 2000), utilizada en el proceso de glicosilación (Warit, Walmsley *et al.* 1998; Ohta, Chibana *et al.* 2000). Es el homólogo funcional de Psa1 de *S. cerevisiae* (Warit, Walmsley *et al.* 1998;

Marchais, Kempf *et al.* 2005) y su expresión se induce en procesos de adhesión en placas de poliestireno (Marchais, Kempf *et al.* 2005).

Es de destacar, que en nuestro estudio se han identificado dentro de este grupo algunas proteínas anteriormente postuladas para aplicaciones biomédicas, como son Bgl2, Pmm1 y Mp65. Este hecho, valida nuestro abordaje ya que ese era uno de nuestros principales objetivos y la identificación de nuevas proteínas lo hace más interesante. Estas proteínas dentro de este grupo serían: **Eng1, Gda1, Rho1 y Srb1**. Además, se ha identificado un Orf, Ofr19.3683, ortólogo al GSC1 de *S. cerevisiae* y que sería interesante analizar.

#### **7.4. PROTEÍNAS MULTIFUNCIONALES DE LA SUPERFICIE CELULAR DE HIFAS DE *C. albicans* ESTIMULADAS CON SUERO HUMANO**

Es de destacar que muchas de las proteínas del surfoma de hifas son proteínas que carecen de péptido señal y que están dentro del grupo de las denominadas proteínas multifuncionales o "moonlighting proteins". La existencia de este tipo de proteínas en la superficie celular ha sido tema de controversia desde los primeros abordajes proteómicos realizados, ya que son proteínas que clásicamente se han descrito como proteínas citoplasmáticas. Estas proteínas normalmente son muy abundantes y están involucradas en diferentes procesos del metabolismo especialmente de carbohidratos, e incluso se identifican proteínas ribosomales. Aunque en muchas de ellas no se conoce su función en el exterior celular, en algunas si se ha descrito además de su función citoplasmática su implicación en funciones de superficie, por ejemplo las capacidad de unir plasminógeno de Eno1 y otras proteínas que se comentan en el punto siguiente (Jong, Chen *et al.* 2003); de ahí el nombre de proteínas multifuncionales. En nuestro trabajo se han identificado 58 de estas proteínas. Es curioso señalar que en este grupo se encuentran las proteínas más abundantes de la superficie celular y por tanto las que con mayor número de péptidos se han identificado. Por este motivo, en este caso particular las proteínas se analizaran en 4 grupos según el rango de péptidos con los que se identificaron y no se tendrán en cuenta las identificadas con un promedio de 3 o menos péptidos. En el primer grupo, se incluyen quince proteínas identificadas con entre 3 y 5 péptidos, en el segundo nueve proteínas con entre 6 y 10 péptidos, en el tercero cinco proteínas con entre 11 y 20 péptidos y en el cuarto nueve proteínas identificadas con entre 21 y 30 péptidos (Tabla 27).

**Tabla 27 Proteínas "Moonlighting" o multifuncionales de la superficie celular de hifas estimuladas con suero humano.**

Proteína	Descripción	Péptidos
Gda1 Hem13 Msb2 Orf19.2296 Pil1 Rpl10 Rpl12 Rpl17b Rpl3 Rpl5 Rps21 Rps6a Rps8a Sam2 Ssc1	GDPasa de membrana de golgi Oxidasa coproporfirinogeno III Adhesina, familia mucina Proteína de función desconocida Componente de los Eisosomas Proteína Ribosomal L10 Proteína Ribosomal L12 Proteína Ribosomal L17 Proteína Ribosomal L3 Proteína Ribosomal L5 Proteína Ribosomal Proteína Ribosomal 6A Proteína Ribosomal 8a S-adenosilmetionina sintetasa Proteína de choque térmico	3-5
Bmh1 Orf19.251 Rpl4b Rpl6 Rps1 Rps7a Snz1 Tkl1 Ugp1	Proteínas de la familia 14-3-3 Proteína de función desconocida Proteína ribosomal 4b Proteína ribosomal 6 Proteína ribosomal 1 Proteína ribosomal S7 Proteína de fase estacionaria 1 Transquetolasa Glucosa 1-fosfatidil transferasa	6-10
Adh1 Cdc19 Kar2 Ssb1 Tef1	Alcohol deshidrogenasa Piruvato Quinasa Proteína de la familia HSP70 Proteína de la familia HSP70 Factor de elongación 1	11-20
Cef3 Eno1 Hsp70 Hsp90 Pdc11 Pgk1 Ssa2 Ssb1 Tdh3	Factor de elongación 3 Enolasa 1 Proteína de choque térmico 70Kd chaperona Proteína de choque térmico 90Kd chaperona Piruvato descarboxilasa Fosfoglicerato kinasa Proteína de la familia HSP70 Proteína de la familia HSP70 Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	21-30

Las proteínas señaladas en rojo están descritas como inmunogénicas en la CGD.

Una de las características relevantes para que una proteína se comporte como buen inmunógeno está relacionada directamente con la concentración y disponibilidad de esta en el organismo del hospedador, que finalmente se traduce en el reconocimiento del antígeno y posterior activación del sistema inmunológico, lo que conlleva a la producción de anticuerpos y/o células de memoria frente al antígeno reconocido. Relacionando los resultados obtenidos en nuestro trabajo, especialmente en lo que se refiere a la abundancia de las proteínas multifuncionales en la superficie celular, con distintos trabajos en los que se comprueba la capacidad

antigénica de estas proteínas (Pitarch, Diez-Orejas *et al.* 2001; Pitarch, Jimenez *et al.* 2006; Ahmad, Fatima *et al.* 2012) podemos relacionar de forma directa su capacidad inmunogénica con la abundancia de estas proteínas en la superficie celular.

### **7.5. PROTEÍNAS RELACIONADAS CON TRÁFICO VESICULAR EN LA SUPERFICIE DE HIFAS DE *C. albicans***

En este trabajo se identificaron en total 269 orf, 210 en la superficie de hifas en medio Lee. Destacamos el hallazgo de tres ORF con homología a adhesinas por su posible relevancia en la superficie celular estos son: orf19.4886, orf19.5126 y orf19.6082.

Por otra parte, el análisis conjunto de las secuencias proteicas pertenecientes a los ORF mediante la herramienta Gene Ontology mostró que este grupo se encontraba enriquecido en proteínas relacionadas con funciones biológicas como el transporte y localización intracelular de proteínas (Figura 17, capítulo de resultados). Este hecho podría estar relacionado con la existencia de vesículas que son capaces de transitar a través la pared celular de *C. albicans* Esta característica fue descrita por el grupo del Dr. Cassadevall (Rodrigues, Nakayasu *et al.* 2008).

La secreción de proteínas es un proceso complejo que involucra varios orgánulos y moléculas accesorias. Mediante este proceso las proteínas se transportan y se localizan intracelularmente. En las células eucariotas la vía mejor estudiada, es la secreción de proteínas por medio de migración vesicular, entre el retículo endoplasmático y las vesículas del aparato de Golgi, este tráfico es dirigido por una compleja red de vesículas (Glick and Malhotra 1998). La liberación del contenido del aparato de Golgi al exterior celular se realiza por exocitosis, después de la fusión de vesículas formadas a partir del aparato de Golgi con la membrana plasmática (Glick and Malhotra 1998). Las células fúngicas secretan proteínas por la ruta de secreción clásica que es muy similar a la ruta de secreción de células eucariotas superiores, y en la que también intervienen unas vesículas que transportan las proteínas del retículo endoplasmático al Aparato de Golgi y a partir de este se forman vesículas post-Golgi que se fusionan con la membrana plasmática para liberar su contenido (Schekman 2002; Schekman 2004). Además, durante los últimos años se ha sido descrito la existencia del transporte de vesículas intactas a través de la pared celular tanto en especies patógenas como no patógenas de hongos (Rodrigues, Nimrichter *et al.* 2007; Albuquerque, Nakayasu *et al.* 2008;

Nosanchuk, Nimrichter *et al.* 2008; Rodrigues, Nimrichter *et al.* 2008; Casadevall, Nosanchuk *et al.* 2009; De Jesus, Nicola *et al.* 2009; Eisenman, Frases *et al.* 2009; Oliveira, Nimrichter *et al.* 2009). Estas vesículas contienen una serie de proteínas, lípidos, polisacáridos y pigmentos de una amplia gama molecular y rango de masas (Albuquerque PC *et al.* 2008, Rodríguez ML *et al.* 2008, Eisenman HC *et al.* 2009, Oliveira DL, *et al.* 2009) (Rodrigues, Nimrichter *et al.* 2007; Albuquerque, Nakayasu *et al.* 2008; Nosanchuk, Nimrichter *et al.* 2008; Rodrigues, Nimrichter *et al.* 2008; Casadevall, Nosanchuk *et al.* 2009; De Jesus, Nicola *et al.* 2009; Eisenman, Frases *et al.* 2009; Oliveira, Nimrichter *et al.* 2009). Muchas de las moléculas secretadas en vesículas que atraviesan la pared celular, han sido relacionadas con el proceso infeccioso y patogénico de los hongos (Albuquerque, Nakayasu *et al.* 2008). Por ejemplo se ha descrito la producción de vesículas extracelulares que contienen diversos componentes asociados con la virulencia en *Cryptococcus neoformans*, hongo patógeno humano. Estos componentes incluyen la casa, una enzima que cataliza la síntesis de melanina y que está relacionada con el proceso patogénico del hongo en el sistema nervioso central (Eisenman, Frases *et al.* 2009).

Probablemente el hallazgo de este número elevado de ORF`s relacionados con el transporte y localización proteica en hifas, este relacionado con una mayor cantidad de vesículas en la forma filamentosa. Por otro lado se ha descrito que la pared de las hifas presenta una mayor porosidad con respecto a las levaduras. Lo que probablemente daría a la tripsina una mayor probabilidad de acceder a niveles más profundos de la pared celular (Horisberger and Clerc 1988).

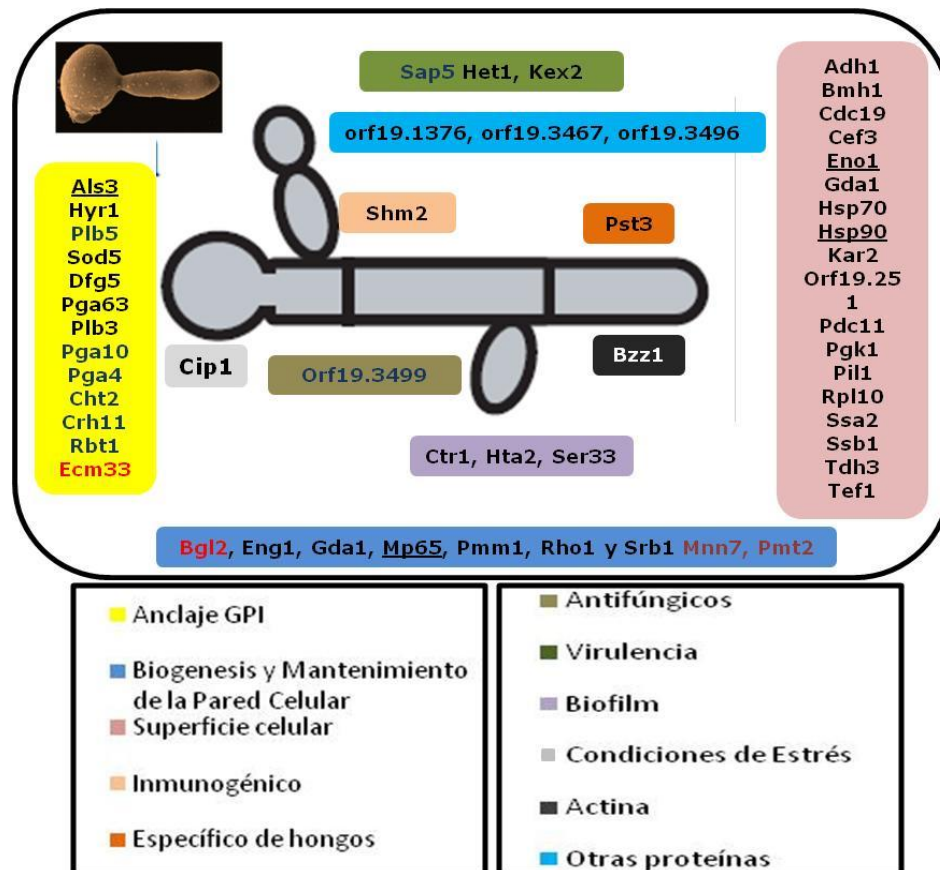
## **7.6. PROTEÍNAS DE *C. albicans* CANDIDATAS A ESTUDIOS EN APLICACIONES BIOMEDICAS**

El análisis de las proteínas superficiales de hifas de *C. albicans* estimuladas con suero humano, ha permitido seleccionar un variado grupo de proteínas fúngicas posibles candidatas a nuevas aplicaciones biomédicas, hay proteínas representantes de cada una de las 11 categorías descritas para este trabajo. Es importante señalar que los grupos de proteínas con mayor número de representantes están en las 3 categorías de mayor relevancia de nuestro estudio; Es decir: proteínas con anclaje GPI, proteínas relacionadas con la biogénesis y mantenimiento de la pared celular y proteínas descritas con localización en la superficie celular.

Todas las proteínas fueron escogidas, teniendo en cuenta su abundancia o exclusividad sobre la superficie de hifas estimuladas en condiciones fisiológicas, las

cuales se consideraron características importantes para comportarse como buenas candidatas para futuros estudios con fines biomédicos. Estas proteínas se muestran en la figura 37.

Los datos correspondientes al número de péptidos y a la condición experimental en la que fueron identificadas se detallan en los anexos del 1 al 11, que corresponden a cada una de las categorías descritas.



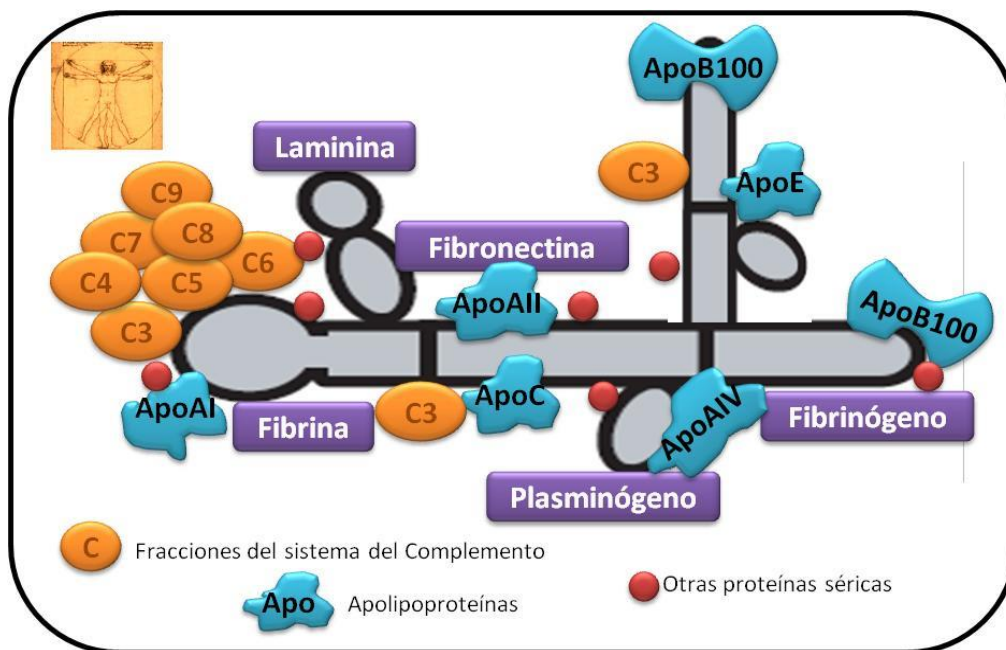
**Figura 37** Proteínas identificadas en el surfoma de hifas estimuladas con suero humano candidatas para estudios con fines biomédicos en el manejo de las Candidiasis invasivas

Las proteínas subrayadas actualmente están siendo estudiadas por otros grupos, las proteínas en letra roja se estudiaron en el presente trabajo, las proteínas en letra azul únicamente se identificaron en hifas estimuladas con suero humano.

### 7.7. PROTEINAS HUMANAS IDENTIFICADAS EN LA SUPERFICIE CELULAR DE HIFAS

Al analizar el surfoma de hifas estimuladas con suero humano encontramos que el 25% de las proteínas identificadas corresponden a proteínas que provienen del suero humano (Figura 38). En estudios anteriores se han descrito proteínas de la

pared celular de *C. albicans* que actúan como receptores de diferentes proteínas del suero humano y es de destacar que todas ellas fueron identificadas en este trabajo. Por ejemplo, en el caso del plasminógeno se ha descrito su unión a la pared y se han descrito entre otras a las proteínas **Eno1**, **Tef1**, **Tsa1** y **Tdh3**, (Crowe, Sievwright *et al.* 2003; Jong, Chen *et al.* 2003; Luo, Hoffmann *et al.* 2013). Otra de las proteínas humanas descritas como ligandos de la pared celular es el fibrinógeno el cual también se une la enolasa (Jong, Chen *et al.* 2003). También se ha publicado la capacidad de **Tdh3** de unirse a fibrina, fibronectina y laminina (Klotz, Hein *et al.* 1994; Gozalbo, Gil-Navarro *et al.* 1998; Gil, Delgado *et al.* 2001; Rauceo, De Armond *et al.* 2006).



**Figura 38:** Proteínas humanas identificadas en el surfoma de hifas estimuladas con suero humano.

Otro grupo de proteínas identificado en la superficie de *C. albicans* es el grupo de proteínas componentes del sistema del complemento. Este sistema fue descubierto hace más de un siglo, al comprobarse la capacidad bactericida del suero fresco, acción mediada por dos factores: uno termoestable (los anticuerpos específicos frente a microorganismos) y otro termolábil, al que se denominó complemento. Los componentes propiamente dichos se nombran con la letra C y un número: C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, y C9. Se conocen 3 vías de activación: La vía clásica mediada por inmunocomplejos, y activada por la fracción Fc de los anticuerpos, la vía alternativa mediada por lipopolisacáridos (LPS) y polisacáridos esencialmente presentes en las paredes celulares de los microorganismos y la vía de las lectinas la

cual se activa por medio de una MBP (manosa binding protein/proteína de unión a manosa) también llamada MBL, que detecta residuos de este azúcar en la superficie de microorganismo. Estas vías producen una enzima con la misma especificidad: convertasa de C3; y a partir de la activación de este componente siguen una secuencia terminal de activación común. El propósito de este sistema de complemento a través de sus tres vías es la destrucción de microorganismos, neutralización de ciertos virus y promover la respuesta inflamatoria, que facilite el acceso de células del sistema inmune al sitio de la infección (Zipfel, Skerka *et al.* 2011). Sin embargo, el efecto final de la formación del complejo de ataque a la membrana, el cual hace poros en la membrana celular que rompen el equilibrio homeostático y conducen a la lisis celular, no se ha observado en los hongos, lo cual ha sido explicado por la protección estérica de la capa de polisacáridos de la pared celular que impiden el anclaje del complejo enzimático a la membrana celular (Kozel, Weinhold *et al.* 1996; Zipfel and Skerka 2009). Sin embargo este es el primer trabajo que identifica todas las proteínas de la vía común de la cascada del complemento en la superficie de *C. albicans*. **C3, C4, C5, C6, C7, C8, y C9**. Para comprobar si la presencia de estas proteínas, en la superficie de *C. albicans* era debida a la activación de la ruta del complemento se realizó un primer ensayo en el cual sustituimos el suero, por suero inactivado con calor, en este primer ensayo solo identificamos algunos péptidos de la fracción C3 del complemento, y no se detectaron todas las demás proteínas de la cascada del complemento. Actualmente se están realizando otras réplicas biológicas para corroborar este hecho. Estos resultados preliminares indican que es necesaria la actividad proteasa de los componentes de la cascada para depositarse en la superficie de *C. albicans*, por lo cual posiblemente existan tanto otros mecanismo de anclaje a la pared celular del complejo de ataque a la membrana, como posiblemente otros efectos biológicos sobre el hongo. Recientemente se ha descrito la relación protectora de una vacuna contra *C. albicans*, con el correcto funcionamiento del sistema del complemento (Han and Rhew 2012), de hecho la fracción C5a ha sido descrita como necesaria para una respuesta inmunitaria protectora frente a las infecciones fúngicas (Cheng, Joosten *et al.* 2012; Zipfel and Skerka 2012).

Por otro lado identificamos un grupo importante de apolipoproteínas del género humano en la superficie de hifas de *C. albicans*. La trascendencia del hallazgo de la unión de apolipoproteínas en la superficie celular de *C. albicans* no se conoce todavía. En la literatura hay dos publicaciones que hacen referencia a la posible relación entre las apolipoproteína y la capacidad innata de protección frente a las

candidemias. Este hecho ha sido reconocido al observarse una mayor susceptibilidad a la candidiasis invasiva en ratones deficientes de ApoE (Vonk, De Bont *et al.* 2004), además se ha descrito la actividad antifúngica de péptidos derivados de la ApoE (Rossignol, Kelly *et al.* 2011).

## 7.8. APLICACIONES BIOMÉDICAS

### 7.8.1. DIAGNÓSTICO

La candidiasis invasiva es una complicación de los pacientes críticos e inmunodeprimidos con una elevada mortalidad. Esto es en gran parte debido a su presentación clínica inespecífica, que dificulta la detección temprana de la candidemia al igual que la identificación precisa de las especies de *Candida*. El hallazgo de la candidemia e identificación a nivel de especie, son pre-requisitos esenciales para la instauración de un protocolo terapéutico que disminuya la mortalidad para estos individuos (Pappas, Kauffman *et al.* 2009). En la actualidad la única metodología estándar para su diagnóstico es el hemocultivo (de Pauw and Picazo 2008) que carece tanto de sensibilidad como de especificidad. Se ha demostrado que cada día de retraso en la iniciación de la terapia antifúngica se convierte en un incremento significativo del riesgo de mortalidad (Garey, Rege *et al.* 2006), por lo que la detección de marcadores inmunológicos y moleculares han proporcionado una alternativa para el diagnóstico precoz de la candidiasis invasiva (Sendid, Tabouret *et al.* 1999; Odabasi, Mattiuzzi *et al.* 2004; Alam, Mustafa *et al.* 2007; Zaragoza, Peman *et al.* 2009; Mokaddas, Khan *et al.* 2011). En la introducción se realizó un amplio resumen de los métodos basados en detección tanto de antígenos como de anticuerpos, en uso clínico y en investigación (Pitarch, Sanchez *et al.* 2002; Pitarch, Mercader *et al.* 2006; Lain, Elguezabal *et al.* 2007; Clancy, Nguyen *et al.* 2008; Pitarch, Jimenez *et al.* 2008; Pitarch, Nombela *et al.* 2011).

En el presente trabajo y teniendo en cuenta tanto los resultados del estudio global proteómico del surfoma de *C. albicans* y de otras especies como la experiencia del grupo en búsqueda de marcadores diagnóstico, se decidió evaluar las proteínas de la pared celular Bgl2 y Ecm33 de *C. albicans* para su posible uso como marcadores diagnósticos en un grupo piloto de sueros de pacientes con hemocultivos positivos para levaduras del género *Candida*. Para ello, Ecm33 y Bgl2 se expresaron de forma heteróloga en un sistema libre de células, se purificaron y se evaluaron los anticuerpos frente a las dos proteínas presentes en los sueros de los pacientes,

mediante la técnica de western blot. Para las dos proteínas se generaron sueros policlonales en conejos, lo que nos permitió poner a punto el ensayo. Sin embargo los resultados obtenidos con los 14 sueros no mostraron niveles de sensibilidad ni especificidad satisfactorios en el caso de Ecm33. En el caso de Bgl2 se han encontrado problemas con la obtención de cantidades suficientes de proteína para la detección de señal con los sueros de los pacientes. Estos resultados pueden deberse a múltiples causas, tanto dependientes de la proteína heteróloga obtenida, como del estado inmune del suero de los pacientes evaluados. En cuanto a las proteínas evaluadas, ambas fueron expresadas en un sistema que no realiza cambios post-transcripcionales como las glicosilaciones. Ecm33 y Bgl2 de *C. albicans* presentan glicosilaciones. En el caso de Ecm33 presenta además un anclaje GPI que la une a la membrana plasmática o la pared celular por su extremo carboxiterminal y, por lo tanto, en su forma nativa presenta una arquitectura específica que puede presentar epítomos conformacionales, que al linearizar la proteína podrían perderse lo que implicaría una disminución tanto de la especificidad como de la sensibilidad del ensayo. En el caso de Bgl2 ya había sido detectada como un buen inmunógeno en productos de secreción de protoplastos en condiciones desnaturalizantes (Pitarch, Jimenez *et al.* 2006); sin embargo en este trabajo se utilizó la proteína nativa, lo cual junto con la concentración limitada de proteína que se podía cargar en el gel, y la ausencia de glicosilaciones, pueden ser la explicaciones de falta de señal de anticuerpos en los sueros de los pacientes. Por otra parte pueden existir características inherentes a los pacientes que pueden afectar directamente la detección de los anticuerpos, como un grado de inmunosupresión alto. De hecho varios autores señalan la falta de reproducibilidad de técnicas diagnósticas basadas en la detección de anticuerpos en pacientes con inmunocompromiso, por lo cual muchos de ellos proponen el uso combinado de la detección de anticuerpos y antígenos, la detección simultánea de anticuerpos frente a varios antígenos o el diagnóstico basado solo en la detección de antígenos. Este último es el que muestra una mayor independencia al estado inmunológico del paciente, por lo que al parecer muestra una mayor reproducibilidad (Prella, Bille *et al.* 2005; Cuetara, Alhambra *et al.* 2009; Aguado, Ruiz-Camps *et al.* 2011; Ahmad, Khan *et al.* 2012; Peman and Zaragoza 2012).

Debido a que los resultados obtenidos con estas dos proteínas para su uso como diagnósticos no fueron los esperados, se analizaron los datos del surfoma de *C. albicans* y de las especies de *Candida* no-albicans para poder proponer otras posibles proteínas que se puedan utilizar como biomarcadores de candidiasis

invasivas. Por lo tanto, se propone un panel de 14 proteínas con ortólogos en las 4 especies de *Candida* analizadas e identificados por espectrometría de masas con una abundancia mayor a 3 péptidos en todas las réplicas biológicas realizadas: **Mp65, Cef3, Eno1, Hsp90, Pgk1, Tdh3, Rpl12, Rps7a, Ssb1, Yst1, Cyp1 Tal1, Act1 y Pdc11**. Muchas de estas proteínas ya han sido evaluadas como posibles marcadores biológicos. Clancy y colaboradores en el 2008 evaluaron el siguiente grupo de proteínas **Bgl2p, Muc1p-1, Muc1p-2, Eno10, Fba1p, Gap1p, Pkg1p-1, Pkgp-2, Not5p, Met6p1, Met6p2, Car1p, Rbt4p, Set1p, e Ipf9162**, sin embargo no consiguieron separar estadísticamente las poblaciones de sanos y enfermos (Clancy, Nguyen *et al.* 2008). Nosotros proponemos este panel no solo para la evaluación de anticuerpos sino para la identificación sérica de ellas por técnicas de proteómica dirigida.

---

### 7.8.2. VACUNAS

Otro objetivo importante en el manejo de las enfermedades infecciosas es prevenirlas y la estrategia que presenta mayor eficacia para conseguir este objetivo es la vacunación (Ito, Lyons *et al.* 2009). Hay varias proteínas de *C. albicans* que actualmente están siendo evaluadas. Entre ellas las adhesinas Als3 (Spellberg, Ibrahim *et al.* 2006; Brena, Omaetxebarria *et al.* 2007; Liu and Filler 2011) y Als1 (Ibrahim, Spellberg *et al.* 2006), la proteína Hyr1 que mostró ser inmunoprotectora en modelo de ratones (Luo, Ibrahim *et al.* 2010) y la enolasa (Li, Hu *et al.* 2011). También se ha probado otras vacunas que contienen varias proteínas citoplasmáticas y de la superficie celular (Chauhan, Swaleha *et al.* 2011) o células del mutante de *C. albicans*  $\Delta ecm33$  (Martinez-Lopez, Nombela *et al.* 2008). Por otra parte se continúa con la de búsqueda de nuevas proteínas candidatas para vacunación (Hernaiz, Ximenez-Embun *et al.* 2010; Vialas, Perumal *et al.* 2012).

En el presente trabajo se han realizado ensayos de vacunación con **Bgl2** y **Ecm33** en un modelo de infección sistémica en ratones Balb/c. En el ensayo de **Bgl2** se ha utilizados la proteína expresada en *P. pastoris* a dosis de 0.3ug/mL en 2 inmunizaciones vía intraperitoneal. En estas condiciones se obtuvo una supervivencia del 25% de ratones. Para comprobar si en esta protección participaba la respuesta humoral se detectó la presencia de anticuerpos frente a Bgl2 en los sueros de los ratones inmunizados, se comprobó que la inmunidad humoral mediada por anticuerpos fue inducida por esta vacunación ya que se detectaron anticuerpos anti-**Bgl2** tanto en los ratones vacunados como en los supervivientes. El resultado obtenido en este ensayo puede mejorarse aumentando las dosis y/o el

número de inmunizaciones. Por otra parte también podría ensayarse la inmunización con varias proteínas específicas de hongos a la vez. Del presente estudio teniendo en cuenta su abundancia, su presencia en la superficie celular y el no poseer homólogo en mamíferos, para su utilización en este nuevo protocolo de inmunización proponemos las siguientes proteínas: **Eng1, Gda1, y Srb1**. En cuanto a los ensayos realizados con la proteína Ecm33 no se obtuvieron ratones supervivientes, sin embargo en la dosis de 3ug/mL se aumentó el tiempo de vida en 3 días en los ratones vacunados. Aún más interesante, es la observación de que en la dosis más alta de proteína se disminuye el tiempo de supervivencia de los ratones, lo que podría estar indicando un papel como factor de virulencia más que como inmunomodulador. Por este motivo, la evaluación del uso de anticuerpos anti-Ecm33, en protocolos de inmunización pasiva, podría ser una alternativa interesante, en pacientes que presenten factores de riesgo para candidiasis invasiva. Actualmente se está usando en la práctica clínica en este tipo de terapias anticuerpos anti-Hsp90 en una formulación comercial llamada Mycograb® de Novartis S.A.

Otros trabajos en búsqueda de candidatos para vacunas muestran que posiblemente la región N-terminal de las proteínas con anclaje GPI **Hwp2, Plb5 y Sod5**, podrían ser utilizadas como vacunas (Heilmann, Sorgo *et al.* 2011). En nuestro trabajo también hemos identificado un péptido altamente abundante, IYDQLPECAK el que es el comienzo del dominio CFEM (Kulkarni, Kelkar *et al.* 2003). Este dominio CFEM es un dominio altamente conservado en hongos, a lo largo de los ocho residuos de cisteína espaciados aproximadamente 70 aminoácidos, y ha sido implicado en la formación de biofilms. Se ha descrito la presencia del dominio CFEM, en cinco proteínas superficiales de *C. albicans*: **Csa1, Csa2, Pga7, Pga10, Rbt5** y en **Ssr1**. Tanto **Pga10**, como **Ssr1** y **Rbt5** han sido identificados en nuestro trabajo. El dominio CFEM se encuentra en su región N-terminal y las proteínas no están glicosilada, por lo cual lo hace ser accesible en la superficie (Heilmann, Sorgo *et al.* 2011).

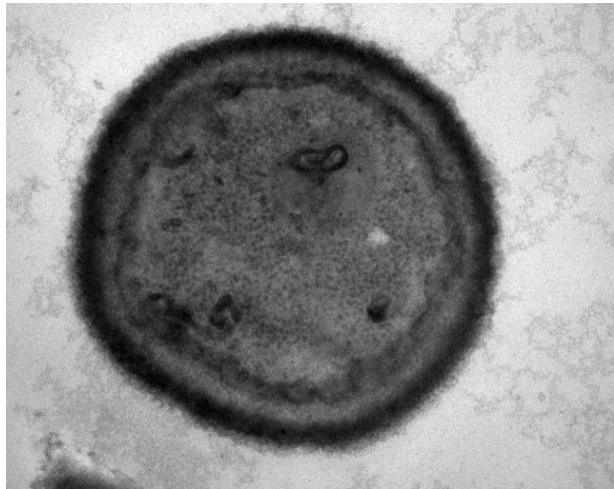
## 7.9. LA PROTEÍNA Ecm33 ESTÁ IMPLICADA EN LA BIOGÉNESIS DE LA PARED CELULAR

Teniendo en cuenta el interés de la proteína Ecm33 en la virulencia de *C. albicans* se decido ahondar en el estudio de su función. El hallazgo más importante en cuanto a la posible aplicación biomédica de Ecm33 de esta parte del estudio fue el encontrar que la proteína con anclaje GPI Ecm33 no solo está implicada en la

## Discusión

arquitectura de la pared celular de *C. albicans* (Martinez-Lopez, Monteoliva *et al.* 2004) sino también en la biogénesis de esta; teniendo en cuenta que protoplastos de la cepa mutante solamente el 33% de ellos poseen la capacidad de regenerar la pared celular. Teniendo en cuenta que la cepa silvestre es capaz de regenerarla al 100%, estos hallazgos a nivel clínico colocan a Ecm33 como un posible candidato como diana terapéutica.

Una cepa triple mutante en los genes **UTR2**, **CRH11** y **CRH12** muestra defectos en la capacidad de regeneración de la pared celular (Pardini, De Groot *et al.* 2006). Todos son miembros de la familia CRH y todos ellos codifican para enzimas con actividad trasnglicosilasa. Que el defecto de un único gen como es ECM33 impida que aproximadamente el 70% de protoplastos no regeneren la pared celular y su abundante y constante presencia en la superficie celular son características que señalan su papel esencial en la biogénesis de la pared, lo que la reafirma como un buen candidato a diana terapéutica.



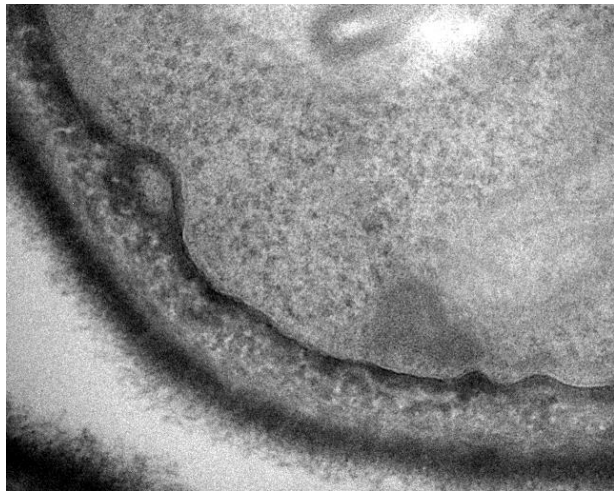
# CONCLUSIONES



## 8. CONCLUSIONES

1. La tripsinización sobre la célula viva y posterior identificación de péptidos en un espectrómetro de masas tipo Orbitrap, es una metodología de gran utilidad para el estudio del proteoma superficial o "surfoma" de las formas levaduriformes y de las hifas de *C. albicans*. Con esta estrategia se consiguió la identificación del mayor número de proteínas en la superficie descrito hasta la fecha, 938 proteínas incluidas en una gran variedad de grupos funcionales: con anclaje GPI, implicadas en la biogénesis y/o mantenimiento de la pared celular, previamente identificadas en la superficie celular, inmunogénicas, específicas de hongos, relacionadas con la respuesta a antifúngicos, relacionadas con mecanismos de patogenicidad, relacionadas con la formación de "biofilms", relacionadas con la respuesta a condiciones de estrés, relacionadas con el citoesqueleto, esencialmente actina y otras proteínas.
2. Se identificaron 78 proteínas clásicas de pared celular que incluyen 31 proteínas con anclaje GPI y 47 proteínas implicadas en el mantenimiento y biogénesis de la pared celular. Cinco proteínas **Pga63**, **Eap1**, **Ecm331**, **Als2** y **Dfg5** fueron identificadas por primera vez mediante estrategias proteómicas.
3. Con esta estrategia proteómica fue posible detectar un elevado número de cambios en el proteoma de la superficie celular de levaduras con respecto al de hifas. Los cambios más importantes se detectaron en proteínas con anclaje tipo GPI y en proteínas implicadas en la biogénesis y mantenimiento de la pared celular, permitiendo establecer perfiles proteicos diferenciales basados en proteínas con anclaje GPI, en levaduras **Ecm331** y **Als2**, en hifas **Als3**, **Hyr1** y **Sod5**. Además por primera vez se analizó la superficie de hifas estimuladas con suero humano, donde fue en la única condición en la que se identificó la fosfolipasa **Pib5**.
4. Las proteínas detectadas en la superficie celular con un mayor número de péptidos correspondieron al grupo de proteínas multifuncionales, muchas de ellas poseen propiedades inmunogénicas.

5. El proteoma de la superficie de hifas obtenidas en medio Lee presentó un número significativo de proteínas de función desconocida (ORFs). El análisis *in silico* de dichas proteínas mostró un enriquecimiento en proteínas relacionadas con transporte y localización de proteínas en la célula, especialmente en el tráfico vesicular.
6. Se identificó un gran número de proteínas humanas adheridas a la superficie de las hifas de *C. albicans* inducidas con un 10% de suero humano entre ellas se encuentra el fibrinógeno, plasminógeno, laminina, todas las proteínas de la vía común de la cascada del complemento (C3, C4, C5, C6, C7, C8, y C9) y diversas apolipoproteínas.
7. La proteína Ecm33 obtenida en un sistema de expresión libre de células no resultó un buen biomarcador para el diagnóstico de candidemia en las condiciones ensayadas ya que no permitió distinguir entre sueros de pacientes con candidemia y sueros control. Por otra parte, ensayos similares con la proteína Bgl2 obtenida mediante el mismo sistema no presentaron suficiente sensibilidad.
8. La proteína Bgl2p expresada en *P. pastoris* utilizada en ensayos de inmunización en modelo de ratón presentó una protección del 25% de los ratones infectados con *C. albicans*, por lo tanto es una buena candidata para futuros estudios con nuevos protocolos de inmunización. Por otro lado, en el ensayo de vacunación con 3µg de la proteína Ecm33 se observó un retraso de entre 3 y 5 días en la muerte de los ratones vacunados frente a los ratones sin vacunar.



# BIBLIOGRAFIA



## 9. BILIOGRAFIA

- Ablordepey, S. Y., P. Fan, *et al.* (1999). "Systemic antifungal agents against AIDS-related opportunistic infections: current status and emerging drugs in development." Curr Med Chem **6**(12): 1151-1195.
- Aerts, A. M., I. E. Francois, *et al.* (2008). "The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins." Cell Mol Life Sci **65**(13): 2069-2079.
- Aguado, J. M., I. Ruiz-Camps, *et al.* (2011). "[Guidelines for the treatment of Invasive Candidiasis and other yeasts. Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). 2010 Update]." Enferm Infecc Microbiol Clin **29**(5): 345-361.
- Ahmad, E., M. T. Fatima, *et al.* (2012). "Plasma beads loaded with *Candida albicans* cytosolic proteins impart protection against the fungal infection in BALB/c mice." Vaccine **30**(48): 6851-6858.
- Ahmad, S., Z. Khan, *et al.* (2012). "Performance comparison of phenotypic and molecular methods for detection and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*." BMC Infect Dis **12**: 230.
- Alam, F. F., A. S. Mustafa, *et al.* (2007). "Comparative evaluation of (1, 3)-beta-D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia." BMC Infect Dis **7**: 103.
- Albrecht, A., A. Felk, *et al.* (2006). "Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions." J Biol Chem **281**(2): 688-694.
- Albuquerque, P. C., E. S. Nakayasu, *et al.* (2008). "Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes." Cell Microbiol **10**(8): 1695-1710.
- Almeida, R. S., S. Brunke, *et al.* (2008). "the hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin." PLoS Pathog **4**(11): e1000217.
- Almirante, B., J. D. Colmenero, *et al.* (2008). "[Current infectious disease care in Spain]." Enferm Infecc Microbiol Clin **26 Suppl 15**: 23-32.
- Andes, D., A. Lepak, *et al.* (2005). "A simple approach for estimating gene expression in *Candida albicans* directly from a systemic infection site." J Infect Dis **192**(5): 893-900.
- Andrews, J. I., D. K. Fleener, *et al.* (2007). "The yeast connection: is *Candida* linked to breastfeeding associated pain?" Am J Obstet Gynecol **197**(4): 424 e421-424.

- Arancia, S., A. Carattoli, *et al.* (2006). "Use of 65 kDa mannoprotein gene primers in Real Time PCR identification of *Candida albicans* in biological samples." Mol Cell Probes **20**(5): 263-268.
- Arendrup, M. C. (2010). "Epidemiology of invasive candidiasis." Curr Opin Crit Care **16**(5): 445-452.
- Arendse, T. and H. Orth (2008). "Candida species: species distribution and antifungal susceptibility patterns." S Afr Med J **98**(6): 455-456.
- Argimon, S., J. A. Wishart, *et al.* (2007). "Developmental regulation of an adhesin gene during cellular morphogenesis in the fungal pathogen *Candida albicans*." Eukaryot Cell **6**(4): 682-692.
- Badiee, P., A. Alborzi, *et al.* (2011). "Susceptibility of *Candida* species isolated from immunocompromised patients to antifungal agents." East Mediterr Health J **17**(5): 425-430.
- Bailey, D. A., P. J. Feldmann, *et al.* (1996). "The *Candida albicans* HYR1 gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins." J Bacteriol **178**(18): 5353-5360.
- Bennett, R. J. and A. D. Johnson (2005). "Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle." Annu Rev Microbiol **59**: 233-255.
- Bikandi, J., M. D. Moragues, *et al.* (2000). "Influence of environmental pH on the reactivity of *Candida albicans* with salivary IgA." J Dent Res **79**(6): 1439-1442.
- Blanco, J. L. and M. E. Garcia (2008). "Immune response to fungal infections." Vet Immunol Immunopathol **125**(1-2): 47-70.
- Bonhomme, J., M. Chauvel, *et al.* (2011). "Contribution of the glycolytic flux and hypoxia adaptation to efficient biofilm formation by *Candida albicans*." Mol Microbiol **80**(4): 995-1013.
- Boone, C., S. S. Sommer, *et al.* (1990). "Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly." J Cell Biol **110**(5): 1833-1843.
- Bougnoux, M. E., A. Tavanti, *et al.* (2003). "Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*." J Clin Microbiol **41**(11): 5265-5266.
- Bourgeois, C., O. Majer, *et al.* (2010). "Fungal attacks on mammalian hosts: pathogen elimination requires sensing and tasting." Curr Opin Microbiol **13**(4): 401-408.
- Bouza, E. and P. Munoz (2008). "Epidemiology of candidemia in intensive care units." Int J Antimicrob Agents **32 Suppl 2**: S87-91.

## Bibliografía

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brand, A., D. M. MacCallum, *et al.* (2004). "Ectopic expression of URA3 can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of URA3 at the RPS10 locus." Eukaryot Cell **3**(4): 900-909.
- Braun, B. R., W. S. Head, *et al.* (2000). "Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*." Genetics **156**(1): 31-44.
- Braun, B. R. and A. D. Johnson (2000). "TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*." Genetics **155**(1): 57-67.
- Braun, B. R., M. van Het Hoog, *et al.* (2005). "A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome." PLoS Genet **1**(1): 36-57.
- Brena, S., M. J. Omaetxebarria, *et al.* (2007). "Fungicidal monoclonal antibody C7 binds to *Candida albicans* Als3." Infect Immun **75**(7): 3680-3682.
- Bromuro, C., A. Torosantucci, *et al.* (1994). "Differential release of an immunodominant 65 kDa mannoprotein antigen from yeast and mycelial forms of *Candida albicans*." J Med Vet Mycol **32**(6): 447-459.
- Brown, A. J. and N. A. Gow (1999). "Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis." Trends Microbiol **7**(8): 333-338.
- Brown, A. J., F. C. Odds, *et al.* (2007). "Infection-related gene expression in *Candida albicans*." Curr Opin Microbiol **10**(4): 307-313.
- Brunke, S. and B. Hube (2012). "Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies." Cell Microbiol.
- Bulawa, C. E. (1993). "Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi." Annu Rev Microbiol **47**: 505-534.
- Butler, G., M. D. Rasmussen, *et al.* (2009). "Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes." Nature **459**(7247): 657-662.
- Cabezón, V., A. Llama-Palacios, *et al.* (2009). "Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome." Proteomics **9**(20): 4770-4786.
- Calderon, J., M. Zavrel, *et al.* (2010). "PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans* encoding a glucan-remodelling enzyme, is required for adhesion and invasion." Microbiology **156**(Pt 8): 2484-2494.

- Calderone, R., F. C. Odds, *et al.* (2009). "Candida albicans: fundamental research on an opportunistic human pathogen." FEMS Yeast Res **9**(7): 971-972.
- Calderone, R. A. (1993). "Molecular interactions at the interface of Candida albicans and host cells." Arch Med Res **24**(3): 275-279.
- Calderone, R. A. and W. A. Fonzi (2001). "Virulence factors of Candida albicans." Trends Microbiol **9**(7): 327-335.
- Caro, L. H., H. Tettelin, *et al.* (1997). "In silico identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of Saccharomyces cerevisiae." Yeast **13**(15): 1477-1489.
- Carvalho, A., C. Cunha, *et al.* (2012). "Immunity and tolerance to fungi in hematopoietic transplantation: principles and perspectives." Front Immunol **3**: 156.
- Casadevall, A., J. D. Nosanchuk, *et al.* (2009). "Vesicular transport across the fungal cell wall." Trends Microbiol **17**(4): 158-162.
- Casadevall, A. and L. A. Pirofski (2001). "Adjunctive immune therapy for fungal infections." Clin Infect Dis **33**(7): 1048-1056.
- Casanova, M., J. P. Martinez, *et al.* (1990). "Fab fragments from a monoclonal antibody against a germ tube mannoprotein block the yeast-to-mycelium transition in Candida albicans." Infect Immun **58**(11): 3810-3812.
- Cassone, A. (2008). "Fungal vaccines: real progress from real challenges." Lancet Infect Dis **8**(2): 114-124.
- Castillo, L., E. Calvo, *et al.* (2008). "A study of the Candida albicans cell wall proteome." Proteomics **8**(18): 3871-3881.
- Castillo, L., D. M. MacCallum, *et al.* (2011). "Differential regulation of kidney and spleen cytokine responses in mice challenged with pathology-standardized doses of Candida albicans mannosylation mutants." Infect Immun **79**(1): 146-152.
- Castillo, L., A. I. Martinez, *et al.* (2003). "Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of Saccharomyces cerevisiae Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall beta-1,3-glucan." Yeast **20**(11): 973-983.
- Castillo, L., A. I. Martinez, *et al.* (2006). "Genomic response programs of Candida albicans following protoplasting and regeneration." Fungal Genet Biol **43**(2): 124-134.
- Clancy, C. J., M. L. Nguyen, *et al.* (2008). "Immunoglobulin G responses to a panel of Candida albicans antigens as accurate and early markers for the presence of systemic candidiasis." J Clin Microbiol **46**(5): 1647-1654.

## Bibliografía

- Clemons, K. V., V. L. Calich, *et al.* (2000). "Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi." Med Mycol **38 Suppl 1**: 99-111.
- Colom, M. F., A. Jover, *et al.* (2006). "[Molecular biology in the diagnosis of deep-seated candidiasis in the critically ill non-neutropenic patient]." Rev Iberoam Micol **23**(1): 26-28.
- Collette, J. R. and M. C. Lorenz (2011). "Mechanisms of immune evasion in fungal pathogens." Curr Opin Microbiol **14**(6): 668-675.
- Crowe, J. D., I. K. Sievwright, *et al.* (2003). "Candida albicans binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins." Mol Microbiol **47**(6): 1637-1651.
- Cuetara, M. S., A. Alhambra, *et al.* (2009). "Detection of (1-->3)-beta-D-glucan as an adjunct to diagnosis in a mixed population with uncommon proven invasive fungal diseases or with an unusual clinical presentation." Clin Vaccine Immunol **16**(3): 423-426.
- Chaffin, W. L. (2008). "Candida albicans cell wall proteins." Microbiol Mol Biol Rev **72**(3): 495-544.
- Chaffin, W. L., J. L. Lopez-Ribot, *et al.* (1998). "Cell wall and secreted proteins of Candida albicans: identification, function, and expression." Microbiol Mol Biol Rev **62**(1): 130-180.
- Chattaway, F. W., M. R. Holmes, *et al.* (1968). "Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of Candida albicans." J Gen Microbiol **51**(3): 367-376.
- Chauhan, A., Z. Swaleha, *et al.* (2011). "Escheriosome mediated cytosolic delivery of Candida albicans cytosolic proteins induces enhanced cytotoxic T lymphocyte response and protective immunity." Vaccine **29**(33): 5424-5433.
- Chauhan, N., D. Inglis, *et al.* (2003). "Candida albicans response regulator gene SSK1 regulates a subset of genes whose functions are associated with cell wall biosynthesis and adaptation to oxidative stress." Eukaryot Cell **2**(5): 1018-1024.
- Cheng, S. C., L. A. Joosten, *et al.* (2012). "Interplay between Candida albicans and the mammalian innate host defense." Infect Immun **80**(4): 1304-1313.
- Chu, W. S., B. B. Magee, *et al.* (1993). "Construction of an SfiI macrorestriction map of the Candida albicans genome." J Bacteriol **175**(20): 6637-6651.
- De Bernardis, F., H. Liu, *et al.* (2007). "Human domain antibodies against virulence traits of Candida albicans inhibit fungus adherence to vaginal epithelium and protect against experimental vaginal candidiasis." J Infect Dis **195**(1): 149-157.

- De Bernardis, F., F. A. Muhlschlegel, *et al.* (1998). "The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*." Infect Immun **66**(7): 3317-3325.
- De Bernardis, F., G. Santoni, *et al.* (2010). "Protection against rat vaginal candidiasis by adoptive transfer of vaginal B lymphocytes." FEMS Yeast Res **10**(4): 432-440.
- de Boer, A. D., P. W. de Groot, *et al.* (2010). "The *Candida albicans* cell wall protein Rhd3/Pga29 is abundant in the yeast form and contributes to virulence." Yeast **27**(8): 611-624.
- De Groot, P. W., A. D. de Boer, *et al.* (2004). "Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins." Eukaryot Cell **3**(4): 955-965.
- De Groot, P. W., K. J. Hellingwerf, *et al.* (2003). "Genome-wide identification of fungal GPI proteins." Yeast **20**(9): 781-796.
- De Jesus, M., A. M. Nicola, *et al.* (2009). "Galactoxylomannan-mediated immunological paralysis results from specific B cell depletion in the context of widespread immune system damage." J Immunol **183**(6): 3885-3894.
- de Pauw, B. E. and J. J. Picazo (2008). "Present situation in the treatment of invasive fungal infection." Int J Antimicrob Agents **32** **Suppl 2**: S167-171.
- Del Palacio, A., M. S. Cuetara, *et al.* (2010). "Serum (1->3)- $\beta$ -D-Glucan assay for the diagnosis of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia." Clin Vaccine Immunol **17**(1): 202-203; author reply 203.
- Dranginis, A. M., J. M. Rauceo, *et al.* (2007). "A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions." Microbiol Mol Biol Rev **71**(2): 282-294.
- Dunkler, A., A. Walther, *et al.* (2005). "Candida albicans CHT3 encodes the functional homolog of the Cts1 chitinase of *Saccharomyces cerevisiae*." Fungal Genet Biol **42**(11): 935-947.
- Dupont, B. F., O. Lortholary, *et al.* (2009). "Treatment of candidemia and invasive candidiasis in the intensive care unit: post hoc analysis of a randomized, controlled trial comparing micafungin and liposomal amphotericin B." Crit Care **13**(5): R159.
- Ebanks, R. O., K. Chisholm, *et al.* (2006). "Proteomic analysis of *Candida albicans* yeast and hyphal cell wall and associated proteins." Proteomics **6**(7): 2147-2156.
- Eisenhaber, B., P. Bork, *et al.* (1998). "Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase." Protein Eng **11**(12): 1155-1161.

## Bibliografía

- Eisenhaber, B., P. Bork, *et al.* (2001). "Post-translational GPI lipid anchor modification of proteins in kingdoms of life: analysis of protein sequence data from complete genomes." Protein Eng **14**(1): 17-25.
- Eisenman, H. C., S. Frases, *et al.* (2009). "Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*." Microbiology **155**(Pt 12): 3860-3867.
- Eloy, O., S. Marque, *et al.* (2006). "Uniform distribution of three *Candida albicans* microsatellite markers in two French ICU populations supports a lack of nosocomial cross-contamination." BMC Infect Dis **6**: 162.
- Ene, I. V. and R. J. Bennett (2009). "Hwp1 and related adhesins contribute to both mating and biofilm formation in *Candida albicans*." Eukaryot Cell **8**(12): 1909-1913.
- Ene, I. V., S. C. Cheng, *et al.* (2013). "Growth of *Candida albicans* Cells on the Physiologically Relevant Carbon Source Lactate Affects Their Recognition and Phagocytosis by Immune Cells." Infect Immun **81**(1): 238-248.
- Ene, I. V., C. J. Heilmann, *et al.* (2012). "Carbon source-induced reprogramming of the cell wall proteome and secretome modulates the adherence and drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans*." Proteomics **12**(21): 3164-3179.
- Enjalbert, B., D. A. Smith, *et al.* (2006). "Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*." Mol Biol Cell **17**(2): 1018-1032.
- Enjalbert, B. and M. Whiteway (2005). "Release from quorum-sensing molecules triggers hyphal formation during *Candida albicans* resumption of growth." Eukaryot Cell **4**(7): 1203-1210.
- Ernst, J. F. (2000). "Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis." Microbiology **146** ( Pt 8): 1763-1774.
- Espinel-Ingroff, A. (2008). "Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi." Rev Iberoam Micol **25**(2): 101-106.
- Esteban, P. F., I. Rios, *et al.* (2005). "Characterization of the CaENG1 gene encoding an endo-1,3-beta-glucanase involved in cell separation in *Candida albicans*." Curr Microbiol **51**(6): 385-392.
- Farahyar, S., F. Zaini, *et al.* (2013). "Overexpression of aldo-keto-reductase in azole-resistant clinical isolates of *Candida glabrata* determined by cDNA-AFLP." Daru **21**(1): 1.
- Fernandez-Arenas, E., G. Molero, *et al.* (2004). "Contribution of the antibodies response induced by a low virulent *Candida albicans* strain in protection against systemic candidiasis." Proteomics **4**(4): 1204-1215.

- Ferwerda, G., M. G. Netea, *et al.* (2010). "The role of Toll-like receptors and C-type lectins for vaccination against *Candida albicans*." Vaccine **28**(3): 614-622.
- Filler, G. and J. Feber (2002). "The transplanted child: New immunosuppressive agents and the need for pharmacokinetic monitoring." Paediatr Child Health **7**(8): 525-532.
- Fonzi, W. A. (1999). "PHR1 and PHR2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans." J Bacteriol **181**(22): 7070-7079.
- Fradin, C., P. De Groot, *et al.* (2005). "Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood." Mol Microbiol **56**(2): 397-415.
- Fradin, C., M. Kretschmar, *et al.* (2003). "Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood." Mol Microbiol **47**(6): 1523-1543.
- Fratti, R. A., P. H. Belanger, *et al.* (1998). "Endothelial cell injury caused by *Candida albicans* is dependent on iron." Infect Immun **66**(1): 191-196.
- Frohner, I. E., C. Bourgeois, *et al.* (2009). "Candida albicans cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance." Mol Microbiol **71**(1): 240-252.
- Fu, X. H., F. L. Meng, *et al.* (2008). "Candida albicans, a distinctive fungal model for cellular aging study." Aging Cell **7**(5): 746-757.
- Fujita, S., T. Takamura, *et al.* (2006). "Evaluation of a newly developed down-flow immunoassay for detection of serum mannan antigens in patients with candidaemia." J Med Microbiol **55**(Pt 5): 537-543.
- Fukazawa, Y. and K. Kagaya (1997). "Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*." J Med Vet Mycol **35**(2): 87-99.
- Gale, C. A., C. M. Bendel, *et al.* (1998). "Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1." Science **279**(5355): 1355-1358.
- Ganz, T. (2002). "Immunology. Versatile defensins." Science **298**(5595): 977-979.
- Garcera, A., A. I. Martinez, *et al.* (2003). "Identification and study of a *Candida albicans* protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Ssr1p, an internal cell-wall protein." Microbiology **149**(Pt 8): 2137-2145.
- Garcia-Sanchez, S., A. L. Mavor, *et al.* (2005). "Global roles of Ssn6 in Tup1- and Nrg1-dependent gene regulation in the fungal pathogen, *Candida albicans*." Mol Biol Cell **16**(6): 2913-2925.

## Bibliografía

- Garey, K. W., M. Rege, *et al.* (2006). "Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study." Clin Infect Dis **43**(1): 25-31.
- Gauglitz, G. G., H. Callenberg, *et al.* (2012). "Host defence against *Candida albicans* and the role of pattern-recognition receptors." Acta Derm Venereol **92**(3): 291-298.
- Gaur, N. K., R. L. Smith, *et al.* (2002). "*Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* expressing ALA1/ALS5 adhere to accessible threonine, serine, or alanine patches." Cell Commun Adhes **9**(1): 45-57.
- Georgopapadakou, N. H. and T. J. Walsh (1996). "Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies." Antimicrob Agents Chemother **40**(2): 279-291.
- Ghoneum, M., I. Grewal, *et al.* (2003). "Phagocytosis of *Candida albicans* by lymphatic tumour cells in vitro." Acta Histochem **105**(2): 127-133.
- Gil, M. L., M. L. Delgado, *et al.* (2001). "The *Candida albicans* cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity increases in response to starvation and temperature upshift." Med Mycol **39**(5): 387-394.
- Gil, M. L. and D. Gozalbo (2009). "Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections." Front Biosci **14**: 570-582.
- Gillum, A. M., E. Y. Tsay, *et al.* (1984). "Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations." Mol Gen Genet **198**(1): 179-182.
- Glick, B. S. and V. Malhotra (1998). "The curious status of the Golgi apparatus." Cell **95**(7): 883-889.
- Glockner, A. (2011). "Treatment and prophylaxis of invasive candidiasis with anidulafungin, caspofungin and micafungin: review of the literature." Eur J Med Res **16**(4): 167-179.
- Gomez, J., E. Garcia-Vazquez, *et al.* (2010). "Nosocomial candidemia at a general hospital: prognostic factors and impact of early empiric treatment on outcome (2002-2005)." Med Clin (Barc) **134**(1): 1-5.
- Gomez, M. J., A. Torosantucci, *et al.* (1996). "Purification and biochemical characterization of a 65-kilodalton mannoprotein (MP65), a main target of anti-*Candida* cell-mediated immune responses in humans." Infect Immun **64**(7): 2577-2584.
- Gow, N. A. (2002). "*Candida albicans* switches mates." Mol Cell **10**(2): 217-218.

- Gow, N. A., A. J. Brown, *et al.* (2002). "Fungal morphogenesis and host invasion." Curr Opin Microbiol **5**(4): 366-371.
- Gow, N. A., F. L. van de Veerdonk, *et al.* (2012). "Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization." Nat Rev Microbiol **10**(2): 112-122.
- Gozalbo, D., I. Gil-Navarro, *et al.* (1998). "The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Candida albicans is also a fibronectin and laminin binding protein." Infect Immun **66**(5): 2052-2059.
- Granger, B. L., M. L. Flenniken, *et al.* (2005). "Yeast wall protein 1 of Candida albicans." Microbiology **151**(Pt 5): 1631-1644.
- Green, C. B., X. Zhao, *et al.* (2005). "Use of green fluorescent protein and reverse transcription-PCR to monitor Candida albicans agglutinin-like sequence gene expression in a murine model of disseminated candidiasis." Infect Immun **73**(3): 1852-1855.
- Gupta, A. K. and E. Tomas (2003). "New antifungal agents." Dermatol Clin **21**(3): 565-576.
- Hachem, R., H. Hanna, *et al.* (2008). "The changing epidemiology of invasive candidiasis: Candida glabrata and Candida krusei as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy." Cancer **112**(11): 2493-2499.
- Han, T. L., R. D. Cannon, *et al.* (2011). "The metabolic basis of Candida albicans morphogenesis and quorum sensing." Fungal Genet Biol **48**(8): 747-763.
- Han, Y. and K. Y. Rhew (2012). "Comparison of two Candida mannan vaccines: the role of complement in protection against disseminated candidiasis." Arch Pharm Res **35**(11): 2021-2027.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-580.
- Hedges, S. B. (2002). "The origin and evolution of model organisms." Nat Rev Genet **3**(11): 838-849.
- Heilmann, C. J., A. G. Sorgo, *et al.* (2012). "News from the fungal front: wall proteome dynamics and host-pathogen interplay." PLoS Pathog **8**(12): e1003050.
- Heilmann, C. J., A. G. Sorgo, *et al.* (2011). "Hyphal induction in the human fungal pathogen Candida albicans reveals a characteristic wall protein profile." Microbiology **157**(Pt 8): 2297-2307.
- Hemann, S., K. Blaser, *et al.* (1997). "Allergens of Aspergillus fumigatus and Candida boidinii share IgE-binding epitopes." Am J Respir Crit Care Med **156**(6): 1956-1962.

## Bibliografía

- Hernaiz, M. L., P. Ximenez-Embun, *et al.* (2010). "Identification of *Candida albicans* exposed surface proteins in vivo by a rapid proteomic approach." J Proteomics **73**(7): 1404-1409.
- Hernandez, R., C. Nombela, *et al.* (2004). "Two-dimensional reference map of *Candida albicans* hyphal forms." Proteomics **4**(2): 374-382.
- Herrero, A. B., D. Uccelletti, *et al.* (2002). "The Golgi GDPase of the fungal pathogen *Candida albicans* affects morphogenesis, glycosylation, and cell wall properties." Eukaryot Cell **1**(3): 420-431.
- Hirsch, T., F. Jacobsen, *et al.* (2008). "Host defense peptides and the new line of defence against multiresistant infections." Protein Pept Lett **15**(3): 238-243.
- Hoehamer, C. F., E. D. Cummings, *et al.* (2010). "Changes in the proteome of *Candida albicans* in response to azole, polyene, and echinocandin antifungal agents." Antimicrob Agents Chemother **54**(5): 1655-1664.
- Horisberger, M. and M. F. Clerc (1988). "Ultrastructural localization of anionic sites on the surface of yeast, hyphal and germ-tube forming cells of *Candida albicans*." Eur J Cell Biol **46**(3): 444-452.
- Hostetter, M. K. (1999). "Integrin-like proteins in *Candida* spp. and other microorganisms." Fungal Genet Biol **28**(3): 135-145.
- Hostetter, M. K. (2008). "The iC3b receptor of *Candida albicans* and its roles in pathogenesis." Vaccine **26 Suppl 8**: I108-112.
- Hoyer, L. L. (2001). "The ALS gene family of *Candida albicans*." Trends Microbiol **9**(4): 176-180.
- Hoyer, L. L., T. L. Payne, *et al.* (1998). "*Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family." Curr Genet **33**(6): 451-459.
- Hoyer, L. L., T. L. Payne, *et al.* (1998). "Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of als proteins to the fungal cell surface." J Bacteriol **180**(20): 5334-5343.
- Hube, B., M. Monod, *et al.* (1994). "Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*." Mol Microbiol **14**(1): 87-99.
- Hube, B. and J. Naglik (2001). "*Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family." Microbiology **147**(Pt 8): 1997-2005.
- Hube, B., F. Stehr, *et al.* (2000). "Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members." Arch Microbiol **174**(5): 362-374.
- Ibrahim, A. S., B. J. Spellberg, *et al.* (2006). "The anti-*Candida* vaccine based on the recombinant N-terminal domain of Als1p is broadly active against disseminated candidiasis." Infect Immun **74**(5): 3039-3041.

- Insenser, M., C. Nombela, *et al.* (2006). "Proteomic analysis of detergent-resistant membranes from *Candida albicans*." Proteomics **6 Suppl 1**: S74-81.
- Ito, J. I., J. M. Lyons, *et al.* (2009). "Vaccine progress." Med Mycol **47 Suppl 1**: S394-400.
- Jacobsen, I. D., D. Wilson, *et al.* (2012). "Candida albicans dimorphism as a therapeutic target." Expert Rev Anti Infect Ther **10**(1): 85-93.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
- Johnson, D. C., K. E. Cano, *et al.* (2005). "Novel regulatory function for the CCAAT-binding factor in *Candida albicans*." Eukaryot Cell **4**(10): 1662-1676.
- Jones, T., N. A. Federspiel, *et al.* (2004). "The diploid genome sequence of *Candida albicans*." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(19): 7329-7334.
- Jong, A. Y., S. H. Chen, *et al.* (2003). "Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells." J Med Microbiol **52**(Pt 8): 615-622.
- Kadosh, D. and A. D. Johnson (2001). "Rfg1, a protein related to the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic regulator Rox1, controls filamentous growth and virulence in *Candida albicans*." Mol Cell Biol **21**(7): 2496-2505.
- Kadosh, D. and A. D. Johnson (2005). "Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis." Mol Biol Cell **16**(6): 2903-2912.
- Karkowska-Kuleta, J., M. Rapala-Kozik, *et al.* (2009). "Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*." Acta Biochim Pol **56**(2): 211-224.
- Kinneberg, K. M., C. M. Bendel, *et al.* (1999). "Effect of INT1 gene on *Candida albicans* murine intestinal colonization." J Surg Res **87**(2): 245-251.
- Klis, F. M., P. de Groot, *et al.* (2001). "Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*." Med Mycol **39 Suppl 1**: 1-8.
- Klis, F. M., G. J. Sosinska, *et al.* (2009). "Covalently linked cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fitness and virulence." FEMS Yeast Res **9**(7): 1013-1028.
- Klotz, S. A., R. C. Hein, *et al.* (1994). "The fibronectin adhesin of *Candida albicans*." Infect Immun **62**(10): 4679-4681.

## Bibliografía

- Klotz, S. A. and R. L. Smith (1992). "Glycosaminoglycans inhibit *Candida albicans* adherence to extracellular matrix proteins." FEMS Microbiol Lett **78**(2-3): 205-208.
- Kollar, R., B. B. Reinhold, *et al.* (1997). "Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->)3-glucan, and chitin." J Biol Chem **272**(28): 17762-17775.
- Kondoh, O., Y. Tachibana, *et al.* (1997). "Cloning of the RHO1 gene from *Candida albicans* and its regulation of beta-1,3-glucan synthesis." J Bacteriol **179**(24): 7734-7741.
- Kozul, R., A. Malpertuy, *et al.* (2003). "The complete mitochondrial genome sequence of the pathogenic yeast *Candida (Torulopsis) glabrata*." FEBS Lett **534**(1-3): 39-48.
- Kozel, T. R., L. C. Weinhold, *et al.* (1996). "Distinct characteristics of initiation of the classical and alternative complement pathways by *Candida albicans*." Infect Immun **64**(8): 3360-3368.
- Kulkarni, R. D., H. S. Kelkar, *et al.* (2003). "An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins." Trends Biochem Sci **28**(3): 118-121.
- La Valle, R., S. Sandini, *et al.* (2000). "Generation of a recombinant 65-kilodalton mannoprotein, a major antigen target of cell-mediated immune response to *Candida albicans*." Infect Immun **68**(12): 6777-6784.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lain, A., N. Elguezabal, *et al.* (2007). "Diagnosis of invasive candidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay using the N-terminal fragment of *Candida albicans* hyphal wall protein 1." BMC Microbiol **7**: 35.
- Lan, C. Y., G. Rodarte, *et al.* (2004). "Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*." Mol Microbiol **53**(5): 1451-1469.
- Leach, M. D., D. A. Stead, *et al.* (2011). "Identification of sumoylation targets, combined with inactivation of SMT3, reveals the impact of sumoylation upon growth, morphology, and stress resistance in the pathogen *Candida albicans*." Mol Biol Cell **22**(5): 687-702.
- Leach, M. D., D. A. Stead, *et al.* (2011). "Molecular and proteomic analyses highlight the importance of ubiquitination for the stress resistance, metabolic adaptation, morphogenetic regulation and virulence of *Candida albicans*." Mol Microbiol **79**(6): 1574-1593.
- Lee, K. H., S. Jun, *et al.* (2005). "*Candida albicans* protein analysis during hyphal differentiation using an integrative HA-tagging method." Biochem Biophys Res Commun **337**(3): 784-790.

- Leng, P., P. R. Lee, *et al.* (2001). "Efg1, a morphogenetic regulator in *Candida albicans*, is a sequence-specific DNA binding protein." J Bacteriol **183**(13): 4090-4093.
- Lewis, R. E. (2011). "Current concepts in antifungal pharmacology." Mayo Clin Proc **86**(8): 805-817.
- Li, F. and S. P. Palecek (2003). "EAP1, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells." Eukaryot Cell **2**(6): 1266-1273.
- Li, F. and S. P. Palecek (2005). "Identification of *Candida albicans* genes that induce *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion and morphogenesis." Biotechnol Prog **21**(6): 1601-1609.
- Li, F., M. J. Svarovsky, *et al.* (2007). "Eap1p, an adhesin that mediates *Candida albicans* biofilm formation in vitro and in vivo." Eukaryot Cell **6**(6): 931-939.
- Li, W., X. Hu, *et al.* (2011). "Immunisation with the glycolytic enzyme enolase confers effective protection against *Candida albicans* infection in mice." Vaccine **29**(33): 5526-5533.
- Lionakis, M. S. and M. G. Netea (2013). "Candida and host determinants of susceptibility to invasive candidiasis." PLoS Pathog **9**(1): e1003079.
- Lipke, P. N. and R. Ovalle (1998). "Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges." J Bacteriol **180**(15): 3735-3740.
- Liu, T. T., R. E. Lee, *et al.* (2005). "Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*." Antimicrob Agents Chemother **49**(6): 2226-2236.
- Liu, Y. and S. G. Filler (2011). "Candida albicans Als3, a multifunctional adhesin and invasin." Eukaryot Cell **10**(2): 168-173.
- Lo, H. J., J. R. Kohler, *et al.* (1997). "Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent." Cell **90**(5): 939-949.
- Lohse, M. B. and A. D. Johnson (2010). "Temporal anatomy of an epigenetic switch in cell programming: the white-opaque transition of *C. albicans*." Mol Microbiol **78**(2): 331-343.
- Lorenz, M. C., J. A. Bender, *et al.* (2004). "Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages." Eukaryot Cell **3**(5): 1076-1087.
- Losse, J., P. F. Zipfel, *et al.* (2010). "Factor H and factor H-related protein 1 bind to human neutrophils via complement receptor 3, mediate attachment to *Candida albicans*, and enhance neutrophil antimicrobial activity." J Immunol **184**(2): 912-921.

## Bibliografía

- Luo, G., A. S. Ibrahim, *et al.* (2010). "Candida albicans Hyr1p confers resistance to neutrophil killing and is a potential vaccine target." J Infect Dis **201**(11): 1718-1728.
- Luo, S., R. Hoffmann, *et al.* (2013). "Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 2 Is a Novel Factor H-, Factor H-like Protein 1-, and Plasminogen-Binding Surface Protein of Candida albicans." J Infect Dis **207**(4): 594-603.
- Magill, S. S., S. M. Swoboda, *et al.* (2009). "The epidemiology of Candida colonization and invasive candidiasis in a surgical intensive care unit where fluconazole prophylaxis is utilized: follow-up to a randomized clinical trial." Ann Surg **249**(4): 657-665.
- Manners, D. J., A. J. Masson, *et al.* (1973). "The structure of a beta-(1--6)-D-glucan from yeast cell walls." Biochem J **135**(1): 31-36.
- Manning, M. and T. G. Mitchell (1980). "Analysis of cytoplasmic antigens of the yeast and mycelial phases of Candida albicans by two-dimensional electrophoresis." Infect Immun **30**(2): 484-495.
- Mao, Y., Z. Zhang, *et al.* (2008). "C-terminal signals regulate targeting of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to the cell wall or plasma membrane in Candida albicans." Eukaryot Cell **7**(11): 1906-1915.
- Marchais, V., M. Kempf, *et al.* (2005). "DNA array analysis of Candida albicans gene expression in response to adherence to polystyrene." FEMS Microbiol Lett **245**(1): 25-32.
- Martchenko, M., A. M. Alarco, *et al.* (2004). "Superoxide dismutases in Candida albicans: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene." Mol Biol Cell **15**(2): 456-467.
- Martinez-Gomariz, M., P. Perumal, *et al.* (2009). "Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of Candida albicans." Proteomics **9**(8): 2230-2252.
- Martinez-Lopez, R., L. Monteoliva, *et al.* (2004). "The GPI-anchored protein CaEcm33p is required for cell wall integrity, morphogenesis and virulence in Candida albicans." Microbiology **150**(Pt 10): 3341-3354.
- Martinez-Lopez, R., C. Nombela, *et al.* (2008). "Immunoproteomic analysis of the protective response obtained from vaccination with Candida albicans ecm33 cell wall mutant in mice." Proteomics **8**(13): 2651-2664.
- Martinez-Lopez, R., H. Park, *et al.* (2006). "Candida albicans Ecm33p is important for normal cell wall architecture and interactions with host cells." Eukaryot Cell **5**(1): 140-147.

- Matthews, R. and J. Burnie (1996). "Antibodies against *Candida*: potential therapeutics?" Trends Microbiol **4**(9): 354-358.
- Matthews, R., S. Hodgetts, *et al.* (1995). "Preliminary assessment of a human recombinant antibody fragment to hsp90 in murine invasive candidiasis." J Infect Dis **171**(6): 1668-1671.
- Matthews, R. C., J. P. Burnie, *et al.* (1991). "Autoantibody to heat-shock protein 90 can mediate protection against systemic candidosis." Immunology **74**(1): 20-24.
- Matthews, R. C., G. Rigg, *et al.* (2003). "Preclinical assessment of the efficacy of mycograb, a human recombinant antibody against fungal HSP90." Antimicrob Agents Chemother **47**(7): 2208-2216.
- Mavor, A. L., S. Thewes, *et al.* (2005). "Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes." Curr Drug Targets **6**(8): 863-874.
- Mayer, F. L., D. Wilson, *et al.* (2013). "*Candida albicans* pathogenicity mechanisms." Virulence **4**(2).
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: impact on the adaptive immune response." Curr Opin Immunol **9**(1): 4-9.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (2002). "Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system." Science **296**(5566): 298-300.
- Merenstein, D., H. Hu, *et al.* (2013). "Colonization by *Candida* Species of the Oral and Vaginal Mucosa in HIV-Infected and Noninfected Women." AIDS Res Hum Retroviruses **29**(1): 30-34.
- Mochon, A. B., Y. Jin, *et al.* (2010). "Serological profiling of a *Candida albicans* protein microarray reveals permanent host-pathogen interplay and stage-specific responses during candidemia." PLoS Pathog **6**(3): e1000827.
- Mokaddas, E., Z. U. Khan, *et al.* (2011). "Value of (1-3)-beta-d-glucan, *Candida* mannan and *Candida* DNA detection in the diagnosis of candidaemia." Clin Microbiol Infect **17**(10): 1549-1553.
- Monod, M., B. Hube, *et al.* (1998). "Differential regulation of SAP8 and SAP9, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*." Microbiology **144** ( Pt 10): 2731-2737.
- Monteoliva, L., R. Martinez-Lopez, *et al.* (2011). "Quantitative proteome and acidic subproteome profiling of *Candida albicans* yeast-to-hypha transition." J Proteome Res **10**(2): 502-517.

## Bibliografia

- Moragues, M. D., N. Ortiz, *et al.* (2004). "[Evaluation of a new commercial test (Candida albicans IFA IgG) for the serodiagnosis of invasive candidiasis]." Enferm Infecc Microbiol Clin **22**(2): 83-88.
- Murad, A. M., P. Leng, *et al.* (2001). "NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in Candida albicans." EMBO J **20**(17): 4742-4752.
- Naglik, J. R., S. J. Challacombe, *et al.* (2003). "Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis." Microbiol Mol Biol Rev **67**(3): 400-428, table of contents.
- Naglik, J. R., C. A. Rodgers, *et al.* (2003). "Differential expression of Candida albicans secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections." J Infect Dis **188**(3): 469-479.
- Nailis, H., D. Vandenbosch, *et al.* (2010). "Transcriptional response to fluconazole and amphotericin B in Candida albicans biofilms." Res Microbiol **161**(4): 284-292.
- Nantel, A. (2006). "The long hard road to a completed Candida albicans genome." Fungal Genet Biol **43**(5): 311-315.
- Nantel, A., D. Dignard, *et al.* (2002). "Transcription profiling of Candida albicans cells undergoing the yeast-to-hyphal transition." Mol Biol Cell **13**(10): 3452-3465.
- Netea, M. G., N. A. Gow, *et al.* (2010). "Variable recognition of Candida albicans strains by TLR4 and lectin recognition receptors." Med Mycol **48**(7): 897-903.
- Nguyen, M. H., M. C. Wissel, *et al.* (2012). "Performance of Candida real-time polymerase chain reaction, beta-D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis." Clin Infect Dis **54**(9): 1240-1248.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, *et al.* (1997). "A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites." Int J Neural Syst **8**(5-6): 581-599.
- Nirenberg, M. W., J. H. Matthaei, *et al.* (1963). "Approximation of genetic code via cell-free protein synthesis directed by template RNA." Fed Proc **22**: 55-61.
- Nishiyama, Y., Y. Aoki, *et al.* (1995). "Morphological aspects of cell wall formation during protoplast regeneration in Candida albicans." J Electron Microsc (Tokyo) **44**(2): 72-78.
- Nobile, C. J., D. R. Andes, *et al.* (2006). "Critical role of Bcr1-dependent adhesins in C. albicans biofilm formation in vitro and in vivo." PLoS Pathog **2**(7): e63.

- Nobile, C. J. and A. P. Mitchell (2005). "Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p." Curr Biol **15**(12): 1150-1155.
- Nobile, C. J. and A. P. Mitchell (2009). "Large-scale gene disruption using the UAU1 cassette." Methods Mol Biol **499**: 175-194.
- Nobile, C. J., J. E. Nett, *et al.* (2009). "Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1." PLoS Biol **7**(6): e1000133.
- Nobile, C. J., H. A. Schneider, *et al.* (2008). "Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation." Curr Biol **18**(14): 1017-1024.
- Noble, S. M. and A. D. Johnson (2007). "Genetics of *Candida albicans*, a diploid human fungal pathogen." Annu Rev Genet **41**: 193-211.
- Nombela, C., C. Gil, *et al.* (2006). "Non-conventional protein secretion in yeast." Trends Microbiol **14**(1): 15-21.
- Nombela, C., R. Pomes, *et al.* (1987). "Protoplasts fusion hybrids from *Candida albicans* morphological mutants." Crit Rev Microbiol **15**(1): 79-85.
- Nosanchuk, J. D., L. Nimrichter, *et al.* (2008). "A role for vesicular transport of macromolecules across cell walls in fungal pathogenesis." Commun Integr Biol **1**(1): 37-39.
- Noverr, M. C., S. M. Phare, *et al.* (2001). "Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins." Infect Immun **69**(5): 2957-2963.
- Nucci, M., F. Queiroz-Telles, *et al.* (2010). "Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America." Clin Infect Dis **51**(5): 561-570.
- O'Connor, L., S. Lahiff, *et al.* (2005). "Quantification of ALS1 gene expression in *Candida albicans* biofilms by RT-PCR using hybridisation probes on the LightCycler." Mol Cell Probes **19**(3): 153-162.
- Obayashi, T., K. Negishi, *et al.* (2008). "Reappraisal of the serum (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections--a study based on autopsy cases from 6 years." Clin Infect Dis **46**(12): 1864-1870.
- Odabasi, Z., G. Mattiuzzi, *et al.* (2004). "Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome." Clin Infect Dis **39**(2): 199-205.
- Odds, F. C., M. E. Bougnoux, *et al.* (2007). "Molecular phylogenetics of *Candida albicans*." Eukaryot Cell **6**(6): 1041-1052.
- Ohta, A., H. Chibana, *et al.* (2000). "The VIG9 gene products from the human pathogenic fungi *Candida albicans* and *Candida glabrata*

## Bibliografía

- encode GDP-mannose pyrophosphorylase." Biochim Biophys Acta **1475**(3): 265-272.
- Oliveira, D. L., L. Nimrichter, *et al.* (2009). "Cryptococcus neoformans cryoultramicrotomy and vesicle fractionation reveals an intimate association between membrane lipids and glucuronoxylomannan." Fungal Genet Biol **46**(12): 956-963.
- Orozco, A. S., X. Zhou, *et al.* (2000). "Mechanisms of the proinflammatory response of endothelial cells to Candida albicans infection." Infect Immun **68**(3): 1134-1141.
- Orozco, P. A., J. A. Cortes, *et al.* (2009). "[Colonization by yeasts in newborns and healthcare personnel in a neonatal intensive care unit at a university hospital in Bogota, Colombia]." Rev Iberoam Micol **26**(2): 108-111.
- Ostrosky-Zeichner, L., B. D. Alexander, *et al.* (2005). "Multicenter clinical evaluation of the (1->3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans." Clin Infect Dis **41**(5): 654-659.
- Osumi, M. (1998). "The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation." Micron **29**(2-3): 207-233.
- Pappas, P. G. (2006). "Invasive candidiasis." Infect Dis Clin North Am **20**(3): 485-506.
- Pappas, P. G., D. Andes, *et al.* (2006). "Invasive fungal infections in low-risk liver transplant recipients: a multi-center prospective observational study." Am J Transplant **6**(2): 386-391.
- Pappas, P. G., C. A. Kauffman, *et al.* (2009). "Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America." Clin Infect Dis **48**(5): 503-535.
- Pardini, G., P. W. De Groot, *et al.* (2006). "The CRH family coding for cell wall glycosylphosphatidylinositol proteins with a predicted transglycosidase domain affects cell wall organization and virulence of Candida albicans." J Biol Chem **281**(52): 40399-40411.
- Pardo, M., L. Monteoliva, *et al.* (1999). "Two-dimensional analysis of proteins secreted by Saccharomyces cerevisiae regenerating protoplasts: a novel approach to study the cell wall." Yeast **15**(6): 459-472.
- Pardo, M., L. Monteoliva, *et al.* (2004). "PST1 and ECM33 encode two yeast cell surface GPI proteins important for cell wall integrity." Microbiology **150**(Pt 12): 4157-4170.
- Pardo, M., M. Ward, *et al.* (2000). "Cross-species identification of novel Candida albicans immunogenic proteins by combination of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry." Electrophoresis **21**(13): 2651-2659.

- Parra-Ortega, B., H. Cruz-Torres, *et al.* (2009). "Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species." Mem Inst Oswaldo Cruz **104**(3): 505-512.
- Parra, C., J. M. Gonzalez, *et al.* (2005). "Anti-glucuronoxylomannan IgG1 specific antibodies production in *Cryptococcus neoformans* resistant mice." Biomedica **25**(1): 110-119.
- Patel, P. K., J. E. Erlandsen, *et al.* (2012). "The Changing Epidemiology of Oropharyngeal Candidiasis in Patients with HIV/AIDS in the Era of Antiretroviral Therapy." AIDS Res Treat **2012**: 262471.
- Peman, J. and R. Zaragoza (2012). "Combined use of nonculture-based lab techniques in the diagnosis and management of critically ill patients with invasive fungal infections." Expert Rev Anti Infect Ther **10**(11): 1321-1330.
- Perez, A., B. Pedros, *et al.* (2006). "Biofilm formation by *Candida albicans* mutants for genes coding fungal proteins exhibiting the eight-cysteine-containing CFEM domain." FEMS Yeast Res **6**(7): 1074-1084.
- Perez, A., G. Ramage, *et al.* (2011). "Some biological features of *Candida albicans* mutants for genes coding fungal proteins containing the CFEM domain." FEMS Yeast Res **11**(3): 273-284.
- Petraitiene, R., V. Petraitis, *et al.* (2005). "Efficacy, plasma pharmacokinetics, and safety of icofungipen, an inhibitor of *Candida* isoleucyl-tRNA synthetase, in treatment of experimental disseminated candidiasis in persistently neutropenic rabbits." Antimicrob Agents Chemother **49**(5): 2084-2092.
- Pfaller, M. A., M. Castanheira, *et al.* (2010). "Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009)." Diagn Microbiol Infect Dis **68**(3): 278-283.
- Pfaller, M. A., S. A. Messer, *et al.* (1998). "National epidemiology of mycoses survey: a multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of *Candida* species." Diagn Microbiol Infect Dis **31**(1): 289-296.
- Phan, Q. T., C. L. Myers, *et al.* (2007). "Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells." PLoS Biol **5**(3): e64.
- Pickering, J. W., H. W. Sant, *et al.* (2005). "Evaluation of a (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections." J Clin Microbiol **43**(12): 5957-5962.

## Bibliografía

- Pietrella, D., G. Bistoni, *et al.* (2006). "Candida albicans mannoprotein influences the biological function of dendritic cells." Cell Microbiol **8**(4): 602-612.
- Pitarch, A., R. Diez-Orejas, *et al.* (2001). "Analysis of the serologic response to systemic Candida albicans infection in a murine model." Proteomics **1**(4): 550-559.
- Pitarch, A., A. Jimenez, *et al.* (2006). "Decoding serological response to Candida cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses." Mol Cell Proteomics **5**(1): 79-96.
- Pitarch, A., A. Jimenez, *et al.* (2008). "Serological proteome analysis to identify systemic candidiasis patients in the intensive care unit: Analytical, diagnostic and prognostic validation of anti-Candida enolase antibodies on quantitative clinical platforms." Proteomics Clin Appl **2**(4): 596-618.
- Pitarch, A., C. Nombela, *et al.* (2006). "Candida albicans biology and pathogenicity: insights from proteomics." Methods Biochem Anal **49**: 285-330.
- Pitarch, A., C. Nombela, *et al.* (2011). "Prediction of the clinical outcome in invasive candidiasis patients based on molecular fingerprints of five anti-Candida antibodies in serum." Mol Cell Proteomics **10**(1): M110 004010.
- Pitarch, A., M. Sanchez, *et al.* (2002). "Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus Candida albicans cell wall proteome." Mol Cell Proteomics **1**(12): 967-982.
- Pitarch, G., P. Mercader, *et al.* (2006). "Reticular telangiectatic erythema associated with an implantable cardioverter defibrillator." Cutis **78**(5): 329-331.
- Polonelli, L. (2000). "Human, monoclonal and recombinant candidacidal, pneumocysticidal and mycobactericidal antibodies." Indian J Chest Dis Allied Sci **42**(4): 259-263.
- Polonelli, L., A. Casadevall, *et al.* (2000). "The efficacy of acquired humoral and cellular immunity in the prevention and therapy of experimental fungal infections." Med Mycol **38 Suppl 1**: 281-292.
- Poltermann, S., A. Kunert, *et al.* (2007). "Gpm1p is a factor H-, FHL-1-, and plasminogen-binding surface protein of Candida albicans." J Biol Chem **282**(52): 37537-37544.
- Ponton, J. (2009). "[Usefulness of biological markers in the diagnosis of invasive candidiasis]." Rev Iberoam Micol **26**(1): 8-14.

- Popolo, L. and M. Vai (1999). "The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker." Biochim Biophys Acta **1426**(2): 385-400.
- Prella, M., J. Bille, *et al.* (2005). "Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies." Diagn Microbiol Infect Dis **51**(2): 95-101.
- Premisler, T., R. P. Zahedi, *et al.* (2009). "Recent advances in yeast organelle and membrane proteomics." Proteomics **9**(20): 4731-4743.
- Putignani, L., F. Del Chierico, *et al.* (2011). "MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi." Mol Biosyst **7**(3): 620-629.
- Ramanan, N. and Y. Wang (2000). "A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence." Science **288**(5468): 1062-1064.
- Raska, M., J. Belakova, *et al.* (2008). "Systemic and mucosal immunization with *Candida albicans* hsp90 elicits hsp90-specific humoral response in vaginal mucosa which is further enhanced during experimental vaginal candidiasis." Med Mycol **46**(5): 411-420.
- Rauceo, J. M., R. De Armond, *et al.* (2006). "Threonine-rich repeats increase fibronectin binding in the *Candida albicans* adhesin Als5p." Eukaryot Cell **5**(10): 1664-1673.
- Reales-Calderon, J. A., L. Martinez-Solano, *et al.* (2012). "Sub-proteomic study on macrophage response to *Candida albicans* unravels new proteins involved in the host defense against the fungus." J Proteomics **75**(15): 4734-4746.
- Rodrigues, M. L., E. S. Nakayasu, *et al.* (2008). "Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence." Eukaryot Cell **7**(1): 58-67.
- Rodrigues, M. L., L. Nimrichter, *et al.* (2007). "Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport." Eukaryot Cell **6**(1): 48-59.
- Rodrigues, M. L., L. Nimrichter, *et al.* (2008). "Vesicular Trans-Cell Wall Transport in Fungi: A Mechanism for the Delivery of Virulence-Associated Macromolecules?" Lipid Insights **2**: 27-40.
- Rodriguez-Ortega, M. J., N. Norais, *et al.* (2006). "Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A *Streptococcus* surface proteome." Nat Biotechnol **24**(2): 191-197.
- Rohm, M., E. Lindemann, *et al.* (2013). "A family of secreted pathogenesis-related proteins in *Candida albicans*." Mol Microbiol **87**(1): 132-151.

## Bibliografía

- Romani, L. (2004). "Immunity to fungal infections." Nat Rev Immunol **4**(1): 1-23.
- Rosenvinge, F. S., E. Dzajic, *et al.* (2012). "Performance of matrix-assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry for identification of clinical yeast isolates." Mycoses.
- Rossignol, T., B. Kelly, *et al.* (2011). "Endocytosis-mediated vacuolar accumulation of the human ApoE apolipoprotein-derived ApoEdpL-W antimicrobial peptide contributes to its antifungal activity in *Candida albicans*." Antimicrob Agents Chemother **55**(10): 4670-4681.
- Rubin-Bejerano, I., I. Fraser, *et al.* (2003). "Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 11007-11012.
- Ruiz-Herrera, J., M. V. Elorza, *et al.* (2006). "Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity." FEMS Yeast Res **6**(1): 14-29.
- Ruiz-Herrera, J., M. Iranzo, *et al.* (1995). "Involvement of transglutaminase in the formation of covalent cross-links in the cell wall of *Candida albicans*." Arch Microbiol **164**(3): 186-193.
- Ruiz-Herrera, J., S. Mormeneo, *et al.* (1994). "Structural organization of the components of the cell wall from *Candida albicans*." Microbiology **140** ( Pt 7): 1513-1523.
- Russo, P., N. Kalkkinen, *et al.* (1992). "A heat shock gene from *Saccharomyces cerevisiae* encoding a secretory glycoprotein." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(18): 8857.
- Saijo, S. and Y. Iwakura (2011). "Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi." Int Immunol **23**(8): 467-472.
- Saiman, L., E. Ludington, *et al.* (2001). "Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients." Pediatr Infect Dis J **20**(12): 1119-1124.
- Sanglard, D. and F. C. Odds (2002). "Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences." Lancet Infect Dis **2**(2): 73-85.
- Sanguinetti, M., B. Posteraro, *et al.* (2005). "Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance." Antimicrob Agents Chemother **49**(2): 668-679.
- Santos, M. A. and M. F. Tuite (1995). "The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*." Nucleic Acids Res **23**(9): 1481-1486.

- Sardi, J. C., L. Scorzoni, *et al.* (2013). "Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options." J Med Microbiol **62**(Pt 1): 10-24.
- Sarthy, A. V., T. McGonigal, *et al.* (1997). "Phenotype in Candida albicans of a disruption of the BGL2 gene encoding a 1,3-beta-glucosyltransferase." Microbiology **143 ( Pt 2)**: 367-376.
- Schaller, M., C. Borelli, *et al.* (2005). "Hydrolytic enzymes as virulence factors of Candida albicans." Mycoses **48**(6): 365-377.
- Schaller, M., W. Schafer, *et al.* (1998). "Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity." Mol Microbiol **29**(2): 605-615.
- Schekman, R. (2002). "Lasker Basic Medical Research Award. SEC mutants and the secretory apparatus." Nat Med **8**(10): 1055-1058.
- Schekman, R. (2004). "Merging cultures in the study of membrane traffic." Nat Cell Biol **6**(6): 483-486.
- Schell, W. A., J. L. Benton, *et al.* (2012). "Evaluation of a digital microfluidic real-time PCR platform to detect DNA of Candida albicans in blood." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **31**(9): 2237-2245.
- Sendid, B., M. Tabouret, *et al.* (1999). "New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating Candida albicans mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis." J Clin Microbiol **37**(5): 1510-1517.
- Shareck, J. and P. Belhumeur (2011). "Modulation of morphogenesis in Candida albicans by various small molecules." Eukaryot Cell **10**(8): 1004-1012.
- Sheehan, D. (1996). "Fast protein liquid chromatography (FPLC) methods." Methods Mol Biol **59**: 269-275.
- Silva, S., M. Negri, *et al.* (2012). "Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance." FEMS Microbiol Rev **36**(2): 288-305.
- Smith, D. A., S. Nicholls, *et al.* (2004). "A conserved stress-activated protein kinase regulates a core stress response in the human pathogen Candida albicans." Mol Biol Cell **15**(9): 4179-4190.
- Smith, D. J., M. Cooper, *et al.* (1992). "The Candida albicans PMM1 gene encoding phosphomannomutase complements a Saccharomyces cerevisiae sec 53-6 mutation." Curr Genet **22**(6): 501-503.
- Smith, S. E., C. Csank, *et al.* (2002). "Candida albicans RHO1 is required for cell viability in vitro and in vivo." FEMS Yeast Res **2**(2): 103-111.

## Bibliografia

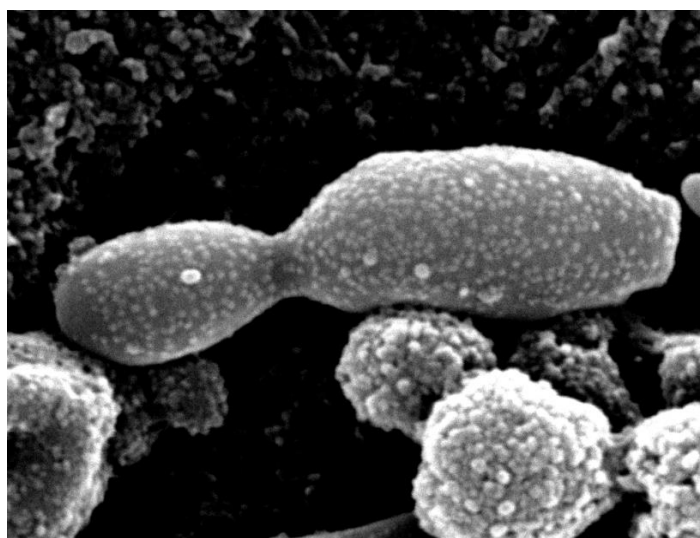
- Sobel, J. D. (2008). "Changing epidemiology of invasive candidiasis in intensive care units--much ado about nothing?" Crit Care Med **36**(7): 2188-2189.
- Sohn, K., C. Urban, *et al.* (2003). "EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays." Mol Microbiol **47**(1): 89-102.
- Soloviev, D. A., W. A. Fonzi, *et al.* (2007). "Identification of pH-regulated antigen 1 released from *Candida albicans* as the major ligand for leukocyte integrin alphaMbeta2." J Immunol **178**(4): 2038-2046.
- Soll, D. R. (2009). "Why does *Candida albicans* switch?" FEMS Yeast Res **9**(7): 973-989.
- Sonesson, A., L. Ringstad, *et al.* (2007). "Antifungal activity of C3a and C3a-derived peptides against *Candida*." Biochim Biophys Acta **1768**(2): 346-353.
- Song, Y., S. A. Cheon, *et al.* (2008). "Role of the RAM network in cell polarity and hyphal morphogenesis in *Candida albicans*." Mol Biol Cell **19**(12): 5456-5477.
- Sorgo, A. G., C. J. Heilmann, *et al.* (2011). "Effects of fluconazole on the secretome, the wall proteome, and wall integrity of the clinical fungus *Candida albicans*." Eukaryot Cell **10**(8): 1071-1081.
- Sorgo, A. G., C. J. Heilmann, *et al.* (2010). "Mass spectrometric analysis of the secretome of *Candida albicans*." Yeast **27**(8): 661-672.
- Sosinska, G. J., P. W. de Groot, *et al.* (2008). "Hypoxic conditions and iron restriction affect the cell-wall proteome of *Candida albicans* grown under vagina-simulative conditions." Microbiology **154**(Pt 2): 510-520.
- Sosinska, G. J., L. J. de Koning, *et al.* (2011). "Mass spectrometric quantification of the adaptations in the wall proteome of *Candida albicans* in response to ambient pH." Microbiology **157**(Pt 1): 136-146.
- Spellberg, B. J., A. S. Ibrahim, *et al.* (2006). "Efficacy of the anti-*Candida* rAls3p-N or rAls1p-N vaccines against disseminated and mucosal candidiasis." J Infect Dis **194**(2): 256-260.
- Spreghini, E., D. A. Davis, *et al.* (2003). "Roles of *Candida albicans* Dfg5p and Dcw1p cell surface proteins in growth and hypha formation." Eukaryot Cell **2**(4): 746-755.
- Staab, J. F., S. D. Bradway, *et al.* (1999). "Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1." Science **283**(5407): 1535-1538.

- Staab, J. F. and P. Sundstrom (1998). "Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene HWP1 of *Candida albicans*." Yeast **14**(7): 681-686.
- Staib, P., M. Kretschmar, *et al.* (1999). "Host-induced, stage-specific virulence gene activation in *Candida albicans* during infection." Mol Microbiol **32**(3): 533-546.
- Steinstraesser, L., T. Koehler, *et al.* (2008). "Host defense peptides in wound healing." Mol Med **14**(7-8): 528-537.
- Sundstrom, P. (2002). "Adhesion in *Candida* spp." Cell Microbiol **4**(8): 461-469.
- Sundstrom, P., J. E. Cutler, *et al.* (2002). "Reevaluation of the role of HWP1 in systemic candidiasis by use of *Candida albicans* strains with selectable marker URA3 targeted to the ENO1 locus." Infect Immun **70**(6): 3281-3283.
- Taylor, B. N., P. Staib, *et al.* (2005). "Profile of *Candida albicans*-secreted aspartic proteinase elicited during vaginal infection." Infect Immun **73**(3): 1828-1835.
- Theiss, S., G. Ishdorj, *et al.* (2006). "Inactivation of the phospholipase B gene PLB5 in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence." Int J Med Microbiol **296**(6): 405-420.
- Thewes, S., M. Kretschmar, *et al.* (2007). "In vivo and ex vivo comparative transcriptional profiling of invasive and non-invasive *Candida albicans* isolates identifies genes associated with tissue invasion." Mol Microbiol **63**(6): 1606-1628.
- Thomas, D. P., J. L. Lopez-Ribot, *et al.* (2009). "A proteomic analysis of secretory proteins of a pre-vacuolar mutant of *Candida albicans*." J Proteomics **73**(2): 342-351.
- Torres, M., R. May, *et al.* (2005). "Variable-region-identical antibodies differing in isotype demonstrate differences in fine specificity and idiootype." J Immunol **174**(4): 2132-2142.
- Towbin, H., T. Staehelin, *et al.* (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
- Tripathi, N., K. Watt, *et al.* (2012). "Treatment and prophylaxis of invasive candidiasis." Semin Perinatol **36**(6): 416-423.
- Tsukahara, K., K. Hata, *et al.* (2003). "Medicinal genetics approach towards identifying the molecular target of a novel inhibitor of fungal cell wall assembly." Mol Microbiol **48**(4): 1029-1042.

## Bibliografia

- van der Meer, J. W., F. L. van de Veerdonk, *et al.* (2010). "Severe *Candida* spp. infections: new insights into natural immunity." *Int J Antimicrob Agents* **36 Suppl 2**: S58-62.
- Veser, J., P. Geywitz, *et al.* (1979). "Purification and properties of a catechol methyltransferase of the yeast *Candida tropicalis*." *Z Naturforsch C* **34**(9-10): 709-714.
- Vialas, V., P. Perumal, *et al.* (2012). "Cell surface shaving of *Candida albicans* biofilms, hyphae, and yeast form cells." *Proteomics* **12**(14): 2331-2339.
- Vonk, A. G., N. De Bont, *et al.* (2004). "Apolipoprotein-E-deficient mice exhibit an increased susceptibility to disseminated candidiasis." *Med Mycol* **42**(4): 341-348.
- Wang, Q., L. Shen, *et al.* (2012). "Overexpression and characterization of a novel (S)-specific extended short-chain dehydrogenase/reductase from *Candida parapsilosis*." *Bioresour Technol* **123**: 690-694.
- Warit, S., R. M. Walmsley, *et al.* (1998). "Cloning and sequencing of the *Candida albicans* homologue of SRB1/PSA1/VIG9, the essential gene encoding GDP-mannose pyrophosphorylase in *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiology* **144 ( Pt 9)**: 2417-2426.
- Weinberger, M., L. Leibovici, *et al.* (2005). "Characteristics of candidaemia with *Candida albicans* compared with non-*albicans* *Candida* species and predictors of mortality." *J Hosp Infect* **61**(2): 146-154.
- Weissman, Z. and D. Kornitzer (2004). "A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization." *Mol Microbiol* **53**(4): 1209-1220.
- Weissman, Z., R. Shemer, *et al.* (2008). "An endocytic mechanism for haemoglobin-iron acquisition in *Candida albicans*." *Mol Microbiol* **69**(1): 201-217.
- Wheeler, R. T. and G. R. Fink (2006). "A drug-sensitive genetic network masks fungi from the immune system." *PLoS Pathog* **2**(4): e35.
- Wheeler, R. T., D. Kombe, *et al.* (2008). "Dynamic, morphotype-specific *Candida albicans* beta-glucan exposure during infection and drug treatment." *PLoS Pathog* **4**(12): e1000227.
- Wysong, D. R., L. Christin, *et al.* (1998). "Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene." *Infect Immun* **66**(5): 1953-1961.
- Yang, Y. L. (2003). "Virulence factors of *Candida* species." *J Microbiol Immunol Infect* **36**(4): 223-228.

- Zaragoza, R., J. Peman, *et al.* (2009). "Clinical significance of the detection of *Candida albicans* germ tube-specific antibodies in critically ill patients." Clin Microbiol Infect **15**(6): 592-595.
- Zhao, X., S. H. Oh, *et al.* (2004). "ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p." Microbiology **150**(Pt 7): 2415-2428.
- Zhao, X., S. H. Oh, *et al.* (2005). "Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the Als family." Microbiology **151**(Pt 5): 1619-1630.
- Zipfel, P. F. and C. Skerka (2009). "Complement regulators and inhibitory proteins." Nat Rev Immunol **9**(10): 729-740.
- Zipfel, P. F. and C. Skerka (2012). "Complement, *Candida*, and cytokines: the role of C5a in host response to fungi." Eur J Immunol **42**(4): 822-825.
- Zipfel, P. F., C. Skerka, *et al.* (2011). "Immune escape of the human facultative pathogenic yeast *Candida albicans*: the many faces of the *Candida* Pra1 protein." Int J Med Microbiol **301**(5): 423-430.



ANEXOS





**ANEXO 1: PROTEINAS CON ANCLAJE GPI**

Proteína	Descripcion	LEVADURAS				HIFAS					HIFAS 10%S			
		1	2	3	Nº exp	1	2	3	4	Nº exp	1	2	3	Nº exp
<b>ALS1</b>	Adhesin; ALS family of cell-surface glycoproteins; adhesion, virulence roles; immunoprotective; band at hyphal base; amyloid domain; biofilm-induced; Rfg1p, Ssk1p; strain background affects expression; N-term binds fucose-containing glycans	4	4	7	3	6	5	5	3	4	3	3	4	3
<b>ALS2</b>	ALS family protein; role in adhesion, biofilm formation, germ tube induction; expressed at infection of human buccal epithelial cells; putative GPI-anchor; induced by ketoconazole, low iron and at cell wall regeneration; regulated by Sfu1p	2	2	6	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ALS3</b>	ALS family cell wall adhesin; role in epithelial adhesion, endothelial invasiveness; allelic variation in adhesiveness; immunoprotective in mice; promotes biofilm formation by binding to SspB adhesin of <i>S. gordonii</i> ; fluconazole-repressed	0	2	3	2	10	10	10	9	4	9	9	9	3
<b>CHT2</b>	GPI-linked chitinase required for normal filamentous growth; downregulated in core caspofungin response; induced in yeast cells; fluconazole, Cyr1p-, Efg1p-, pH-regulated; mRNA binds She3p, is localized to yeast-form buds and hyphal tips	12	11	10	3	9	9	7	7	4	8	4	7	3
<b>CRH11</b>	GPI-anchored cell wall transglycosylase, putative ortholog of <i>S. cerevisiae</i> Crh1p; predicted glycosyl hydrolase domain; similar to Csf4p and to antigenic <i>A. fumigatus</i> AspF9; predicted Kex2p substrate; caspofungin-induced	7	9	12	3	8	7	7	2	4	4	4	10	3
<b>DFG5</b>	N-linked mannoprotein of cell wall and membrane; possible signal transducer; role in hyphal growth and HWP1 induction in alkaline pH; GPI modification predicted; dfg5 dcw1 double mutant is inviable; caspofungin-induced, fungal-specific	-	-	-	-	0	1	1	0	2	1	1	1	3
<b>EAP1</b>	Cell wall adhesin required for cell-cell adhesion and biofilm formation; GPI anchored; Efg1p-regulated; suppresses polystyrene or cell adhesion, filamentation, invasive growth defects of <i>S. cerevisiae</i> flo8 or flo11 mutant; biofilm-induced	1	0	3	2	2	2	1	0	3	-	-	-	-
<b>ECM33</b>	GPI-anchored cell wall protein; mutants show cell-wall defects and reduced adhesion, host cell damage, and endocytosis; mutant infection is immunoprotective in murine model; fluconazole-induced; caspofungin repressed	6	6	6	3	4	5	4	7	4	3	4	6	3
<b>ECM331</b>	GPI-anchored protein; mainly at plasma membrane, also at cell wall; Hap43p-, caspofungin-induced; Plc1p-regulated; repressed by Rim101p, Hog1p; colony morphology-related regulated by Ssn6p; induced by ketoconazole and hypoxia	1	1	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>HYR1</b>	Hyphal-induced GPI-anchored cell wall protein; macrophage-induced; repressed by neutrophil-co-culture; resistance to killing by neutrophils, azole resistance; regulated by Rfg1p, Efg1p, Nrg1p, Tup1p, Cyr1p, Bcr1p, Hap43p; biofilm-induced	-	-	-	-	8	6	5	0	3	1	6	8	3
<b>IHD1</b>	Putative GPI-anchored protein; alkaline upregulated; greater transcription in hyphal form than yeast form; regulated by Nrg1p, Rfg1p, Tup1p; regulated by Tsa1p, Tsa1Bp in minimal media at 37; induced in oralpharyngeal candidiasis	2	2	2	3	2	2	2	2	4	2	3	3	3
<b>PGA10</b>	Plasma membrane protein of heme-iron utilization; allows utilization of heme and hemoglobin as iron sources in host tissues; predicted GPI anchor; biofilm, hypoxia, ketoconazole, ciclopirox, or hyphal-induced; upregulated by Rim101p at pH8	-	-	-	-	0	0	0	3	1	2	0	2	2

<b>PGA4</b>	GPI-anchored cell surface protein; beta-1,3-glucanoyltransferase with similarity to the <i>A. fumigatus</i> GEL family; fungal-specific (no mammalian homolog); transcription upregulated in RHE model of oral candidiasis; fluconazol-induced	6	9	12	3	10	12	11	4	4	8	4	8	3
<b>PGA45</b>	Cell wall protein; putative GPI-anchor; downregulated in core caspofungin response; Hog1p-induced; regulated by Ssn6p; Mob2p-dependent hyphal regulation; biofilm-induced	1	2	4	3	4	5	5	1	4	2	6	5	3
<b>PGA52</b>	GPI-anchored cell surface protein of unknown function; Hap43p-repressed gene; fluconazole-induced; possibly an essential gene, disruptants not obtained by UAU1 method	1	1	2	3	3	2	1	2	4	-	-	-	-
<b>PGA53</b>	GPI-anchored cell surface protein of unknown function; greater mRNA abundance observed in a <i>cyr1</i> homozygous null mutant than in wild type	1	1	0	2	1	1	1	0	3	1	1	1	3
<b>PGA63</b>	Ortholog(s) have structural molecule activity, role in COPII-coated vesicle budding, intracellular protein transport, nuclear envelope organization and COPII vesicle coat, cytosol, mating projection tip localization	-	-	-	-	14	14	13	2	4	5	1	2	3
<b>PHR1</b>	Glycosidase of cell surface; may act on cell-wall beta-1,3-glucan prior to beta-1,6-glucan linkage; E169 and E270 at active site; role in systemic but not vaginal virulence (neutral, not low pH); high pH or filamentation induced	14	15	19	3	16	18	16	11	4	18	25	21	3
<b>PHR2</b>	Glycosidase; role in cell wall structure; may act on beta-1,3-glucan prior to beta-1,6-glucan linkage; role in vaginal not systemic virulence (low pH not neutral); low pH, high iron, fluconazole, Hap43p-induced; Rim101p-downregulated at pH8	7	5	5	3	5	5	6	4	4	3	3	3	3
<b>PLB3</b>	GPI-anchored cell surface phospholipase B; possibly secreted; fungal-specific (no mammalian homolog); transcription positively regulated by Tbf1p; possible essential gene (UAU1 method); late-stage biofilm-induced gene; fluconazole-induced	0	1	3	2	5	4	6	1	4	0	3	3	2
<b>PLB4.5</b>	Putative phospholipase B; Hog1p-induced; regulated by Ssn6p; putative GPI-anchor; repressed during cell wall regeneration; clade-associated gene expression; Hap43p-induced gene	16	17	18	3	10	8	9	2	4	0	4	6	2
<b>PLB5</b>	Putative GPI-linked phospholipase B, fungal-specific (no mammalian homolog); null mutation eliminates cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence; fluconazole-repressed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	3
<b>RBT1</b>	Cell wall protein with similarity to Hwp1p, required for virulence; predicted glycosylation; Tup1p repressed; serum, hyphal and alkaline induced; farnesol, alpha factor induced; Rfg1p-, Rim101p-regulated; fluconazole-repressed	5	6	8	3	11	10	10	9	4	5	8	9	3
<b>RBT4</b>	Protein similar to plant pathogenesis-related proteins; required for virulence in mouse systemic and rabbit corneal infections; not required for filamentation; mRNA binds to She3p and is localized to hyphal tips; Hap43p-induced gene	2	1	2	3	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>RBT5</b>	GPI-anchored cell wall protein involved in hemoglobin utilization; regulated by Rfg1p, Rim101p, Tbf1p, iron; repressed by Sfu1p, Hog1p, Tup1p; induced by serum, alkaline pH, ketoconazole, ciclopirox olamine, geldamycin, Hap43p, biofilm	2	2	2	3	2	2	2	4	4	3	2	2	3
<b>RHD3</b>	GPI-anchored cell wall protein; yeast-associated protein; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; clade-associated gene expression; not essential for cell wall integrity; fluconazole-repressed	3	1	7	3	5	4	4	2	4	0	2	3	2
<b>SAP10</b>	Secreted aspartyl protease; roles in adhesion, virulence (RHE model), cell surface integrity; distinct specificity from Sap9p; at cell membrane and wall; GPI-anchored; N-glycosylated; expression greater in low iron; Tbf1p-activated	3	1	2	3	-	-	-	-	-	1	1	2	3

<b>SAP9</b>	Secreted aspartyl protease; roles in adhesion, cell surface integrity; induced by antifungal drugs, stationary phase, or in white-phase cells; farnesol-downregulated in biofilm; autocatalytic processing; GPI-anchor; N-glycosylated	6	6	10	3	7	6	7	0	3	0	4	3	2
<b>SOD5</b>	Copper- and zinc-containing superoxide dismutase; protective against oxidative stress; induced by neutrophils, hyphal growth, caspofungin, osmotic, oxidative stress; gene family includes SOD1,4,5,6; induced in oropharyngeal candidiasis	-	-	-	-	1	1	1	1	4	5	3	4	3
<b>SSR1</b>	Beta-glucan associated ser/thr rich cell-wall protein with a role in cell wall structure; GPI anchor; similar mRNA abundance in yeast-form and germ tubes; detected at germ tube plasma membrane; repressed in cells treated with Congo Red	3	3	3	3	3	3	3	3	4	2	2	2	3
<b>UTR2</b>	GPI anchored cell wall putative glycosidase; role in adhesion; required for hyphal growth on Spider (not serum) medium; chitin-binding, glycosyl hydrolase domains; induced during cell wall regeneration; mRNA detected in yeast-form cells	6	7	6	3	6	4	4	2	4	1	3	2	3



**ANEXO 2: PROTEINAS RELACIONADAS CON MANTENIMIENTO Y BIOGENESIS DE LA PARED CELULAR**

Proteína	Descripción	LEVADURAS				HIFAS					HIFAS 10%S			
		1	2	3	Nº exp	1	2	3	4	Nº exp	1	2	3	Nº exp
<b>ABG1</b>	Vacuolar membrane protein of yeast and hyphae; depletion causes abnormal vacuolar morphology, cell separation defect, sensitivity to cell wall perturbation, increased hyphal branching; essential gene, no mammalian homolog; Cyr1p-regulated	3	1	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ARP2</b>	Putative component of the Arp2/3 complex; required for virulence, hyphal growth, and cell wall and cytoskeleton organization, but not for endocytosis; mutation confers hypersensitivity to cytochalasin D; regulated by Gcn2p and Gcn4p	-	-	-	-	1	4	0	0	2	-	-	-	-
<b>ATC1</b>	Cell wall acid trehalase; catalyzes hydrolysis of the disaccharide trehalose; similar to <i>S. cerevisiae</i> vacuolar acid trehalase (Ath1p); Hap43p-repressed gene	4	6	8	3	3	3	0	4	3	-	-	-	-
<b>BGL2</b>	1,3-beta-Glucosyltransferase, cell wall enzyme; one of multiple 1,3-beta-glucosyltransferases; mutant has cell-wall and growth defects, but wild-type 1,3- or 1,6-beta-glucan content; antigenic; virulence role in mouse systemic infection	6	6	7	3	7	6	8	7	4	5	3	4	3
<b>BUD7</b>	Ortholog(s) have role in Golgi to plasma membrane transport, fungal-type cell wall chitin biosynthetic process and cell division site, clathrin-coated vesicle, cytosol, exomer complex, nucleus, ribosome localization	-	-	-	-	4	7	3	0	3	-	-	-	-
<b>CHS5</b>	Putative chitin biosynthesis protein; fungal-specific (no human or murine homolog); transcription decreases upon yeast-to-hyphal switch	-	-	-	-	4	1	2	0	3	-	-	-	-
<b>CHT3</b>	Major chitinase; secreted; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Cts1p; 4 N-glycosylation motifs; possible O-mannosylation; putative signal peptide; hyphal-repressed; farnesol upregulated in biofilm; regulated by Efg1p, Cyr1p, Ras1p	6	6	5	3	4	4	3	3	4	-	-	-	-
<b>CSP37</b>	Hyphal cell wall protein; role in progression of mouse systemic infection; predicted P-loop, divalent cation binding, N-glycosylation sites; expressed in yeast and hyphae; hyphal downregulated; stationary-phase enriched; GlcNAc-induced	6	7	4	3	9	10	11	4	4	3	0	2	2
<b>CYS4</b>	Cystathionine beta-synthase; sulfur amino acid biosynthesis; antigenic in mouse; biofilm and alkaline upregulated; macrophage/pseudohyphal-induced; present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	-	-	-	-	3	6	4	6	4	-	-	-	-
<b>ECM17</b>	Enzyme of sulfur amino acid biosynthesis; putative role in regulation of cell wall biogenesis; upregulated in biofilm; possibly adherence-induced; regulated by Tsa1p/Tsa1Bp in H2O2 stress; Gcn4p-regulated; Tbf1p-activated; Hap43p-repressed	-	-	-	-	3	3	4	1	4	-	-	-	-
<b>ENG1</b>	Endo-1,3-beta-glucanase required for cell separation after division, orthologous to <i>S. cerevisiae</i> Dse4p; caspofungin-, fluconazole-repressed; fungal-specific; repressed in response to alpha pheromone in SpiderM medium; biofilm-induced gene	14	17	14	3	3	3	3	3	4	1	7	4	3
<b>FRS1</b>	Phenylalanyl-tRNA synthetase; possible role in early cell wall biosynthesis; downregulated by phagocytosis by macrophages; possibly essential gene, disruptants not obtained by UAU1 method; protein present in exponential and stationary phase	-	-	-	-	4	5	6	4	4	-	-	-	-

<b>GAL10</b>	UDP-glucose 4-epimerase required for galactose utilization; mutant has cell wall defects and increased filamentation; fluconazole- and ketoconazole-induced; stationary phase enriched protein; late-stage biofilm-induced gene; GlcNAc-induced	-	-	-	-	0	3	1	0	2	-	-	-	-
<b>GDA1</b>	Golgi membrane GDPase, required for wild-type O-mannosylation, not N-glycosylation; required for wild-type hyphal induction, cell wall, and cell surface charge; not required for HeLa cell adherence; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Gda1p	8	8	6	3	4	6	5	0	3	3	6	6	3
<b>GFA1</b>	Glucosamine-6-phosphate synthase, homotetrameric enzyme of chitin/hexosamine biosynthesis; inhibited by UDP-GlcNAc, FMDP, N-acyl peptide, kanosamine-6-P; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Gfa1p; Cagrowth-phase regulated; catalytic Cys	1	1	2	3	3	4	4	5	4	2	1	2	3
<b>GNA1</b>	Glucosamine-6-phosphate acetyltransferase; enzyme of UDP-GlcNAc biosynthesis; required for viability in absence of GlcNAc supplementation; required for persistent infection and wild-type virulence in mouse systemic infection	-	-	-	-	2	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>GPD2</b>	Similar to glycerol 3-P dehydrogenases; regulated by Ssn6p, Nrg1p, Efg1p; induced upon osmotic and oxidative stress (via Hog1p), cell wall regeneration, macrophage/pseudohyphal growth, core stress response; possibly essential (UAU1 method)	2	4	0	2	6	9	8	7	4	1	2	2	3
<b>GSC1</b>	Subunit of beta-1,3-glucan synthase; essential; gsc1 allele determines resistance/sensitivity to echinocandin antifungals; 16 predicted membrane-spanning regions; mRNA abundance declines after yeast-to-hyphal transition; fungal-specific	-	-	-	-	11	6	4	1	4	-	-	-	-
<b>HEX1</b>	Beta-N-acetylhexosaminidase/chitobiase, highly glycosylated enzyme that is secreted to the periplasm and culture medium; required for full virulence; may have role in carbon or nitrogen scavenging; possibly an essential gene (UAU1 method)	2	2	3	3	0	3	1	0	2	-	-	-	-
<b>KRE9</b>	Protein of beta-1,6-glucan biosynthesis; required for serum-induced hyphal growth; required for efficient utilization of galactose and for growth on glucose; similar to <i>S. cerevisiae</i> Kre9p and Knh1p; O-glycosylated by Pmt1p	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>MNN2</b>	Alpha-1,2-mannosyltransferase; likely involved in iron utilization in the endocytosis pathway under iron-limiting conditions; similar to <i>S. cerevisiae</i> Mnn2p and Mnn5p; transposon mutation affects filamentous growth; filament induced	1	3	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>MNN7</b>	Putative mannosyltransferase; identified in detergent-resistant membrane fraction (possible lipid raft component); predicted N-terminal acetylation and transmembrane helix	-	-	-	-	0	1	2	0	2	0	3	3	2
<b>MNT1</b>	Alpha-1,2-mannosyl transferase; adds second mannose during cell-wall mannoprotein biosynthesis; required for wild-type virulence and adherence to epithelial cells; predicted type II Golgi membrane protein; fungal-specific; Hap43p-induced	1	3	3	3	9	7	8	0	3	0	3	2	2
<b>MP65</b>	Cell surface mannoprotein; cell-wall glucan metabolism, biofilm, adhesion; adhesin motif; O-glycosylation; induced by heat, germ tube formation, wall regeneration; mycelial antigen; diagnostic marker; fluconazole-repressed	11	11	14	3	11	10	11	9	4	10	9	6	3
<b>orf19.3414</b>	SUR7 - Protein required for normal cell wall, plasma membrane, cytoskeletal organization, endocytosis; localizes to eisosome subdomains of plasma membrane; four transmembrane motifs; mutant shows ectopic, chitin-rich cell wall; fluconazole-induced	1	1	0	2	3	3	3	1	4	-	-	-	-

<b>orf19.3683</b>	Putative ADP-ribosylation factor GTPase activating protein, functional ortholog of <i>S. cerevisiae</i> GCS1; mutation affects endocytosis, hyphal growth, chemical and drug resistance, and sensitivity to cell wall inhibitors	1	3	0	2	3	2	1	3	4	-	-	-	-
<b>orf19.4246</b>	Protein with similarity to <i>S. cerevisiae</i> Ykr070wp; transposon mutation affects filamentous growth; Hog1p-downregulated; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p; induced during cell wall regeneration; possibly essential gene	3	1	0	2	6	5	6	8	4	4	0	2	2
<b>orf19.7124</b>	Protein required for endocytosis; contains a BAR domain, which is found in proteins involved in membrane curvature; null mutant exhibits defects in hyphal growth, virulence, cell wall integrity, and actin patch localization	-	-	-	-	1	3	2	0	3	-	-	-	-
<b>PIR1</b>	1,3-beta-glucan-linked structural cell wall protein; N-mannosylated, O-glycosylated by Pmt1p; tandem repeats; cell wall defect in heterozygous mutant; hyphal repressed; Hog1p, fluconazole, hypoxia induced; iron, Efg1p, Plc1p, temp regulated	2	2	3	3	2	2	2	2	4	2	2	2	3
<b>PMI1</b>	Phosphomannose isomerase; cell wall biosynthesis enzyme; drug target; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> and <i>E. coli</i> phosphomannose isomerase; Gcn4p-regulated; repressed by 3-AT; induced on adherence to polystyrene, phagocytosis	6	9	0	2	7	7	7	8	4	1	2	1	3
<b>PMM1</b>	Phosphomannomutase; enzyme of O- and N-linked mannosylation; interconverts mannose-6-phosphate and mannose-1-phosphate; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Sec53p; antigenic during murine systemic infection; Hap43p-induced gene	4	7	3	3	5	7	6	9	4	5	3	5	3
<b>PMR1</b>	Putative secretory pathway P-type Ca <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> -ATPase; required for protein glycosylation and cell wall maintenance; required for hyphal tip oscillation in semisolid substrate; putative ortholog of <i>S. cerevisiae</i> PMR1	-	-	-	-	1	2	1	0	3	-	-	-	-
<b>PMT1</b>	Protein mannosyltransferase (PMT), required for virulence in mouse systemic infection and for adhesion to epithelial cells; role in hyphal growth and drug sensitivity; Als1p, Sec20p, Kre9p, Pir1p are substrates; one of 5 PMT family members	-	-	-	-	6	3	5	0	3	-	-	-	-
<b>PMT2</b>	Protein mannosyltransferase (PMT) with roles in hyphal growth and drug sensitivity; member of the PMT family which includes Pmt1p, Pmt2p, Pmt4p, Pmt5p, and Pmt6p; induced during cell wall regeneration; essential	-	-	-	-	1	2	1	1	4	1	1	2	3
<b>PSA2</b>	Mannose-1-phosphate guanyltransferase; macrophage-downregulated gene; stationary phase enriched protein; Hap43p-repressed gene	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>RBE1</b>	Cell wall protein; transcript negatively regulated by Rim101p, Efg1p, Ssn6p, alkaline conditions; signal sequence, O-glycosylation; no GPI anchor predicted; ketoconazol upregulated; biofilm-induced, regulated by Sef1p, Sfu1p, Hap43p	4	4	5	3	3	3	3	4	4	-	-	-	-
<b>RHO1</b>	Small GTPase of Rho family; regulates beta-1,3-glucan synthesis activity and binds Gsc1p; essential; expected to be geranylgeranylated by geranylgeranyltransferase type I; plasma membrane-localized	2	3	2	3	6	7	7	6	4	4	5	7	3
<b>RVS167</b>	SH3-domain- and BAR domain-containing protein involved in endocytosis; null mutant exhibits defects in hyphal growth, virulence, cell wall integrity, and actin patch localization; cosediments with phosphorylated Myo5p	-	-	-	-	1	1	2	0	3	-	-	-	-
<b>SCW11</b>	Cell wall protein; transcription decreased in mutant lacking ACE2; downregulated in core caspofungin response; expression greater in high iron; possibly an essential gene, disruptants not obtained by UAU1 method; planktonic growth-induced	4	4	7	3	4	3	5	3	4	1	1	1	3

<b>SIM1</b>	Putative adhesin-like protein involved in cell wall maintenance, redundant with Sun41p; possibly secreted; macrophage-downregulated gene; transcription is negatively regulated by Rim101p, Cyr1p, Ras1p	9	9	8	3	6	5	5	5	4	1	2	3	3
<b>SLK19</b>	Alkaline-induced protein of plasma membrane; affects cell aggregation, cell wall; similar to <i>S. cerevisiae</i> Slk19p (a kinetochore protein with roles in mitosis, meiosis); required for wild-type virulence in mouse; macrophage-downregulated	1	8	0	2	21	17	18	18	4	2	1	2	3
<b>SMI1</b>	Cell wall biosynthesis protein; Hap43p-, caspofungin-repressed; Cyr1p-induced in hyphal cells; planktonic and biofilm-induced; reduced biofilm cell wall glucan in null mutant; essential using the UAU1 method of gene disruption	-	-	-	-	5	4	4	3	4	-	-	-	-
<b>SRB1</b>	Essential GDP-mannose pyrophosphorylase; synthesizes GDP-mannose for protein glycosylation; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Psa1p; on yeast-form cell surface, not hyphal cells; alkaline upregulated; induced on adherence to polystyrene	4	4	1	3	11	11	12	14	4	6	5	4	3
<b>SUN41</b>	Cell wall glycosidase involved in biofilm formation and cell separation; possibly secreted; hypoxia and hyphal induced; caspofungin repressed; Efg1p, Cph1p regulated; O-glycosylation, potential Kex2p substrate; 9 5' E-boxes; 5'-UTR intron;	4	5	5	3	4	4	5	5	4	-	-	-	-
<b>TMA19</b>	Cell wall protein, ortholog of <i>S. cerevisiae</i> Tma19p (Ykl065cp)	1	2	0	2	3	3	2	3	4	2	2	0	2
<b>UAP1</b>	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase, catalyzes biosynthesis of UDP-N-acetylglucosamine from UTP and N-acetylglucosamine 1-phosphate; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Qri1p; alkaline upregulated	-	-	-	-	1	2	1	0	3	-	-	-	-
<b>XYL2</b>	Putative D-xylulose reductase; immunogenic in mice; soluble protein in hyphae; induced by caspofungin, fluconazole, Hog1p and during cell wall regeneration; Mnl1p-induced in weak acid stress; stationary phase enriched; biofilm-induced	1	5	0	2	4	8	6	6	4	-	-	-	-
<b>YWP1</b>	Secreted yeast cell wall protein; possible role in dispersal in host; mutation causes increased adhesion and biofilm formation; stable propeptide; regulated by growth phase, phosphate, Ssk1p, Ssn6p, Efg1p, Efh1p, Hap43p; mRNA binds to She3p	3	2	3	3	1	1	1	1	4	1	1	1	3

**ANEXO 3: PROTEINAS RELACIONADAS CON LA SUPERFICIE CELULAR**

Proteína	Descripción	LEVADURAS				HIFAS					HIFAS 10%S			
		1	2	3	Nº exp	1	2	3	4	Nº exp	1	2	3	Nº exp
<b>ADH1</b>	Alcohol dehydrogenase; oxidizes ethanol into acetaldehyde; at yeast, but not hyphal cell surface; soluble in hyphae; immunogenic in human/mouse; complements <i>S. cerevisiae</i> adh1 adh2 adh3 mutation; biofilm-, fluconazole-, farnesol-induced	12	16	14	3	17	19	17	24	4	17	13	15	3
<b>APE2</b>	Neutral arginine-, alanine-, leucine-specific metallo-aminopeptidase; expected to be secreted, purified from cell wall and intracellular fractions; protein repressed during the mating process; Hog1p-, farnesol-induced; possibly essential	9	17	4	3	15	12	16	2	4	5	1	1	3
<b>ATC1</b>	Cell wall acid trehalase; catalyzes hydrolysis of the disaccharide trehalose; similar to <i>S. cerevisiae</i> vacuolar acid trehalase (Ath1p); Hap43p-repressed gene	4	6	8	3	3	3	0	4	3	-	-	-	-
<b>ATP1</b>	ATP synthase alpha subunit; antigenic in human/mouse; at hyphal surface, not yeast; induced by ciclopirox, ketoconazole, flucytosine; downregulated by Efg1p, caspofungin; may be essential; sumoylation target; stationary phase-enriched	5	6	12	3	20	15	19	7	4	-	-	-	-
<b>BMH1</b>	Sole 14-3-3 protein in <i>C. albicans</i> ; role in hyphal growth; possibly regulated by host interaction; localizes to yeast-form cell surface, not hyphae; alternatively spliced intron in 5' UTR	6	16	4	3	12	13	14	6	4	11	8	8	3
<b>CDC19</b>	Pyruvate kinase; on yeast cell surface; Gcn4p, Hog1p, GlcNAc regulated; induced on polystyrene adherence; downregulated by phagocytosis, farnesol treatment; mutation affects filamentation; stationary phase enriched; biofilm, Hap43p-induced	14	22	11	3	25	25	23	25	4	18	14	10	3
<b>CEF3</b>	Translation elongation factor 3; antigenic in humans; predicted C-term nucleotide-binding active site; protein on surface of yeast, not hyphae; polystyrene adherence induced; higher protein amount in stationary phase; possibly essential	15	17	19	3	30	33	27	42	4	27	19	23	3
<b>EGD2</b>	Putative nascent polypeptide associated complex protein alpha subunit; soluble protein in hyphae; macrophage/pseudohyphal-induced; protein level decrease in stationary phase cultures; GlcNAc-induced protein	6	8	6	3	8	8	9	6	4	7	5	5	3
<b>ENO1</b>	Enolase, enzyme of glycolysis and gluconeogenesis; major cell-surface antigen; binds host plasmin/plasminogen; immunoprotective; phagocytosis, biofilm and planktonic growth-induced; farnesol-downregulated; possibly essential; Hap43p-induced	21	28	19	3	28	31	37	49	4	31	31	27	3
<b>FRE10</b>	Major cell-surface ferric reductase under low-iron conditions; 7 transmembrane regions and a secretion signal predicted; repressed by Tup1p, Rim101p, Ssn6p, Hog1p, caspofungin; ciclopirox olamine induced; not required for filamentous growth	-	-	-	-	2	2	2	1	4	-	-	-	-
<b>GCA1</b>	Predicted extracellular or plasma membrane-associated glucoamylase; promotes biofilm matrix formation; possible adhesin; gene transcribed during rat oral infection; transcription regulated by carbohydrates, pH, galactose; biofilm-induced	1	2	1	3	1	1	1	3	4	2	1	1	3

<b>GDA1</b>	Golgi membrane GDPase, required for wild-type O-mannosylation, not N-glycosylation; required for wild-type hyphal induction, cell wall, and cell surface charge; not required for HeLa cell adherence; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Gda1p	8	8	6	3	4	6	5	0	3	3	6	6	3
<b>GPH1</b>	Putative glycogen phosphorylase with a role in glycogen metabolism; regulated by Ssk1p, Mig1p, Tup1p, Hap43p; fluconazole-induced; localizes to cell surface of hyphae, not yeast cells; stationary phase enriched protein	1	2	2	3	8	7	8	10	4	7	0	3	2
<b>GPM1</b>	Phosphoglycerate mutase; surface protein that binds host complement Factor H and FHL-1; antigenic in murine/human infection; biofilm-, fluconazole-, or amino acid starvation (3-AT) induced, farnesol-downregulated; biofilm, Hap43p-induced	1	6	6	3	5	5	6	12	4	-	-	-	-
<b>HEM13</b>	Coproporphyrinogen III oxidase; antigenic; localizes to yeast cell surface, not hyphae; iron-regulated expression; macrophage-downregulated; not Rfg1p regulated, farnesol-induced; possibly essential; Hap43p-repressed gene; biofilm-induced	2	6	2	3	8	8	9	5	4	4	3	6	3
<b>HSP70</b>	Putative hsp70 chaperone; role in entry into host cells; heat-shock, amphotericin B, cadmium, ketoconazole-induced; farnesol-downregulated in biofilm; surface localized in yeast-form and hyphal cells; antigenic in host	9	15	16	3	35	31	38	32	4	24	21	21	3
<b>HSP90</b>	Essential chaperone, regulates several signal transduction pathways and temperature-induced morphogenesis; activated by heat shock, stress; localizes to surface of hyphae, not yeast cells; mediates echinocandin and biofilm azole resistance	12	21	16	3	29	31	31	37	4	21	21	24	3
<b>KAR2</b>	Similar to chaperones of Hsp70p family; role in translocation of proteins into the ER; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	6	10	10	3	30	30	32	22	4	14	12	10	3
<b>MSB2</b>	Adhesin-like protein; mucin family; cell wall damage sensor; N-terminal secretion signal; required for Cek1p phosphorylation in response to cell wall stress; Rim101p-repressed; activation releases extracellular domain into medium	2	2	3	3	2	1	2	1	4	2	3	7	3
<b>orf19.2296</b>	Protein with similarity to mucins; ketoconazole-induced; fluconazole-downregulated; mRNA abundance increased in a <i>cyr1</i> mutant than in wild type; colony morphology-related gene regulation by Ssn6p; late-stage biofilm-induced	11	19	7	3	21	19	19	34	4	11	0	3	2
<b>orf19.251</b>	ThiJ/PfpI protein; binds human immunoglobulin E; 2 N-glycosylation motifs; alkaline, fluconazole, Hog1p-downregulated; induced in core stress response or by oxidative stress (via Cap1p); induced by hypoxia, Hap43p; stationary-phase enriched	2	9	2	3	10	13	12	21	4	15	10	5	3
<b>orf19.4886</b>	Putative adhesin-like protein; Hap43p-repressed gene	1	3	2	3	2	3	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.5126</b>	Putative adhesin-like protein	2	3	3	3	3	4	4	4	4	-	-	-	-
<b>orf19.6082</b>	Ortholog(s) have unfolded protein binding activity, role in protein folding, protein localization at cell surface and integral to endoplasmic reticulum membrane, mitochondrial outer membrane localization	-	-	-	-	2	1	1	0	3	-	-	-	-

<b>PDC11</b>	Putative pyruvate decarboxylase; antigenic; at hyphal cell surface, not yeast-form cells; regulated by Hap43p, Gcn4p, Efg1p, Efh1p, Hsf1; fluconazole-, farnesol-, biofilm-induced; repressed upon amino acid starvation; sumoylation target	16	21	14	3	26	25	27	36	4	23	25	19	3
<b>PGK1</b>	Phosphoglycerate kinase, enzyme of glycolysis; localizes to cell wall and cytoplasm; antigenic in murine/human infection; biofilm, planktonic culture-, Hog1p-, Hap43p-, GCN-induced; downregulated upon phagocytosis	18	23	18	3	31	32	29	43	4	26	17	17	3
<b>PIL1</b>	Eisosome component with a predicted role in endocytosis; echinocandin-binding protein; localizes to cell surface of hyphae, but not yeast-form cells; biofilm induced; fungal-specific (no human/murine homolog); Hap43p-induced	8	10	8	3	16	16	16	13	4	10	3	7	3
<b>RPL10</b>	Ribosomal protein L10; intron in 5'-UTR; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; transcription regulated upon yeast-hyphal switch	5	6	2	3	8	9	8	10	4	7	5	6	3
<b>RPL11</b>	Ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; colony morphology-related gene regulation by Ssn6p; Hap43p-induced	4	6	3	3	9	8	7	6	4	5	3	3	3
<b>RPL12</b>	Ribosomal protein L12, 60S ribosomal subunit; downregulated by human whole blood or polymorphonuclear cells; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits are downregulated upon phagocytosis by macrophage; Tbf1p-activated; Hap43p-induced	5	6	6	3	6	6	7	8	4	7	5	3	3
<b>RPL17B</b>	Ribosomal protein L17; mutation confers hypersensitivity to 5-FU, tubercidin; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated on phagocytosis by macrophage; Hap43p-induced gene	3	6	3	3	7	7	8	6	4	5	3	4	3
<b>RPL18</b>	Predicted ribosomal protein; Plc1p-regulated, Tbf1p-activated; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; Hap43p-induced gene	2	4	2	3	7	7	7	10	4	4	1	3	3
<b>RPL19A</b>	Ribosomal protein L19; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophages; Hap43p-induced gene	5	6	6	3	8	6	10	9	4	4	3	2	3
<b>RPL25</b>	Putative rRNA-binding ribosomal protein component of the 60S ribosomal subunit; Hap43p-induced gene; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p	2	2	2	3	3	4	5	4	4	1	2	2	3
<b>RPL3</b>	Putative ribosomal protein, large subunit; induced by ciclopirox olamine treatment; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits are downregulated upon phagocytosis by murine macrophages; Hap43p-induced gene	14	14	6	3	19	15	21	15	4	9	4	6	3
<b>RPL38</b>	60S ribosomal ribosomal protein subunit; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	4	4	1	3	4	5	4	3	4	3	0	1	2
<b>RPL4B</b>	Ribosomal protein 4B; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	8	10	9	3	14	12	13	15	4	11	7	6	3
<b>RPL5</b>	Ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophages; Hap43p-induced gene	2	3	3	3	7	7	8	8	4	9	5	5	3

<b>RPL6</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> ribosomal subunit, Rpl6p; transposon mutation affects filamentous growth; translation-related genes are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; Hap43p-induced gene	8	8	7	3	10	10	11	12	4	8	7	8	3
<b>RPS1</b>	Putative ribosomal protein 10 of the 40S subunit, elicits a host antibody response during infection; transcription is induced during active growth	9	11	7	3	20	17	18	15	4	9	7	5	3
<b>RPS10</b>	Ribosomal protein S10; downregulated in the presence of human whole blood or polymorphonuclear (PMN) cells	2	3	3	3	3	3	3	3	4	1	2	1	3
<b>RPS14B</b>	Putative ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; transcription is positively regulated by Tbf1p	7	9	5	3	11	9	10	11	4	6	1	2	3
<b>RPS18</b>	Predicted ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; repressed by nitric oxide; Hap43p-induced gene	7	7	9	3	8	10	12	6	4	6	2	4	3
<b>RPS21</b>	Predicted ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; transcription is positively regulated by Tbf1p	5	8	5	3	11	12	12	12	4	9	5	6	3
<b>RPS28B</b>	Putative ribosomal protein S28B	1	3	1	3	5	4	5	4	4	3	1	2	3
<b>RPS6A</b>	Ribosomal protein 6A; localizes to cell surface of yeast cells but not hyphae; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; possibly essential; Hap43p-induced	6	5	4	3	10	12	11	12	4	5	4	3	3
<b>RPS7A</b>	Ribosomal protein S7; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	6	8	2	3	12	10	11	11	4	8	6	6	3
<b>RPS8A</b>	Small 40S ribosomal subunit protein; gene is induced by ciclopirox olamine; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; intron in 5'-UTR; Hap43p-induced gene	7	7	5	3	7	8	7	8	4	7	5	4	3
<b>SAM2</b>	S-adenosylmethionine synthetase, localizes to surface of hyphal cells, but not yeast-form cells; possible biofilm-induced expression (reports differ); alkaline upregulated; Hog1p-induced; farnesol-downregulated	4	7	2	3	9	11	13	14	4	6	4	6	3
<b>SDH2</b>	Succinate dehydrogenase, Fe-S subunit; localizes to surface of yeast cells, but not hyphae; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; repressed by nitric oxide, Hap43p; induced during log phase aerobic growth	-	-	-	-	4	5	5	0	3	-	-	-	-
<b>SNZ1</b>	Stationary phase protein; soluble in hyphae; induced on yeast to hyphal switch, in response to 3-aminotriazole, or inazole-resistant strain overexpressing MDR1; regulated by Gcn4p, macrophage; no human/murine homolog	2	4	0	2	12	10	12	14	4	12	7	6	3
<b>SSA2</b>	HSP70 family chaperone; found in cell wall fractions; antigenic; role in import of beta-defensin peptides; ATPase domain binds histatin 5; at surface of hyphae, not yeast-form cells; farnesol-downregulated in biofilm; caspofungin repressed	10	19	15	3	31	31	37	34	4	23	23	24	3

<b>SSB1</b>	HSP70 family heat shock protein; mRNA in yeast cells and germ tubes; at surface of yeast cells, not hyphae; antigenic in human, mouse systemic infection; macrophage, GCN-induced; possibly essential gene; sumoylation target; Hap43p-induced	17	17	19	3	20	21	25	30	4	20	16	15	3
<b>SSC1</b>	Heat shock protein; at yeast-form cell surface, not hyphae; antigenic; Gcn4p-regulated; induced by amino acid starvation (3-aminotriazole) or upon adherence to polystyrene; macrophage-downregulated; sumoylation target; possibly essential	4	10	10	3	18	19	16	6	4	2	2	4	3
<b>TDH3</b>	NAD-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; glycolysis enzyme; binds fibronectin and laminin; at yeast and hyphal surface; antigenic in infection; farnesol-downregulated; stationary phase-enriched; biofilm-induced; GlcNAc-induced	17	24	16	3	29	27	27	31	4	28	22	0	2
<b>TEF1</b>	Translation elongation factor 1-alpha, detected at the cell surface; binds human plasminogen; macrophage/pseudohyphal-induced; upregulated in RHE model of oral candidiasis and in clinical oral candidiasis isolates; possibly essential gene	10	14	14	3	19	19	18	27	4	16	16	0	2
<b>TKL1</b>	Putative transketolase; localizes to surface of yeast-form cells, but not hyphae; soluble protein in hyphae; transcription regulated by Nrg1p, Mig1p, and Tup1p; antigenic in human or murine infection; possibly essential (by UAU1 method)	5	7	2	3	16	16	10	19	4	12	7	0	2
<b>TSA1</b>	TSA/alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhPC) family protein; similar to thiol-dependent peroxidases of oxidative stress signaling; antigenic; hyphal surface, nucleus; yeast-form nucleus, cytoplasm; biofilm, phagocytosis, peroxide induced	3	7	5	3	9	8	11	7	4	9	0	0	1
<b>UGP1</b>	Possible UTP-glucose-1-phosphaturidyl transferase; localizes to cell surface of yeast-form cells, but not hyphal cells; Hog1p-downregulated; stationary phase enriched protein; induced in oralpharyngeal candidiasis	3	2	2	3	11	12	13	12	4	7	6	0	2
<b>VPS1</b>	Dynamin-family GTPase-related protein; induced upon adherence to polystyrene; regulated by Gcn2p and Gcn4p	-	-	-	-	12	15	10	0	3	-	-	-	-



**ANEXO 4: PROTEINAS INMUNOGENICAS**

Proteína	Descripcion	LEVADURAS				HIFAS					HIFAS 10%S			
		1	2	3	Nº exp	1	2	3	4	Nº exp	1	2	3	Nº exp
<b>ACH1</b>	Acetyl-coA hydrolase; acetate utilization; nonessential; soluble protein in hyphae; antigenic in human; induced on polystyrene adherence; farnesol-, ketoconazole-induced; no human or murine homolog; stationary phase-enriched protein	0	2	3	2	7	6	7	1	4	-	-	-	-
<b>ACO1</b>	Aconitase; expression greater in high iron; 2 upstream CCAAT motifs; amino acid starvation (3-AT), amphotericin B, phagocytosis, farnesol induced; fluconazole-downregulated; Gcn4p-regulated; Hap43p-repressed; antigenic in infection	1	10	8	3	14	15	15	6	4	-	-	-	-
<b>ACS2</b>	Acetyl-CoA synthetase; antigenic during human and murine infection; upregulated by Efg1p; macrophage-induced protein; soluble protein in hyphae; gene contains an intron	2	6	3	3	14	13	12	13	4	7	7	8	3
<b>ACT1</b>	Actin; gene has intron; transcriptionally regulated by growth phase and by starvation; localizes to polarized growth site in budding and hyphal cells; required for wild-type Cdc42p localization; unprocessed N terminus; induced by Hap43p	8	9	5	3	16	15	15	18	4	15	7	10	3
<b>ADE17</b>	5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribotide transformylase, enzyme of adenine biosynthesis; antigenic in human; soluble protein in hyphae; not induced during GCN response, in contrast to the <i>S. cerevisiae</i> ortholog	2	4	0	2	16	19	16	12	4	6	3	5	3
<b>ADH5</b>	Putative alcohol dehydrogenase; regulated by white-opaque switching; fluconazole-induced; antigenic in murine infection; regulated by Nrg1p, Tup1p; Hap43p-repressed, macrophage-downregulated protein; biofilm- and planktonic growth-induced	-	-	-	-	4	3	4	0	3	-	-	-	-
<b>AHP1</b>	Putative alkyl hydroperoxide reductase; immunogenic in mouse; biofilm-induced; fluconazole-induced; amphotericin B, caspofungin, alkaline downregulated; induced in core stress response; regulated by Ssk1p, Nrg1p, Tup1p, Ssn6p, Hog1p, Hap43p	2	6	2	3	8	7	8	7	4	5	5	5	3
<b>ATP2</b>	F1 beta subunit of F1FO ATPase complex; antigenic in human, mouse; induced by ciclopirox olamine; flucytosine; caspofungin repressed; macrophage/pseudohyphal-induced; detected during exponential and stationary growth phases	4	8	6	3	15	13	14	7	4	-	-	-	-
<b>CEF3</b>	Translation elongation factor 3; antigenic in humans; predicted C-term nucleotide-binding active site; protein on surface of yeast, not hyphae; polystyrene adherence induced; higher protein amount in stationary phase; possibly essential	15	17	19	3	30	33	27	42	4	27	19	23	3
<b>DDR48</b>	Immunogenic stress-associated protein; regulated by filamentous growth pathways; induced by benomyl, caspofungin, ketoconazole or in azole-resistant strain; Hog1p, farnesol, alkaline downregulated; stationary phase enriched; biofilm-induced	10	7	5	3	13	11	11	19	4	10	1	6	3
<b>EFB1</b>	Translation elongation factor EF-1 beta; downregulated in the presence of human whole blood or PMNs; macrophage/pseudohyphal-induced; antigenic in mouse; farnesol-downregulated; the snoRNA snR18 is encoded within the EFB1 intron	0	4	3	2	5	6	5	6	4	6	6	5	3
<b>EFT2</b>	Elongation Factor 2 (eEF2); GTPase; essential; highly expressed; target of sordarin antifungals; antigenic in human/mouse; lacks site for regulatory phosphorylation by eEF2 kinase; GCN-regulated; higher protein amount in stationary phase	9	16	14	3	24	25	23	20	4	16	17	15	3

<b>FBA1</b>	Putative fructose-bisphosphate aldolase, enzyme of glycolysis; antigenic in murine/human infection; regulated by yeast-hyphal switch; induced by Efg1p, Gcn4p, Hog1p, biofilm, planktonic growth, or fluconazole; phagocytosis-repressed	5	14	6	3	18	16	18	21	4	19	13	18	3
<b>GND1</b>	Putative 6-phosphogluconate dehydrogenase; soluble in hyphae; farnesol-, macrophage-induced protein; antigenic in mice; dual localization to cytosol and peroxisomes depends on alternative splicing	4	10	6	3	15	16	19	17	4	16	16	7	3
<b>GPM1</b>	Phosphoglycerate mutase; surface protein that binds host complement Factor H and FHL-1; antigenic in murine/human infection; biofilm-, fluconazole-, or amino acid starvation (3-AT) induced, farnesol-downregulated; biofilm, Hap43p-induced	1	6	6	3	5	5	6	12	4	-	-	-	-
<b>GRE3</b>	Putative D-xylose reductase; antigenic in murine systemic infection; soluble protein in hyphae; transcriptionally induced by macrophage interaction and by Mnl1p under weak acid stress; farnesol-induced; stationary-phase enriched protein	3	7	3	3	2	4	4	8	4	6	0	1	2
<b>GRP2</b>	Methylglyoxal reductase; regulation associated with azole resistance; induced in core stress response or by oxidative stress (via Cap1p), fluphenazine, benomyl, or with long term fluconazole treatment; Hap43p-induced; antigenic in humans	2	9	4	3	2	6	5	15	4	6	3	4	3
<b>HXK2</b>	Hexokinase II; antigenic in humans; downregulated by human neutrophils; Efg1p-regulated; biofilm, fluconazole-induced; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p; protein present in exponential and stationary growth phases	9	15	5	3	12	10	13	28	4	19	13	17	3
<b>ILV5</b>	Ketol-acid reductoisomerase; antigenic in human/murine infection; regulated by Gcn4p; GlcNAc, amino acid starvation (3-AT)-induced; biofilm induced; macrophage-downregulated protein; protein present in exponential and stationary phase	5	8	4	3	9	10	6	7	4	-	-	-	-
<b>IMH3</b>	Inosine monophosphate (IMP) dehydrogenase; enzyme of GMP biosynthesis; target of mycophenolic acid and mizoribine monophosphate; antigenic during infection; downregulated in core stress response; snoRNA snR54 encoded within IMH3 intron	-	-	-	-	5	5	6	6	4	-	-	-	-
<b>INO1</b>	Inositol-1-phosphate synthase; inositol biosynthesis; antigenic in human; repressed by farnesol in biofilm or by caspofungin; regulated during biofilm, planktonic growth; upstream inositol/choline regulatory element; glycosylation predicted	1	4	0	2	19	20	17	10	4	13	10	12	3
<b>IPP1</b>	Putative inorganic pyrophosphatase; antigenic; soluble protein in hyphae; macrophage-induced protein; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; possibly an essential gene (UAU1 method); sumoylation target	8	12	6	3	12	12	14	15	4	10	9	9	3
<b>LEU1</b>	3-isopropylmalate dehydratase; antigenic in humans; decreased expression in hyphae vs yeast cells; alkaline downregulated; upregulated by human whole blood or PMN cells; regulated by Sef1p-, Sfu1p-, and Hap43p	-	-	-	-	4	2	4	1	4	-	-	-	-
<b>LPD1</b>	Putative dihydrolipoamide dehydrogenase; soluble in hyphae; antigenic in human oral infection and murine systemic infection; macrophage-induced protein; protein present in exponential and stationary phase yeast cultures; Hap43p-repressed	0	1	7	2	8	5	6	1	4	-	-	-	-
<b>MDH1</b>	Malate dehydrogenase, mitochondrial; transcription regulated by Mig1p, Tup1p, white-opaque switching; induced in high iron, biofilm; regulated upon phagocytosis; antigenic during murine and human infection	1	4	4	3	5	8	5	14	4	12	1	2	3

<b>MET15</b>	O-acetylhomoserine O-acetylserine sulfhydrylase; involved in sulfur amino acid biosynthesis; immunogenic; Hog1p, biofilm, possibly adherence-induced; brown colony color of homozygous mutant in Pb(2+) medium is visual selection marker	3	5	0	2	7	8	7	7	4	8	4	5	3
<b>MET6</b>	Essential 5-methyltetrahydropteroyltryglutamate-homocysteine methyltransferase (cobalamin-independent methionine synthase); antigenic during murine or human systemic infection; heat shock, estrogen, possibly biofilm, and GCN-induced	4	8	8	3	18	24	21	34	4	27	16	12	3
<b>MSI3</b>	Essential antigenic HSP70 family protein, required for fluconazole resistance and calcineurin-dependent transcription; interacts with Cgr1p; transcriptionally regulated by iron; farnesol downregulated in biofilm; sumoylation target	4	5	4	3	22	22	21	14	4	12	3	4	3
<b>NOT5</b>	Protein with similarity to <i>S. cerevisiae</i> Not5p, a member of the transcription regulatory CCR4-NOT complex; required for hyphal growth; antigenic during human oral infection; greater expression in yeast-form cells than hyphae	-	-	-	-	2	2	2	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.1946</b>	Similar to an aldose 1-epimerase-related protein; antigenic during murine systemic infection; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; Hap43p-induced gene	2	6	0	2	3	4	4	3	4	-	-	-	-
<b>PDI1</b>	Putative protein disulfide-isomerase; antigenic in human infection; soluble protein in hyphae; transcription induced upon filamentous growth; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	3	7	8	3	19	20	17	6	4	15	10	10	3
<b>PGI1</b>	Putative glucose-6-phosphate isomerase, enzyme of glycolysis; antigenic in human; Efg1p-regulated; induced in biofilm, upon adherence to polystyrene; downregulated by human neutrophils, upon phagocytosis	7	19	9	3	12	17	15	21	4	20	7	7	3
<b>PIL1</b>	Eisosome component with a predicted role in endocytosis; echinocandin-binding protein; localizes to cell surface of hyphae, but not yeast-form cells; biofilm induced; fungal-specific (no human/murine homolog); Hap43p-induced	8	10	8	3	16	16	16	13	4	10	3	7	3
<b>POR1</b>	Mitochondrial outer membrane porin; in detergent-resistant membrane fraction (possible lipid raft component); antigenic in human, mouse; Hap43p-induced; flucytosine-, macrophage-, farnesol-induced; fluconazole, caspofungin repressed	-	-	-	-	1	1	3	0	3	-	-	-	-
<b>QCR2</b>	Ubiquinol-cytochrome-c reductase; antigenic; induced by interaction with macrophage; repressed by nitric oxide; in detergent-resistant membrane fraction (possible lipid raft component); levels decrease in stationary phase; Hap43p-repressed	0	1	5	2	3	3	5	0	3	-	-	-	-
<b>RPL13</b>	Putative ribosomal subunit; antigenic during murine systemic infection; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	4	5	2	3	7	6	7	8	4	2	1	2	3
<b>RPP0</b>	Putative ribosomal protein; antigenic in mouse; biofilm induced; cytoplasmic ribosomal subunit, translation factor, tRNA synthetase genes are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; induced by Tbf1p; overlaps orf19.7014	5	7	6	3	9	11	9	7	4	6	4	3	3
<b>SAH1</b>	Putative S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase; predicted enzyme of sulfur amino acid metabolism; antigenic in human; biofilm-, alkaline-, fluconazole-induced expression; Gcn4p-regulated; amino acid starvation (3-AT) repressed	8	16	9	3	21	21	18	19	4	14	7	6	3

<b>SAM2</b>	S-adenosylmethionine synthetase, localizes to surface of hyphal cells, but not yeast-form cells; possible biofilm-induced expression (reports differ); alkaline upregulated; Hog1p-induced; farnesol-downregulated	4	7	2	3	9	11	13	14	4	6	4	6	3
<b>SEC13</b>	Putative protein transport factor; antigenic during murine systemic infection; macrophage-downregulated protein abundance; protein level decreases in stationary phase cultures	-	-	-	-	2	2	2	0	3	-	-	-	-
<b>SHM2</b>	Cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase; complements glycine auxotrophy of <i>S. cerevisiae</i> shm1 shm2 gly1-1 triple mutant; antigenic in human; soluble protein in hyphae; farnesol-upregulated in biofilm; stationary-phase enriched protein	-	-	-	-	11	12	15	3	4	3	2	6	3
<b>TIF</b>	Translation initiation factor; upregulated in highly virulent strain compared to less virulent strain; antigenic in human; flucytosine induced; translation-related genes are downregulated upon phagocytosis	4	10	7	3	11	11	9	14	4	10	5	0	2
<b>TOS1</b>	Protein similar to alpha agglutinin anchor subunit; secreted; exogenously expressed protein is a substrate for Kex2p processing in vitro; fluconazole-induced; induced by alpha pheromone in SpiderM medium; Hap43p-induced	11	9	10	3	9	10	10	9	4	4	6	0	2
<b>TPI1</b>	Triose-phosphate isomerase; antigenic in mouse or human; mutation affects filamentous growth; biofilm-induced; macrophage-downregulated protein; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; possibly essential	10	11	6	3	6	10	11	17	4	9	5	0	2
<b>YST1</b>	Ribosome-associated protein; antigenic in mice; complements <i>S. cerevisiae</i> yst1 yst2 mutant; similar to laminin-binding proteins, does not bind laminin; predicted S/T phosphorylation, N-glycosylation, myristoylation, Hap43p-, Gcn4p-regulated	5	5	5	3	9	9	7	9	4	5	0	0	1
<b>ZWF1</b>	Putative glucose-6-phosphate dehydrogenase; antigenic in murine infection; activity induced by O2 or oxidizing agents H2O2 or menadione; caspofungin repressed; macrophage induced; induced in core stress response; regulated by Gcn2p, Gcn4p	-	-	-	-	3	5	3	4	4	-	-	-	-

**ANEXO 5: PROTEINAS ESPECIFICAS DE HONGOS**

Proteína	Descripcion	LEVADURAS				HIFAS					HIFAS 10%S			
		1	2	3	Nº exp	1	2	3	4	Nº exp	1	2	3	Nº exp
<b>ADE1</b>	Phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase, enzyme of adenine biosynthesis; not induced in GCN response, unlike the <i>S. cerevisiae</i> ortholog; fungal-specific (no human or murine homolog); levels decrease in stationary phase	1	7	0	2	3	5	6	4	4	-	-	-	-
<b>ADH2</b>	Alcohol dehydrogenase; soluble in hyphae; fungal-specific; expression regulated by white-opaque switching; regulated by Ssn6p; transcriptionally induced by Mnl1p by weak acid stress; protein enriched in stationary phase yeast cultures	4	3	7	3	7	5	4	8	4	3	3	3	3
<b>ARO1</b>	Putative pentafunctional arom enzyme; fungal-specific (no human or murine homolog); Gcn2p-, Gcn4p-regulated	-	-	-	-	8	7	7	5	4	-	-	-	-
<b>ARO2</b>	Putative chorismate synthase; fungal-specific (no human or murine homolog); protein level decreased in stationary phase yeast cultures; GlcNAc-induced protein	-	-	-	-	2	1	3	2	4	-	-	-	-
<b>ARO7</b>	Putative chorismate mutase; fungal-specific (no human or murine homolog); alkaline upregulated	-	-	-	-	2	2	0	3	3	-	-	-	-
<b>FMP27</b>	Putative mitochondrial protein; mRNA binds She3p; fungal-specific (no human or murine homolog)	1	1	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>GDH2</b>	Putative NAD-specific glutamate dehydrogenase; fungal-specific (no human or murine homolog); transcription is regulated by Nrg1p, Mig1p, Tup1p, and Gcn4p; stationary phase enriched protein; biofilm-induced	-	-	-	-	5	2	3	0	3	-	-	-	-
<b>GNP1</b>	Protein similar to asparagine and glutamine permease; fluconazole or caspofungin induced; transcription is regulated by Nrg1p, Mig1p, Tup1p, Gcn2p, Gcn4p, and alkaline regulated by Rim101p; biofilm-induced; fungal-specific	-	-	-	-	1	2	3	0	3	-	-	-	-
<b>HIS7</b>	Putative imidazole glycerol phosphate synthase; histidine biosynthesis; no human/murine homolog; transcription induced by histidine starvation; regulated by Gcn2p and Gcn4p; higher protein level in stationary phase	2	3	0	2	1	3	0	3	3	-	-	-	-
<b>HOM3</b>	Putative L-aspartate 4-P-transferase; fungal-specific (no human or murine homolog); regulated by Gcn2p and Gcn4p; early-stage biofilm-induced gene	-	-	-	-	2	2	1	2	4	-	-	-	-
<b>LEU42</b>	Putative alpha-isopropylmalate synthase; fungal-specific (no human/murine homolog); upregulated in the presence of human blood or polymorphonuclear cells; regulated by Gcn2p and Gcn4p; stationary phase enriched protein	-	-	-	-	1	1	0	3	3	-	-	-	-
<b>LYS1</b>	Saccharopine dehydrogenase (biosynthetic); enzyme of alpha-amino adipate lysine biosynthesis pathway; functionally complements <i>S. cerevisiae</i> lys1 mutation; fungal-specific (no human or murine homolog)	2	5	0	2	7	9	6	7	4	1	1	1	3
<b>MCA1</b>	Putative cysteine protease with similarity to <i>S. cerevisiae</i> Mca1p; has a role in apoptotic cell death upon H2O2 treatment; fungal-specific (no human or murine homolog); farnesol-induced	-	-	-	-	1	0	1	1	3	-	-	-	-
<b>NDE1</b>	Putative NADH dehydrogenase that could act alternatively to complex I in respiration; caspofungin repressed; fungal-specific (no human or murine homolog); transcription is upregulated in both intermediate and mature biofilms	-	-	-	-	2	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.2269</b>	Putative 3-phosphoserine phosphatase; fungal-specific (no human or murine homolog); increased transcription observed upon benomyl treatment or in an azole-resistant strain that overexpresses MDR1; early-stage biofilm-induced	-	-	-	-	2	3	3	5	4	-	-	-	-

<b>OSM1</b>	Putative flavoprotein subunit of fumarate reductase; soluble protein in hyphae; fungal-specific (no human or murine homolog); caspofungin repressed; stationary phase enriched protein; biofilm-induced gene	-	-	-	-	4	3	5	6	4	-	-	-	-
<b>PHM7</b>	Putative transporter; fungal-specific (no human or murine homolog); Hog1p-downregulated; downregulated in response to 17-beta-estradiol, ethynyl estradiol; Hap43p-induced gene	-	-	-	-	3	2	1	0	3	-	-	-	-
<b>PST3</b>	Putative flavodoxin; biofilm induced; fungal-specific (no human or murine homolog); stationary phase enriched protein	-	-	-	-	1	2	1	2	4	3	3	3	3
<b>RGD3</b>	Putative Rho GTPase activating protein; fungal-specific (no human or murine homolog)	-	-	-	-	1	1	2	1	4	-	-	-	-
<b>RIB5</b>	Putative riboflavin synthase; fungal-specific (no human or murine homolog); farnesol-downregulated; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	-	-	-	-	2	2	0	0	2	-	-	-	-
<b>SCT1</b>	Putative glycerol-3-phosphate O-acyltransferase; fungal-specific (no human or murine homolog)	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>SVF1</b>	Putative survival factor; stationary phase enriched protein; fluconazole-induced; regulated by Gcn4p; repressed in response to amino acid starvation (3-AT treatment); fungal-specific (no human or murine homolog)	-	-	-	-	2	1	3	1	4	-	-	-	-
<b>YCP4</b>	Putative flavodoxin; fungal-specific (no human or murine homolog)	-	-	-	-	2	2	3	1	4	-	-	-	-

**ANEXO 6: PROTEINAS RELACIONADAS CON ANTIFUNGICOS**

Proteína	Descripcion	LEVADURAS				HIFAS					HIFAS 10%S			
		1	2	3	Nº exp	1	2	3	4	Nº exp	1	2	3	Nº exp
<b>AAT1</b>	Aspartate aminotransferase; soluble protein in hyphae; macrophage-induced protein; alkaline upregulated; amphotericin B repressed; gene used for strain identification by multilocus sequence typing; farnesol-, Hap43p-induced; GlcNAc-induced	0	4	3	2	3	7	4	0	3	-	-	-	-
<b>ABP1</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Abp1p, which is an actin-binding protein of the cortical actin cytoskeleton; caspofungin induced; protein only detected in stationary phase yeast-form cultures	2	6	0	2	14	12	13	13	4	5	6	9	3
<b>ACB1</b>	Protein similar to a region of acyl-coenzyme-A-binding protein; amphotericin B repressed; regulated by Nrg1p, Tup1p; Hap43p-induced	1	2	2	3	4	5	5	3	4	2	2	2	3
<b>ACC1</b>	Putative acetyl-coenzyme-A carboxylases; regulated by Efg1p; amphotericin B repressed; caspofungin repressed; intron in 5'-UTR; gene used for strain identification by multilocus sequence typing; Hap43p-induced gene	2	2	3	3	32	40	34	25	4	7	5	8	3
<b>ACS1</b>	Putative acetyl-CoA synthetase; upregulated by human neutrophils; fluconazole-downregulated; regulated by Nrg1p and Mig1p; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p; only detected in stationary phase cultures; biofilm-induced	-	-	-	-	3	3	0	2	3	-	-	-	-
<b>ADO1</b>	Adenosine kinase; heterozygous null mutant exhibits resistance to cordycepin in the <i>C. albicans</i> fitness test; ketoconazole-induced; protein level decreased in stationary phase cultures; sumoylation target	6	10	5	3	7	8	8	9	4	5	4	4	3
<b>ALD5</b>	NAD-aldehyde dehydrogenase; decreased expression in fluconazole-resistant isolate, or in hyphae; biofilm induced; fluconazole-downregulated; protein abundance is affected by URA3 expression in the CAI-4 strain; stationary phase enriched	1	4	8	3	10	9	10	9	4	-	-	-	-
<b>ATP3</b>	F1-ATP synthase complex subunit; caspofungin repressed; flucytosine and macrophage/pseudohyphal-induced; present in exponential and stationary growth phases; Hap43p-induced gene	-	-	-	-	2	2	2	0	3	-	-	-	-
<b>ATP5</b>	Putative FO-ATP synthase FO subunit B; caspofungin repressed; protein level decreased in stationary phase yeast cultures	0	2	5	2	7	7	4	1	4	-	-	-	-
<b>CAR2</b>	Ornithine aminotransferase; role in arginine metabolism; alkaline upregulated; mutation confers hypersensitivity to toxic ergosterol analog and to amphotericin B; present in exponential and stationary phase yeast cultures; biofilm-induced	6	7	6	3	3	6	6	9	4	2	2	2	3
<b>CAT1</b>	Catalase; resistance to oxidative stress, neutrophils, peroxide; role in virulence; regulated by iron, ciclopirox, fluconazole, carbon source, pH, Rim101p, Ssn6p, Hog1p, Hap43p, Sfu1p, Sef1p, farnesol, core stress response	-	-	-	-	3	2	3	0	3	-	-	-	-
<b>CDC3</b>	Septin; essential for viability; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Cdc3p; down-regulation associated with azole resistance; macrophage/pseudohyphal-repressed; virulence-group-correlated expression; gene has intron	-	-	-	-	16	14	18	7	4	4	3	4	3
<b>CDC60</b>	Cytosolic leucyl tRNA synthetase; conserved amino acid and ATP binding class I signature, tRNA binding, proofreading motifs; likely essential for growth; interacts with benzoxaborole antifungals; present in exponential and stationary phase	1	5	3	3	11	13	9	8	4	4	1	4	3
<b>COX13</b>	Cytochrome c oxidase; flucytosine induced; repressed by nitric oxide	-	-	-	-	2	3	2	0	3	-	-	-	-

<b>CRM1</b>	Functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Crm1p, which acts in protein nuclear export; predicted to be resistant to antifungal drug leptomycin B; partially suppresses signal transduction defects of <i>S. cerevisiae</i> ste20 mutant	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>CYS3</b>	Cystathionine gamma-lyase; upregulated by alkaline, biofilm, amphotericin B, heavy metal (cadmium) stress, oxidative stress (via Cap1p); possibly adherence-induced; Hog1p regulated; levels decrease in stationary phase yeast cells	-	-	-	-	5	4	6	5	4	3	2	3	3
<b>DAG7</b>	Secretory protein; alpha-factor induced gene; mutation confers hypersensitivity to toxic ergosterol analog; a-specific transcription; planktonic growth-induced; fluconazole-induced	2	0	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>DAK2</b>	Putative dihydroxyacetone kinase; transcription decreases upon yeast-hyphal switch; fluconazole-induced; caspofungin repressed; protein enriched in stationary phase yeast cultures; biofilm- and planktonic growth-induced gene	3	7	1	3	7	5	7	10	4	2	3	1	3
<b>DAP1</b>	Similar to mammalian membrane-associated progesterone receptors involved in DNA damage response; induced in core stress response; Hog1p regulated; clade-associated expression; Hap43p-repressed; planktonic growth-induced gene	-	-	-	-	1	2	0	1	3	-	-	-	-
<b>DBP2</b>	Putative DEAD-box family ATP-dependent RNA helicase; flucytosine induced; downregulated in core stress response	-	-	-	-	4	3	4	2	4	-	-	-	-
<b>DEF1</b>	Regulator of RNA polymerase II; required for filamentous growth and epithelial cell escape, dissemination in RHE model; induced by fluconazole, high cell density; Efg1p/hyphally regulated; role in adhesion and hyphal growth on solid surface	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>ECE1</b>	Hyphal-specific protein; expression increases with extent of cell elongation; regulated by Rfg1p, Nrg1p, Tup1p, Cph1p, Efg1p, Hog1p, farnesol, phagocytosis; fluconazole-induced; may contribute to biofilm formation	-	-	-	-	16	19	16	6	4	5	15	14	3
<b>ERG1</b>	Squalene epoxidase, catalyzes epoxidation of squalene to 2,3(S)-oxidosqualene in the ergosterol biosynthesis; target of allylamine antifungal drugs; uses NADH as a reducing cofactor, while <i>S. cerevisiae</i> Erg1p uses NADPH; biofilm-induced	-	-	-	-	2	1	2	0	3	-	-	-	-
<b>ERG10</b>	Acetyl-CoA acetyltransferase; role in ergosterol biosynthesis; soluble in hyphae; changes in protein abundance associated with azole resistance; fluconazole or ketoconazole induced; macrophage-downregulated protein; GlcNAc-induced protein	0	2	5	2	8	9	7	4	4	4	3	3	3
<b>ERG11</b>	Lanosterol 14-alpha-demethylase, cytochrome P450 family member, role in ergosterol biosynthesis; target of azole antifungals; may contribute to drug resistance; azole- or biofilm-induced; drug treated biofilm induced; hypoxia regulated	-	-	-	-	2	1	4	0	3	-	-	-	-
<b>ERG13</b>	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase; ergosterol biosynthesis protein; sumoylation target; transposon mutation affects filamentous growth; amphotericin B, caspofungin repressed; exponential and stationary growth phase expressed	1	3	0	2	11	7	7	9	4	3	0	3	2
<b>ERG4</b>	Protein similar to sterol C-24 reductase; shows Mob2p-dependent hyphal regulation; fluconazole-induced; caspofungin repressed	-	-	-	-	1	1	2	1	4	-	-	-	-
<b>ERG6</b>	Delta(24)-sterol C-methyltransferase, converts zymosterol to fecosterol in ergosterol biosynthesis by methylating C-24; mutation confers nystatin resistance; Hap43p, fluconazole-induced; upregulated in azole-resistant strain; GlcNAc-induced	-	-	-	-	6	7	8	7	4	-	-	-	-

<b>ERG9</b>	Putative farnesyl-diphosphate farnesyl transferase (squalene synthase) involved in the sterol biosynthesis pathway; likely to be essential for growth; regulated by fluconazole and lovastatin; amphotericin B, caspofungin repressed	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>FAS1</b>	Beta subunit of fatty-acid synthase; multifunctional enzyme; fluconazole-induced; Hap43p-induced; amphotericin B, caspofungin repressed; macrophage/pseudohyphal-induced; fungal-specific (no human or murine homolog)	2	4	9	3	38	42	41	6	4	1	1	5	3
<b>FAS2</b>	Alpha subunit of fatty-acid synthase; required for virulence in mouse systemic infection and rat oropharyngeal infection models; regulated by Efg1p; fluconazole-induced; amphotericin B repressed	1	2	4	3	34	34	34	16	4	2	1	3	3
<b>FDH1</b>	Formate dehydrogenase, oxidizes formate to produce CO <sub>2</sub> ; Mig1p regulated; induced by macrophages; fluconazole-downregulated; downregulated by Efg1p under yeast, not hyphal, growth conditions; predicted cytosolic; stationary phase enriched	3	3	3	3	5	4	3	10	4	-	-	-	-
<b>FET3</b>	Multicopper oxidase; required for growth in low-iron; required for prostaglandin E2 production; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Fet3p; ketoconazole, caspofungin, amphotericin B repressed; regulated by Sef1p, Sfu1p, and Hap43p	3	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>FRP3</b>	Putative ammonium transporter; upregulated in the presence of human neutrophils; fluconazole-downregulated; repressed by nitric oxide	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>FUM12</b>	Putative fumarate hydratase, enzyme of citric acid cycle; fluconazole-downregulated; downregulated by Efg1p; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; protein present in exponential and stationary growth phase	-	-	-	-	3	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>GAD1</b>	Putative glutamate decarboxylase; alkaline, macrophage-downregulated gene; amphotericin B induced; transcriptionally activated by Mnl1p under weak acid stress; stationary phase enriched protein	-	-	-	-	0	1	1	8	3	-	-	-	-
<b>GIS2</b>	Putative transcription factor; expression is increased in high iron and reduced upon yeast-hyphal switch; null mutant exhibits sensitivity to sorbitol, 5-fluorocytosine, and cold temperatures	3	4	4	3	5	4	6	2	4	1	3	3	3
<b>GLK1</b>	Putative glucokinase; transcription regulated upon yeast-hyphal switch; regulated by Efg1p; fluconazole-induced; induced in core stress response; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p; GlcNAc-induced protein	0	3	1	2	2	5	6	2	4	-	-	-	-
<b>GRX3</b>	Putative glutaredoxin; flucytosine induced; regulated by Gcn4p; repressed in response to amino acid starvation (3-aminotriazole treatment)	-	-	-	-	3	2	3	2	4	-	-	-	-
<b>GUA1</b>	Putative GMP synthase, involved in the final step of guanine biosynthesis; soluble protein in hyphae; flucytosine induced; macrophage-downregulated protein abundance; protein level decreases in stationary phase cultures	2	4	0	2	6	7	5	4	4	-	-	-	-
<b>HGT6</b>	Putative high-affinity major facilitator superfamily glucose transporter; 20 family members; 12 probable membrane-spanning segments; core stress response, fluconazole-induced; biofilm-induced; induced in oralpharyngeal candidiasis	2	2	0	2	4	3	4	0	3	2	3	2	3
<b>HGT7</b>	Putative glucose transporter, major facilitator superfamily; glucose-, fluconazole-, Snf3p-induced, expressed at high glucose; upregulated in biofilm; <i>C. albicans</i> glucose transporter family comprises 20 members; 12 TM regions predicted	-	-	-	-	4	4	4	3	4	-	-	-	-
<b>HHF1</b>	Putative histone H4; reduced mRNA in homozygous fkh2 null mutant; regulated by Efg1p; fluconazole induced; amphotericin B repressed; farnesol regulated; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p; Hap43p-induced gene	-	-	-	-	1	2	1	2	4	-	-	-	-

<b>HMG1</b>	HMG-CoA reductase; enzyme of sterol pathway; inhibited by lovastatin; gene not transcriptionally regulated in response to lovastatin and fluconazole	-	-	-	-	1	2	1	2	4	-	-	-	-
<b>HOG1</b>	MAP kinase of osmotic-, heavy metal-, and core stress response; role in regulation of glycerol, D-arabitol in response to stress; phosphorylated in response to H2O2 (Ssk1p-dependent) or NaCl; mutant induces protective mouse immune response	-	-	-	-	2	2	2	4	4	-	-	-	-
<b>HSP12</b>	Heat-shock protein; induced upon osmotic/oxidative/cadmium stress, fluphenazine treatment, low iron, CDR1 and CDR2 overexpression, or ssn6 or ssk1 homozygous null mutation; repressed by Hog1p, flucytosine, elevated CO2	8	8	6	3	8	8	8	17	4	7	4	5	3
<b>HTA1</b>	Histone H2A; reduced mRNA abundance detected in homozygous fkh2 null mutant; amphotericin B repressed; farnesol regulated; RNA abundance regulated by tyrosol and cell density; Hap43p-induced gene	-	-	-	-	2	3	0	0	2	3	0	3	2
<b>IFE2</b>	Putative alcohol dehydrogenase; decreased expression in hyphae compared to yeast-form cells; Efg1p-regulated; fluconazole-induced; Hog1p-induced; increased expression in response to prostaglandins	1	3	1	3	2	2	3	0	3	1	1	1	3
<b>ILS1</b>	Putative isoleucyl-tRNA synthetase, the target of drugs including the cyclic beta-amino acid icofungipen/PLD-118/BAY-10-8888 and mupirocin; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	1	2	2	3	9	7	10	5	4	-	-	-	-
<b>KRE30</b>	YEF3-subfamily ABC family protein, predicted not to be a transporter; downregulated during core stress response; mutation confers hypersensitivity to amphotericin B	2	2	0	2	5	5	6	4	4	-	-	-	-
<b>LAG1</b>	Putative ceramide synthase component; Hap43p-repressed gene; amphotericin B repressed	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>LSC1</b>	Putative succinate-CoA ligase subunit; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; fluconazole-induced; f protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	1	2	3	3	4	5	5	3	4	-	-	-	-
<b>LSP1</b>	Eisosome component with a predicted role in endocytosis; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; caspofungin repressed; biofilm induced; fungal-specific (no human/murine homolog); sumoylation target	8	11	8	3	14	11	15	16	4	11	4	8	3
<b>LYS21</b>	Putative homocitrate synthase of lysine biosynthesis; expression increased in a fluconazole-resistant isolate; colony morphology-related gene regulation by Ssn6p; ketoconazole-repressed; regulated by Gcn2p, Gcn4p, Hap43p	-	-	-	-	7	6	8	8	4	-	-	-	-
<b>LYS9</b>	Putative enzyme of lysine biosynthesis; soluble protein in hyphae; amphotericin B repressed; Gcn4p-regulated; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cells	-	-	-	-	4	6	5	4	4	-	-	-	-
<b>MBF1</b>	Putative transcriptional coactivator; caspofungin repressed	1	1	2	3	2	2	4	3	4	-	-	-	-
<b>MET3</b>	ATP sulfurlyase of sulfate assimilation; repressed by Met or Cys, Sfu1p, or in fluconazole-resistant isolate; strongly induced on biofilm formation, even in presence of Met and Cys; Hog1p-, caspofungin-, white phase-induced	-	-	-	-	4	4	6	2	4	-	-	-	-
<b>MIR1</b>	Putative mitochondrial phosphate transporter; caspofungin repressed; expression is increased in a fluconazole-resistant isolate; induced upon adherence to polystyrene	1	1	1	3	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>MIS11</b>	Similar to precursor of mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase; putative protein of glycine catabolism; downregulated by Efg1p; fluconazole-induced; stationary phase enriched protein	2	3	1	3	11	10	14	8	4	-	-	-	-
<b>MRF1</b>	Putative mitochondrial respiratory protein; induced by farnesol, benomyl treatment, nitric oxide, core stress response; oxidative stress-induced via Cap1p; stationary-phase enriched protein	-	-	-	-	1	2	1	2	4	-	-	-	-

<b>MVD</b>	Mevalonate diphosphate decarboxylase; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Erg19p; possible drug target; transcriptionally regulated by carbon source, yeast-hyphal switch, growth phase, antifungals; gene has intron	-	-	-	-	2	3	3	1	4	-	-	-	-
<b>MXR1</b>	Putative methionine sulfoxide reductase; flucytosine induced; Plc1p-regulated; upregulated in the presence of human neutrophils; macrophage regulated (gene induced, protein decreased); possibly adherence-induced	-	-	-	-	2	1	2	2	4	2	1	2	3
<b>NCP1</b>	NADPH-cytochrome P450 reductase, acts with Erg11p in sterol 14 alpha-demethylation in ergosterol biosynthesis; subject to hypoxic regulation; ketoconazole-induced; caspofungin repressed	-	-	-	-	3	2	2	0	3	-	-	-	-
<b>NHP6A</b>	Putative non-histone chromatin component; RNA abundance regulated by tyrosol and cell density; Hap43p-induced; amphotericin B, caspofungin repressed; intron in 5'-UTR	1	2	1	3	2	2	2	4	4	3	2	2	3
<b>NMT1</b>	Myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase; attaches the fatty acid myristate to a small number of proteins at an N-terminal Gly; essential; antifungal drug target; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Nmt1p	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>NOPI</b>	Nucleolar protein; flucytosine induced; Hap43p-induced gene	1	1	2	3	4	4	3	6	4	-	-	-	-
<b>OLE1</b>	Fatty acid desaturase, essential protein involved in oleic acid synthesis; required for aerobic hyphal growth and chlamyospore formation; subject to hypoxic regulation; fluconazole-induced; caspofungin repressed; Hap43p-induced	-	-	-	-	5	4	2	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.1902</b>	Putative nucleolar protein; Hap43p-induced gene; mutation confers resistance to 5-fluorocytosine (5-FC), 5-fluorouracil (5-FU), and tubercidin (7-deazaadenosine)	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.2296</b>	Protein with similarity to mucins; ketoconazole-induced; fluconazole-downregulated; mRNA abundance increased in a <i>cyr1</i> mutant than in wild type; colony morphology-related gene regulation by <i>Ssn6p</i> ; late-stage biofilm-induced	11	19	7	3	21	19	19	34	4	11	0	3	2
<b>orf19.2452</b>	Transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; downregulated in core caspofungin response; ketoconazole-repressed; shows colony morphology-related gene regulation by <i>Ssn6p</i> ; possibly subject to <i>Kex2p</i> processing	-	-	-	-	1	3	0	0	2	-	-	-	-
<b>orf19.2622</b>	Protein required for resistance to toxic ergosterol analog	1	2	1	3	8	8	8	7	4	-	-	-	-
<b>orf19.3260</b>	Ortholog(s) have phosphopantothienoylcysteine decarboxylase activity, role in coenzyme A biosynthetic process, response to salt stress and phosphopantothienoylcysteine decarboxylase complex localization	-	-	-	-	0	2	1	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.337</b>	Ortholog(s) have SNAP receptor activity and role in Golgi to vacuole transport, intra-Golgi vesicle-mediated transport, vacuole fusion, non-autophagic, vesicle fusion	-	-	-	-	3	3	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.3475</b>	Described as a Gag-related protein; hyphal induced; downregulation correlates with clinical development of fluconazole resistance; repressed by nitric oxide, 17-beta-estradiol, ethynyl estradiol	3	6	4	3	5	7	5	4	4	5	4	3	3
<b>orf19.3499</b>	Secreted protein; Hap43p-repressed; fluconazole-induced; regulated by <i>Tsa1p</i> , <i>Tsa1Bp</i> under H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> stress conditions; transcriptionally activated by <i>Mnl1p</i> under weak acid stress	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	6	3	2
<b>orf19.3683</b>	AGE3 - Putative ADP-ribosylation factor GTPase activating protein, functional ortholog of <i>S. cerevisiae</i> GCS1; mutation affects endocytosis, hyphal growth, chemical and drug resistance, and sensitivity to cell wall inhibitors	1	3	0	2	3	2	1	3	4	-	-	-	-
<b>orf19.3932</b>	Stationary phase enriched protein; induced in core caspofungin response; induced by nitric oxide independent of <i>Yhb1p</i> ; repressed in a <i>ssr1</i> null mutant; induced by ketoconazole and by hypoxia	2	6	2	3	6	5	6	6	4	4	0	1	2
<b>orf19.4216</b>	Putative Products heat shock protein; decreased expression in hyphae compared to yeast-form cells; transcription is increased in populations of cells exposed to fluconazole over multiple generations	8	8	6	3	8	8	8	17	4	7	4	5	3

<b>orf19.5180</b>	PRX1 - Thioredoxin peroxidase; transcriptionally induced by interaction with macrophage; fluconazole induced; Fkh2p-downregulated; caspofungin repressed; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	4	7	3	3	7	6	7	9	4	-	-	-	-
<b>orf19.5517</b>	Similar to alcohol dehydrogenases; increased transcription is observed upon benomyl treatment; induced by nitric oxide; induced in core stress response; oxidative stress-induced via Cap1p	-	-	-	-	3	2	3	3	4	-	-	-	-
<b>orf19.5947</b>	Putative guanine nucleotide exchange factor (GEF); mutation confers hypersensitivity to Brefeldin A; caspofungin repressed	-	-	-	-	5	5	2	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.6014</b>	Putative ribosome biogenesis and nuclear export protein; Hap43p-induced gene; mutation confers hypersensitivity to 5-fluorocytosine (5-FC), 5-fluorouracil (5-FU), and tubercidin (7-deazaadenosine)	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.6553</b>	Membrane-localized protein; possibly secreted; fluconazole-induced	2	2	0	2	1	1	1	0	3	0	4	3	2
<b>orf19.7034</b>	Ortholog(s) have eukaryotic initiation factor 4E binding activity, role in negative regulation of translation and cytoplasmic stress granule, mRNA cap binding complex localization	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.7160</b>	Ortholog(s) have role in cellular response to oxidative stress, response to osmotic stress, ribosomal small subunit biogenesis and cytosol, nucleus localization	-	-	-	-	0	1	1	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.7310</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Gin3p; transcription is upregulated in response to treatment with ciclopirox olamine; positively regulated by Sfu1p; Hog1p, fluconazole-downregulated; Hap43p-induced	-	-	-	-	2	2	0	0	2	-	-	-	-
<b>orf19.7350</b>	RCT1 - Fluconazole-induced protein; elevated mRNA levels in a <i>cyr1</i> or <i>ras1</i> null mutant and decreased mRNA abundance in <i>efg1</i> null mutant; regulated by Nrg1p, Tup1p, Tbf1p, Ssn6p; induced in oralpharyngeal candidiasis	4	3	2	3	4	6	5	7	4	-	-	-	-
<b>orf19.7368</b>	Ortholog(s) have mRNA binding, poly(U) RNA binding activity and role in nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay, regulation of mRNA stability, stress granule assembly	-	-	-	-	2	3	2	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.7384</b>	Putative GTPase; Hap43p-induced gene; mutation confers hypersensitivity to 5-fluorocytosine (5-FC), 5-fluorouracil (5-FU), and tubercidin (7-deazaadenosine); decreased expression in response to prostaglandins	-	-	-	-	1	1	0	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.7531</b>	Putative protein of unknown function; stationary phase enriched protein; transcription is induced upon yeast-hyphal transition; benomyl or caspofungin induced; Hap43p-repressed gene	-	-	-	-	1	2	2	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.7602</b>	Putative Hsp90p co-chaperone; Hap43p-repressed gene; heavy metal (cadmium) stress-induced; oxidative stress-induced via Cap1p	-	-	-	-	2	2	2	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.822</b>	HSP21 - Small heat shock protein involved in stress response and virulence; detected in some, not all, biofilm extracts; fluconazole-downregulated; transcription induced in <i>cyr1</i> or <i>ras1</i> mutants; stationary phase enriched protein	2	2	0	2	4	3	3	9	4	-	-	-	-
<b>orf19.951</b>	Hap43p-repressed gene; transcription downregulated upon yeast-hyphal switch; fluconazole-induced; biofilm-induced	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>PBS2</b>	MAPK kinase (MAPKK); role in osmotic and oxidative stress responses, oxidative stress adaptation; required for stress regulation of Hog1p localization and activity; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Pbs2p	-	-	-	-	2	1	2	1	4	-	-	-	-
<b>PCK1</b>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase; regulated by hyphal switch, carbon source, Hap43p; repressed on glucose; induced by fluconazole, phagocytosis, H2O2, biofilm formation; induced in oralpharyngeal candidiasis	3	7	4	3	9	5	9	3	4	9	3	3	3
<b>PDA1</b>	Putative pyruvate dehydrogenase alpha chain; fluconazole-induced; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; Hap43p-induced gene	1	1	2	3	15	12	16	5	4	-	-	-	-

<b>PDB1</b>	Putative pyruvate dehydrogenase; fluconazole-induced; protein level decreases in stationary phase cultures	0	3	2	2	7	9	5	8	4	-	-	-	-
<b>PET9</b>	Mitochondrial ADP/ATP carrier protein involved in ATP biosynthesis; possible lipid raft component; 3 predicted transmembrane helices; flucytosine induced; ketoconazole-induced; downregulated by Efg1p	5	6	11	3	11	10	9	4	4	2	3	4	3
<b>PFK1</b>	Phosphofructokinase alpha subunit, Pfk1p-Pfk2p heteromultimer; activated by fructose 2,6-bisphosphate, AMP, inhibited by ATP; activity reduced on hyphal induction; phagocytosis-downregulated; fluconazole-induced; biofilm-induced	6	9	4	3	23	23	21	14	4	8	1	4	3
<b>PFK2</b>	Phosphofructokinase beta subunit, a Pfk1p-Pfk2p heteromultimer; activated by fructose 2,6-bisphosphate, AMP, inhibited by ATP; downregulated upon phagocytosis or hyphal growth; fluconazole-induced; stationary-phase enriched; biofilm-induced	5	10	3	3	14	17	14	14	4	6	2	4	3
<b>PHO88</b>	Protein with a role in phosphate transport; biofilm-regulated expression; amphotericin B repressed	-	-	-	-	3	2	3	1	4	-	-	-	-
<b>PMA1</b>	Plasma membrane H(+)-ATPase; highly expressed, comprising 20-40% of total plasma membrane protein; abundance increases at stationary phase transition; fluconazole induced; caspofungin repressed; upregulated in RHE model	7	7	13	3	23	23	25	14	4	11	8	7	3
<b>PYC2</b>	Putative pyruvate carboxylase, binds to biotin cofactor; up-regulated in mutant lacking the Ssk1p response regulator protein, upon benomyl treatment, or in an azole-resistant strain overexpressing MDR1; stationary phase enriched protein	-	-	-	-	15	16	17	4	4	1	1	1	3
<b>RBP1</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase; rapamycin-binding protein; homozygous null mutation confers rapamycin resistance; regulated by Gcn4p; macrophage-induced protein; repressed in response to 3-AT; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Rbp1p	-	-	-	-	2	3	3	3	4	2	1	1	3
<b>RCK2</b>	Predicted MAP kinase-activated protein kinase, similar to <i>S. cerevisiae</i> serine/threonine protein kinase Rck2p; induced by osmotic stress via Hog1p; macrophage/pseudohyphal-repressed; mutants are sensitive to rapamycin	-	-	-	-	0	1	2	1	3	-	-	-	-
<b>RNR21</b>	Ribonucleoside-diphosphate reductase; regulated by tyrosol and cell density; transcription upregulated in response to ciclopirox olamine; fluconazole or flucytosine induced; regulated by Sef1p, Sfu1p, and Hap43p; planktonic growth-induced	2	4	1	3	2	3	2	11	4	1	0	3	2
<b>RPT2</b>	Putative ATPase of the 19S regulatory particle of the 26S proteasome; oxidative stress-induced via Cap1p	-	-	-	-	1	2	1	1	4	-	-	-	-
<b>SNF1</b>	Essential protein; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Snf1p regulator of sugar metabolism; constitutively expressed; Thr208 phosphorylation may have regulatory role; up-regulation associated with azole resistance; has polyhistidine tract	-	-	-	-	1	1	2	2	4	-	-	-	-
<b>TRX1</b>	Thioredoxin, involved in response to reactive oxygen species; biofilm, benomyl, flucytosine, peroxide, Hap43p induced; amphotericin B, caspofungin repressed; upregulated in the presence of human neutrophils; macrophage-downregulated gene	1	1	2	3	1	3	2	4	4	-	-	-	-
<b>TUB2</b>	Beta-tubulin; functional homolog of ScTub2p; overproduction causes <i>S. cerevisiae</i> inviability; has two introns; hyphal-induced; fluconazole-induced; slow growth, ectopic expression causes increased white-to opaque switching; GlcNAc-induced	2	5	0	2	13	8	11	12	4	5	0	0	1
<b>UBP6</b>	Putative ubiquitin-specific protease of the 26S proteasome; oxidative stress-induced via Cap1p	-	-	-	-	1	2	1	0	3	-	-	-	-
<b>VMA2</b>	Vacuolar H(+)-ATPase; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; plasma membrane localized; amphotericin B repressed, caspofungin repressed	1	1	3	3	9	7	9	2	4	-	-	-	-

<b>VMA4</b>	H <sup>+</sup> transporting ATPase E chain; transcription is regulated by Mig1p; caspofungin repressed; protein level decreases in stationary phase cultures	1	2	3	3	7	8	9	1	4	-	-	-	-
<b>VMA8</b>	Protein similar to the <i>S. cerevisiae</i> Vma8p subunit of vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase; transcription is regulated by Nrg1p and Mig1p; transcription is increased in populations of cells exposed to fluconazole over multiple generations	-	-	-	-	1	1	0	1	3	-	-	-	-
<b>YCK2</b>	Plasma membrane protein similar to <i>S. cerevisiae</i> casein kinase I, Yck2p; null mutant has defect in damaging oral epithelial cells and in hyphal branching; transcription is activated in weak acid stress or on contact with host cells	-	-	-	-	3	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>ZPR1</b>	Protein with putative zinc finger; regulated by Gcn4p; repressed in response to amino acid starvation (3-aminotriazole treatment); upregulation correlates with clinical development of fluconazole resistance	2	3	0	2	3	1	3	0	3	-	-	-	-
<b>ZRT2</b>	Zinc transporter; ciclopirox olamine, fluconazole, alkaline downregulated; transcriptionally induced by amphotericin B, interaction with macrophages; possibly essential, disruptants not obtained by UAU1 method; in oropharyngeal candidiasis	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-

**ANEXO 7: PROTEINAS RELACIONADAS CON VIRULENCIA**

Proteína	Descripcion	LEVADURAS				HIFAS					HIFAS 10%S			
		1	2	3	Nº exp	1	2	3	4	Nº exp	1	2	3	Nº exp
<b>ADE5,7</b>	Phosphoribosylamine-glycine ligase and phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase; interacts with Vps34p; required for hyphal growth and virulence; flucytosine induced; not induced in GCN response, in contrast to <i>S. cerevisiae</i> ortholog	-	-	-	-	3	3	3	7	4	-	-	-	-
<b>ALO1</b>	D-Arabinono-1,4-lactone oxidase involved in biosynthesis of dehydro-D-arabinono-1,4-lactone, which has a protective role against oxidative damage; plasma membrane-localized; required for full virulence in a mouse model of systemic infection	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>ASC1</b>	40S ribosomal subunit similar to G-beta subunits; required for filamentous growth in glucose or nitrogen starvation; required for virulence in mice; snoRNA snR24 encoded in ASC1 intron; levels decrease in stationary phase; GlcNAc-induced	5	9	6	3	10	10	11	8	4	7	6	6	3
<b>CDC10</b>	Septin, required for wild-type cell, hyphal, or chlamyospore morphology; role in virulence and kidney tissue invasion in a mouse model of systemic infection; forms ring at sites of cell division and filaments in mature chlamyospore	-	-	-	-	6	6	6	2	4	-	-	-	-
<b>CDC11</b>	Septin; required for wild-type cell and hyphal morphology, agar-invasive growth, full virulence and kidney tissue invasion in mouse, but not for kidney colonization, immunogenicity; phosphorylation is hyphal- and cell-cycle-regulated	-	-	-	-	2	4	3	0	3	-	-	-	-
<b>CDC42</b>	Rho-type GTPase; required for budding and maintenance of hyphal growth; GGTase I geranylgeranylated; misexpression blocks hyphal growth, causes avirulence in mouse IV infection; shows actin-dependent localization to hyphal tip	2	2	2	3	2	2	1	0	3	-	-	-	-
<b>CLA4</b>	Ste20p family Ser/Thr kinase required for wild-type filamentous growth, organ colonization and virulence in mouse systemic infection; role in chlamyospore formation; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Cla4p; mutant caspofungin sensitive	-	-	-	-	5	1	2	1	4	-	-	-	-
<b>CSH3</b>	Functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Shr3p, which is a chaperone specific for amino acid permeases; localized to ER; required for wild-type amino-acid responsive hyphal growth and for mouse systemic virulence; regulated by Gcn2p and Gcn4p	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>HET1</b>	Putative sphingolipid transfer protein involved in localization of glucosylceramide, which is important for virulence	-	-	-	-	1	1	3	4	4	1	2	1	3
<b>HEX1</b>	Beta-N-acetylhexosaminidase/chitobiase, highly glycosylated enzyme that is secreted to the periplasm and culture medium; required for full virulence; may have role in carbon or nitrogen scavenging; possibly an essential gene (UAU1 method)	2	2	3	3	0	3	1	0	2	-	-	-	-
<b>KEL1</b>	Kelch repeat domain-containing protein; localizes to sites of polarized growth; mutant colonies exhibit slightly decreased filamentation ratio; not required for buccal epithelial cell adherence or virulence in mice	-	-	-	-	3	3	3	1	4	-	-	-	-

<b>KEX2</b>	Subtilisin-like protease (proprotein convertase), processes aspartyl proteinase Sap2p; required for hyphal growth and wild-type virulence in mice; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Kex2p, which processes alpha-factor; Tup1p-repressed	-	-	-	-	3	1	3	1	4	2	1	2	3
<b>MLT1</b>	Vacuolar membrane transporter: MRP subfamily of ABC family; similar to <i>S. cerevisiae</i> Bpt1p and Ycf1p; may transport organic anions conjugated to glutathione, glucuronate, or sulfate; required for virulence in mouse peritonitis model	-	-	-	-	1	2	3	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.2245</b>	Vacuolar Rab small monomeric GTPase involved in vacuolar biogenesis; involved in filamentous growth and virulence	-	-	-	-	2	1	1	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.2538</b>	Protein phosphatase of the Type 2C-related family (serine/threonine-specific) with a potential role in DNA damage checkpoint control; localizes to both cytoplasm and mitochondria; mutant shows virulence defect	-	-	-	-	5	0	2	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.3045</b>	Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21; virulence-group-correlated expression	-	-	-	-	2	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.4831</b>	Sphingolipid C9-methyltransferase, catalyzes methylation of the 9th carbon in the long chain base component of glucosylceramides; glucosylceramide biosynthesis is important for virulence	-	-	-	-	5	2	5	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.589</b>	Late endosomal Rab small monomeric GTPase involved in transport of endocytosed proteins to the vacuole; involved in filamentous growth and virulence	-	-	-	-	1	1	0	1	3	-	-	-	-
<b>RAS1</b>	RAS signal transduction GTPase; regulates cAMP and MAP kinase pathways; role in hyphal induction, virulence, apoptosis, heat-shock sensitivity; nonessential; plasma membrane-localized; complements viability of <i>S. cerevisiae</i> ras1 ras2 mutant	1	3	1	3	6	6	6	4	4	2	3	2	3
<b>RSR1</b>	RAS-related protein; GTP/GDP cycling required for wild-type polar bud site selection, hyphal growth guidance; role in systemic virulence in mouse; geranylgeranylation predicted; suppresses <i>S. cerevisiae</i> cdc24-4 mutant heat sensitivity	-	-	-	-	3	3	3	2	4	-	-	-	-
<b>SAP5</b>	Secreted aspartyl proteinase; sap4 sap5 sap6 triple mutant is defective in utilization of protein as N source; assessment of virulence role complicated by URA3 effects; expressed during infection; mRNA is localized to hyphal tip via She3p	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	2	3	2
<b>SOD1</b>	Cytosolic copper- and zinc-containing superoxide dismutase, involved in protection from oxidative stress and required for full virulence; alkaline upregulated by Rim101p; upregulated in the presence of human blood	1	6	1	3	4	2	4	5	4	2	2	2	3
<b>SRV2</b>	Adenylate cyclase-associated protein that regulates adenylate cyclase activity; required for wild-type germ tube formation and for virulence in mouse systemic infection; mutant defects in filamentous growth are rescued by cAMP or dbcAMP	-	-	-	-	2	2	0	1	3	-	-	-	-
<b>SSD1</b>	Protein with role in resistance to host antimicrobial peptides; virulence role in murine infection; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Ssd1p, which suppresses various mutant phenotypes; constitutively expressed and not cell-cycle regulated	-	-	-	-	5	4	7	1	4	-	-	-	-

<b>SSN6</b>	Functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Cyc8p/Ssn6p; Ssn6p and Tup1p regulate distinct sets of genes; hyphal growth regulator; overexpression or mutation causes avirulence in mouse IV infection; TPR motifs; repressed during hyphal growth	-	-	-	-	2	1	2	1	4	-	-	-	-
<b>TPS2</b>	Trehalose-6-phosphate (Tre6P) phosphatase; mutant heat sensitive, has Tre6P accumulation, decreased mouse virulence; possible drug target; two conserved phosphohydrolase motifs; no mammalian homolog; Hap43p-repressed gene; biofilm-induced	-	-	-	-	2	4	4	0	3	-	-	-	-
<b>TTR1</b>	Putative glutaredoxin; described as a glutathione reductase; upregulated in the presence of human neutrophils, and upon benomyl treatment; alkaline downregulated; regulated by Gcn2p and Gcn4p; required for virulence in mouse model	-	-	-	-	2	2	2	1	4	-	-	-	-
<b>VPS34</b>	Autophosphorylated class III phosphatidylinositol 3-kinase; required for normal vesicle transport, hyphal growth, fibroblast adherence, virulence in mouse systemic infection; growth-regulated; caspofungin and hydrogen peroxide sensitivity	-	-	-	-	1	0	1	1	3	-	-	-	-
<b>WH11</b>	Cytoplasmic protein expressed specifically in white phase yeast cells; expression in opaque cells increases virulence and frequency of opaque-to-white switching; null mutant has wild-type switching; Hap43p, hypoxia and ketoconazol induced	5	6	6	3	6	4	6	6	4	6	0	0	1
<b>YHB1</b>	Nitric oxide dioxygenase, acts in nitric oxide scavenging/detoxification; role in virulence in mouse; transcription activated by NO, macrophage interaction; hyphal downregulated; mRNA binds to She3p; Hap43p-repressed	-	-	-	-	4	4	3	4	4	-	-	-	-



**ANEXO 8: PROTEINAS RELACIONADAS CON BIOFILM**

Proteína	Descripcion	LEVADURAS				HIFAS					HIFAS 10%S			
		1	2	3	Nº exp	1	2	3	4	Nº exp	1	2	3	Nº exp
<b>ADK1</b>	Putative adenylate kinase; decreased expression in hyphae compared to yeast; macrophage-induced protein; adenylate kinase release used as a marker for cell lysis; possibly an essential gene (UAU1 method); biofilm-induced gene	0	5	2	2	11	9	12	5	4	1	2	3	3
<b>CAR2</b>	Ornithine aminotransferase; role in arginine metabolism; alkaline upregulated; mutation confers hypersensitivity to toxic ergosterol analog and to amphotericin B; present in exponential and stationary phase yeast cultures; biofilm-induced	6	7	6	3	3	6	6	9	4	2	2	2	3
<b>CYP1</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase; cyclosporin A sensitive activity; soluble in hyphae; biofilm induced, macrophage-induced protein; downregulated upon treatment of biofilm with farnesol; present in exponential and stationary phase cells	8	10	7	3	6	8	11	19	4	9	9	9	3
<b>EGD1</b>	Putative GAL4 DNA-binding enhancer protein; soluble protein in hyphae; biofilm induced; macrophage/pseudohyphal-induced; the same level of protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	2	2	1	3	8	7	8	8	4	5	1	2	3
<b>GCA1</b>	Predicted extracellular or plasma membrane-associated glucoamylase; promotes biofilm matrix formation; possible adhesin; gene transcribed during rat oral infection; transcription regulated by carbohydrates, pH, galactose; biofilm-induced	1	2	1	3	1	1	1	3	4	2	1	1	3
<b>HSP104</b>	Heat-shock protein; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Hsp104p; chaperone and prion propagation activity in <i>S. cerevisiae</i> ; guanidine-insensitive; heat shock/stress induced; downregulated in farnesol-treated biofilm; sumoylation target	2	8	1	3	21	20	17	19	4	10	3	6	3
<b>orf19.2286</b>	Putative deoxyhypusine hydroxylase; required for biofilm formation; ketoconazole-induced; protein level decreases in stationary phase cultures	2	5	1	3	4	5	4	4	4	3	2	2	3
<b>orf19.3053</b>	Protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; identified in extracts from biofilm and planktonic cells; biofilm-induced gene; GlcNAc-induced protein	0	3	1	2	1	0	1	2	3	4	1	1	3
<b>PGM2</b>	Ortholog of <i>S. cerevisiae</i> PGM2; induced during biofilm formation and in planktonic culture; Tye7p-regulated	3	10	0	2	6	8	8	8	4	5	4	3	3
<b>RHR2</b>	Glycerol 3-phosphatase; roles in osmotic tolerance, glycerol accumulation in response to salt; required for biofilm formation; biofilm-induced; regulated by macrophage, stress response, yeast-hyphal switch, pheromone, GCN4, HOG1, NRG1, TUP1	2	4	2	3	5	2	2	9	4	0	2	3	2
<b>STI1</b>	Protein that interacts with Cdc37p and Crk1p in two-hybrid system; may be involved in Cdc37p chaperone activity; biofilm induced; soluble protein in hyphae; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	5	9	2	3	15	13	13	11	4	7	7	7	3
<b>TAL1</b>	Putative transaldolase; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; biofilm induced; oxidative stress-induced via Cap1p; induced by nitric oxide independent of Yhb1p; sumoylation target	14	18	10	3	24	23	25	29	4	20	12	0	2
<b>TUB1</b>	Alpha-tubulin; gene has intron; complements cold-sensitivity of <i>S. cerevisiae</i> tub1 mutant; <i>C. albicans</i> has single alpha-tubulin gene, whereas <i>S. cerevisiae</i> has two (TUB1, TUB3); farnesol-upregulated in biofilm; sumoylation target	2	3	1	3	10	11	11	6	4	6	0	0	1

<b>ADE12</b>	Adenylosuccinate synthase; upregulated in biofilm; decreased expression in hyphae vs yeast-form cells; not induced during GCN response, in contrast to <i>S. cerevisiae</i> ADE12, which is induced by Gcn4p; stationary phase-enriched protein	0	3	1	2	6	4	5	5	4	-	-	-	-
<b>CIT1</b>	Citrate synthase; soluble in hyphae; expression greater in high iron; upregulated by phagocytosis, biofilm growth; Hog1p-downregulated; Efg1p-regulated under yeast, not hyphal growth conditions; present in exponential and stationary phase	0	4	3	2	9	8	8	5	4	-	-	-	-
<b>GLT1</b>	Putative glutamate synthase; alkaline downregulated; transcription is downregulated in both intermediate and mature biofilms; regulated by Sef1p, Sfu1p, and Hap43p	4	5	0	2	17	13	14	5	4	-	-	-	-
<b>GUK1</b>	Putative guanylate kinase; identified in extracts from biofilm and planktonic cells; protein level decrease in stationary phase cultures; Hap43p-induced gene	2	4	1	3	3	3	3	4	4	-	-	-	-
<b>orf19.6559</b>	Putative RNA polymerase III transcription initiation factor complex (TFIIIC) subunit; growth phase regulated protein; levels decrease in stationary phase yeast cultures; Hap43p-repressed; biofilm-induced	1	4	1	3	2	2	3	3	4	-	-	-	-
<b>STF2</b>	Protein involved in ATP biosynthesis; decreased expression in hyphae vs yeast-form cells; downregulated by Efg1p, Hap43p; transcription upregulated in clinical isolates from HIV+ patients with oral candidiasis; biofilm-induced	2	2	0	2	2	2	2	2	4	-	-	-	-
<b>YNK1</b>	Nucleoside diphosphate kinase (NDP kinase); homo-hexameric; soluble protein in hyphae; flucytosine induced; biofilm induced; macrophage-induced protein; stationary phase enriched protein	3	6	4	3	7	8	9	6	4	-	-	-	-
<b>ARG4</b>	Argininosuccinate lyase, catalyzes the final step in the arginine biosynthesis pathway; alkaline downregulated; late-stage biofilm-induced	-	-	-	-	2	0	2	0	2	-	-	-	-
<b>ARG8</b>	Putative acetylornithine aminotransferase; Gcn2p-, Gcn4p-regulated; transcription is upregulated in both intermediate and mature biofilms	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>CDR1</b>	Multidrug transporter of ATP-binding cassette (ABC) superfamily; transports phospholipids in an in-to-out direction; transcription induced by beta-estradiol, progesterone, corticosteroid, or cholesterol; repressed in young biofilms	-	-	-	-	5	0	4	0	2	-	-	-	-
<b>CET1</b>	mRNA 5'-triphosphatase; large subunit of mRNA capping enzyme; positively regulates Ceg1p activity; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Cet1p; Cet1p and Cgt1p form a 2:1 complex; late-stage biofilm-induced gene	-	-	-	-	1	1	2	1	4	-	-	-	-
<b>CTM1</b>	Putative cytochrome c lysine methyltransferase; early-stage biofilm-induced gene; regulated by Gcn2p and Gcn4p; transcriptionally activated by Mnl1p under weak acid stress	-	-	-	-	2	3	1	0	3	-	-	-	-
<b>DOT5</b>	Putative nuclear thiol peroxidase; alkaline downregulated; biofilm- and planktonic growth-induced gene; sumoylation target	-	-	-	-	2	2	2	4	4	-	-	-	-
<b>ELF1</b>	Putative mRNA export protein; Walker A and B (ATP/GTP binding) motifs, ABC transporter consensus; required for wild-type morphology, growth; expressed in hyphal, pseudohyphal, and yeast form, upregulated in biofilm; Hap43p-induced gene	-	-	-	-	4	4	6	0	3	-	-	-	-
<b>GSY1</b>	Putative UDP glucose/starch glucosyltransferase; transcript repressed by yeast-hyphal switch, Efg1p-regulated; strong oxidative stress induced; colony morphology-related regulation by Ssn6p; stationary phase enriched; biofilm-induced	-	-	-	-	1	2	1	1	4	-	-	-	-
<b>LEM3</b>	Putative membrane protein; early-stage biofilm-induced gene; mutation causes increased resistance to miltefosine	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-

<b>MCR1</b>	Putative NADH-cytochrome-b5 reductase; soluble protein in hyphae; biofilm induced; alkaline downregulated; ketoconazole or flucytosine induced, farnesol-induced; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	-	-	-	-	3	5	4	0	3	-	-	-	-
<b>MUQ1</b>	Putative choline phosphate cytidyltransferase/phosphoethanolamine cytidyltransferase; decreased expression in hyphae compared to yeast-form cells; Hap43p-repressed gene; biofilm-induced	-	-	-	-	2	0	2	1	3	-	-	-	-
<b>NPL3</b>	Putative RNA-binding protein; required for normal biofilm growth; nuclear export is facilitated by Hmt1p; transcription is upregulated in an RHE model of oral candidiasis	-	-	-	-	0	1	1	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.2006.1</b>	Putative copper metallochaperone; Hap43p-repressed gene; transcription is upregulated in both intermediate and mature biofilms	-	-	-	-	1	0	1	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.409</b>	Plasma membrane-localized protein; similar to <i>S. cerevisiae</i> Aim38p; Hap43p-repressed gene; late-stage biofilm-induced gene; induced in oralpharyngeal candidiasis	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.4450.1</b>	Protein conserved among the fungal CTG-clade; gene contains two adjacent upstream SRE-1 elements; highly up-regulated in cecum-grown cells in a Cph2p-dependent manner; Hap43p-repressed gene; biofilm-induced	-	-	-	-	1	1	2	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.4928</b>	Guanyl-nucleotide exchange factor for the small G-protein Sec4p; delivery of post-Golgi secretory vesicles to sites of polarized growth; phosphorylation by Cdc28p needed for normal hyphal growth; Hap43p-repressed gene; biofilm-induced	-	-	-	-	4	4	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.5620</b>	Stationary phase enriched protein; Gcn4p-regulated; induced by amino acid starvation (3-AT); increased transcription by benomyl treatment or in an azole-resistant strain that overexpresses MDR1; biofilm-induced; overlaps orf19.5621	-	-	-	-	0	2	3	4	3	-	-	-	-
<b>orf19.6090</b>	Putative nucleolar protein with a predicted role in pre-rRNA processing and ribosome biogenesis; required for biofilm formation; repressed by nitric oxide	-	-	-	-	1	4	2	3	4	-	-	-	-
<b>orf19.6696</b>	Predicted protein of the mitochondrial intermembrane space; transcription is upregulated in both intermediate and mature biofilms	-	-	-	-	2	2	2	0	3	-	-	-	-
<b>PST1</b>	Putative 1,4-benzoquinone reductase; biofilm induced; hyphal-induced expression, regulated by Cyr1p, Ras1p, Efg1p, Nrg1p, Rfg1p, Tup1p; Hap43p-induced gene	-	-	-	-	2	2	1	2	4	-	-	-	-
<b>PUT2</b>	Putative delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase; alkaline upregulated; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; late-stage biofilm-induced gene	-	-	-	-	5	5	6	0	3	-	-	-	-
<b>RGA2</b>	Putative GTPase-activating protein (GAP) for Rho-type GTPase Cdc42p; involved in cell signaling pathways controlling cell polarity; similar to <i>S. cerevisiae</i> Rga2p; induced upon low-level peroxide stress; late-stage biofilm-induced	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>SEC14</b>	Essential protein; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Sec14p, a Golgi phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein that regulates choline-phosphate cytidyltransferase and thereby affects secretion; biofilm-regulated	-	-	-	-	3	2	2	0	3	-	-	-	-
<b>SOD3</b>	Cytosolic manganese-containing superoxide dismutase; protection against oxidative stress; downregulated by ciclopirox olamine, induced during stationary phase when SOD1 expression is repressed; Hap43p-repressed; biofilm-induced	-	-	-	-	3	4	4	1	4	-	-	-	-
<b>TPS3</b>	Putative regulatory subunit of trehalose-phosphate synthase; regulated by Efg1p; biofilm-repressed expression; biofilm-induced in another study; regulated by Tsa1p, Tsa1Bp under H2O2 stress conditions	-	-	-	-	2	0	1	3	3	-	-	-	-

<b>TRP4</b>	Predicted enzyme of amino acid biosynthesis; upregulated in biofilm; regulated by Gcn2p and Gcn4p; <i>S. cerevisiae</i> ortholog is Gcn4p regulated	-	-	-	-	1	0	1	1	3	-	-	-	-
<b>TRP5</b>	Predicted tryptophan synthase; identified in detergent-resistant membrane fraction (possible lipid raft component); predicted N-terminal acetylation; Gcn4p-regulated; <i>S. cerevisiae</i> ortholog is Gcn4p regulated; upregulated in biofilm;	-	-	-	-	6	3	2	5	4	-	-	-	-
<b>TUP1</b>	Transcriptional corepressor with C-terminal WD40 repeats; represses filamentous growth, regulates phase switching, roles in germ tube induction, farnesol response; farnesol upregulated in biofilm; in repression pathways with Nrg1p, Rfg1p	-	-	-	-	4	7	7	2	4	-	-	-	-
<b>CTR1</b>	Copper transporter; transcribed in limited copper; induced by biofilm, Mac1p, Tye7p, macrophage interaction, alkaline pH via Rim101p; 17-beta-estradiol downregulated; complements <i>S. cerevisiae</i> ctr1 ctr3 copper transport mutant	-	-	-	-	1	1	2	1	4	1	1	1	3
<b>HTA2</b>	Putative histone H2A; farnesol regulated; transcription is downregulated in both intermediate and mature biofilms; Hap43p-induced	-	-	-	-	0	4	1	1	3	3	0	3	2
<b>SER33</b>	Predicted enzyme of amino acid biosynthesis; Gcn4p-regulated; upregulated in biofilm; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; <i>S. cerevisiae</i> ortholog is Gcn4p regulated	-	-	-	-	6	9	8	6	4	5	0	2	2

**ANEXO 9: PROTEINAS RELACIONADAS CON CONDICIONES DE ESTRÉS**

Proteína	Descripción	LEVADURAS				HIFAS					HIFAS 10%S			
		1	2	3	Nº exp	1	2	3	4	Nº exp	1	2	3	Nº exp
<b>ADH2</b>	Alcohol dehydrogenase; soluble in hyphae; fungal-specific; expression regulated by white-opaque switching; regulated by Ssn6p; transcriptionally induced by Mnl1p by weak acid stress; protein enriched in stationary phase yeast cultures	4	3	7	3	7	5	4	8	4	3	3	3	3
<b>ASR3</b>	Gene regulated by cAMP and by osmotic stress; greater mRNA abundance observed in a <i>cyr1</i> or <i>ras1</i> homozygous null mutant than in wild type	2	2	0	2	2	2	2	4	4	2	1	1	3
<b>FDH3</b>	Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase involved in glycine catabolism; downregulated by Efg1p under yeast, not hyphal growth conditions; transcriptionally activated by Mnl1p under weak acid stress	3	5	2	3	4	1	3	3	4	2	3	1	3
<b>GLN1</b>	Putative glutamate synthase; regulated by Tsa1p, Tsa1Bp under H2O2 stress conditions	2	0	2	2	4	4	4	2	4	0	2	3	2
<b>HSP12</b>	Heat-shock protein; induced upon osmotic/oxidative/cadmium stress, fluphenazine treatment, low iron, CDR1 and CDR2 overexpression, or <i>ssn6</i> or <i>ssk1</i> homozygous null mutation; repressed by Hog1p, flucytosine, elevated CO2	8	8	6	3	8	8	8	17	4	7	4	5	3
<b>orf19.1862</b>	Possible stress protein; increased transcription associated with CDR1 and CDR2 overexpression or fluphenazine treatment; transcription regulated by Sfu1p, Nrg1p, Tup1p; stationary phase enriched protein	4	4	0	2	4	5	5	7	4	4	4	4	3
<b>orf19.6160</b>	Ortholog(s) have role in eisosome assembly and eisosome, membrane raft, mitochondrion localization	2	5	1	3	13	9	12	8	4	5	2	1	3
<b>orf19.7085</b>	Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21; induced in core stress response; induced by heavy metal (cadmium) stress via Hog1p; oxidative stress-induced via Cap1p; induced by Mnl1p under weak acid stress; macrophage-downregulated	2	2	3	3	3	4	5	4	4	3	1	2	3
<b>ASR1</b>	Putative heat shock protein; transcription regulated by cAMP, osmotic stress, ciclopirox olamine, ketoconazole; negatively regulated by <i>Cyr1p</i> , <i>Ras1p</i> ; colony morphology-related regulation by <i>Ssn6p</i> ; stationary phase enriched; Hap43p-induced	0	2	2	2	6	4	5	5	4	-	-	-	-
<b>ASR2</b>	Gene regulated by cAMP and by osmotic stress; greater mRNA abundance observed in a <i>cyr1</i> or <i>ras1</i> homozygous null mutant than in wild type; stationary phase enriched protein	3	8	5	3	5	2	6	2	4	-	-	-	-
<b>CPR6</b>	Putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase; macrophage/pseudohyphal-repressed; heavy metal (cadmium) stress-induced; heterozygous null mutant displays sensitivity to virgineone	2	2	0	2	7	4	7	2	4	-	-	-	-

<b>HSP60</b>	Heat shock protein; soluble in hyphae; regulated by Nrg1p and by iron; expression greater in high iron; heavy metal (cadmium) stress-induced; sumoylation target; protein present in exponential and stationary phase cells; Hap43p-repressed	0	3	9	2	9	8	11	11	4	-	-	-	-
<b>IFR2</b>	Zinc-binding dehydrogenase; upregulated by benomyl, ciclopirox olamine or alpha pheromone; regulated by oxidative stress (via Cap1p) and osmotic stress (via Hog1p); protein present in exponential and stationary phase; Hap43p-induced gene	2	3	1	3	5	5	3	3	4	-	-	-	-
<b>orf19.4089</b>	SGT1 - Putative co-chaperone protein with a predicted role in kinetochore assembly; mutation confers hypersensitivity to radicicol; sumoylation target	3	4	0	2	7	4	4	3	4	-	-	-	-
<b>orf19.4449</b>	Ortholog(s) have superoxide dismutase copper chaperone activity, role in cellular copper ion homeostasis, cellular response to metal ion, intracellular copper ion transport and cytosol, mitochondrial inner membrane, nucleus localization	3	1	1	3	2	1	3	5	4	-	-	-	-
<b>RIP1</b>	Putative ubiquinol cytochrome c-reductase; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; alkaline downregulated; repressed by nitric oxide; Hap43p-repressed	1	1	1	3	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>CIP1</b>	Possible oxidoreductase; transcription induced by cadmium but not by other heavy metals, heat shock, yeast-hyphal switch, oxidative stress (via Cap1p), or macrophage interaction; stationary phase enriched protein	-	-	-	-	3	3	3	0	3	4	1	1	3
<b>SIS1</b>	Putative Type II HSP40 co-chaperone; macrophage/pseudohyphal-repressed; heavy metal (cadmium) stress-induced; heterozygous null mutant displays sensitivity to virgineone	-	-	-	-	5	4	6	4	4	-	-	-	-
<b>YDJ1</b>	Putative type I HSP40 co-chaperone; heavy metal (cadmium) stress-induced	-	-	-	-	6	7	6	2	4	-	-	-	-

**ANEXO 10: PROTEINAS RELACIONADAS CON ACTINA**

Proteína	Descripción	LEVADURAS				HIFAS					HIFAS 10%S			
		1	2	3	Nº exp	1	2	3	4	Nº exp	1	2	3	Nº exp
<b>ACT1</b>	Actin; gene has intron; transcriptionally regulated by growth phase and by starvation; localizes to polarized growth site in budding and hyphal cells; required for wild-type Cdc42p localization; unprocessed N terminus; induced by Hap43p	8	9	5	3	16	15	15	18	4	15	7	10	3
<b>MYO2</b>	Class V myosin; nonessential; sole class V myosin in <i>C. albicans</i> ; required for wild-type actin cytoskeletal polarity, nuclear organization and migration, and hyphal growth; conserved myosin ATPase and tail domains; Hap43p-induced gene	-	-	-	-	13	11	9	2	4	0	5	3	2
<b>orf19.1236</b>	Ortholog(s) have role in endocytosis, establishment or maintenance of actin cytoskeleton polarity, vacuole organization and integral to Golgi membrane localization	-	-	-	-	7	5	7	5	4	1	1	1	3
<b>SAC6</b>	Actin filament bundling protein, fimbrin; transcription is regulated by Nrg1p and Mig1p; protein level decreases in stationary phase cultures	-	-	-	-	1	1	2	2	4	1	1	1	3
<b>orf19.1444</b>	Ortholog(s) have phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding activity, role in actin cortical patch assembly, actin filament organization, endocytosis and actin cortical patch, mating projection tip localization	-	-	-	-	1	2	2	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.3235</b>	Putative F-actin capping protein subunit alpha; possibly an essential gene, disruptants not obtained by UAU1 method	-	-	-	-	2	2	3	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.6534.2</b>	Ortholog(s) have actin filament binding, microtubule binding, protein binding, bridging activity	-	-	-	-	2	0	5	0	2	-	-	-	-
<b>PAN1</b>	Essential protein involved in endocytosis and polarized growth; similar to <i>S. cerevisiae</i> Pan1p, which is a part of a complex that regulates actin cytoskeleton	-	-	-	-	4	1	3	3	4	-	-	-	-
<b>SLA2</b>	Actin binding protein with roles in growth control and morphogenesis; required for alkaline pH-induced hyphal formation; localized to actin patches	-	-	-	-	4	4	3	2	4	-	-	-	-
<b>WAL1</b>	Protein required for hyphal growth and for wild-type cell morphology, polarized budding, endocytosis, vacuole morphology; similar to Wiskott-Aldrich syndrome protein; localizes to cortical actin patches and hyphal tips	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>BZZ1</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Bzz1p, which is an SH3 domain protein involved in the regulation of actin polymerization	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	3	2	2



**ANEXO 11: OTRAS PROTEINAS**

Proteína	Descripcion	LEVADURAS				HIFAS					HIFAS 10%S			
		1	2	3	Nº exp	1	2	3	4	Nº exp	1	2	3	Nº exp
<b>ANB1</b>	Translation initiation factor eIF-5A; decreased expression in hyphae vs yeast cells; downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; Hap43p-induced; GlcNAc-induced protein	1	4	0	2	2	2	4	2	4	2	3	4	3
<b>ARC1</b>	Putative G4 nucleic acid binding protein; macrophage/pseudohyphal-repressed; protein enriched in stationary phase yeast-form cultures	0	2	2	2	2	3	5	0	3	1	1	1	3
<b>ARO4</b>	3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase; aromatic amino acid biosynthesis; GCN-regulated; feedback-inhibited by tyrosine if produced in <i>S. cerevisiae</i> Aro3p and Aro4p catalyze same reaction; protein decreases in stationary phase	3	4	3	3	12	9	13	10	4	4	1	3	3
<b>ARO8</b>	Aromatic transaminase of the Ehrlich fusel oil pathway of aromatic alcohol biosynthesis; Rim101p independent alkaline induction; protein abundance affected by URA3 expression in the CAI-4 strain; Gcn4p-regulated; stationary phase enriched	1	2	1	3	5	6	6	5	4	2	1	3	3
<b>ASN1</b>	Putative asparagine synthetase; soluble protein in hyphae; regulated by Rim101p; decreased expression at pH 4 vs pH 8; protein detected during exponential and stationary phases of yeast-form growth	1	6	0	2	7	8	6	7	4	1	2	2	3
<b>ASR3</b>	Gene regulated by cAMP and by osmotic stress; greater mRNA abundance observed in a <i>cyr1</i> or <i>ras1</i> homozygous null mutant than in wild type	2	2	0	2	2	2	2	4	4	2	1	1	3
<b>CAM1</b>	Putative translation elongation factor eEF1 gamma; protein level decreased in stationary phase cultures	2	7	2	3	12	10	11	8	4	8	5	7	3
<b>CAM1-1</b>	Putative translation elongation factor; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophages; Hap43p-induced gene	3	7	4	3	10	7	10	3	4	5	4	6	3
<b>CDC48</b>	Putative microsomal ATPase; plasma membrane-localized; regulated by Gcn2p and Gcn4p; induced by amino acid starvation (3-AT treatment); macrophage/pseudohyphal-repressed; protein levels decrease in stationary phase yeast cultures	0	7	4	2	15	15	17	17	4	6	7	8	3
<b>CDC60</b>	Cytosolic leucyl tRNA synthetase; conserved amino acid and ATP binding class I signature, tRNA binding, proofreading motifs; likely essential for growth; interacts with benzoxaborole antifungals; present in exponential and stationary phase	1	5	3	3	11	13	9	8	4	4	1	4	3
<b>CMD1</b>	Calmodulin; calmodulin inhibitors cause a defect in hyphal growth; not transcriptionally regulated by yeast-hyphal transition; mutation confers hypersensitivity to cytochalasin D and high concentrations of tunicamycin; gene has intron	1	2	1	3	2	2	3	0	3	0	2	3	2
<b>COF1</b>	Putative cofilin; macrophage-induced protein; protein present in exponential and stationary-phase yeast cells, but higher amounts in stationary phase	3	4	0	2	6	2	4	8	4	4	2	3	3
<b>DPS1-1</b>	Putative tRNA-Asp synthetase; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; protein enriched in stationary phase yeast cultures	1	6	0	2	11	10	10	4	4	5	0	2	2
<b>EGD2</b>	Putative nascent polypeptide associated complex protein alpha subunit; soluble protein in hyphae; macrophage/pseudohyphal-induced; protein level decrease in stationary phase cultures; GlcNAc-induced protein	6	8	6	3	8	8	9	6	4	7	5	5	3
<b>EMP46</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Emp46p; transcription is induced in response to alpha pheromone in SpiderM medium	3	5	0	2	2	1	1	1	4	2	1	3	3

<b>FAA4</b>	Predicted acyl CoA synthase	0	3	2	2	14	15	12	5	4	4	3	4	3
<b>FDH3</b>	Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase involved in glycine catabolism; downregulated by Efg1p under yeast, not hyphal growth conditions; transcriptionally activated by Mnl1p under weak acid stress	3	5	2	3	4	1	3	3	4	2	3	1	3
<b>GFA1</b>	Glucosamine-6-phosphate synthase, homotetrameric enzyme of chitin/hexosamine biosynthesis; inhibited by UDP-GlcNAc, FMDP, N-acyl peptide, kanosamine-6-P; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Gfa1p; Cagrowth-phase regulated; catalytic Cys	1	1	2	3	3	4	4	5	4	2	1	2	3
<b>GIS2</b>	Putative transcription factor; expression is increased in high iron and reduced upon yeast-hyphal switch; null mutant exhibits sensitivity to sorbitol, 5-fluorocytosine, and cold temperatures	3	4	4	3	5	4	6	2	4	1	3	3	3
<b>GRS1</b>	Putative tRNA-Gly synthetase; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; stationary phase enriched protein	1	3	2	3	9	13	7	10	4	4	4	3	3
<b>GSP1</b>	Small RAN G-protein; essential; prenylation not predicted; overproduction rescues <i>S. cerevisiae</i> gsp1 viability; macrophage/pseudohyphal-induced; not transcriptionally regulated by white-opaque or yeast-hyphal switching; GlcNAc-induced	2	3	2	3	6	7	8	4	4	2	1	1	3
<b>HOM6</b>	Putative homoserine dehydrogenase; Gcn4p-regulated; induced in response to amino acid starvation (3-AT treatment); macrophage-induced protein; protein level decreases in stationary phase cultures	3	8	1	3	3	5	4	4	4	3	4	4	3
<b>IDI1</b>	Ortholog(s) have isopentenyl-diphosphate delta-isomerase activity, role in farnesyl diphosphate biosynthetic process and cytosol, nucleus localization	3	3	1	3	4	3	2	9	4	2	4	3	3
<b>KAR2</b>	Similar to chaperones of Hsp70p family; role in translocation of proteins into the ER; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	6	10	10	3	30	30	32	22	4	14	12	10	3
<b>KRS1</b>	Putative tRNA-Lys synthetase; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophages; stationary phase enriched protein	1	4	4	3	10	16	8	14	4	6	2	5	3
<b>MDH1-1</b>	Predicted malate dehydrogenase precursor; macrophage-induced transcript; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	2	8	7	3	11	11	12	9	4	5	1	4	3
<b>MLC1</b>	Protein with microtubule-dependent localization to the Spitzenkorper, also localizes to cytokinetic ring in hyphae; cell-cycle dependent localization to bud tip (polarisome) and bud neck in yeast and pseudohyphal cells; sumoylation target	1	4	0	2	6	6	6	5	4	2	3	4	3
<b>NUP</b>	Nucleoside permease; adenosine and guanosine are substrates, whereas cytidine, adenine, guanine, uridine, uracil are not; similar to a nucleoside permease of <i>S. pombe</i> ; possibly processed by Kex2p	1	4	3	3	1	0	1	2	3	0	2	2	2
<b>orf19.1052</b>	Predicted histone H2B; Hap43p-induced gene	2	2	3	3	1	3	5	3	4	2	1	2	3
<b>orf19.200</b>	Ortholog(s) have RNA binding, chromatin binding, double-stranded DNA binding activity, role in poly(A)+ mRNA export from nucleus, ribonucleoprotein complex assembly, transcription, DNA-dependent and nucleus localization	1	3	1	3	7	6	6	3	4	3	0	1	2
<b>orf19.2478.1</b>	60S ribosomal protein L7; snoRNA snR39b encoded within the 2nd intron	4	8	4	3	9	10	11	10	4	5	3	6	3
<b>orf19.2769</b>	Putative protease B inhibitor; hyphal-induced expression; Cyr1p- and Ras1p-repressed	4	5	2	3	6	6	5	7	4	3	1	1	3
<b>orf19.3037</b>	Putative poly(A)-binding protein; regulated by Gcn4p; induced in response to amino acid starvation (3-AT treatment); protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	5	8	8	3	13	14	13	9	4	5	1	1	3
<b>orf19.3061.1</b>	Ortholog of <i>S. cerevisiae</i> Rps22Ap and Rps22Bp; gene contains 5' UTR intron	4	4	3	3	5	5	6	7	4	3	3	3	3

<b>orf19.3354</b>	Ortholog(s) have structural constituent of ribosome activity and 90S preribosome, cytosolic small ribosomal subunit, nucleolus localization	10	11	6	3	15	15	16	12	4	11	9	8	3
<b>orf19.3572.3</b>	Ortholog(s) have structural constituent of ribosome activity, role in cytoplasmic translation, regulation of translational fidelity and cytosolic large ribosomal subunit localization	2	4	3	3	6	6	5	4	4	4	3	3	3
<b>orf19.3690.2</b>	Ortholog(s) have RNA binding, structural constituent of ribosome activity, role in cytoplasmic translation and cytosolic large ribosomal subunit, nucleolus localization	8	9	4	3	9	7	10	7	4	2	4	5	3
<b>orf19.3799</b>	Ortholog(s) have role in endoplasmic reticulum tubular network maintenance, nuclear pore complex assembly and Golgi apparatus, cortical endoplasmic reticulum, integral to endoplasmic reticulum membrane, mitochondrion localization	1	1	1	3	2	3	2	3	4	1	1	1	3
<b>orf19.3915</b>	Putative metalloprotease; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; Hog1p-induced; Hap43p-repressed; sumoylation target	3	7	0	2	4	5	5	4	4	1	1	1	3
<b>orf19.4149.1</b>	Ortholog(s) have structural constituent of ribosome activity and role in maturation of SSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA), ribosomal small subunit assembly	6	7	7	3	9	9	9	11	4	2	2	5	3
<b>orf19.4609</b>	Putative diene lactone hydrolase; protein abundance is affected by URA3 expression in the CAI-4 strain background; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	1	2	1	3	0	0	0	3	1	1	1	1	3
<b>orf19.4622</b>	Ortholog(s) have role in telomere maintenance, transcription-coupled nucleotide-excision repair, ubiquitin-dependent protein catabolic process and nucleus localization	3	3	0	2	2	2	3	2	4	1	1	1	3
<b>orf19.4799</b>	Ortholog(s) have role in nuclear mRNA splicing, via spliceosome and Prp19 complex, U2-type catalytic step 1 spliceosome localization	1	1	1	3	1	1	1	1	4	1	1	1	3
<b>orf19.5281</b>	Ortholog(s) have G-protein alpha-subunit binding, RNA binding activity	0	4	1	2	23	25	26	10	4	6	2	5	3
<b>orf19.5773</b>	Putative dipeptidyl-peptidase III; protein detected by mass spec in exponential and stationary phase cultures; Hog1p-induced; clade-associated gene expression	2	3	0	2	2	1	3	3	4	4	4	2	3
<b>orf19.5943.1</b>	Putative protein of unknown function, transcription is upregulated in an RHE model of oral candidiasis	5	8	1	3	12	7	12	13	4	4	3	6	3
<b>orf19.6160</b>	Ortholog(s) have role in eisosome assembly and eisosome, membrane raft, mitochondrion localization	2	5	1	3	13	9	12	8	4	5	2	1	3
<b>orf19.6220.4</b>	Ortholog(s) have cytosol, nucleolus localization	1	1	2	3	2	2	2	3	4	1	1	1	3
<b>orf19.6403</b>	Ortholog(s) have adenylyl-nucleotide exchange factor activity, role in SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane, translocation and endoplasmic reticulum localization	2	2	3	3	1	1	1	1	4	3	2	1	3
<b>orf19.6415.1</b>	Ortholog(s) have structural constituent of ribosome activity and cytosolic small ribosomal subunit, nucleus localization	2	5	1	3	4	5	5	3	4	1	2	2	3
<b>orf19.6882.1</b>	Ortholog(s) have structural constituent of ribosome activity, role in cytoplasmic translation and cytosolic large ribosomal subunit, nucleolus localization	3	2	2	3	3	4	3	4	4	2	2	2	3
<b>orf19.7239</b>	Ortholog(s) have role in pheromone-dependent signal transduction involved in conjugation with cellular fusion and membrane raft, plasma membrane localization	1	3	1	3	6	7	8	7	4	4	3	3	3
<b>orf19.7392</b>	Ortholog(s) have ATP-dependent RNA helicase activity, RNA strand annealing activity	0	3	2	2	10	12	12	8	4	2	1	3	3
<b>PFY1</b>	Profilin, functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Pfy1p; hyphal-induced; macrophage/pseudohyphal-induced; regulated by Nrg1p, Tup1p; gene lacks intron (unlike <i>S. cerevisiae</i> PFY1); complements growth of <i>S. cerevisiae</i> srv2 mutant; nonessential	2	6	0	2	5	3	4	5	4	4	3	4	3
<b>RPL10</b>	Ribosomal protein L10; intron in 5'-UTR; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; transcription regulated upon yeast-hyphal switch	5	6	2	3	8	9	8	10	4	7	5	6	3

<b>RPL11</b>	Ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; colony morphology-related gene regulation by Ssn6p; Hap43p-induced	4	6	3	3	9	8	7	6	4	5	3	3	3
<b>RPL12</b>	Ribosomal protein L12, 60S ribosomal subunit; downregulated by human whole blood or polymorphonuclear cells; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits are downregulated upon phagocytosis by macrophage; Tbf1p-activated; Hap43p-induced	5	6	6	3	6	6	7	8	4	7	5	3	3
<b>RPL15A</b>	Putative ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; transcription is positively regulated by Tbf1p	4	5	3	3	8	8	6	7	4	4	3	3	3
<b>RPL17B</b>	Ribosomal protein L17; mutation confers hypersensitivity to 5-FU, tubercidin; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated on phagocytosis by macrophage; Hap43p-induced gene	3	6	3	3	7	7	8	6	4	5	3	4	3
<b>RPL18</b>	Predicted ribosomal protein; Plc1p-regulated, Tbf1p-activated; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; Hap43p-induced gene	2	4	2	3	7	7	7	10	4	4	1	3	3
<b>RPL19A</b>	Ribosomal protein L19; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophages; Hap43p-induced gene	5	6	6	3	8	6	10	9	4	4	3	2	3
<b>RPL20B</b>	Ribosomal protein L20; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; alternatively spliced intron in 5' UTR; Hap43p-induced	6	8	6	3	13	10	12	9	4	6	4	2	3
<b>RPL21A</b>	Putative ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	7	7	3	3	7	8	8	7	4	5	3	3	3
<b>RPL23A</b>	Ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; Hap43p-induced gene; sumoylation target	4	5	4	3	7	8	8	6	4	5	2	3	3
<b>RPL24A</b>	Predicted ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; intron in 5'-UTR; Hap43p-induced gene	4	6	5	3	8	7	7	5	4	4	0	2	2
<b>RPL25</b>	Putative rRNA-binding ribosomal protein component of the 60S ribosomal subunit; Hap43p-induced gene; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p	2	2	2	3	3	4	5	4	4	1	2	2	3
<b>RPL27A</b>	Ribosomal protein L27	3	4	4	3	5	6	5	5	4	3	2	4	3
<b>RPL28</b>	Putative ribosomal protein; Plc1p-regulated; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	2	4	3	3	5	5	5	3	4	2	3	5	3
<b>RPL3</b>	Putative ribosomal protein, large subunit; induced by ciclopirox olamine treatment; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits are downregulated upon phagocytosis by murine macrophages; Hap43p-induced gene	14	14	6	3	19	15	21	15	4	9	4	6	3
<b>RPL30</b>	Similar to <i>S. cerevisiae</i> L30 ribosomal subunit; pre-mRNA is alternatively spliced to productive and unproductive transcripts; splicing is temperature-regulated; colony morphology-related gene regulation by Ssn6p; regulated by Nrg1p, Tup1p	4	4	2	3	7	8	7	7	4	4	2	4	3
<b>RPL32</b>	Component of the large (60S) ribosomal subunit	2	3	2	3	5	5	7	5	4	2	1	2	3

<b>RPL38</b>	60S ribosomal ribosomal protein subunit; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	4	4	1	3	4	5	4	3	4	3	0	1	2
<b>RPL39</b>	Ribosomal protein L39; transcription is induced upon germ tube formation; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p; Hap43p-induced	2	5	3	3	4	4	4	3	4	2	1	1	3
<b>RPL4B</b>	Ribosomal protein 4B; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	8	10	9	3	14	12	13	15	4	11	7	6	3
<b>RPL5</b>	Ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophages; Hap43p-induced gene	2	3	3	3	7	7	8	8	4	9	5	5	3
<b>RPL6</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> ribosomal subunit, Rpl6p; transposon mutation affects filamentous growth; translation-related genes are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; Hap43p-induced gene	8	8	7	3	10	10	11	12	4	8	7	8	3
<b>RPL8B</b>	Predicted ribosomal protein; transcription is regulated upon yeast-hyphal switch; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	6	9	8	3	17	12	15	14	4	10	7	12	3
<b>RPL9B</b>	Ribosomal protein L9; downregulated upon phagocytosis by murine macrophages; repressed by nitric oxide; protein levels decrease in stationary phase; Hap43p-induced	4	6	5	3	9	9	9	9	4	4	2	2	3
<b>RPP1B</b>	Conserved acidic ribosomal protein, likely to be involved in regulation of translation elongation; interacts with Rpp2Ap; one of four similar <i>C. albicans</i> ribosomal proteins (Rpp1Ap, Rpp1Bp, Rpp2Ap, Rpp2Bp); transcription activated by Tbf1p	1	1	1	3	1	1	1	2	4	1	1	1	3
<b>RPP2A</b>	Conserved acidic ribosomal protein, likely involved in regulation of translation elongation; interacts with Rpp1Bp; one of four similar ribosomal proteins (Rpp1Ap, Rpp1Bp, Rpp2Ap, Rpp2Bp); CUG start codon; upstream uORFs; Tbf1p-activated	1	3	2	3	3	3	3	1	4	2	1	1	3
<b>RPS1</b>	Putative ribosomal protein 10 of the 40S subunit, elicits a host antibody response during infection; transcription is induced during active growth	9	11	7	3	20	17	18	15	4	9	7	5	3
<b>RPS10</b>	Ribosomal protein S10; downregulated in the presence of human whole blood or polymorphonuclear (PMN) cells	2	3	3	3	3	3	3	3	4	1	2	1	3
<b>RPS12</b>	Acidic ribosomal protein S12; regulated by Gcn4p, activated by Tbf1p; repressed under amino acid starvation (3-aminotriazole treatment); protein abundance is affected by URA3 expression in the CAI-4 strain background; sumoylation target	3	8	3	3	7	10	8	3	4	3	3	2	3
<b>RPS13</b>	Putative ribosomal protein of the small subunit	2	5	4	3	9	9	7	8	4	4	2	3	3
<b>RPS14B</b>	Putative ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; transcription is positively regulated by Tbf1p	7	9	5	3	11	9	10	11	4	6	1	2	3
<b>RPS15</b>	Putative ribosomal protein; macrophage/pseudohyphal-induced after 16 h; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	3	4	4	3	4	5	5	5	4	3	3	3	3
<b>RPS18</b>	Predicted ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; repressed by nitric oxide; Hap43p-induced gene	7	7	9	3	8	10	12	6	4	6	2	4	3
<b>RPS19A</b>	Putative ribosomal protein S19; protein level decreases in stationary phase cultures	6	7	6	3	8	7	9	4	4	4	5	5	3

<b>RPS20</b>	Putative ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; transcription is positively regulated by Tbf1p	6	6	4	3	8	10	10	7	4	6	5	6	3
<b>RPS21</b>	Predicted ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; transcription is positively regulated by Tbf1p	5	8	5	3	11	12	12	12	4	9	5	6	3
<b>RPS21B</b>	Protein similar to ribosomal protein S21; regulated by Nrg1p, Tup1p; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p; transcription is positively regulated by Tbf1p, Hap43p	2	3	1	3	3	4	3	3	4	2	1	1	3
<b>RPS24</b>	Predicted ribosomal protein; hyphal downregulated; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; transcription activated by Tbf1p	6	7	3	3	9	9	9	9	4	4	2	4	3
<b>RPS25B</b>	Ribosomal protein; macrophage/pseudohyphal-induced after 16 h; downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; transcription is positively regulated by Tbf1p; intron in 5'-UTR; Hap43p-induced gene	1	3	2	3	4	4	4	3	4	3	2	3	3
<b>RPS26A</b>	Predicted ribosomal protein; regulated by Nrg1p, Tup1p; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; alternatively spliced intron in 5'-UTR	2	2	3	3	2	2	2	2	4	2	1	2	3
<b>RPS27</b>	Putative ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	1	3	3
<b>RPS28B</b>	Putative ribosomal protein S28B	1	3	1	3	5	4	5	4	4	3	1	2	3
<b>RPS3</b>	Ribosomal protein S3; Hog1p-, Hap43p-induced; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; present in exponential and stationary phase cells	9	9	9	3	15	15	11	14	4	9	8	10	3
<b>RPS5</b>	Ribosomal protein S5; macrophage/pseudohyphal-induced after 16 h; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; Hap43p-induced gene	7	8	5	3	11	11	11	9	4	6	4	6	3
<b>RPS7A</b>	Ribosomal protein S7; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	6	8	2	3	12	10	11	11	4	8	6	6	3
<b>RPS8A</b>	Small 40S ribosomal subunit protein; gene is induced by ciclopirox olamine; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; intron in 5'-UTR; Hap43p-induced gene	7	7	5	3	7	8	7	8	4	7	5	4	3
<b>RPS9B</b>	Predicted ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; possibly transcriptionally regulated upon hyphal formation	5	6	5	3	8	9	6	6	4	5	3	2	3
<b>SAR1</b>	Functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Sar1p, which is required for ER-to-Golgi protein transport; binds GTP; similar to small GTPase superfamily proteins; gene has intron; Hap43p-induced gene	1	2	2	3	4	4	6	5	4	3	2	2	3
<b>SBP1</b>	Similar to RNA binding proteins; downregulated upon adherence to polystyrene; stationary-phase enriched protein	0	3	3	2	7	7	7	8	4	2	1	2	3
<b>SES1</b>	Seryl-tRNA synthetase; charges the tRNA that recognizes the CUG codon, which typically specifies Leu, but specifies Ser in <i>C. albicans</i> ; complements <i>S. cerevisiae</i> ses1 mutant viability; soluble protein in hyphae; macrophage-regulated	2	3	1	3	5	9	5	7	4	3	2	4	3

<b>SGT2</b>	Putative small tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein; protein abundance is affected by URA3 expression in the CAI-4 strain background; transcription is regulated by Mig1p	1	1	1	3	4	4	6	5	4	2	1	1	3
<b>SKP1</b>	Putative subunit D of kinetochore protein complex CBF3; regulated by Gcn4p; repressed in response to amino acid starvation (3-aminotriazole treatment)	1	5	0	2	5	6	5	5	4	4	2	1	3
<b>SMT3</b>	SUMO, small ubiquitin-like protein; Smt3p-conjugated proteins localize to septation site and mother side of bud neck; <i>C. albicans</i> septins appear not to be Smt3p-modified, in contrast to <i>S. cerevisiae</i> septins	2	2	0	2	3	3	3	3	4	1	2	1	3
<b>SNZ1</b>	Stationary phase protein; soluble in hyphae; induced on yeast to hyphal switch, in response to 3-aminotriazole, or in azole-resistant strain overexpressing MDR1; regulated by Gcn4p, macrophage; no human/murine homolog	2	4	0	2	12	10	12	14	4	12	7	6	3
<b>THR4</b>	Putative threonine synthase; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; Gcn4p-regulated; sumoylation target	4	5	1	3	9	6	7	9	4	2	3	0	2
<b>TOM70</b>	Ortholog(s) have mitochondrial targeting sequence binding, protein channel activity and role in protein import into mitochondrial inner membrane, protein import into mitochondrial matrix	1	1	1	3	7	9	8	4	4	3	2	0	2
<b>TPM2</b>	Putative tropomyosin isoform 2; regulated by Gcn4p; repressed under amino acid starvation; macrophage-induced; protein levels decrease in stationary cells; Hap43p-induced gene	3	9	2	3	12	9	10	8	4	8	8	0	2
<b>TUB2</b>	Beta-tubulin; functional homolog of ScTub2p; overproduction causes <i>S. cerevisiae</i> inviability; has two introns; hyphal-induced; fluconazole-induced; slow growth, ectopic expression causes increased white-to opaque switching; GlcNAc-induced	2	5	0	2	13	8	11	12	4	5	0	0	1
<b>UBA1</b>	Ubiquitin-activating enzyme; protein level decreases in stationary phase cultures	1	6	0	2	10	10	9	2	4	5	0	0	1
<b>ADE13</b>	Adenylosuccinate lyase; enzyme of adenine biosynthesis; soluble protein in hyphae; not induced during GCN response, in contrast to the <i>S. cerevisiae</i> ortholog; repressed by nitric oxide	1	4	2	3	6	4	5	4	4	-	-	-	-
<b>AGM1</b>	Phosphoacetylglucosamine mutase (N-acetylglucosamine-phosphate mutase); enzyme of UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) biosynthesis	1	3	0	2	2	1	2	2	4	-	-	-	-
<b>ARO3</b>	3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase; aromatic amino acid biosynthesis; GCN-regulated; feedback-inhibited by phenylalanine if expressed in <i>S. cerevisiae</i> ; Aro3p and Aro4p catalyze same reaction; decreased in stationary phase	3	3	3	3	4	6	5	4	4	-	-	-	-
<b>ASR2</b>	Gene regulated by cAMP and by osmotic stress; greater mRNA abundance observed in a <i>cyr1</i> or <i>ras1</i> homozygous null mutant than in wild type; stationary phase enriched protein	3	8	5	3	5	2	6	2	4	-	-	-	-
<b>ATP5</b>	Putative FO-ATP synthase FO subunit B; caspofungin repressed; protein level decreased in stationary phase yeast cultures	0	2	5	2	7	7	4	1	4	-	-	-	-
<b>COX4</b>	Putative cytochrome c oxidase subunit IV; transcription is regulated by Mig1p; macrophage/pseudohyphal-induced gene; macrophage-induced protein; repressed by nitric oxide; intron in 5'-UTR; Hap43p-repressed	1	2	3	3	1	2	3	1	4	-	-	-	-
<b>COX5</b>	Cytochrome oxidase subunit V; putative upstream CCAAT box regulatory element; macrophage/pseudohyphal-induced; repressed by nitric oxide; intron in 5'-UTR; Hap43p-dependent repression in low iron medium	0	2	2	2	1	2	2	0	3	-	-	-	-
<b>CPR6</b>	Putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase; macrophage/pseudohyphal-repressed; heavy metal (cadmium) stress-induced; heterozygous null mutant displays sensitivity to virgineone	2	2	0	2	7	4	7	2	4	-	-	-	-

<b>CRD2</b>	Metallothionein; role in adaptation to growth in high copper; basal transcription is cadmium-repressed; regulated by Ssn6p; complements copper sensitivity of an <i>S. cerevisiae</i> cup1 null mutant; regulated by Sef1p-, Sfu1p-, and Hap43p	7	4	3	3	1	1	2	0	3	-	-	-	-
<b>ERV25</b>	Component of COPII-coated vesicles; transcription induced upon filamentous growth	2	3	1	3	4	4	3	0	3	-	-	-	-
<b>GLT1</b>	Putative glutamate synthase; alkaline downregulated; transcription is downregulated in both intermediate and mature biofilms; regulated by Sef1p, Sfu1p, and Hap43p	4	5	0	2	17	13	14	5	4	-	-	-	-
<b>HIS7</b>	Putative imidazole glycerol phosphate synthase; histidine biosynthesis; no human/murine homolog; transcription induced by histidine starvation; regulated by Gcn2p and Gcn4p; higher protein level in stationary phase	2	3	0	2	1	3	0	3	3	-	-	-	-
<b>HRT2</b>	Protein described as having a role in Ty3 transposition; decreased expression in hyphae compared to yeast-form cells; stationary phase enriched protein	1	3	0	2	1	1	1	2	4	-	-	-	-
<b>IDH1</b>	Putative mitochondrial NAD-isocitrate dehydrogenase subunit 1; soluble protein in hyphae; protein level decrease in stationary phase cultures	1	1	4	3	4	4	6	0	3	-	-	-	-
<b>IFR1</b>	Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21; induced by nitric oxide	2	2	0	2	3	2	2	0	3	-	-	-	-
<b>KGD1</b>	Putative 2-oxoglutarate dehydrogenase; regulated by Efg1p under yeast-form but not hyphal growth conditions; transcription is upregulated in an RHE model of oral candidiasis; stationary phase enriched protein; Hap43p-repressed gene	1	1	2	3	6	5	6	1	4	-	-	-	-
<b>LAT1</b>	Putative dihydrolipoamide acetyltransferase component (E2) of pyruvate dehydrogenase complex; sumoylation target	2	3	3	3	6	5	8	3	4	-	-	-	-
<b>LSC2</b>	Putative succinate-CoA ligase beta subunit; transcription regulated by Mig1p and Tup1p; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; filament; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cells	1	4	3	3	10	8	8	2	4	-	-	-	-
<b>LYS12</b>	Putative mitochondrial homoisocitrate dehydrogenase; clade-associated gene expression; protein level decreases in stationary phase cultures	0	4	4	2	5	7	6	1	4	-	-	-	-
<b>NIP1</b>	Putative translation initiation factor; mutation confers hypersensitivity to roridin A and verrucarin A; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	2	2	2	3	7	8	6	2	4	-	-	-	-
<b>NOP1</b>	Nucleolar protein; flucytosine induced; Hap43p-induced gene	1	1	2	3	4	4	3	6	4	-	-	-	-
<b>NOP5</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Nop5p protein of small nucleolar ribonucleoprotein complex; transposon mutation affects filamentous growth; macrophage/pseudohyphal-induced; physically interacts with TAP-tagged Nop1p	1	2	2	3	4	5	7	3	4	-	-	-	-
<b>orf19.1564</b>	Plasma membrane-localized protein of unknown function	1	2	1	3	4	4	3	4	4	-	-	-	-
<b>orf19.1649</b>	RNA1 - Putative GTPase-activating protein; protein level decreases in stationary phase cultures	2	3	0	2	3	6	3	3	4	-	-	-	-
<b>orf19.1680</b>	TFP1 - Subunit of vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase; stationary phase enriched protein; sumoylation target	2	1	2	3	11	8	8	3	4	-	-	-	-
<b>orf19.2250</b>	SPE3 - Ortholog(s) have spermidine synthase activity, role in pantothenate biosynthetic process, spermidine biosynthetic process and cytosol, nucleus localization	1	3	0	2	3	3	2	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.2309.2</b>	RPL2 - Putative 60S ribosomal protein L2; Hap43p-induced gene; shows downregulation in infected rabbit kidney in SC5314, but not NGY152, strain background	5	5	4	3	11	9	11	11	4	-	-	-	-
<b>orf19.2329.1</b>	RPS17B - Ribosomal protein 17B; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophages; Hap43p-induced gene	4	5	3	3	7	6	6	7	4	-	-	-	-

<b>orf19.2489</b>	Putative karyopherin beta; repressed by nitric oxide	4	7	2	3	6	8	6	8	4	-	-	-	-
<b>orf19.2533.1</b>	Protein with a predicted role in protein translocation from the endoplasmic reticulum	3	2	2	3	4	3	4	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.2622</b>	YPT31 - Protein required for resistance to toxic ergosterol analog	1	2	1	3	8	8	8	7	4	-	-	-	-
<b>orf19.2795</b>	Ortholog(s) have tRNA binding activity, role in regulation of ascospore formation, regulation of conjugation with cellular fusion, tRNA 3'-trailer cleavage and nucleolus, nucleoplasm localization	1	2	1	3	2	3	2	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.2994.1</b>	RPS16A - Putative 40S ribosomal subunit; macrophage/pseudohyphal-induced after 16 h	4	4	4	3	7	10	9	8	4	-	-	-	-
<b>orf19.4089</b>	Putative co-chaperone protein with a predicted role in kinetochore assembly; mutation confers hypersensitivity to radicicol; sumoylation target	3	4	0	2	7	4	4	3	4	-	-	-	-
<b>orf19.4449</b>	Ortholog(s) have superoxide dismutase copper chaperone activity, role in cellular copper ion homeostasis, cellular response to metal ion, intracellular copper ion transport and cytosol, mitochondrial inner membrane, nucleus localization	3	1	1	3	2	1	3	5	4	-	-	-	-
<b>orf19.4560</b>	BFR1 - Protein involved in the maintenance of normal ploidy; <i>S. cerevisiae</i> ortholog confers Brefeldin A resistance; stationary phase enriched protein	4	9	4	3	17	14	16	7	4	-	-	-	-
<b>orf19.4577.3</b>	Ortholog(s) have protein transporter activity, unfolded protein binding activity and role in protein import into mitochondrial inner membrane	1	1	2	3	1	4	3	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.4633</b>	Ortholog(s) have carbonyl reductase (NADPH) activity, oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor activity and cytosol, nucleus, ribosome localization	1	1	1	3	1	2	2	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.4886</b>	Putative adhesin-like protein; Hap43p-repressed gene	1	3	2	3	2	3	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.4931.1</b>	RPL14 - Ribosomal protein L14; promoter bound directly by Tbf1p; Hap43p-induced gene	4	7	2	3	10	10	9	10	4	-	-	-	-
<b>orf19.5006</b>	GCV3 - Glycine decarboxylase, subunit H; protein level decrease in stationary phase cultures	2	3	1	3	4	5	5	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.5063</b>	COI1 - Secreted protein; ciclopirox olamine induced; regulated by Ssn6p; induced by nitric oxide independent of Yhb1p; Hap43p-induced	4	3	5	3	1	3	0	3	3	-	-	-	-
<b>orf19.754</b>	YBN5 - Ortholog(s) have ATPase activity and cytosol, nucleus localization	1	4	2	3	9	14	10	8	4	-	-	-	-
<b>orf19.7569</b>	SIK1 - Putative U3 snoRNP protein; Hap43p-induced gene; physically interacts with TAP-tagged Nop1p	1	4	3	3	5	2	5	2	4	-	-	-	-
<b>RAX2</b>	Plasma membrane protein; detected at yeast-form cell plasma membrane by mass spectrometry; transcription is filament induced and negatively regulated by Rim101p, Tup1p; Hap43p-induced gene	2	1	0	2	3	2	2	0	3	-	-	-	-
<b>RBT7</b>	Protein with similarity to RNase T2 enzymes, has putative secretion signal; expression is Tup1p-repressed	4	2	4	3	3	2	3	0	3	-	-	-	-
<b>RET2</b>	Protein that interacts with Crk1p in the two-hybrid system; potential ortholog of <i>S. cerevisiae</i> Ret2p	1	1	3	3	2	2	4	1	4	-	-	-	-
<b>RIP1</b>	Putative ubiquinol cytochrome c-reductase; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; alkaline downregulated; repressed by nitric oxide; Hap43p-repressed	1	1	1	3	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>RLI1</b>	Member of RNase L inhibitor (RLI) subfamily of ABC family; predicted not to be a transporter; regulated by Sef1p, Sfu1p, and Hap43p	2	1	1	3	6	6	4	3	4	-	-	-	-
<b>RPG1A</b>	Putative translation initiation factor; mutation confers hypersensitivity to roridin A and verrucarin A; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	1	1	1	3	6	6	4	5	4	-	-	-	-
<b>RPL10A</b>	Predicted ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophages; Hap43p-induced gene	2	4	4	3	2	4	6	1	4	-	-	-	-
<b>RPL16A</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> ribosomal protein Rpl16Ap; transposon mutation affects filamentous growth; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits are downregulated upon phagocytosis by murine macrophages; Hap43p-induced gene	3	3	2	3	10	8	10	6	4	-	-	-	-

<b>RPL37B</b>	Ribosomal protein L37; Hap43p-induced gene	1	3	1	3	4	2	5	0	3	-	-	-	-
<b>RPL43A</b>	Putative ribosomal protein, large subunit; downregulated in the presence of human whole blood or polymorphonuclear (PMN) cells; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p	2	3	2	3	4	5	4	3	4	-	-	-	-
<b>RPS30</b>	Putative 40S ribosomal protein S30; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p	2	2	2	3	3	2	5	2	4	-	-	-	-
<b>SOL3</b>	Putative 6-phosphogluconolactonase; present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; macrophage-downregulated protein abundance	2	6	2	3	1	3	3	5	4	-	-	-	-
<b>TIF3</b>	Putative translation initiation factor; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	4	8	3	3	8	9	9	11	4	-	-	-	-
<b>TIF4631</b>	Putative translation initiation factor eIF4G; overexpression causes hyperfilamentation; hyphal- and macrophage-induced; genes encoding some translation factors are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	3	2	1	3	5	5	4	4	4	-	-	-	-
<b>TIF5</b>	Putative translation initiation factor; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	1	1	1	3	2	5	2	3	4	-	-	-	-
<b>TYS1</b>	Putative tRNA-Tyr synthetase; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophages; stationary phase enriched protein	1	3	0	2	5	4	5	4	4	-	-	-	-
<b>UBI3</b>	Fusion of ubiquitin with the S34 protein of the small ribosomal subunit; mRNA decreases upon heat shock, appears to be degraded; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> RPS31; Hap43p-induced gene	5	6	5	3	8	5	10	12	4	-	-	-	-
<b>URA2</b>	Putative bifunctional carbamoylphosphate synthetase-aspartate transcarbamylase; flucytosine induced; macrophage/pseudohyphal-induced; intron in 5'-UTR	2	3	3	3	14	9	11	12	4	-	-	-	-
<b>YPS7</b>	Putative aspartic-type endopeptidase with limited ability to degrade alpha pheromone; mutants show increased sensitivity to alpha pheromone	3	5	6	3	6	4	6	2	4	-	-	-	-
<b>YPT1</b>	Functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Ypt1p, which is an essential small Ras-type GTPase involved in protein secretion at ER-to-Golgi; dominant-negative mutation causes SAP secretion defect and accumulation of intracellular secretory vesicles	2	3	1	3	5	4	5	5	4	-	-	-	-
<b>YRB1</b>	Functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Yrb1p, which regulates Gsp1p GTPase activity and thereby affects nucleocytoplasmic transport and cytoskeletal dynamics; transcription is not regulated by white-opaque switching or by dimorphic transition	2	2	0	2	3	3	2	6	4	-	-	-	-
<b>ZUO1</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Zuo1p, which is a cytosolic ribosome-associated chaperone; likely to be essential for growth, based on an insertional mutagenesis strategy	3	8	4	3	13	9	13	9	4	-	-	-	-
<b>ARG1</b>	Argininosuccinate synthase; arginine biosynthesis; regulated by Gcn4p, Rim101p; induced by amino acid starvation (3-AT) and benomyl treatment; stationary phase enriched protein; repressed in alkalinizing medium; planktonic growth-induced	-	-	-	-	10	10	12	13	4	7	2	3	3
<b>BCY1</b>	Protein kinase A regulatory subunit; required for nuclear localization of Tpk1p; physically interacts with Tpk1p; essential; apoptosis-regulated; bcy1 heterozygous or bcy1 tpk2 mutant has filamentous growth defect; planktonic growth-induced	-	-	-	-	4	4	3	5	4	2	3	2	3
<b>CDC12</b>	Septin; essential for viability; gene has predicted splice sites; forms ring at sites of cell division and also forms filaments in mature chlamydo-spore; filamentous growth induced; regulated by Nrg1p, Tup1p, tyrosol and cell density	-	-	-	-	7	7	7	5	4	2	2	4	3

<b>EIF4E</b>	Translation initiation factor eIF4E; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases downregulated by phagocytosis by macrophage; alternatively spliced intron in 5' UTR; protein levels decrease in stationary phase	-	-	-	-	6	3	4	2	4	2	1	1	3
<b>GLC7</b>	Putative catalytic subunit of type 1 serine/threonine protein phosphatase; regulated by Shp1p; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; alternatively spliced intron in 5' UTR	-	-	-	-	2	4	2	3	4	1	1	2	3
<b>HMO1</b>	Transcription factor that binds upstream of genes involved in hexose and ergosterol metabolism and in the cell cycle; activates pseudohyphal growth when expressed in <i>S. cerevisiae</i> ; expression repressed in hyphae relative to yeast-form cells	-	-	-	-	4	4	4	4	4	4	1	1	3
<b>IDP2</b>	Isocitrate dehydrogenase; expression is regulated upon white-opaque switching; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; Hap43p-repressed gene	-	-	-	-	5	7	5	8	4	4	0	1	2
<b>IST2</b>	Ortholog(s) have lipid binding activity and cellular bud membrane, endoplasmic reticulum localization	-	-	-	-	5	4	3	3	4	1	2	2	3
<b>MXR1</b>	Putative methionine sulfoxide reductase; flucytosine induced; Plc1p-regulated; upregulated in the presence of human neutrophils; macrophage regulated (gene induced, protein decreased); possibly adherence-induced	-	-	-	-	2	1	2	2	4	2	1	2	3
<b>NTF2</b>	Putative nuclear envelope protein; regulated by Ssn6p	-	-	-	-	0	2	1	5	3	1	1	1	3
<b>OBPA</b>	Similar to oxysterol binding protein; non-sex gene located within the MTL <sub>a</sub> mating-type-like locus; Plc1p-regulated	-	-	-	-	2	1	2	1	4	1	1	1	3
<b>orf19.1376</b>	Ortholog(s) have SNAP receptor activity, phosphatidic acid binding activity and role in ascospore-type prospore membrane assembly	-	-	-	-	2	4	2	1	4	2	2	1	3
<b>orf19.3467</b>	Ortholog(s) have ubiquitin binding activity and role in ER to Golgi vesicle-mediated transport, late endosome to vacuole transport via multivesicular body sorting pathway, retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER	-	-	-	-	5	3	6	0	3	1	1	1	3
<b>orf19.3496</b>	Ortholog(s) have role in endocytosis and cytoplasm localization	-	-	-	-	17	14	17	0	3	1	1	4	3
<b>orf19.6507</b>	Stationary phase enriched protein	-	-	-	-	4	5	5	2	4	2	1	1	3
<b>orf19.6701</b>	Protein with similarity to amino acid-tRNA ligase; stationary phase enriched protein; GlcNAc-induced protein	-	-	-	-	8	7	7	5	4	4	3	2	3
<b>RPL82</b>	Predicted ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	-	-	-	-	17	0	13	0	2	0	7	0	1
<b>SEC4</b>	Small GTPase of Rab family; role in post-Golgi secretion; possible C-terminal palmitoylation; downregulated on adherence to polystyrene; localizes to the Spitzenkörper during hyphal growth; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Sec4p	-	-	-	-	5	4	6	2	4	1	4	7	3
<b>SSZ1</b>	Putative HSP70 chaperone; protein level decreases in stationary phase cultures	-	-	-	-	6	7	6	9	4	3	4	1	3
<b>SUB2</b>	Putative TREX complex component with a predicted role in nuclear mRNA export; transcription is regulated by Mig1p; Hap43p-induced gene	-	-	-	-	8	5	7	5	4	2	1	2	3
<b>SUI2</b>	Translation initiation factor eIF2, alpha chain; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; stationary phase enriched protein	-	-	-	-	5	2	6	4	4	4	0	1	2

<b>GDH3</b>	NADP-glutamate dehydrogenase; hyphal downregulated; regulated by Nrg1p, Plc1p; Efg1p-downregulated; upregulated by Rim101p at pH 8; GlcNAc, ciclopirox, ketoconazole induced; hypoxia repressed; protein in exponential and stationary phases	0	5	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>orf19.1533</b>	Hap43p-induced gene; <i>S. cerevisiae</i> ortholog YKL077W localizes to fungal-type vacuole	1	1	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>orf19.4150</b>	Putative glutaredoxin; induced by nitric oxide	1	2	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>orf19.5572</b>	Ortholog of <i>C. parapsilosis</i> CDC317 : CPAR2_600660, <i>Candida tenuis</i> NRRL Y-1498 : CANTEDRAFT_104804, <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767 : DEHA2C11902g and <i>Candida dubliniensis</i> CD36 : CD36_63110	2	2	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>orf19.6630</b>	Ortholog(s) have role in ER-associated protein catabolic process	2	2	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>orf19.7196</b>	Putative vacuolar protease; upregulated in the presence of human neutrophils	2	0	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>PHO112</b>	Putative constitutive acid phosphatase; transcription is negatively regulated by Rim101p; DTT-extractable; N-glycosylated; Hap43p-induced; possibly an essential gene, disruptants not obtained by UAU1 method	2	0	4	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>TFS1</b>	Putative carboxypeptidase y inhibitor; transcription is regulated upon yeast-hyphal switch; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p	1	2	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>AAT21</b>	Putative aspartate aminotransferase; higher protein amounts present in stationary phase; Gcn4p-regulated	-	-	-	-	5	5	6	1	4	-	-	-	-
<b>ADE6</b>	5-Phosphoribosylformyl glycinamide synthetase, enzyme of adenine biosynthesis; not induced in GCN response, in contrast to the <i>S. cerevisiae</i> ortholog; protein only detected in stationary phase yeast-form cultures	-	-	-	-	4	4	3	9	4	-	-	-	-
<b>ALA1</b>	Alanyl-tRNA synthetase; translational regulation generates cytoplasmic and mitochondrial forms; Gcn4p-regulated; repressed by amino acid starvation (3-AT); translation-related genes downregulated upon phagocytosis by murine macrophages	-	-	-	-	9	7	6	0	3	-	-	-	-
<b>APM1</b>	Phosphorylated protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Apm1, which is involved in vesicle transport; transposon mutation affects filamentous growth	-	-	-	-	2	1	2	0	3	-	-	-	-
<b>ARD</b>	D-arabitol dehydrogenase, NAD-dependent (ArDH); enzyme of D-arabitol and D-arabinose catabolism; D-arabitol is a marker for active infection in humans; has conserved YXXK motif of short-chain alcohol-polyol-sugar dehydrogenases	-	-	-	-	4	3	4	2	4	-	-	-	-
<b>ARG5,6</b>	Arginine biosynthetic enzyme activities; in <i>S. cerevisiae</i> , processed into distinct polypeptides with acetylglutamate kinase (Arg6p) activity and acetylglutamate-phosphate reductase (Arg5p) activity; Gcn4p regulated; alkaline downregulated	-	-	-	-	2	1	2	0	3	-	-	-	-
<b>ARO10</b>	Aromatic decarboxylase of the Ehrlich fusel oil pathway of aromatic alcohol biosynthesis; pH-regulated (alkaline downregulated); protein abundance is affected by URA3 expression in the CAI-4 strain background	-	-	-	-	6	2	3	1	4	-	-	-	-
<b>ATP14</b>	Putative mitochondrial F1F0 ATP synthase subunit; macrophage/pseudohyphal-induced	-	-	-	-	2	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>ATP17</b>	Mitochondrial ATPase complex subunit; downregulated by Efg1p; flucytosine induced; caspofungin repressed	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>ATP4</b>	Putative F0-ATP synthase subunit 4; macrophage/pseudohyphal-induced; present in exponential and stationary growth phases	-	-	-	-	3	0	4	0	2	-	-	-	-
<b>ATP7</b>	Putative subunit of the F1F0-ATPase complex; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p; farnesol-, macrophage-downregulated protein abundance; protein present in exponential and stationary yeast growth phases; Hap43p-induced	-	-	-	-	1	2	2	0	3	-	-	-	-

<b>BAT22</b>	Putative branched chain amino acid aminotransferase; regulated by Gcn4p; induced by farnesol treatment, GlcNAc, amino acid starvation (3-aminotriazole treatment); present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	-	-	-	-	0	3	2	6	3	-	-	-	-
<b>BDF1</b>	Putative transcription factor; downregulated upon adherence to polystyrene; reduced mRNA abundance detected in homozygous null mutant; macrophage/pseudohyphal-repressed; possibly an essential gene, disruptants not obtained by UAU1 method	-	-	-	-	2	3	1	0	3	-	-	-	-
<b>BEM3</b>	Putative GTPase-activating protein (GAP) for Rho-type GTPase Cdc42p; involved in cell signaling pathways that control cell polarity; similar to <i>S. cerevisiae</i> Bem3p	-	-	-	-	1	0	1	1	3	-	-	-	-
<b>BRE1</b>	Putative transcription factor with C3HC4 zinc finger DNA-binding motif; similar to <i>S. cerevisiae</i> Bre1p; transposon mutation affects filamentous growth	-	-	-	-	1	2	1	0	3	-	-	-	-
<b>CBP1</b>	Corticosteroid binding protein; transcription induced at late log-phase or upon adherence to polystyrene; not induced by corticosterone; contains a possible NAD/FAD binding region; regulated by Nrg1p, Tup1p	-	-	-	-	1	1	1	2	4	-	-	-	-
<b>CCP1</b>	Similar to cytochrome-c peroxidase N terminus; negatively regulated by Rim101p or alkaline pH; transcription induced by interaction with macrophage or low iron; oxygen-induced activity; regulated by Sef1p-, Sfu1p-, and Hap43p	-	-	-	-	5	3	6	4	4	-	-	-	-
<b>CCT8</b>	Chaperonin-containing T-complex subunit; involved in hyphal morphogenesis, particularly starvation-induced; essential; expression in <i>S. cerevisiae</i> inhibits Ras2p-mediated pathways (including pseudohyphal); CCT8 and TRP1 genes overlap	-	-	-	-	3	1	5	4	4	-	-	-	-
<b>CDC28</b>	Cyclin-dependent protein kinase, interacts with regulatory subunit Cyb1p; involved in determination of cell morphology during the cell cycle; phosphorylated primarily by Swe1p and phosphorylation is regulated by Hsl1p; intron in 5'-UTR	-	-	-	-	2	2	0	1	3	-	-	-	-
<b>CDC54</b>	Putative pre-replication complex helicase subunit; transcription is regulated by Nrg1p and Mig1p; periodic mRNA expression, peak at cell-cycle M/G1 phase; Hap43p-induced gene	-	-	-	-	1	2	1	1	4	-	-	-	-
<b>CDC68</b>	Functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Cdc68p, which is a transcription elongation factor; essential; possible drug target	-	-	-	-	3	3	3	1	4	-	-	-	-
<b>COX19</b>	Putative cytochrome c oxidase assembly protein; Plc1p-regulated	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>COX6</b>	Putative cytochrome c oxidase; flucytosine induced	-	-	-	-	3	2	5	1	4	-	-	-	-
<b>COX9</b>	Putative subunit VIIa of cytochrome c oxidase; flucytosine induced	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>CTA3</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Ede1p, which is involved in endocytosis; activates transcription in 1-hybrid assay in <i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	8	6	6	2	4	-	-	-	-
<b>CYC1</b>	Cytochrome c; complements defects of <i>S. cerevisiae</i> cyc1 cyc7 double mutant; expression greater in high iron; alkaline downregulated; repressed by nitric oxide; Cap2-dependent downregulation in low iron; regulated by Sef1p, Sfu1p, and Hap43p	-	-	-	-	0	1	1	1	3	-	-	-	-
<b>CYT1</b>	Cytochrome c1; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; alkaline downregulated; possibly an essential gene, disruptants not obtained by UAU1 method; Hap43p-repressed gene	-	-	-	-	2	3	3	0	3	-	-	-	-
<b>DNM1</b>	Putative dynamin-related GTPase; transcription is upregulated in an RHE model of oral candidiasis; transcription is regulated by Nrg1p, Mig1p, and Tup1p	-	-	-	-	1	3	1	1	4	-	-	-	-
<b>DOA1</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Doa1p, which is involved in ubiquitin-mediated protein degradation; WD-repeats; mellitin-like sequence	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-

<b>DPM1</b>	Putative dolichol phosphate mannose synthase; filament induced; Tup1p-regulated	-	-	-	-	2	4	5	0	3	-	-	-	-
<b>DRG1</b>	Member of the DRG family of GTP-binding proteins; involved in regulation of invasive filamentous growth	-	-	-	-	2	2	2	0	3	-	-	-	-
<b>END3</b>	Regulated by Gcn4p; induced in response to amino acid starvation (3-aminotriazole treatment)	-	-	-	-	1	1	2	2	4	-	-	-	-
<b>ERF1</b>	Putative translation release factor 1, which interacts with stop codons and promotes release of nascent peptides from ribosomes; Hap43p-induced gene	-	-	-	-	4	4	1	3	4	-	-	-	-
<b>ERG12</b>	Ortholog(s) have mevalonate kinase activity and role in ergosterol biosynthetic process, farnesyl diphosphate biosynthetic process, mevalonate pathway, isopentenyl diphosphate biosynthetic process, mevalonate pathway	-	-	-	-	1	2	1	0	3	-	-	-	-
<b>ERG20</b>	Putative farnesyl pyrophosphate synthetase involved in isoprenoid and sterol biosynthesis, based on similarity to <i>S. cerevisiae</i> Erg20p; likely to be essential for growth, based on an insertional mutagenesis strategy	-	-	-	-	4	2	3	2	4	-	-	-	-
<b>ERG5</b>	Putative C-22 sterol desaturase; fungal C-22 sterol desaturases are cytochrome P450 enzymes of ergosterol biosynthesis, catalyze formation of the C-22(23) double bond in the sterol side chain; transposon mutation affects filamentous growth	-	-	-	-	2	4	1	0	3	-	-	-	-
<b>FAD2</b>	Delta-12 fatty acid desaturase, involved in production of linoleic acid, which is a major component of membranes	-	-	-	-	3	2	3	2	4	-	-	-	-
<b>FGR44</b>	Protein lacking an ortholog in <i>S. cerevisiae</i> ; transposon mutation affects filamentous growth	-	-	-	-	1	2	1	1	4	-	-	-	-
<b>FLC2</b>	Protein involved in heme uptake; putative FAD transporter, similar to <i>S. cerevisiae</i> Flc2p	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>FRE7</b>	Copper-regulated cupric reductase similar to Fre10p; transcription is downregulated in response to treatment with ciclopirox olamine or 17-beta-estradiol; transcriptionally induced by alkaline conditions or interaction with macrophage	-	-	-	-	2	0	2	0	2	-	-	-	-
<b>FRS2</b>	Putative tRNA-Phe synthetase; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	-	-	-	-	3	4	5	0	3	-	-	-	-
<b>FUN12</b>	Functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Fun12p translation initiation factor eIF5B; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	-	-	-	-	4	7	2	2	4	-	-	-	-
<b>GAP4</b>	Putative amino acid permease; hyphal induced; regulated by Hap43p, Gcn2p and Gcn4p; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p; detected at plasma membrane of yeast-form and germ tube by mass spectrometry	-	-	-	-	3	3	2	1	4	-	-	-	-
<b>GCD11</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Gcd11p, which is a subunit of translation initiation factor eIF2; likely to be essential for growth, based on an insertional mutagenesis strategy	-	-	-	-	1	3	1	0	3	-	-	-	-
<b>GCN1</b>	Ortholog(s) have role in regulation of translational elongation and cytosolic ribosome, mitochondrion localization	-	-	-	-	1	2	1	0	3	-	-	-	-
<b>GEA2</b>	Putative ARF GTP/GDP exchange factor; transcriptionally regulated by iron; expression greater in low iron	-	-	-	-	1	1	2	0	3	-	-	-	-
<b>GLN4</b>	Putative tRNA-Gln synthetase; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	-	-	-	-	4	3	4	0	3	-	-	-	-
<b>GLO3</b>	Ortholog(s) have ARF GTPase activator activity and role in COPI coating of Golgi vesicle, ER to Golgi vesicle-mediated transport, retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER	-	-	-	-	7	6	8	6	4	-	-	-	-

<b>GPA2</b>	G-protein alpha subunit; regulates filamentous growth; involved in cAMP-mediated glucose signaling; reports differ on role in cAMP-PKA pathway, MAP kinase cascade; Gpr1p C terminus binds Gpa2p; regulates HWP1 and ECE1	-	-	-	-	1	2	1	2	4	-	-	-	-
<b>GPX2</b>	Similar to glutathione peroxidase; expression greater in high iron; alkaline upregulated by Rim101p; transcriptionally induced by alpha factor or interaction with macrophage; regulated by Efg1p; caspofungin repressed	-	-	-	-	3	4	3	0	3	-	-	-	-
<b>GYP2</b>	Ortholog(s) have Rab GTPase activator activity, role in intracellular protein transport and cell division site, cytosol localization	-	-	-	-	3	0	3	0	2	-	-	-	-
<b>HBR1</b>	Essential protein involved in regulation of MTL gene expression; hemoglobin-regulated inhibitor of white-opaque switching, which may affect survival in host; activator of MTLalpha1 and MTLalpha2; transcription is activated by hemoglobin	-	-	-	-	1	1	2	1	4	-	-	-	-
<b>HCH1</b>	Protein not essential for viability; regulated by Gcn4p; induced in response to amino acid starvation (3-aminotriazole treatment); similar to <i>S. cerevisiae</i> Hch1p, which is a regulator of heat shock protein Hsp90p	-	-	-	-	2	1	2	3	4	-	-	-	-
<b>HCR1</b>	Putative translation initiation factor; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	-	-	-	-	2	0	1	1	3	-	-	-	-
<b>HEM2</b>	Putative porphobilinogen synthase; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; protein level decrease in stationary phase cultures	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>HHO1</b>	Putative histone H1; farnesol regulated; Hap43p-induced gene; contains 5' UTR intron	-	-	-	-	3	3	4	2	4	-	-	-	-
<b>HIS4</b>	Multifunctional enzyme that catalyzes three steps of histidine biosynthesis, with phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase, phosphoribosyl-ATP diphosphatase, and histidinol dehydrogenase activities; required for wild-type adhesion to human cells	-	-	-	-	3	2	2	1	4	-	-	-	-
<b>HLJ1</b>	Putative HSP40 co-chaperone; repressed during the mating process	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>HOM2</b>	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase; forms a homodimer; conserved in bacteria, archaea, and fungi but not in mammals; ketoconazole-repressed; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; GlcNAc-induced protein	-	-	-	-	2	3	3	1	4	-	-	-	-
<b>HPT1</b>	Putative hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; protein abundance is affected by URA3 expression in the CAI-4 strain background; protein level decrease in stationary phase cultures	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>HTS1</b>	Putative tRNA-His synthetase; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; stationary phase enriched protein	-	-	-	-	4	5	6	3	4	-	-	-	-
<b>IDH2</b>	Putative mitochondrial NAD-isocitrate dehydrogenase subunit; transcription upregulated by treatment with ciclopirox; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; present in exponential and stationary growth phases	-	-	-	-	4	3	6	1	4	-	-	-	-
<b>IDP1</b>	Putative isocitrate dehydrogenase; transcriptionally induced by interaction with macrophage; alkaline upregulated	-	-	-	-	3	1	3	2	4	-	-	-	-
<b>IFU5</b>	Predicted membrane protein; estradiol-induced; increased transcription associated with CDR1 and CDR2 overexpression or fluphenazine treatment; putative drug-responsive regulatory site; similar to <i>S. cerevisiae</i> Wwm1p; Hap43p-repressed gene	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>ILV2</b>	Putative acetolactate synthase; regulated by Gcn4p; induced by amino acid starvation (3-AT treatment); stationary phase enriched protein	-	-	-	-	3	2	2	1	4	-	-	-	-

<b>KGD2</b>	Putative dihydrolipoamide S-succinyltransferase; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; Hap43p-repressed gene	-	-	-	-	0	2	2	0	2	-	-	-	-
<b>KIN3</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Kin3p; induced under Cdc5p depletion; shows Mob2p-dependent hyphal regulation; mutants are hypersensitive to caspofungin	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>MAM33</b>	Putative mitochondrial acidic matrix protein; regulated by Ssn6p; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	-	-	-	-	1	2	2	1	4	-	-	-	-
<b>MES1</b>	Cytoplasmic methionyl-tRNA synthetase; zinc-binding motif; ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; protein present in exponential and stationary phase yeast	-	-	-	-	3	4	2	2	4	-	-	-	-
<b>MET10</b>	Sulfite reductase; role in sulfur amino acid metabolism; biofilm-induced expression; upregulated in the presence of human whole blood or polymorphonuclear (PMN) cells; Hog1p-induced; possibly adherence-induced	-	-	-	-	3	6	0	0	2	-	-	-	-
<b>MRP8</b>	Protein not essential for viability; similar to <i>S. cerevisiae</i> Mrp8p, which is a mitochondrial ribosomal protein; greater transcription in hyphal form than yeast form	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.1030</b>	Putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	-	-	-	-	2	3	1	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.1058</b>	Ortholog(s) have ubiquitin binding activity, role in ubiquitin-dependent protein catabolic process and proteasome regulatory particle, lid subcomplex, proteasome storage granule localization	-	-	-	-	2	2	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.1082.1</b>	Ortholog(s) have cytochrome-c oxidase activity, role in mitochondrial respiratory chain complex IV assembly and cytosol, mitochondrial respiratory chain complex IV, nucleus localization	-	-	-	-	4	4	3	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.1085</b>	Ortholog(s) have ubiquitin-protein ligase activity and role in ER-associated protein catabolic process, protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process, vesicle organization	-	-	-	-	2	2	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.1086</b>	Ortholog(s) have role in protein deubiquitination, regulation of ER to Golgi vesicle-mediated transport, regulation of retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER, ribophagy and cytoplasm localization	-	-	-	-	6	6	4	4	4	-	-	-	-
<b>orf19.1124.2</b>	Ortholog(s) have dipthine synthase activity, role in peptidyl-diphthamide biosynthetic process from peptidyl-histidine and cytosol, nucleus localization	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.117</b>	Ortholog(s) have SNAP receptor activity, role in vesicle fusion and SNARE complex, extrinsic to plasma membrane localization	-	-	-	-	1	1	1	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.121</b>	Putative ARP2/3 complex subunit; mutation confers hypersensitivity to cytochalasin D	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.1212</b>	Ortholog(s) have FFAT motif binding, phosphatidylinositol binding activity	-	-	-	-	1	1	0	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.1248</b>	Putative RNA polymerase II subunit B44; heterozygous null mutant exhibits resistance to parnafungin in the <i>C. albicans</i> fitness test	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.1301</b>	Ortholog(s) have cytoplasm, nucleus, ribosome localization	-	-	-	-	2	2	2	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.1338</b>	Ortholog of <i>C. glabrata</i> CBS138 : CAGL0L0522g and <i>C. parapsilosis</i> CDC317 : CPAR2_704050	-	-	-	-	2	3	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.1340</b>	Putative aldose reductase; protein level decreases in stationary phase cultures	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.135</b>	Predicted subunit of the exocyst complex, involved in exocytosis; localizes to a crescent on the surface of the hyphal tip	-	-	-	-	2	1	0	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.1355</b>	Putative protein of unknown function; stationary phase enriched protein	-	-	-	-	4	1	5	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.1361</b>	Protein involved in mitochondrial matrix protein import	-	-	-	-	2	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.1372</b>	Gene transcription regulated by Mig1p and Tup1p	-	-	-	-	1	2	2	1	4	-	-	-	-

<b>orf19.1374</b>	Ortholog of <i>Candida tenuis</i> NRRL Y-1498 : CANTEDRAFT_104074, <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767 : DEHA2B13310g, <i>Candida dubliniensis</i> CD36 : CD36_23840 and <i>Pichia stipitis</i> Pignal : PICST_58235	-	-	-	-	1	1	2	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.1386</b>	Ortholog(s) have SNAP receptor activity and role in ER to Golgi vesicle-mediated transport, retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER, vesicle fusion	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.1389</b>	Ortholog(s) have poly(A) RNA binding activity, role in mRNA metabolic process and cytoplasm localization	-	-	-	-	3	2	3	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.1402</b>	Chaperonin of the cytosolic TCP1 ring complex; protein present in exponential and stationary-phase yeast cells, but higher amounts in stationary phase; GlcNAc-induced protein	-	-	-	-	7	8	6	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.1409.1</b>	Ortholog(s) have structural constituent of ribosome activity, role in cytoplasmic translation and cytosolic large ribosomal subunit, nucleolus localization	-	-	-	-	2	2	2	3	4	-	-	-	-
<b>orf19.1414</b>	Protein of unknown function, transcription is upregulated in an RHE model of oral candidiasis; Hap43p-repressed gene	-	-	-	-	1	1	1	3	4	-	-	-	-
<b>orf19.1478</b>	Putative oligosaccharyltransferase complex component	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.1578</b>	Hap43p-induced gene	-	-	-	-	1	0	2	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.1626</b>	Ortholog(s) have transferase activity, transferring alkyl or aryl (other than methyl) groups activity, role in peptidyl-lysine modification to hypusine and cytosol, nucleus localization	-	-	-	-	2	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.1630</b>	Has domain(s) with predicted nucleic acid binding, nucleotide binding activity	-	-	-	-	5	4	3	3	4	-	-	-	-
<b>orf19.1642</b>	Hap43p-induced gene; ortholog of <i>S. cerevisiae</i> LOC1, a nuclear protein involved in asymmetric localization of ASH1 mRNA in <i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	1	0	1	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.1658</b>	Ortholog(s) have cell cortex, cellular bud neck, mating projection tip localization	-	-	-	-	1	1	2	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.1661</b>	Ortholog(s) have RNA helicase activity, RNA-dependent ATPase activity, inositol hexakisphosphate binding activity and role in mRNA export from nucleus, translational termination	-	-	-	-	2	3	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.1672</b>	Ortholog(s) have ubiquitin binding activity, role in ER to Golgi vesicle-mediated transport, retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER and COPI vesicle coat localization	-	-	-	-	10	9	9	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.1697</b>	Ortholog(s) have role in cytoplasmic translation and cytoplasm, polysomal ribosome localization	-	-	-	-	0	4	3	2	3	-	-	-	-
<b>orf19.1710</b>	Putative NADH-ubiquinone oxidoreductase; in detergent-resistant membrane fraction (possible lipid raft component); predicted N-terminal acetylation; nitric oxide-repressed; plasma membrane-localized; protein decreases in stationary phase	-	-	-	-	2	1	2	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.1738.1</b>	Ortholog(s) have beta-tubulin binding activity, role in tubulin complex assembly and cytoplasm localization	-	-	-	-	4	3	3	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.1750</b>	Protein similar to mammalian SR-like RNA splicing factor; gene has intron; significant changes made to ORF with coordinate updates (see Locus History)	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.1754</b>	Putative calmodulin-dependent protein kinase; possibly an essential gene, disruptants not obtained by UAU1 method	-	-	-	-	3	4	4	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.1777</b>	Ortholog(s) have ubiquitin-specific protease activity, role in endocytosis, protein deubiquitination, regulation of protein kinase activity and cell division site, cytosol, nucleus, transport vesicle localization	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.1796</b>	Ortholog(s) have oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor activity and role in metabolic process	-	-	-	-	0	3	1	0	2	-	-	-	-
<b>orf19.1801</b>	Putative cytochrome B5 reductase; plasma membrane-localized	-	-	-	-	3	5	4	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.1815</b>	Ortholog(s) have ribosomal large subunit binding activity	-	-	-	-	2	1	1	1	4	-	-	-	-

<b>orf19.1833</b>	Ortholog(s) have pseudouridine synthase activity, role in box H/ACA snoRNA 3'-end processing, rRNA pseudouridine synthesis, snRNA pseudouridine synthesis and 90S preribosome, box H/ACA snoRNP complex, cytosol localization	-	-	-	-	3	2	0	4	3	-	-	-	-
<b>orf19.1840</b>	Ortholog(s) have lipid binding activity and cortical endoplasmic reticulum, mitochondrion, plasma membrane localization	-	-	-	-	1	3	0	0	2	-	-	-	-
<b>orf19.1866</b>	Ortholog(s) have cytosol, nucleus, vacuolar proton-transporting V-type ATPase, V1 domain localization; GlcNAc-induced protein	-	-	-	-	4	4	3	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.1970</b>	Putative vacuole biogenesis protein	-	-	-	-	3	0	2	0	2	-	-	-	-
<b>orf19.1993</b>	Ortholog(s) have structural molecule activity, role in proteasome assembly, ubiquitin-dependent protein catabolic process and proteasome regulatory particle, lid subcomplex, proteasome storage granule localization	-	-	-	-	2	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.2125</b>	GlcNAc-induced protein	-	-	-	-	1	1	0	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.213</b>	Ortholog(s) have role in ubiquitin-dependent protein catabolic process and nucleus, proteasome regulatory particle, lid subcomplex, proteasome storage granule localization	-	-	-	-	2	2	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.2146</b>	Ortholog(s) have histone acetyltransferase activity, histone binding activity, role in chromatin assembly or disassembly, chromatin silencing at telomere, histone acetylation and cytoplasm, histone acetyltransferase complex localization	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.2150</b>	Ortholog(s) have mitochondrion localization	-	-	-	-	3	1	2	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.2166</b>	Putative vacuolar H(+)-ATPase; plasma membrane localized	-	-	-	-	1	1	3	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.2168.3</b>	Ortholog(s) have role in cellular protein localization, endoplasmic reticulum tubular network organization, nuclear pore complex assembly, site selection involved in cell cycle cytokinesis, vesicle-mediated transport	-	-	-	-	2	2	2	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.2175</b>	Putative mitochondrial cell death effector; induced by nitric oxide	-	-	-	-	2	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.2194</b>	Phosphorylated protein of unknown function	-	-	-	-	1	1	0	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.2246</b>	Ortholog(s) have cytosol, nucleus localization	-	-	-	-	2	2	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.2278</b>	Putative 20S proteasome assembly protein; filament induced; transcription is induced in response to alpha pheromone in SpiderM medium	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.2288</b>	T-complex protein 1, epsilon subunit; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	-	-	-	-	6	3	4	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.2304</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Gvp36p; transposon mutation affects filamentous growth	-	-	-	-	5	7	7	3	4	-	-	-	-
<b>orf19.2322.3</b>	Ortholog(s) have Golgi apparatus, endoplasmic reticulum localization	-	-	-	-	3	2	2	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.2335</b>	Putative aspartyl aminopeptidase; stationary phase enriched protein; mutation confers hypersensitivity to 5-fluorouracil (5-FU); Hog1p-induced; planktonic growth-induced	-	-	-	-	0	2	2	0	2	-	-	-	-
<b>orf19.2341</b>	Protein with similarity to protein kinase C inhibitor-I; protein level decreases in stationary phase cultures	-	-	-	-	1	3	2	6	4	-	-	-	-
<b>orf19.239</b>	Putative ATP-dependent helicase; induced by nitric oxide	-	-	-	-	1	1	3	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.2549</b>	Regulator of the type 1 protein phosphatase Glc7p activity, involved in control of morphogenesis, progression through the cell cycle and response to DNA damage	-	-	-	-	5	3	5	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.2570</b>	Putative NADH-ubiquinone dehydrogenase; Hap43p-repressed gene	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.2639.1</b>	Ortholog(s) have RNA binding activity and role in maturation of SSU-rRNA, nuclear mRNA splicing, via spliceosome, nuclear-transcribed mRNA catabolic process	-	-	-	-	2	1	1	0	3	-	-	-	-

<b>orf19.2710</b>	Ortholog(s) have enzyme activator activity, role in chromosome segregation and cytoplasm, nucleus localization	-	-	-	-	2	0	2	2	3	-	-	-	-
<b>orf19.2720</b>	Ortholog(s) have unfolded protein binding activity, role in protein folding and chaperonin-containing T-complex, nucleus localization	-	-	-	-	7	3	5	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.2786</b>	Has domain(s) with predicted protein transporter activity, role in intracellular protein transport, vesicle-mediated transport and clathrin adaptor complex localization	-	-	-	-	1	1	0	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.2829</b>	Ortholog(s) have role in protein transport and endoplasmic reticulum, nuclear envelope localization	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.285</b>	Ortholog(s) have role in mRNA stabilization and cytoplasm, nucleus localization	-	-	-	-	1	1	2	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.287</b>	Putative NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit; Hap43p-repressed gene; repressed by nitric oxide; identified in detergent-resistant membrane fraction (possible lipid raft component)	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.2917</b>	Putative GTPase; heterozygous null mutant exhibits resistance to parnafungin in the <i>C. albicans</i> fitness test; Hap43p-induced gene	-	-	-	-	1	3	2	3	4	-	-	-	-
<b>orf19.2928</b>	Ortholog(s) have COPI-coated vesicle, Golgi apparatus localization	-	-	-	-	2	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.2930</b>	Ortholog(s) have translation initiation factor activity, role in translational initiation and cytosolic small ribosomal subunit, ribosome localization	-	-	-	-	3	4	2	4	4	-	-	-	-
<b>orf19.2953</b>	Putative mitochondrial primary import receptor	-	-	-	-	2	0	1	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.2965</b>	Ortholog(s) have ATPase activity, guanyl-nucleotide exchange factor activity	-	-	-	-	3	3	4	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.2973</b>	Ortholog(s) have RNA binding, flap-structured DNA binding activity and role in nuclear-transcribed mRNA poly(A) tail shortening, positive regulation of endodeoxyribonuclease activity	-	-	-	-	1	1	0	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.2974</b>	Putative protein of the vacuolar SNARE complex with a predicted role in vacuolar fusion	-	-	-	-	2	5	2	6	4	-	-	-	-
<b>orf19.3003</b>	Putative lipid-binding protein with a predicted role in calcium-dependent phospholipid-binding	-	-	-	-	3	4	2	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.3004</b>	Ortholog of <i>C. parapsilosis</i> CDC317 : CPAR2_108490	-	-	-	-	1	1	0	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.3006</b>	Ortholog(s) have phosphatidylinositol-4-phosphate binding, ubiquitin binding activity	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.3031</b>	Putative endoplasmic reticulum (ER) protein-translocation complex subunit	-	-	-	-	5	3	5	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.3060</b>	Ortholog(s) have dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycotransferase activity, role in protein N-linked glycosylation and oligosaccharyltransferase complex localization	-	-	-	-	2	3	2	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.3122.2</b>		0	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.3126</b>	Putative cytosolic chaperonin Cct ring complex subunit; mutation confers hypersensitivity to cytochalasin D; GlcNAc-induced protein	-	-	-	-	3	3	4	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.3129</b>	Putative chromatin remodelling complex protein; heterozygous null mutant displays sensitivity to virgineone	-	-	-	-	1	1	1	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.3141</b>	Ortholog(s) have role in ER to Golgi vesicle-mediated transport and cytoplasmic mRNA processing body, endoplasmic reticulum membrane, extrinsic to membrane localization	-	-	-	-	1	1	2	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.3206</b>	Cytosolic chaperonin Cct ring complex; protein is present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; sumoylation target	-	-	-	-	5	6	3	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.3230</b>	Putative SH3-domain-containing protein; mutation confers hypersensitivity to toxic ergosterol analog	-	-	-	-	2	2	2	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.3290</b>	Plasma membrane-localized protein; repressed by nitric oxide; Hap43p-repressed gene	-	-	-	-	2	2	0	0	2	-	-	-	-
<b>orf19.3295</b>	Ortholog of <i>C. parapsilosis</i> CDC317 : CPAR2_110120, <i>Candida tenuis</i> NRRL Y-1498 : CANTEDRAFT_134584, <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767 : DEHA2D14520g and <i>Candida dubliniensis</i> CD36 : CD36_01010	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-

<b>orf19.330.1</b>	Ubiquitin-related protein with similarity to mammalian NEDD8; reversible conjugation (neddylation) of the cullin subunit (Cdc53p) modulates the ubiquitin ligase activity of the SCF complexes	-	-	-	-	1	1	2	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.3333</b>	Ortholog(s) have poly(A) RNA binding activity, role in mRNA polyadenylation, poly(A)+ mRNA export from nucleus, regulation of mRNA stability and cytoplasm, nucleus localization	-	-	-	-	1	1	2	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.3335</b>	Plasma membrane protein; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p; repressed by nitric oxide	-	-	-	-	1	1	2	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.3341</b>	Putative tRNA-Arg synthetase; essential; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; downregulated by growth in the mouse cecum	-	-	-	-	5	5	4	4	4	-	-	-	-
<b>orf19.3349</b>	Putative RNA polymerase II subunit B150; heterozygous null mutant exhibits resistance to parnafungin in the <i>C. albicans</i> fitness test	-	-	-	-	1	1	0	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.338</b>	Putative protein of unknown function; stationary phase enriched protein; Hog1p-downregulated; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p	-	-	-	-	5	7	6	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.3430</b>	Plasma membrane-associated protein; physically interacts with TAP-tagged Nop1p	-	-	-	-	1	2	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.3476</b>	Ortholog(s) have protein serine/threonine kinase activity	-	-	-	-	2	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.3481</b>	Putative mitochondrial ATP-dependent RNA helicase of the DEAD-box family, transcription is activated in the presence of elevated CO <sub>2</sub>	-	-	-	-	1	1	0	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.3561</b>	Putative kinase; cell-cycle regulated periodic mRNA expression; <i>S. cerevisiae</i> ortholog is not cell-cycle regulated; possibly an essential gene, disruptants not obtained by UAU1 method	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.3583</b>	Ortholog(s) have role in protein export from nucleus, regulation of chromatin silencing at telomere, ribosomal small subunit export from nucleus and nuclear pore localization	-	-	-	-	0	1	1	2	3	-	-	-	-
<b>orf19.3681</b>	Ortholog(s) have Ran guanyl-nucleotide exchange factor activity, protein transporter activity	-	-	-	-	2	2	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.3687</b>	Ortholog(s) have unfolded protein binding activity, role in cytoskeleton organization, protein folding and prefoldin complex localization	-	-	-	-	3	3	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.3792</b>	Ortholog(s) have role in chromosome segregation, cytoplasmic mRNA processing body assembly, deadenylation-dependent decapping of nuclear-transcribed mRNA and formation of translation preinitiation complex, more	-	-	-	-	2	1	0	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.3836</b>	Ortholog(s) have cytoplasm localization	-	-	-	-	1	1	1	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.3859</b>	Putative microsomal beta-keto-reductase; transcription is upregulated in response to treatment with ciclopirox olamine; transcription is induced in response to alpha pheromone in SpiderM medium; regulated by Sef1p-, Sfu1p-, and Hap43p	-	-	-	-	1	2	0	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.3872</b>	Oral infection upregulated gene; mutants have reduced capacity to damage oral epithelial cells	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.3952</b>	Ortholog(s) have GTP binding, signal recognition particle binding activity, role in protein targeting to ER and cytosol, endoplasmic reticulum membrane, nucleus localization	-	-	-	-	2	0	1	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.3977</b>	Ortholog(s) have role in cytoplasmic translation and cell tip, cytoplasm localization	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.4004</b>	Putative cytosolic chaperonin Cct ring complex subunit; mutation confers hypersensitivity to cytochalasin D	-	-	-	-	3	2	3	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.4164</b>	Ortholog(s) have mitochondrion, ribosome localization	-	-	-	-	2	0	1	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.4180</b>	ER protein-translocation complex component; regulated by Gcn4p; repressed in response to amino acid starvation (3-aminotriazole treatment); sumoylation target	-	-	-	-	2	0	2	0	2	-	-	-	-

<b>orf19.4283</b>	Ortholog(s) have role in translational initiation and cytosol, eukaryotic 43S preinitiation complex, eukaryotic translation initiation factor 3 complex, eIF3e, eukaryotic translation initiation factor 3 complex, eIF3m, nucleus localization	-	-	-	-	1	1	2	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.4346</b>	Ortholog(s) have protein anchor activity, role in COPII vesicle coating and ER to Golgi transport vesicle membrane localization	-	-	-	-	2	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.4382</b>	Ortholog(s) have role in retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER and COPI vesicle coat, cytosol, nucleus localization	-	-	-	-	2	2	2	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.4396</b>	Ortholog(s) have role in cristae formation, protein import into mitochondrial intermembrane space and integral to mitochondrial inner membrane, mitochondrial crista, mitochondrial crista junction localization	-	-	-	-	4	3	4	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.448</b>	Ortholog(s) have ubiquitin binding activity and cytoplasm localization	-	-	-	-	2	4	3	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.4503</b>	Ortholog(s) have cytosol, nucleus localization	-	-	-	-	2	1	2	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.4594</b>	Ortholog(s) have role in endocytosis and Golgi apparatus localization	-	-	-	-	3	3	3	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.4666</b>	Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21; hyphal-induced expression, regulated by Cyr1p, Ras1p, Efg1p	-	-	-	-	1	0	2	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.4686</b>	Ortholog of <i>S. cerevisiae</i> : YIL151C, <i>C. glabrata</i> CBS138 : CAGL0H06611g, <i>C. parapsilosis</i> CDC317 : CPAR2_401340 and <i>Candida tenuis</i> NRRL Y-1498 : CANTEDRAFT_104645	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.4751</b>	Ortholog(s) have structural constituent of ribosome activity and mitochondrial small ribosomal subunit localization	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.4796</b>	Putative eIF-4E-binding repressor of CAP-dependent translation; stationary phase enriched protein	-	-	-	-	1	2	2	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.485</b>	Ortholog(s) have structural constituent of cytoskeleton activity	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.4864</b>	Ortholog(s) have acylglycerol lipase activity, serine hydrolase activity, role in triglyceride metabolic process and lipid particle, mitochondrial outer membrane, plasma membrane enriched fraction localization	-	-	-	-	0	3	2	0	2	-	-	-	-
<b>orf19.4931</b>	Putative tRNA-Cys synthetase; ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; induced by alpha pheromone in SpiderM medium; protein decreases in yeast stationary phase	-	-	-	-	4	3	3	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.4953</b>	Ortholog(s) have ATPase activity, role in ER-associated protein catabolic process, invasive growth in response to glucose limitation, pseudohyphal growth and cytosol, nucleus localization	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.5006.1</b>	Ortholog(s) have SNAP receptor activity and role in Golgi to plasma membrane transport, cell cycle cytokinesis, endocytosis, exocytosis, vesicle fusion	-	-	-	-	2	3	2	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.5030</b>	Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21; induced during planktonic growth	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.5085</b>	Ortholog(s) have nuclear localization sequence binding, protein transporter activity and role in mRNA export from nucleus, protein import into nucleus, regulation of mitosis, regulation of protein desumoylation	-	-	-	-	1	3	1	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.5095</b>	Putative oxysterol-binding protein; caspofungin induced; possibly an essential gene, disruptants not obtained by UAU1 method	-	-	-	-	2	1	3	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.51</b>	Ortholog(s) have role in mitochondrion organization, translational initiation and eukaryotic translation initiation factor 3 complex localization	-	-	-	-	2	2	2	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.512</b>	Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21; essential; <i>S. cerevisiae</i> ortholog is essential	-	-	-	-	2	1	0	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.5194.1</b>	Putative protein of unknown function; clade-associated gene expression	-	-	-	-	1	2	1	1	4	-	-	-	-

<b>orf19.5195</b>	Ortholog(s) have adenylate kinase activity, uridylylase activity, role in 'de novo' pyrimidine base biosynthetic process and cytosol, nucleus localization	-	-	-	-	5	1	2	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.5242</b>	Putative ATP-binding protein with a predicted role in DNA replication; member of conserved Mcm1p regulon; periodic mRNA expression, peak at cell-cycle M/G1 phase	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.528</b>	Secretory vesicles coatamer complex protein	-	-	-	-	13	9	11	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.5345</b>	Putative ubiquitin-like polyubiquitin-binding protein; induced by nitric oxide independent of Yhb1p	-	-	-	-	2	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.5352</b>	Protein not essential for viability	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.5369</b>	Ortholog(s) have uroporphyrinogen decarboxylase activity, role in heme biosynthetic process and cytosol, nucleus localization	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.5411</b>	Ortholog(s) have NEDD8 ligase activity, role in protein neddylation, regulation of mitotic cell cycle and cytosol, nucleus localization	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.543</b>	Putative fumarate hydratase; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; protein in exponential and stationary-phase yeast cells, but higher amounts in stationary phase	-	-	-	-	0	1	1	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.5459</b>	Putative mRNA polyadenylation regulating protein; Hap43p-repressed gene, transcription is upregulated in an RHE model of oral candidiasis and in clinical isolates from HIV+ patients with oral candidiasis	-	-	-	-	2	3	2	3	4	-	-	-	-
<b>orf19.5484</b>	Putative 3-phosphoserine aminotransferase with a predicted role in serine and glycine biosynthesis; protein present in exponential and stationary yeast growth phases	-	-	-	-	2	2	3	3	4	-	-	-	-
<b>orf19.5516</b>	Ortholog(s) have signal sequence binding activity, role in protein targeting to ER and cytosol, nucleus, signal recognition particle, endoplasmic reticulum targeting localization	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.5522</b>	Ortholog of <i>C. parapsilosis</i> CDC317 : CPAR2_601700, <i>Candida tenuis</i> NRRL Y-1498 : CANTEDRAFT_115220, <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767 : DEHA2A06666g and <i>Candida dubliniensis</i> CD36 : CD36_62760	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.5525</b>	Protein abundance is affected by URA3 expression in the CAI-4 strain background; regulated by Efg1p and Efh1p; repressed by Rgt1p; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	-	-	-	-	2	2	3	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.5595</b>	mRNA-binding protein that localizes specific mRNAs to daughter yeast-form cells and to hyphal tips; required for normal filamentous growth and host epithelial cell damage; ortholog of <i>S. cerevisiae</i> She3p but set of target mRNAs differs	-	-	-	-	1	4	2	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.5627</b>	Hap43p-induced gene	-	-	-	-	3	2	4	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.5669</b>	Membrane-localized protein	-	-	-	-	2	2	2	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.5682</b>	Ortholog(s) have protein binding, bridging, protein transporter activity	-	-	-	-	3	3	3	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.5711</b>	Putative phosphatidylinositol transfer protein; possibly an essential gene, disruptants not obtained by UAU1 method	-	-	-	-	3	1	0	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.581</b>	Putative RNA-binding protein; transcription is upregulated in an RHE model of oral candidiasis	-	-	-	-	1	0	1	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.5825</b>	Beta subunit of NC2, heterodimeric regulator of transcription; activates CDR1 transcription; possibly an essential gene, disruptants not obtained by UAU1 method; conditional mutants show decreased susceptibility to azoles	-	-	-	-	1	1	1	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.5830</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Hsp70p; predicted Kex2p substrate; possibly an essential gene, disruptants not obtained by UAU1 method	-	-	-	-	6	3	6	3	4	-	-	-	-
<b>orf19.5838</b>	Ortholog(s) have phosphoserine phosphatase activity, role in L-serine biosynthetic process and cytoplasm, nucleus localization	-	-	-	-	1	0	1	3	3	-	-	-	-

<b>orf19.590</b>	Putative thiamine biosynthesis enzyme; decreased expression in an <i>ssr1</i> null mutant; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	-	-	-	-	0	1	2	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.5917.3</b>	Ortholog(s) have RNA binding activity, role in poly(A)+ mRNA export from nucleus, transcription-coupled nucleotide-excision repair and transcription export complex localization	-	-	-	-	3	3	3	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.5921</b>	Ortholog of <i>C. parapsilosis</i> CDC317 : CPAR2_404290, <i>Candida tenuis</i> NRRL Y-1498 : CANTEDRAFT_115338, <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767 : DEHA2G13596g and <i>Candida dubliniensis</i> CD36 : CD36_84580	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.5956</b>	Putative SH3-domain-containing protein	-	-	-	-	2	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.5964</b>	Putative ADP-ribosylation factor; mutation confers hypersensitivity to Brefeldin A	-	-	-	-	4	4	3	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.6031</b>	Putative ESCRT-0 complex protein with a role in multivesicular body (MVB) trafficking	-	-	-	-	2	1	3	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.6079</b>	Predicted ORF in retrotransposon Tca8 with similarity to the Gag region encoding nucleocapsid-like protein; transcription is downregulated in response to ciclopirox olamine; filament induced; regulated by Rfg1p, Tup1p; overlaps orf19.6078.1	-	-	-	-	1	3	0	0	2	-	-	-	-
<b>orf19.6250</b>	Ortholog(s) have eukaryotic initiation factor 4G binding, mRNA binding activity	-	-	-	-	2	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.6252</b>	Ortholog(s) have RNA polymerase II transcription factor binding transcription factor activity, core RNA polymerase II binding transcription factor activity	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.6264.3</b>	Ortholog(s) have role in ER to Golgi vesicle-mediated transport and ER to Golgi transport vesicle, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum localization	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.6264.4</b>	Hap43p-induced gene; ortholog of <i>S. cerevisiae</i> RPL39, a component of the 60S ribosomal subunit	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.6293</b>	COPII-coated vesicle component	-	-	-	-	2	4	2	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.6358</b>	Ortholog(s) have protein homodimerization activity, ubiquitin-protein ligase activity and role in cellular response to ionizing radiation, free ubiquitin chain polymerization, postreplication repair, protein K63-linked ubiquitination	-	-	-	-	2	1	0	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.6476</b>	Putative protein with a predicted role in exocytic transport from the Golgi; filament induced	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.6539</b>	Putative transcription modulator; RuvB-like protein family member; heterozygous null mutant displays sensitivity to virgineone	-	-	-	-	1	2	2	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.6551</b>	Ortholog(s) have SNAP receptor activity, role in Golgi vesicle transport, vesicle fusion and Golgi medial cisterna, SNARE complex localization	-	-	-	-	2	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.6599.1</b>	Ortholog(s) have role in cytoplasmic translation and cytoplasm, nucleus localization	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.6705</b>	Putative guanyl nucleotide exchange factor with Sec7 domain, required for normal filamentous growth; transcriptionally regulated upon yeast-hyphal switch; filament induced; regulated by Nrg1p, Tup1p, Mob2p, Hap43p; mRNA binds to She3p	-	-	-	-	1	2	4	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.6796</b>	Ortholog(s) have ADP-ribose diphosphatase activity, role in ribose phosphate metabolic process and cytosol, mitochondrion, nucleus localization	-	-	-	-	2	2	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.680</b>	Putative mitochondrial translocase complex subunit	-	-	-	-	2	2	2	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.6809</b>	Putative phosphomutase-like protein; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; Hap43p-repressed gene; planktonic growth-induced gene	-	-	-	-	1	0	1	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.6810</b>	Ortholog(s) have protein serine/threonine phosphatase activity and role in establishment or maintenance of cytoskeleton polarity, mitotic cell cycle spindle assembly checkpoint, regulation of translation	-	-	-	-	4	4	8	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.6828.1</b>	Ortholog(s) have P-P-bond-hydrolysis-driven protein transmembrane transporter activity, structural molecule activity	-	-	-	-	1	1	1	2	4	-	-	-	-

<b>orf19.6843</b>	Ortholog(s) have role in CenH3-containing nucleosome assembly at centromere, chromatin silencing at centromere, mitotic sister chromatid segregation and nucleus localization	-	-	-	-	1	2	0	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.6867</b>	Predicted ORF in Assemblies 19, 20 and 21; transcription is repressed in response to alpha pheromone in SpiderM medium	-	-	-	-	1	0	2	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.6883</b>	Ortholog(s) have oxysterol binding, phosphatidic acid binding, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding, phosphatidylinositol-4-phosphate binding, sterol transporter activity	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.6893</b>	Ortholog(s) have role in ER to Golgi vesicle-mediated transport	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.6898.1</b>	Ortholog of <i>C. parapsilosis</i> CDC317 : CPAR2_300360, <i>Candida tenuis</i> NRRL Y-1498 : CANTEDRAFT_105022, <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767 : DEHA2F22066g and <i>Candida dubliniensis</i> CD36 : CD36_71020	-	-	-	-	2	1	2	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.7057</b>	Putative glutamine-tRNA ligase; stationary phase enriched protein	-	-	-	-	8	2	4	10	4	-	-	-	-
<b>orf19.7076</b>	Putative single-strand telomeric DNA-binding protein; protein level decreases in stationary phase cultures	-	-	-	-	3	1	4	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.7097</b>	Putative cytoplasmic RNA-binding protein; heterozygous null mutant exhibits hypersensitivity to parnafungin and cordycepin in the <i>C. albicans</i> fitness test	-	-	-	-	2	2	3	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.7108</b>	D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase; stationary phase enriched protein	-	-	-	-	1	1	1	4	4	-	-	-	-
<b>orf19.7116</b>	Putative protein of unknown function, transcription is upregulated in an RHE model of oral candidiasis	-	-	-	-	1	0	4	0	2	-	-	-	-
<b>orf19.7215.3</b>	Ortholog(s) have chaperone binding, unfolded protein binding activity, role in protein refolding and mitochondrial matrix localization	-	-	-	-	4	4	3	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.7216</b>	Ortholog(s) have GTP binding, GTPase activity, role in G1 to G0 transition, endocytosis, protein targeting to vacuole, regulation of vesicle fusion and cytosol, late endosome, nucleus localization	-	-	-	-	1	2	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.7261</b>	Putative Rab GDP-dissociation inhibitor; GlcNAc-induced protein	-	-	-	-	2	3	3	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.7264</b>	Ortholog(s) have ubiquitin-specific protease activity and role in mitochondrial fission, peroxisome fission, proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process, protein deubiquitination	-	-	-	-	3	2	5	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.7269</b>	Ortholog(s) have aralkylamine N-acetyltransferase activity, diamine N-acetyltransferase activity, role in chromatin organization and cytoplasm localization	-	-	-	-	3	2	4	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.7297</b>	Putative cystathionine gamma-synthase; decreased levels in stationary phase cultures; Hog1p-induced; Gcn4p-regulated	-	-	-	-	1	2	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.7328</b>	Gene transcription regulated by Mig1p and Tup1p	-	-	-	-	10	5	8	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.7347</b>	Ortholog(s) have ubiquitin-protein ligase activity, role in ER-associated protein catabolic process and endoplasmic reticulum membrane localization	-	-	-	-	1	1	2	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.74</b>	Predicted exocyst component; ortholog of <i>S. cerevisiae</i> Sec5p; merged with orf19.75 in Assembly 21	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.7501</b>	Nucleosome assembly protein; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	-	-	-	-	4	4	3	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.7502</b>	Hap43p-induced gene; greater mRNA abundance observed in a <i>cyr1</i> homozygous null mutant than in wild type	-	-	-	-	7	7	5	7	4	-	-	-	-
<b>orf19.7510</b>	Protein with similarity to <i>S. cerevisiae</i> Kin2p, transcription is positively regulated by Tbf1	-	-	-	-	4	2	3	2	4	-	-	-	-
<b>orf19.7522</b>	Hap43p-repressed gene; mutation confers hypersensitivity to amphotericin B	-	-	-	-	1	2	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.759</b>	Ortholog(s) have role in ER to Golgi vesicle-mediated transport, retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER and COPI vesicle coat, cytosol, endosome localization	-	-	-	-	7	7	6	1	4	-	-	-	-
<b>orf19.7590</b>	Putative NADH-ubiquinone oxidoreductase; identified in detergent-resistant membrane fraction (possible lipid raft component); predicted N-terminal acetylation; repressed by nitric oxide	-	-	-	-	2	5	3	0	3	-	-	-	-

<b>orf19.809</b>	Ortholog(s) have role in maturation of LSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA) and nucleolus, preribosome localization	-	-	-	-	1	1	0	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.815</b>	Putative guanine nucleotide exchange factor required for embedded filamentous growth; activates Rac1p; contains a DOCKER domain; similar to adjacent DCK2 and to <i>S. cerevisiae</i> Ylr422wp; regulated by Nrg1p	-	-	-	-	10	9	8	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.841</b>	Ortholog(s) have role in Golgi vesicle transport and Golgi membrane localization	-	-	-	-	1	1	4	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.86</b>	Putative glutathione peroxidase; peroxide-induced; induced in response to peroxide, exposure to neutrophils and macrophage blood fractions; downregulated during infection of macrophages	-	-	-	-	2	3	0	1	3	-	-	-	-
<b>orf19.900</b>	Essential component of the nuclear pore complex; sumoylation target; stationary phase enriched protein	-	-	-	-	2	2	1	0	3	-	-	-	-
<b>orf19.933</b>	Ortholog(s) have protein homodimerization activity, ubiquitin-protein ligase activity and role in cellular response to ionizing radiation, free ubiquitin chain polymerization, postreplication repair, protein K63-linked ubiquitination	-	-	-	-	1	2	1	2	4	-	-	-	-
<b>OSM2</b>	Putative mitochondrial fumarate reductase; regulated by Ssn6p, Gcn2p, and Gcn4p; Hog1p-downregulated; stationary phase enriched protein; Hap43p-repressed gene	-	-	-	-	2	2	5	0	3	-	-	-	-
<b>PDX1</b>	Pyruvate dehydrogenase complex protein X, an essential component of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex which is involved in the respiratory pathway; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	-	-	-	-	2	2	2	1	4	-	-	-	-
<b>PDX3</b>	Pyridoxamine-phosphate oxidase; transcription regulated by yeast-hyphal switch and by Nrg1p, Mig1p, Tup1p; caspofungin repressed; present in exponential and stationary phase yeast cultures; Hap43p-repressed; planktonic growth-induced	-	-	-	-	2	2	2	1	4	-	-	-	-
<b>PHO85</b>	Functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Pho85p, a cyclin-dependent kinase that regulates transcription of PHO genes involved in phosphate metabolism; necessary for geldanamycin-induced filamentation; gene has intron	-	-	-	-	2	3	2	1	4	-	-	-	-
<b>POB3</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Pob3p, which is involved in chromatin assembly and disassembly; transposon mutation affects filamentous growth	-	-	-	-	2	1	4	0	3	-	-	-	-
<b>POL30</b>	Similar to proliferating cell nuclear antigen (PCNA); RNA abundance regulated by tyrosol and cell density; transcriptionally induced by interaction with macrophages; flucytosine induced; stationary phase enriched protein	-	-	-	-	1	2	2	1	4	-	-	-	-
<b>PPH21</b>	Putative protein phosphatase of the Type 2A-related family (serine/threonine-specific), similar to <i>S. cerevisiae</i> Pph21p; caspofungin repressed; possibly an essential gene, disruptants not obtained by UAU1 method	-	-	-	-	2	2	2	1	4	-	-	-	-
<b>PR26</b>	Protein with similarity to proteasomal 26S regulatory subunit of <i>S. cerevisiae</i> , <i>H. sapiens</i> , <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> (Archaeobacterium)	-	-	-	-	3	3	2	2	4	-	-	-	-
<b>PRD1</b>	Putative proteinase; transcription is regulated by Nrg1p, Mig1p, and Tup1p; Hog1p-induced; stationary phase enriched protein; Hap43p-repressed gene	-	-	-	-	5	2	4	2	4	-	-	-	-
<b>PRE9</b>	Alpha3 (C9) subunit of the 20S proteasome; transcription is regulated by Mig1p	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>PRO2</b>	Putative gamma-glutamyl phosphate reductase with a predicted role in proline biosynthesis; regulated by Gcn2p and Gcn4p	-	-	-	-	2	3	0	1	3	-	-	-	-
<b>PRO3</b>	Delta 1-pyrroline-5-carboxylate reductase; protein induced during the mating process; alkaline upregulated; stationary phase enriched protein	-	-	-	-	2	2	1	0	3	-	-	-	-

<b>PRT1</b>	Putative translation initiation factor eIF3; mutation confers hypersensitivity to roridin A, verrucarin A; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophages	-	-	-	-	3	2	2	1	4	-	-	-	-
<b>PTP3</b>	Protein not essential for viability; similar to <i>S. cerevisiae</i> Ptp3p, which is a protein tyrosine phosphatase; hyphal induced; alkaline upregulated; regulated by Efg1p, Ras1p, cAMP pathways	-	-	-	-	2	2	5	1	4	-	-	-	-
<b>RAC1</b>	G-protein of RAC subfamily; required for embedded filamentous growth, not for serum-induced hyphal growth; dynamic localization at plasma membrane and nucleus; similar to, but not interchangeable with, Cdc42p; lacks <i>S. cerevisiae</i> homolog	-	-	-	-	1	2	2	0	3	-	-	-	-
<b>RAD23</b>	Ortholog(s) have damaged DNA binding, peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminy)asparagine amidase activity, protein binding, bridging, ubiquitin binding activity	-	-	-	-	1	1	3	1	4	-	-	-	-
<b>RD11</b>	Putative rho GDP dissociation inhibitor; transposon mutation affects filamentous growth; farnesol-, filament-induced; regulated by Nrg1p, Tup1p; protein levels decrease in stationary phase yeast cultures	-	-	-	-	6	3	5	3	4	-	-	-	-
<b>RFA2</b>	Putative DNA replication factor A; RNA abundance regulated by cell cycle, tyrosol and cell density	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>RGD1</b>	GTPase activator protein; transcriptionally regulated by iron; expression greater in low iron; alkaline upregulated; localized to the bud emergence area in G1 phase and in the bud tip during S and G2 phases	-	-	-	-	1	3	0	2	3	-	-	-	-
<b>RHO3</b>	Putative Rho family GTPase; possible substrate of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I; greater transcription in hyphal form than yeast form; plasma membrane-localized	-	-	-	-	3	2	3	1	4	-	-	-	-
<b>RIA1</b>	Putative translation elongation factor; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>RIB3</b>	3,4-Dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase; homodimeric enzyme of riboflavin biosynthesis; converts ribulose 5-phosphate to L-3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate; transcription regulated on yeast-hyphal switch, macrophage interaction	-	-	-	-	2	2	2	3	4	-	-	-	-
<b>RPN1</b>	Putative 19S regulatory particle of the 26S proteasome; regulated by Gcn2p and Gcn4p	-	-	-	-	2	3	2	2	4	-	-	-	-
<b>RPN2</b>	Putative 26S proteasome subunit; transcription is regulated by Mig1p; caspofungin repressed; regulated by Gcn2p and Gcn4p; gene used for strain identification by multilocus sequence typing	-	-	-	-	2	2	3	0	3	-	-	-	-
<b>RPN6</b>	Putative 26S proteasome subunit; Hap43p-induced gene; regulated by Gcn2p and Gcn4p	-	-	-	-	1	2	1	0	3	-	-	-	-
<b>RPN7</b>	Subunit of the proteasome regulatory particle; regulated by Gcn2p and Gcn4p; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>RPO21</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Rpo21p, RNA polymerase II; transposon mutation affects filamentous growth	-	-	-	-	2	1	2	0	3	-	-	-	-
<b>RPP1A</b>	Conserved acidic ribosomal protein, likely involved in regulation of translation elongation; interacts with Rpp2Bp; one of four similar <i>C. albicans</i> ribosomal proteins (Rpp1Ap, Rpp1Bp, Rpp2Ap, Rpp2Bp); Hap43p-induced	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>RPS23A</b>	Putative ribosomal protein; genes encoding cytoplasmic ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	-	-	-	-	1	1	2	0	3	-	-	-	-
<b>RPT1</b>	Putative 26S proteasome regulatory subunit 7; Hap43p-repressed gene; regulated by Gcn2p and Gcn4p; overlaps orf19.442	-	-	-	-	5	4	2	3	4	-	-	-	-
<b>RPT4</b>	26S proteasome regulatory subunit; regulated by Gcn2p and Gcn4p; protein level decreases in stationary phase cultures	-	-	-	-	3	2	3	1	4	-	-	-	-

<b>RPT5</b>	26S proteasome regulatory subunit; transcription is regulated by Nrg1p and Mig1p; regulated by Gcn2p and Gcn4p; protein level decreases in stationary phase cultures	-	-	-	-	6	6	4	5	4	-	-	-	-
<b>RTS1</b>	Putative serine/threonine-protein phosphatase B-type regulatory subunit; transcription is regulated upon yeast-hyphal switch	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>SAM4</b>	Putative S-adenosylmethionine-homocysteine methyltransferase; Hap43p-repressed gene; alkaline upregulated	-	-	-	-	1	1	2	2	4	-	-	-	-
<b>SDH12</b>	Succinate dehydrogenase; soluble protein in hyphae; macrophage-downregulated protein level; downregulated by Efg1p; repressed by nitric oxide; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; Hap43p-repressed gene	-	-	-	-	3	3	2	0	3	-	-	-	-
<b>SEC18</b>	Functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Sec18p, which acts in protein transport; conserved ATP binding site; not glycosylated	-	-	-	-	4	6	3	3	4	-	-	-	-
<b>SEC23</b>	Putative GTPase-activating protein; transcription is regulated upon yeast-hyphal switch	-	-	-	-	5	4	4	0	3	-	-	-	-
<b>SEC24</b>	Protein with a possible role in ER to Golgi transport; induced upon yeast-hyphal switch; sumoylation target	-	-	-	-	7	8	8	1	4	-	-	-	-
<b>SEC3</b>	Predicted subunit of the exocyst complex, involved in exocytosis; required for hyphal growth after the first septin ring formation; interacts with septins Cdc3p, Cdc10p, and Cdc11p; localizes to a crescent on the surface of the hyphal tip	-	-	-	-	2	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>SEC61</b>	ER protein-translocation complex subunit; essential; similar to <i>S. cerevisiae</i> Sec61p; 10 transmembrane regions predicted; chimeric mutant partially functionally complements <i>S. cerevisiae</i> sec61 defects	-	-	-	-	3	2	2	0	3	-	-	-	-
<b>SHM1</b>	Mitochondrial serine hydroxymethyltransferase; complements the glycine auxotrophy of an <i>S. cerevisiae</i> shm1 null shm2 null gly1-1 triple mutant; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	-	-	-	-	6	5	4	0	3	-	-	-	-
<b>SIN3</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Sin3p (transcriptional corepressor involved in histone deacetylase recruitment); has paired amphipathic helix PAH1 domain; interacts with ScOpi1p, not CaOpi1p; transposon mutation affects filamentous growth	-	-	-	-	2	2	0	1	3	-	-	-	-
<b>SOU1</b>	Enzyme involved in utilization of L-sorbose; has sorbitol dehydrogenase, fructose reductase, and sorbose reductase activities; NAD-binding site motif; transcriptional regulation affected by chromosome 5 copy number; Hap43p-induced gene	-	-	-	-	2	2	2	1	4	-	-	-	-
<b>SPT5</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Spt5p transcription elongation factor; transposon mutation affects filamentous growth	-	-	-	-	1	1	2	0	3	-	-	-	-
<b>SUI3</b>	Putative translation initiation factor; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	-	-	-	-	2	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>SUP35</b>	Translation factor eRF3; shows prion-like aggregation in some, not all, studies; partially complements <i>S. cerevisiae</i> sup35 mutant translation defect; species barrier with <i>S. cerevisiae</i> Sup35p prion; gene not regulated by yeast-hyphal switch	-	-	-	-	2	4	3	0	3	-	-	-	-
<b>TAF14</b>	Putative DNA-binding transcription factor; TFIIF subunit; macrophage-induced protein; possibly required for yeast cell adherence to silicone substrate; mutant has pleiotrophic effects	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>TBP1</b>	Transcription initiation factor; binds TATA box sequence, and binding does not require TFIIA; caspofungin repressed; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> and human TATA-binding proteins	-	-	-	-	1	1	0	1	3	-	-	-	-

<b>TCP1</b>	Chaperonin-containing T-complex subunit, transcription induced by alpha pheromone in SpiderM medium; stationary phase enriched protein	-	-	-	-	5	4	2	1	4	-	-	-	-
<b>TFG1</b>	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Tfg1p, which is part of transcription factor TFIIF; transposon mutation affects filamentous growth; possibly an essential gene, disruptants not obtained by UAU1 method	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>THI13</b>	Thiamin pyrimidine synthase, involved in synthesis of the thiamine precursor hydroxymethylpyrimidine phosphate; single-turnover enzyme that provides histidine for HMP-P formation; induced by nitric oxide independently of Yhb1p	-	-	-	-	2	2	1	5	4	-	-	-	-
<b>THS1</b>	Putative threonyl-tRNA synthetase; transcription regulated by Mig1p and Tup1p; downregulated upon phagocytosis by murine macrophages; stationary phase enriched protein	-	-	-	-	7	6	6	1	4	-	-	-	-
<b>TIF11</b>	Translation initiation factor eIF1a; possibly transcriptionally regulated upon hyphal formation; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	-	-	-	-	2	2	3	4	4	-	-	-	-
<b>TIF34</b>	Putative translation initiation factor eIF3, p39 subunit; mutation confers hypersensitivity to roridin A and verrucaric acid; ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophages	-	-	-	-	5	5	3	1	4	-	-	-	-
<b>TIF35</b>	Putative translation initiation factor; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	-	-	-	-	2	1	3	0	3	-	-	-	-
<b>TOM22</b>	Putative mitochondrial import receptor subunit; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p	-	-	-	-	3	2	2	2	4	-	-	-	-
<b>TRP2</b>	Putative anthranilate synthase with a predicted role in tryptophan biosynthesis; regulated by Gcn2p and Gcn4p	-	-	-	-	4	4	5	1	4	-	-	-	-
<b>TRP3</b>	Putative bifunctional enzyme with predicted indole-3-glycerol-phosphate synthase and anthranilate synthase activities; regulated by Gcn2p and Gcn4p	-	-	-	-	2	2	3	0	3	-	-	-	-
<b>TUF1</b>	Translation elongation factor TU; macrophage/pseudohyphal-induced; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage; levels decrease in stationary phase cells	-	-	-	-	2	3	2	1	4	-	-	-	-
<b>URA7</b>	CTP synthase 1; flucytosine induced; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	-	-	-	-	2	2	0	0	2	-	-	-	-
<b>USO6</b>	Putative vesicular transport protein; transcription is induced upon filamentous growth	-	-	-	-	2	0	1	1	3	-	-	-	-
<b>VAS1</b>	Putative tRNA-Val synthetase; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	-	-	-	-	7	10	4	6	4	-	-	-	-
<b>VPS2</b>	Ortholog(s) have role in intraluminal vesicle formation, protein retention in Golgi apparatus, protein targeting to vacuole involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process via the multivesicular body sorting pathway	-	-	-	-	1	1	1	1	4	-	-	-	-
<b>WRS1</b>	Putative tRNA-Trp synthetase; genes encoding ribosomal subunits, translation factors, tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophages	-	-	-	-	2	2	0	1	3	-	-	-	-
<b>YML6</b>	Putative mitochondrial ribosomal protein; induced upon adherence to polystyrene	-	-	-	-	1	1	1	0	3	-	-	-	-
<b>GIN1</b>	Protein involved in regulation of DNA-damage-induced filamentous growth; putative component of DNA replication checkpoint; ortholog of <i>S. cerevisiae</i> Mrc1p, an S-phase checkpoint protein; Hap43p-induced gene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	3

<b>GLK4</b>	Putative glucokinase; decreased expression in hyphae compared to yeast-form cells	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	2	2
<b>orf19.5885</b>	Putative U3 snoRNP protein; flucytosine induced	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	3
<b>orf19.775</b>	Ortholog of <i>C. parapsilosis</i> CDC317 : CPAR2_105460	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	3