

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Análisis funcional de la subunidad  $\beta$ 4 del proteosoma de  
*Candida albicans*: evaluación como diana selectiva de nuevos  
antifúngicos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

María Luisa Hernández Sánchez

DIRECTORES

María Concepción Gil García  
Federico Navarro García  
Elvira Román González



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Análisis funcional de la subunidad  $\beta$ 4 del proteosoma de  
*Candida albicans*: evaluación como diana selectiva de nuevos  
antifúngicos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN EL PROGRAMA DE  
MICROBIOLOGÍA Y A PARASITOLOGÍA

PRESENTADA POR

María Luisa Hernández Sánchez

DIRECTORES

María Concepción Gil García  
Federico Navarro García  
Elvira Román González





La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a los siguientes proyectos:

- “Aislamiento de genes de *Candida albicans* implicados en el dimorfismo y la resistencia a antifúngicos”.93/0183 Fondo de Investigaciones Sanitarias.
- “Identificación de funciones biológicas en hongos patógenos que pueden servir como dianas para nuevos antifúngicos.”. 96/00 Glaxo, S.A.
- “Programación de Circuitos Microbianos en Medicina Protectora”. S2010/BMD-2414 de la Comunidad Autónoma de Madrid.
- “Ingeniería Microbiana, Salud y Calidad de Vida”. S2017/BMD-3691 de la Comunidad Autónoma de Madrid.
- “Red Española de Investigación en Patología Infecciosa”. (REIPI)”. RD06/0008/1027. Ministerio de Sanidad y Consumo.
- “Interacción *Candida albicans*-hospedador: Vesículas extracelulares, estrés oxidativo y respuesta inmunitaria. Relación entre microbiota intestinal y sepsis”. PID2021-124062NB-I00. Ministerio de Ciencia e Innovación.



# AGRADECIMIENTOS





Aunque sea lo primero que leáis, y espero que no lo único, es lo que he dejado para escribir al final. Como imaginaréis en estos años, tengo mucho que agradecer y mucha gente que me ha ayudado a llegar hasta aquí.

No puedo más que empezar por el profesor del Máster de Biotecnología que me brindó la oportunidad de realizar el trabajo fin de Máster en el Departamento y siempre me consiguió financiación para poder investigar, el profesor César Nombela, que era todo un ejemplo de una mente clara, un científico de renombre y una persona excelente que se interesó tanto a nivel profesional como personal en todas mis etapas.

Tuvo el acierto de ponerme bajo la dirección de Jesús Pla, otra mente brillante que me transmitió la pasión por la ciencia. Con sus diseños de experimentos y sus enseñanzas diarias, consiguió que, después de varios años trabajando en resistencias a azoles, comenzara esta tesis y, lo más importante, que la haya acabado. Siempre me he sentido muy cuidada por tí, y sabes que el artífice de esta tesis eres tú. Gracias por estar tantos años presente.

Por supuesto, otra persona que merece una mención aparte es Concha Gil. Me ofreció la oportunidad de iniciarme en la proteómica, desde su recomendación para irme al CNB hasta acogerme de nuevo y darme la posibilidad de trabajar en la recién inaugurada Unidad de Proteómica, allá por el 2001. Es un honor tenerte como directora. Nos entendemos perfectamente y contagias la ilusión por cada proyecto que solicitamos y por cada técnica que ponemos a punto. La verdad es que hemos disfrutado mucho con el trabajo, con los Congresos, donde he aprendido de tu don de gentes y no puedo dejar de mencionar tu dedicación y esfuerzo. Estoy muy agradecida, Concha, sobre todo por tu amistad.

Federico Navarro, compañero de tesis, de proyecto de Glaxo, siempre pendiente de los experimentos que realizábamos y una máquina informática. Cuánto me has ayudado, enseñado y cuántas tardes hemos cerrado el Departamento. Mi mejor amigo, confidente de penas y alegrías y mi director de tesis, sí, es compatible. Muchas gracias porque nunca he dejado de sentir tu apoyo.

Elvira Román, mi otra directora, todo un descubrimiento, en sus propuestas y en los ratos de ocio compartidos. Gracias. Eres un ejemplo de trabajo y de trabajo bien hecho. Me he sentido muy identificada contigo y con tu energía; haces que todo tenga sentido.

Mis compañeros de la Unidad de Proteómica, Lola, Felipe, Inés, mis bioinformáticos preferidos, Edu, Enrique y Samu. Todos habéis hecho que el venir a trabajar sea un placer todos los días. Os tengo tanto que agradecer a cada uno: la disponibilidad para cualquier reto, el trabajo duro y diario, las manos de la poyata, la optimización de los equipos, el diseño de los proyectos, el uso de los softwares más avanzados, pero esto no es nada comparado con vuestro talante, vuestro

apoyo, vuestro afecto y vuestra amistad. Formamos un equipazo técnico, científico y humanamente excelente. Muchas gracias por todo.

A mis compañeros del PAS, Benito, Elena, José Alberto, Sonia y Natalia, y de secretaria, Almudena, Inma y Yolanda. Todos en algún momento me habéis ayudado en lo que he necesitado. A mis compañeros de la Unidad de Genómica, Jesús Cantalejo (compañero, qué fácil es entenderse contigo), a Maribel (secuenciadora de pro), a Sara y a Pedro.

Al Departamento de Micro, a los profesores que ahora no están, Carmen de la Rosa y Conchita Pintado y, en otro orden, Miguel Sánchez. Os recuerdo la frase de Miguel. “No lo has pensado, lo has leído o te lo han contado”. A Aida, por tantas horas compartidas con *Candida*. A Claudia, una amiga.

A algunos os conocí ya como profesores: María Molina (cualquier conversación contigo es muy agradable y enriquecedora), Rosa Cenamor (compartimos aficiones, como los viajes, el arte y los toros) y Ángela (también compartimos pasión por el flamenco y qué encantadora eres siempre). A otros, recién leída la tesis: Gloria Molero (directora actual, sabia consejera y una buena amiga), Rosalía Diez-Orejas (gracias por los ratos que compartimos) y Javier Arroyo (mi director de CAI durante muchos años, gracias por tu confianza y por darme la oportunidad de trabajar contigo).

Con otros compartí mi primera etapa de tesis, como con José Manuel (me encanta hablar contigo de ciencia y no ciencia, eres fantástico; por cierto, también cerrabas el Depar con Fede y conmigo), Humberto (un ejemplo de templanza y gracias porque siempre has estado disponible para cualquier cuestión), Víctor (un genio, un creativo y un placer conocerte) y Raquel (qué maja eres).

No puedo acordarme de todos; mejor dicho, sí me acuerdo, pero es por espacio: Carmina, Teresa, Isabel...

A otros os he conocido a mi vuelta a Proteómica y en los últimos años de esta tesis, y también os quiero agradecer que siempre habéis estado dispuestos a echarme una mano e incluso a compartir celebraciones. Raúl, Belén, Alba, Laura y Yulia de la U3, Dani, Isa, Alba, Marina, Alex de la U2 y, por supuesto, a mis amiguitos de la U1, con los que he compartido trabajos, puestas a punto y cumpleaños: Victoria (SILAC), Ana Borrajo (interactoma y fosfoproteómica), Carmen (microbiota) y Víctor (Prn1).

Con todos los que os he nombrado, según voy escribiendo, me surgen un montón de recuerdos y anécdotas. A todos, gracias por hacerme sentir tan bien y crear en el Departamento un ambiente científico y familiar.

Por penúltimo he dejado a mis compañeras de tesis, mi grupo de Ex\_Micro. Carmen San José, con su sentido del humor, compartíamos la U9, las dos solitas hasta que llegó nuestro “Regi”, del que también quiero acordarme. ¡Qué fiestas nos pasábamos los fines en el laboratorio! Anabel Negredo, una persona especial y que siempre sabe escucharte. Rosa Pérez, mis primeras manos en el laboratorio (ella es la RM de las cepas). Inma Ríos, conversar contigo es un lujo. Rebeca, te he considerado de este grupo, aunque podías estar en compañeros de tesis, en profesores o en coordinadora de doctorado, que bastante lata te estoy dando. Pero no, estás en este grupo de amigas, en el que, a pesar del paso de los años, seguimos cuidándonos como cuando éramos becarias, con las que cada cena que organizamos es reconfortante y donde se respira cariño por todos lados. Gracias a todas por estar ahí.

¿Y quién me queda? Lucía y Mar. Mis amigas inseparables. Lucía, siempre he sentido que estás pendiente de mí. Cuántos trabajos compartidos, cuántas explicaciones científicas, cuántas conversaciones personales y cuántas experiencias vividas. Mar, también compañera de tesis, gracias por la excelente gestión de los proyectos. Mar, ¿qué haría yo si no pudiera tomar café contigo todos los días? Qué diferentes somos y cómo nos entendemos. Eres sin duda la amiga con la que más tiempo he compartido, más confidencias, más preocupaciones, y cómo hemos sabido apoyarnos y cuidarnos. Cualquier problema que nos contamos se convierte al final en una carcajada. Ya me gustaría tener tu carácter. Tantos recuerdos y tantas vivencias, y lo que nos queda, chicas. En este bloque, no puede faltar Rafa y Amalia. Rafa, la persona que sabe de todo, y los que lo leáis estaréis de acuerdo conmigo. Es un placer conversar contigo y sobre todo tu generosidad a la hora de enseñar. Amalia, gracias por los análisis de citometría. No te voy a decir solo lo simpática que eres, pero sí lo buena amiga, lo agradable, lo lista y los buenos consejos que das y cómo te echo de menos. Gracias a los dos por abrirme las puertas de vuestras casas.

Ahora sí que viene lo más difícil. A mi familia. Sin ti, papá, esta tesis no tendría sentido. Mira que me has insistido veces. Debería haber aprendido de tu constancia, de la importancia del esfuerzo, pero prefiero quedarme con tu honestidad y tu sentido de la justicia, como buen abogado que eras. Mamá, no puedo, no puedo recordar tantas cosas, pero gracias por hacernos fuertes, valientes e independientes. Todo un ejemplo de cómo andar por la vida. Cómo os quiero. A mis hermanos, Lola y Manolo, que siempre estáis a mi lado, me cuidáis como a una hermana chica y gracias por animarme e interesaros por el fin de esta memoria. A mis sobrinos, Felipe y Alfredo, por vuestro cariño y por ser tan audaces. A Carmen, Antonia y Ascensión, por quererme incondicionalmente.

A mis hijos, Luis y Gonzalo. Aquí no voy a expresar todo lo que os tengo que agradecer, pero sí que estoy orgullosa de cómo sois, *en el buen sentido de la palabra*, buenos. Gracias por sacarme una sonrisa todos los días, por vuestras innumerables muestras de amor, y por animarme en todos los planes que me propongo.

A Floren, que es el que ha estado presente en todos los momentos de esta tesis. Gracias por esperarme.

# ÍNDICE





ÍNDICE.....	1
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	15
SUMMARY.....	21
INTRODUCCIÓN.....	27
1. Importancia clínica de <i>Candida albicans</i> como hongo patógeno oportunista.....	29
1.1 Transición de <i>C. albicans</i> de un estado comensal a patógeno.....	29
1.2 Manifestaciones clínicas.....	30
1.3 Epidemiología.....	31
1.4 Arsenal terapéutico.....	32
2. Características de <i>Candida albicans</i> .....	34
2.1 Diploidía.....	35
2.2 Polimorfismo.....	35
2.3 Transición dimórfica.....	36
3. Degradación de proteínas. Proteólisis.....	36
3.1 Sistemas de degradación de proteínas.....	37
3.2 Estructura y función del proteosoma.....	39
3.3 Mecanismo de acción del proteosoma.....	42
3.4 Ruta de la ubiquitinación de la proteólisis intracelular.....	44
3.5 Ruta de la regla del amino terminal.....	46
4. Proteómica cuantitativa: visión global e integrada de los procesos biológicos.....	49
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	53
MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
1. Microorganismos y medios de cultivo.....	59
1.1 Microorganismos utilizados.....	59
1.2 Medios de cultivo.....	60
2. Condiciones y métodos para ensayos fenotípicos y bioquímicos.....	60
2.1 Ensayos de crecimiento microbiano.....	60
2.2 Estudios de cinéticas de viabilidad.....	61

2.3 Estudios de filamentación en medio líquido.....	61
3. Técnicas de biología molecular .....	61
3.1 Plásmidos, oligonucleótidos y genotecas .....	61
3.2 Manipulación de DNA .....	63
3.3 Transformaciones genéticas .....	64
4. Construcción de cepas genéticamente modificadas de <i>C. albicans</i> .....	64
4.1 Deleción de un alelo del gen <i>CaPRE1</i> .....	65
4.2 Deleción de un alelo del gen <i>CaHIS1</i> y del gen <i>CaPRE1</i> en la cepa CA14.....	66
4.3 Deleción del segundo alelo del gen <i>CaHIS1</i> . .....	67
4.4 Obtención de un mutante condicional <i>pre1</i> de <i>C. albicans</i> .....	68
5. Aislamiento y clonación del gen <i>HsC7-I</i> homólogo humano de <i>CaPRE1</i> .....	69
6. Construcción de cepas de <i>S. cerevisiae</i> genéticamente modificadas .....	69
6.1 Construcción de plásmidos episómicos usados en la complementación del fenotipo <i>pre1Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> .....	69
6.2 Construcción de cepas de <i>S. cerevisiae</i> con expresión controlada de <i>PRE1</i> .....	70
6.2.1 Marcaje de la cepa <i>candidizada</i> con proteína verde y en el locus de <i>LEU2</i> .....	70
7. Construcción de sustratos proteolíticos.....	71
8. Obtención de muestras proteicas de <i>C. albicans</i> .....	72
8.1 Obtención de extractos citoplasmáticos .....	72
8.2 Precipitación, cuantificación y digestión de proteínas.....	72
8.2.1 Precipitación de proteínas con acetona .....	72
8.2.2 Precipitación de proteínas con metanol/cloroformo .....	72
8.2.3 Digestión en gel .....	72
8.2.4 Digestión en líquido con el kit iST de Preomics.....	73
9. Análisis por espectrometría de masas acoplada a nano-cromatografía líquida. ....	73
9.1 Separación de péptidos por nano-cromatografía en fase reversa .....	74
9.2 Análisis mediante espectrometría de masas de adquisición dependiente de datos (DDA) .....	74
9.3 Análisis mediante espectrometría de masas de adquisición independiente de datos (DIA) .....	74

10. Identificación de proteínas mediante datos de espectrometría de masas .....	74
10.1 Análisis de datos crudos por método DDA .....	74
10.2 Análisis de datos crudos por método DIA y cuantificación sin marcaje .....	75
10.3 Análisis de datos de DIA y cuantificación sin marcaje por <i>TraianProt</i> .....	75
11. Identificación del complejo del proteosoma .....	76
11.1 Separación de complejos mediante electroforesis nativa ( <i>blue native</i> ) .....	76
11.2 Cuantificación relativa de proteínas por recuento de espectros .....	76
12. Técnicas de microscopía y citometría de flujo .....	77
12.1 Tinción con blanco de calcoflúor .....	77
12.2 Tinción con yoduro de propidio. ....	77
12.3 Tinción con dihidrorodamina 123 .....	77
12.4 Tinción con DAPI .....	78
12.5 Tinción con FM4-64 .....	78
13. Herramientas bioinformáticas .....	78
RESULTADOS .....	81
1. Clonación del gen <i>PRE1</i> de <i>C. albicans</i> .....	83
1.1 Análisis <i>in silico</i> de la región 3' del inserto que comprende el gen <i>HIS1</i> .....	83
1.2 Análisis de la secuencia nucleotídica y aminoacídica .....	83
2. <i>CaPRE1</i> es el homólogo funcional en <i>C. albicans</i> del gen <i>PRE1</i> de <i>S. cerevisiae</i> .....	84
3. El gen <i>CaPRE1</i> es esencial en <i>C. albicans</i> .....	87
3.1 Obtención de un doble mutante <i>his1 pre1</i> .....	88
3.2 Construcción de un mutante condicional <i>pre1</i> de <i>C. albicans</i> .....	88
4. Estudio funcional de <i>CaPRE1</i> en un mutante condicional dependiente de doxiciclina ....	93
4.1 La represión de <i>CaPRE1</i> afecta al crecimiento celular .....	93
4.2 La represión de <i>CaPRE1</i> produce una morfología celular aberrante .....	95
5. Ensamblaje del complejo 20S del proteosoma cuando se reprime la expresión de <i>CaPRE1</i> .....	97
6. Análisis proteómico del efecto de la represión del gen <i>CaPRE1</i> .....	100

6.1 Proteínas cuantificadas que aumentan su abundancia en condiciones de represión de <i>CaPRE1</i> .....	105
6.2 Proteínas cuantificadas que disminuyen su abundancia en condiciones de represión de <i>CaPRE1</i> .....	109
6.3 Rutas metabólicas alteradas cuando se reprime el gen <i>CaPRE1</i> .....	110
7. Caracterización fenotípica de procesos celulares afectados cuando <i>CaPRE1</i> está reprimido .....	112
7.1 Efecto de la represión del gen <i>CaPRE1</i> en la transición levadura-hifa .....	112
7.2 Análisis de especies reactivas de oxígeno y estado de la mitocondria .....	113
7.3 Análisis del transporte endocítico .....	114
8. Desarrollo de un ensayo competitivo y positivo para la búsqueda de nuevos antifúngicos cuya diana sea el gen <i>CaPRE1</i> .....	116
8.1 Aislamiento y complementación del gen humano <i>HsC7-I</i> homólogo a <i>PRE1</i> .....	116
8.2 Construcción de cepas de <i>S. cerevisiae</i> con expresión controlada de <i>PRE1</i> .....	117
9. Desarrollo de un sistema de búsqueda de nuevos antifúngicos basado en la degradación de proteínas .....	120
9.1 Construcción de sustratos de proteólisis.....	121
9.2 Expresión de los sustratos de proteólisis.....	122
10. Estudio <i>in silico</i> de los N-degrones en <i>C. albicans</i> .....	127
11. Desarrollo de una aplicación para convertir identificadores de genes y proteínas de <i>C. albicans</i> .....	129
DISCUSIÓN .....	131
1. <i>PRE1</i> es un gen esencial para la viabilidad celular en <i>C. albicans</i> .....	133
2. Impacto de la disfunción de <i>PRE1</i> ( $\beta 4$ ) sobre el ensamblaje del proteosoma 26S.....	135
3. Aproximación proteómica para estudio del proteoma en <i>C. albicans</i> .....	136
3.1 Proteómica cuantitativa: visión integradora de la degradación de proteínas por el proteosoma en <i>C. albicans</i> .....	137
3.2. Una deficiente función proteosomal altera importantes procesos biológicos en <i>C. albicans</i> .....	138
4. Desarrollo de un ensayo competitivo y positivo para la búsqueda de nuevos antifúngicos cuya diana sea el gen <i>PRE1</i> .....	145

5. Desarrollo de sistema de cribado para la búsqueda de antifúngicos basado en la degradación de proteínas .....	146
6. Estudio del N degrón <i>in silico</i> .....	146
7. Inhibidores del proteosoma como agentes terapéuticos .....	148
8. La ruta del N-degrón con aplicación terapéutica .....	149
9. Herramienta para convertir los identificadores de proteínas de <i>C. albicans</i> .....	149
10. Avances preliminares y futuras líneas de investigación .....	150
CONCLUSIONES .....	153
LISTADO DE FIGURAS.....	157
LISTADO DE TABLAS .....	163
BIBLIOGRAFÍA.....	167
ANEXO .....	195



# ABREVIATURAS





**aa** Aminoácido

**ACN** Acetonitrilo

**AF** Ácido fórmico

**AmBi** (Ammonium bicarbonate) Bicarbonato amónico

**ARN** Ácido ribonucleico

**ARNt** Ácido ribonucleico de transferencia

**ATP** (Adenosine triphosphate) Adenosina trifosfato

**CFW** Blanco de Calcoflúor

**CGD** (Candida Genome Database) Base de datos de Candida

**CI** Candidiasis invasiva

**CID** (Collision-induced dissociation) Colisión inducida por disociación

**DNA** Ácido desoxirribonucleico

**D.O.** Densidad óptica

**DDA** (Data Dependent Acquisition) Adquisición dependiente de datos

**DHR** Dihidrorodamina

**DIA** (Data Independent Acquisition) Adquisición independiente de datos

**DIC** Microscopía de contraste de interferencia diferencial

**DMSO** (Dimethyl Sulfoxide) Dimetil sulfóxido

**Dox** Doxiciclina

**DTT** Ditioetritol

**EDTA** (Ethylenediaminetetraacetic acid) Ácido etilendiaminotetraacético

**FM4-64** N-(3-trietilamoniumpropil)-4-(6-(4-(dietilamino) fenilo) hexatrienilo) piridinio dibromuro

**h** Horas

**HPLC** (High Performance Liquid Chromatography) Cromatografía líquida de alta eficacia

**IAA** (Iodoacetamide) Iodoacetamida

**IP** (Propidium Iodide) Ioduro de propidio

**iTRAQ** (Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitattion) Etiqueta isobárica para cuantificación relativa y absoluta

**KDa** Kilodalton

**Kpb** Kilo pares de bases

**LC** Cromatografía líquida

**LC-MS/MS** Cromatografía líquida acoplada a espectromería de masas en tandem

**M** Molar

**MAPK** (Mitogen Activated Protein Kinasa) Proteína quinasa activada por mitógenos

**MDa** Megadaltons

**MeOH** Metanol

**mg/mL** Miligramo/mililitro

**min.** Minutos

**mL** Mililitro

**mm** Milímetro

**mM** Milimolar

**mRNA** ARN mensajero

**MS** (Mass Spectrometry) Espectrometría de masas

**MS/MS** Espectrometría de masas en tandem

**MW** Peso molecular

**NADH** (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) Nicotinamida adenina dinucleótido de hidrógeno

**NADPH** (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) Nicotinamida adenina dinucleótido

**NAG** N-acetilglucosamina

**ng/mL** Nanogramo/mililitro

**nm** Nanómetro

**O/N** (Overnight) Durante la noche

**ORFs** Open Reading Frames

**pb** Pares de bases

**PBS** (Phosphate-Buffered Saline) Tampón fosfato salino

**PCR** (Polymerase Chain Reaction) Reacción en cadena de la polimerasa

**PKA** Protein kinase A

**pmol** Picomol

**PMSF** (Phenylmethylsulfonyl fluoride) Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**ROS** (Reactive Oxygen Species) Especies reactivas de oxígeno

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

**RT** (Retention time) Tiempo de retención

**SD** Desviación estándar

**SDS** Dodecilsulfato sódico

**SILAC** (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) Marcaje con isótopos estables de aminoácidos en cultivo celular

**TCA** (Tricarboxylic acid cycle) Ciclo de los ácidos tricarbóxicos

**Tg** Tiempo de generación

**tims** (Trapped Ion mobility Spectrometry) Separación de iones basada en la movilidad iónica

**TMT** (Tandem Mass Tag) Etiquetas de masa en tandem

**TOF** (Time-Of-Flight) Analizador de tiempo de vuelo

**UFCs** Unidades formadoras de colonias

**UPS** (Ubiquitin Proteasome System) Sistema Ubiquitina-Proteosoma

**wt** (*Wild type*) *Cepa silvestre*

**X-Gal** 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopiranosido

**YPD** (*Yeast extract Peptone Dextrose*) Extracto de levadura peptona y dextrosa

**$\mu\text{g/mL}$**  Microgramo/mililitro

**$\mu\text{L}$**  Microlitro

**$\mu\text{M}$**  Micromolar

### Lista de aminoácidos

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra	Clasificación	Tipo de N-degrón
Alanina	Ala	A	No polar	Ac/N-degrón
Arginina	Arg	R	Básico	Arg/N-degrón tipo1
Asparagina	Asn	N	Polar	Arg/N-degrón terciario
Ácido aspártico	Asp	D	Ácido	Arg/N-degrón secundario
Cisteína	Cys	C	Polar	Ac/N-degrón
Glutamina	Gln	Q	Polar	Arg/N-degrón terciario
Ácido glutámico	Glu	E	Ácido	Arg/N-degrón secundario
Glicina	Gly	G	No polar	Ac/N-degrón
Histidina	His	H	Básico	Arg/N-degrón tipo1
Isoleucina	Ile	I	No polar	Arg/N-degrón tipo2
Leucina	Leu	L	No polar	Arg/N-degrón tipo2
Lisina	Lys	K	Básico	Arg/N-degrón tipo1
Metionina	Met	M	No polar	Ac/N-degrón
Fenilalanina	Phe	F	Aromático	Arg/N-degrón tipo2
Prolina	Pro	P	No polar	Pro/N-degrón
Serina	Ser	S	Polar	Ac/N-degrón
Treonina	Thr	T	Polar	Ac/N-degrón
Triptófano	Trp	W	Aromático	Arg/N-degrón tipo2
Tirosina	Tyr	Y	Aromático	Arg/N-degrón tipo2
Valina	Val	V	No polar	Ac/N-degrón



## RESUMEN

---



## Análisis funcional de la subunidad $\beta$ 4 del proteosoma de *Candida albicans*: evaluación como diana selectiva de nuevos antifúngicos.

### Introducción

*Candida albicans* es un hongo patógeno oportunista que forma parte de la microbiota de individuos sanos como comensal. Sin embargo, situaciones de inmunodepresión favorecen el desarrollo de infecciones sistémicas en el hospedador como las candidiasis invasivas que tienen una tasa alta de mortalidad. A pesar de la investigación en las últimas décadas el arsenal terapéutico disponible sigue siendo escaso y la aparición de resistencias hace necesario el desarrollo de nuevos antifúngicos.

En la célula, el recambio proteico es continuo y dinámico para mantener la proteostasis (homeostasis proteica) y es crucial para prácticamente todos los procesos celulares. En células eucariotas existen dos vías principales de proteólisis: la lisosomal o vacuolar, por osis y autofagia, y la vía proteosomal, a través del proteosoma, que puede ser mediada por ubiquitina. El proteosoma es un complejo multicatalítico con una alta plasticidad y muy selectivo siendo esencial para la viabilidad celular, lo que le postula como una diana ideal para el desarrollo de nuevas terapias antifúngicas.

### Objetivos

1. Estudio de la esencialidad del gen *CaPRE1*, que codifica la subunidad  $\beta$ 4 del proteosoma, de *C. albicans*.
2. Identificación de sustratos de degradación vía proteosoma en *C. albicans* mediante una aproximación de proteómica cuantitativa. Análisis de los procesos biológicos, rutas metabólicas y funciones principales en las que está implicado el gen *CaPRE1*.
3. Desarrollo de un ensayo competitivo positivo para la búsqueda de nuevos antifúngicos cuya diana sea el gen *CaPRE1* mediante la construcción de cepas de *S. cerevisiae* humanizada y *candidizada*.
4. Desarrollo de un sistema de búsqueda de nuevos antifúngicos basado en la degradación de proteínas mediante la construcción de diferentes sustratos de proteólisis.

## Resultados

El análisis de un fragmento de DNA de *C. albicans* próximo al gen *CaHIS1* condujo a la identificación de un homólogo de *ScPRE1* de *S. cerevisiae*. Los estudios de complementación del fenotipo de un mutante termosensible *pre1-1* de *S. cerevisiae* permitieron comprobar que se trataba del homólogo funcional en *C. albicans*. Para abordar la caracterización de *CaPRE1*, se procedió a la delección de los dos alelos del gen y, ante la imposibilidad de encontrar un mutante homocigoto, se dedujo que *CaPRE1* es un gen esencial en *C. albicans*. Con el objetivo de estudiar su función se han obtenido mutantes condicionales regulados por fuente de carbono y un mutante dependiente de tetraciclina, que en presencia de doxiciclina reprime la expresión de *CaPRE1* (*PRE1<sup>OFF</sup>*) y en su ausencia se induce (*PRE1<sup>ON</sup>*). Los estudios fenotípicos muestran que en ausencia de *CaPRE1* las células presentan una morfología celular aberrante, hiperfilamentan y tienen defectos en la separación celular.

Mediante la técnica de electroforesis nativa para la separación de complejos proteicos, se analizó en este mutante el ensamblaje del proteosoma, ante la deficiencia en la subunidad  $\beta 4$  del proteosoma.

Haciendo uso de una aproximación proteómica DIA (*Data Independent Analysis*), se cuantificaron 4780 proteínas. El análisis del efecto de la represión del gen *CaPRE1*, muestra que entre las principales rutas metabólicas alteradas destacan la autofagia, la endocitosis y el tráfico vesicular hacia la vacuola, lo que sugiere una activación de rutas catabólicas y de reciclaje celular, y un compromiso en la función mitocondrial.

Por último, se ha abordado la problemática de falta de antifúngicos, desarrollando dos sistemas para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad frente a este hongo. El primero de ellos, se basa en un ensayo competitivo que utiliza dos cepas de *S. cerevisiae* delecionadas en *ScPRE1* que expresan de forma controlada el gen humano *HsC7-I* homólogo a *CaPRE1* (humanizada) y el gen *CaPRE1* marcada con proteína verde (*candidizada*). Un posible inhibidor selectivo debiera, por tanto, manifestarse como un pocillo con crecimiento (turbidez) pero sin fluorescencia: inhibición del crecimiento de la cepa *candidizada*, pero no de la cepa humanizada. El segundo, se basa en la construcción de sustratos de proteólisis de la ruta del N-terminal con aminoácidos amino-terminales estabilizadores y desestabilizadores, y se expresaron en cepas de *S. cerevisiae* afectadas en la degradación de proteínas, como mutantes en los genes *PRE1* y *UBR1*. En ambos casos, se estabilizaban los sustratos, por lo que son candidatos para ser utilizados en ensayos de búsqueda de inhibidores de la degradación de proteínas.

## Conclusiones

1. El gen *CaPRE1* es el homólogo funcional en *C. albicans* del gen *PRE1* de *S. cerevisiae*. Codifica la subunidad  $\beta 4$  del complejo catalítico 20S del proteosoma, y es esencial para el crecimiento y la viabilidad celular en *C. albicans*.
2. Mutantes condicionales *pre1* de *C. albicans* dependientes de fuente de carbono muestran una morfología celular aberrante, hiperfilamentosa y con defectos en separación celular.
3. En condiciones de represión de la expresión de *PRE1* (bajo un promotor regulable de tetraciclina), el proteosoma 20S no está ensamblado completamente y la subunidad  $\beta 4$  del proteosoma no se detecta.
4. El alto número de proteínas identificadas, casi un 80% del proteoma de *C. albicans*, valida la aproximación proteómica DIA como una herramienta poderosa para el estudio y la caracterización a gran escala del proteoma.
5. El estudio de proteómica cuantitativa diferencial entre la represión y la inducción de *CaPRE1* muestra un 42% de proteínas con cambios significativos en su abundancia, con predominio de proteínas que aumentaron en su abundancia cuando se reprime la expresión de *PRE1*.
6. La represión de *PRE1* induce un aumento en la abundancia de proteínas relacionadas con el proceso catabólico del proteosoma, transporte de proteínas, la endocitosis, el transporte vacuolar, la autofagia, la morfogénesis y el ciclo celular, entre otros procesos biológicos.
7. La represión de *PRE1* provoca la disminución de la fosforilación oxidativa, una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo, lo que evidencia una deficiencia en la función mitocondrial y un fenotipo apoptótico.
8. El aumento en la abundancia de proteínas de las subunidades de la parte reguladora del proteosoma 19S, algunas del complejo catalítico 20S y del factor de transcripción Rpn4, las posicionan como sustratos directos del proteosoma. La disminución en la abundancia de proteínas implicadas en la biogénesis y ensamblaje de los ribosomas, y el metabolismo de aminoácidos cuando se reprime el gen *PRE1*, los sitúan como procesos compensatorios de la deficiencia de la actividad del proteosoma.
9. El ensayo competitivo basado en la humanización y *candidización* de un mutante de *S. cerevisiae* deficiente en *PRE1*, constituye un sistema idóneo para el cribado de compuestos con actividad antifúngica y con especificidad farmacológica para la proteína Pre1 de *C. albicans*.
10. Los sustratos de proteólisis generados son específicos de la ruta del N-terminal, lo que ha posibilitado el desarrollo de un ensayo positivo para la identificación de agentes antifúngicos dirigidos a componentes específicos de la maquinaria de degradación.
11. La aplicación web H-Converter es una herramienta proteómica de acceso público para la comunidad científica de gran utilidad para el análisis global de proteínas de *C. albicans*.



## SUMMARY





## Functional analysis of the $\beta 4$ subunit of the proteasome in *Candida albicans*: evaluation as a selective target for new antifungal agent.

### Introduction

*Candida albicans* is an opportunistic pathogenic fungus that is part of the microbiota of healthy individuals as a commensal organism. However, immunosuppressed situations favour the development of systemic infections in the host, such as invasive candidiasis, which is associated with high mortality rates. Despite research efforts in recent decades, the available therapeutic arsenal remains limited, and the emergence of resistance highlights the need for the development of new antifungal agents. Therefore, in this work, we explored protein degradation as a potential target for new antifungal therapies.

In the cell, protein turnover is continuous and dynamic to maintain proteostasis (protein homeostasis), which is crucial for virtually all cellular processes. In eukaryotic cells, there are two main pathways for protein degradation: the lysosomal or vacuolar pathway, through endocytosis and autophagy, and the proteasomal pathway, via the proteasome, which can be ubiquitin-mediated. The proteasome is a multicatalytic complex that is highly plastic and selective, and essential for cell viability, making it an ideal target for the development of new antifungal therapies.

### Objectives

1. To study the essentiality of the *CaPRE1* gene, which encodes the  $\beta 4$  subunit of the proteasome in *C. albicans*.
2. To identify substrates degraded via the proteasome in *C. albicans* using a quantitative proteomics approach. To analyse the biological processes, metabolic pathways, and functions involving *CaPRE1*.
3. To develop a positive competitive assay to screen for new antifungal compounds targeting *CaPRE1* by constructing humanised and "candidised" *S. cerevisiae* strains.
4. To develop a screening system for antifungal compounds based on protein degradation, through the construction of various proteolysis substrates.

### Results

Analysis of a DNA fragment from *C. albicans* near the *CaHIS1* gene led to the identification of a homolog to *ScPRE1* from *S. cerevisiae*. Complementation studies in a temperature-sensitive *pre1-1* mutant of *S. cerevisiae* confirmed it as the functional homolog in *C. albicans*. To characterise *CaPRE1*, both alleles were deleted, and the inability to obtain a homozygous mutant indicated that *CaPRE1* is essential in *C. albicans*.

To study its function, we generated conditional mutants regulated by carbon source and tetracycline, where the presence of doxycycline represses *CaPRE1* expression (*PRE1<sup>OFF</sup>*) and its absence induces expression (*PRE1<sup>ON</sup>*). Phenotypic studies showed that *CaPRE1* deficiency causes aberrant cell morphology, hyperfilamentation, and defects in cell separation.

Using blue-native, a protein complex separation technique, we analysed proteasome assembly in the mutant, revealing a deficiency in the  $\beta 4$  subunit.

Through a DIA (Data Independent Acquisition) proteomics approach, we quantified 4,780 proteins. Repression of *CaPRE1* expression revealed significant alterations in metabolic pathways, including autophagy, endocytosis, and vesicular trafficking to the vacuole, suggesting activation of catabolic and recycling pathway. Mitochondrial function was compromised.

Finally, to address the lack of antifungals, we developed two systems to screen for new compounds active against this fungus. The first system is a competitive assay using two *S. cerevisiae* strains deleted for *ScPRE1*: one expressing the human homolog *HsC7-I* (humanised), and the other expressing GFP-tagged *CaPRE1* (*candidised*). A selective inhibitor would manifest as a well with cell growth (turbidity) but no fluorescence, indicating inhibition of the *candidised* strain but not the humanised one.

The second system involves constructing N-terminal degradation substrates with stabilising and destabilising amino-terminal residues. They were expressed in *S. cerevisiae* mutants defective in protein degradation (*PRE1* and *UBR1*). In both cases, the substrates were stabilised, indicating their suitability for use in screening inhibitors of protein degradation.

## Conclusions

1. *CaPRE1* is the functional homolog of *S. cerevisiae* *PRE1* in *C. albicans*, encoding the  $\beta 4$  subunit of the 20S proteasome catalytic core, and is essential for cell growth and viability in *C. albicans*.
2. Carbon source-dependent *pre1* conditional mutants of *C. albicans* with an aberrant and hyperfilamentous cell morphology with no cell separation.
3. Under tetracycline-repressed expression, the 20S proteasome is not fully assembled, and the  $\beta 4$  subunit is not detected.
4. The large number of proteins identified—nearly 80% of the *C. albicans* proteome—validates the DIA proteomics approach as a powerful tool for large-scale proteomic studies.
5. Differential quantitative proteomics between *PRE1* repression and induction revealed 42% of proteins with significant abundance changes, with a predominance of upregulated proteins.
6. *PRE1* repression leads to increased abundance of proteins involved in proteasomal catabolic processes, protein and carbohydrate transport, endocytosis, vacuole transport, autophagy, morphogenesis, and the cell cycle, among other biological processes.
7. *PRE1* repression causes a reduced oxidative phosphorylation, increased reactive oxygen species (ROS) production, and oxidative stress, indicating mitochondrial dysfunction and an apoptotic phenotype.

8. The increased abundance of several subunits of the 19S regulatory particle, selected components of the 20S catalytic core, and the transcription factor Rpn4 suggests that these proteins are direct substrates of the proteasome. Conversely, the decreased abundance of proteins involved in ribosome biogenesis and amino acid metabolism under *PRE1* repression indicates the activation of compensatory mechanisms in response to impaired proteasome activity.
9. The competitive assay based on humanisation and *candidisation* of a *S. cerevisiae* mutant deficient in *PRE1* represents a suitable system for screening antifungal compounds with pharmacological specificity for the *C. albicans* Pre1 protein.
10. The engineered N-terminal degradation substrates are specific to the N-end rule pathway and have enabled the development of a positive screening assay for identifying antifungal agents that target specific components of the protein degradation machinery.
11. The web application H-Convensor is a publicly accessible proteomics tool for the scientific community, useful for global analysis of *C. albicans* proteins.



# INTRODUCCIÓN





## 1. Importancia clínica de *Candida albicans* como hongo patógeno oportunista

*Candida albicans* es un microorganismo eucariota que, en condiciones normales, forma parte de la microbiota del ser humano, comportándose como un comensal que coloniza la piel y las mucosas, entre las que se encuentran la cavidad orofaríngea y los tractos gastrointestinal y urogenital.<sup>1,2</sup> Su importancia clínica radica en que, en determinadas ocasiones, se comporta como patógeno, por razones que incluyen las propias del microorganismo, las del hospedador y las del ambiente en que se desarrolla, por lo que debe considerarse como patógeno oportunista.<sup>3,4,5</sup> Como patógeno, *C. albicans* produce una infección denominada candidiasis, siendo la especie responsable del 50% de estas infecciones, puesto que existen otras especies de este género que son responsables del resto de las candidiasis.<sup>6,7,8</sup>

### 1.1 Transición de *C. albicans* de un estado comensal a patógeno

*C. albicans* posee una variedad de factores implicados tanto en su capacidad para establecerse como comensal y formar parte de la microbiota como en su virulencia.<sup>9</sup> Esta última, en la mayoría de los casos, comienza con una colonización inicial determinada por su capacidad de adherirse a células epiteliales, seguida de una infección superficial y una posterior infección profunda, favorecida por su capacidad de formar hifas, antes de la infección diseminada.<sup>10</sup>

La capacidad de *C. albicans* para infectar nichos del hospedador tan diversos se debe a diversos **factores de virulencia**<sup>11</sup> entre los que destacan:

- la transición morfológica entre las formas de levadura e hifa<sup>12</sup>
- la expresión de adhesinas e invasinas en la superficie celular<sup>13,14</sup>
- el tigmotropismo<sup>15,16</sup>
- la formación de biopelículas<sup>17,18,19</sup>
- la plasticidad fenotípica<sup>20,21,22,23</sup>
- la secreción de enzimas hidrolíticas<sup>24,25,26</sup>

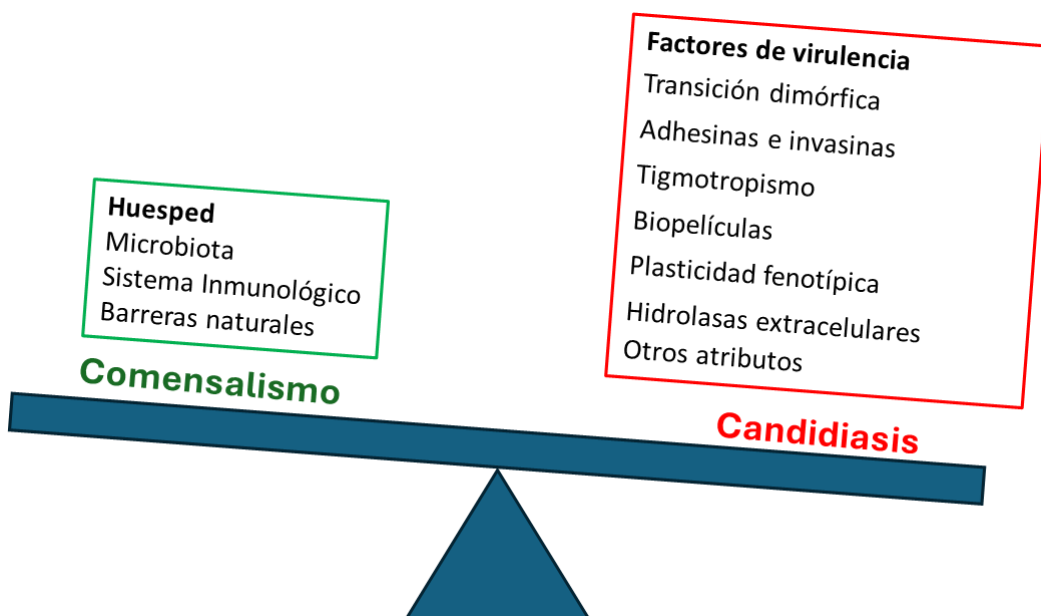
Además, su rápida adaptación a las fluctuaciones del pH ambiental, la respuesta a diferentes condiciones de estrés, la flexibilidad metabólica, y los diferentes sistemas de adquisición de nutrientes, también son importantes mecanismos asociados a su virulencia.<sup>27</sup>

La candidiasis diseminada sólo se produce cuando *C. albicans* escapa de los mecanismos del sistema inmunitario, penetra en los tejidos vasculares y entra en la sangre. La entrada al torrente sanguíneo se produce por dos vías: a) Vías naturales (a través de la superficie de las células de la mucosa, penetra en las células epiteliales) y b) Vías artificiales (a través de la implantación de dispositivos médicos, cirugía y depleción de la microbiota natural por tratamiento con antibióticos).<sup>10</sup>

El sistema inmunológico humano controla esta transición perjudicial siempre que no existan condiciones de **inmunodepresión** o enfermedades subyacentes.<sup>28,29,30,31,32</sup> En primer lugar, el origen de las infecciones por *C. albicans* generalmente es endógeno, y afecta principalmente a

enfermos inmunocomprometidos o pacientes sometidos a quimioterapia, con tumores sólidos o cánceres hematológicos, receptores de trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) o de órganos sólidos (TOS), los que reciben dosis altas y prolongadas de corticoides u otros inmunosupresores causantes de disfunción de la inmunidad celular, y los pacientes infectados por el VIH. Asimismo, las alteraciones físicas de las barreras anatómicas se convierten en factores de riesgo para desarrollar candidiasis invasivas, como son los dispositivos invasivos, nutrición parenteral, catéteres, hemodiálisis, politraumatismo y grandes quemados.

Sin embargo, una infección no es una simple interacción bidireccional entre *C. albicans* y el huésped, sino que incluye la interacción con la multitud de otros microorganismos que colonizan las superficies mucosas como las bacterias de **la microbiota**.<sup>33,1</sup> Esto demuestra la importancia de una microbiota saludable, ya que una perturbación en este ecosistema bien equilibrado, por ejemplo, a través de la terapia con antibióticos, la ingesta alta de carbohidratos o una nutrición desequilibrada,<sup>34</sup> resulta en un desequilibrio entre las bacterias comensales y los hongos, que favorece el desarrollo de infecciones oportunistas.<sup>29</sup> **(Figura 1).**



**Figura 1. Factores causantes del paso de *C. albicans* de comensal a patógeno.**

Factores de virulencia del hongo y factores del huésped, que alterados predisponen a cursar la infección, originando una candidiasis en el ser humano.

## 1.2 Manifestaciones clínicas

Dependiendo del grado de invasión y de la localización o tipo de tejido afectado, las infecciones producidas por *C. albicans* pueden ser clasificadas en infecciones superficiales e infecciones sistémicas, que pueden ser localizadas en algún órgano o diseminadas.<sup>35</sup>

**Las infecciones superficiales** son aquellas cuyas lesiones son visibles sin necesidad de utilizar ningún tipo de instrumental especial. Se incluyen dentro de este grupo las infecciones orales,

genitales, de la piel y de las uñas. Este tipo de infecciones son las más comunes y fáciles de diagnosticar.<sup>36</sup> Las lesiones que produce abarcan desde pequeñas y leves a graves y desfigurantes, pero no suelen ser letales.<sup>37</sup> *C. albicans* está presente en la cavidad oral del 75% de la población. En individuos sanos, esta colonización es benigna, sin embargo, en individuos inmunocomprometidos pueden sufrir con frecuencia infecciones recalcitrantes en la cavidad oral, y pueden afectar a la faringe o al esófago denominándose candidiasis oral.

El problema mayor son las candidiasis superficiales recurrentes. Se estima que aproximadamente el 5% de las mujeres sufren al menos una vez en su vida candidiasis vulvo-genital, el 40–50% sufren otro episodio, y un 5-8% sufren episodios recurrentes anualmente, siendo factores de predisposición la diabetes mellitus, el uso de antibióticos y anticonceptivos orales, el embarazo y la terapia hormonal.<sup>12,38</sup>

**Las candidiasis invasivas** comprenden las candidemias, donde se produce la diseminación de *C. albicans* en forma de levadura por el torrente sanguíneo pudiendo producir una sepsis y las denominadas candidiasis profundas o sistémicas.<sup>39</sup> Estas últimas se producen como consecuencia de la invasión de tejidos, proceso favorecido por la capacidad de formar hifas o por inoculación directa de *C. albicans* en un sitio estéril, alcanzando los órganos internos, pudiendo estar localizada en un órgano concreto como el corazón, riñones, sistemas sanguíneo, respiratorio y digestivo, ojos, sistema nervioso, huesos y articulaciones. Su diagnóstico es difícil y normalmente está basado en el aislamiento del microorganismo en fluidos corporales estériles, como puede ser la sangre, orina, líquido cefalorraquídeo y líquido articular.<sup>40,41</sup>

La importancia de disponer de antifúngicos eficaces, cuyas características, ventajas e inconvenientes se detallarán más adelante, se pone de manifiesto a la hora de tratar enfermos que padecen candidiasis, y esta necesidad se hace más acuciante si la infección fúngica es de tipo sistémico.

Debido a la importancia de *C. albicans* como microorganismo patógeno humano, en el siguiente apartado se analiza la situación actual de las infecciones fúngicas causadas por *C. albicans*.

### 1.3 Epidemiología

Aunque *C. albicans* sigue siendo el agente etiológico predominante en las candidiasis invasivas, hay al menos 15 especies distintas de *Candida* que causan enfermedades humanas, pero más del 95% de ellas son causadas por los 5 patógenos más comunes. En el último estudio multicéntrico español, *C. albicans* fue la especie más frecuentemente aislada, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei*.<sup>42,43</sup> Es importante resaltar la creciente importancia médica que se le está dando a *C. auris*<sup>44</sup> desde que se aisló en 2009, por la dificultad en su identificación por las técnicas de diagnóstico convencionales y por su resistencia a los azoles y a la anfotericina B.<sup>45</sup>

Las infecciones fúngicas invasivas tienen una incidencia mucho menor que las infecciones superficiales. 100 millones de mujeres son víctimas de infecciones vulvovaginales recurrentes anualmente y más de mil millones de personas sufren infecciones cutáneas ([www.gaffi.org](http://www.gaffi.org)).

Sin embargo, las infecciones invasivas son de mayor preocupación ya que están asociadas con tasas de mortalidad inaceptablemente altas, estimándose en un millón y medio de personas cada año en el mundo.<sup>46,47,48,49</sup> De hecho, las muertes anuales debidas a infecciones fúngicas son mayores que la mortalidad mundial debida a malaria, cáncer de mama o próstata, y son similares a las causadas por la tuberculosis o el VIH (<https://fungalinfectiontrust.org/>).

El 90% de todas las muertes relacionadas con hongos reportadas son el resultado de especies que pertenecen a uno de los cuatro géneros: *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* y *Pneumocystis* ([www.killerfungus.org](http://www.killerfungus.org)). No existen vacunas o inmunoterapias para las micosis y solo se dispone de un arsenal limitado de medicamentos antimicóticos para tratar este tipo de infecciones, que en ocasiones resultan ineficaces por la emergencia de cepas resistentes.<sup>50</sup> Además, las infecciones invasivas a menudo se diagnostican demasiado tarde para salvar al paciente.<sup>51,35,52</sup> Una mención especial, merecen las infecciones *nosocomiales* que afectan a un gran número de pacientes, y cuya incidencia aumenta día a día.<sup>53</sup> En las últimas décadas se ha producido un incremento global de las infecciones fúngicas de origen nosocomial (IFON) y de las asociadas a cuidados sanitarios, a consecuencia de los avances en las terapias médicas y quirúrgicas cada vez más eficaces, pero también más agresivas.<sup>32</sup>

#### 1.4 Arsenal terapéutico

Tradicionalmente, una de las principales líneas de investigación en *C. albicans* se centra en la identificación de dianas para el desarrollo de sustancias antifúngicas. Ciertas estructuras y procesos presentes en la célula fúngica y ausentes en las células de los mamíferos, o que aún, estando presentes, exhiban diferente sensibilidad frente al antifúngico, serían las dianas ideales para el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos.<sup>54,55,56</sup>

El tratamiento utilizado en cada caso depende de la gravedad de la infección y de su localización, existiendo formulaciones adecuadas para uso sistémico y tópico.<sup>57</sup> Dependiendo del diagnóstico, de la evidencia microbiológica y de la probabilidad de infección grave, hay que elegir entre tratamiento profiláctico, tratamiento preventivo y tratamiento empírico o tratamiento dirigido.<sup>58,59,60</sup>

Entre el arsenal terapéutico antifúngico disponible en la actualidad (**Figura 2**), los agentes antifúngicos administrados para el tratamiento de candidiasis sistémica<sup>57</sup> se agrupan en las tres clases siguientes<sup>30</sup>:

##### **Las equinocandinas, inhibidores de la síntesis de la pared celular fúngica**

La diana óptima para un hongo es la pared celular, puesto que es una estructura que no se encuentra presente en las células humanas. Los componentes básicos de la pared celular son los polisacáridos glucano, manano y quitina, junto con diversas glicoproteínas.<sup>61</sup> La quitina es un

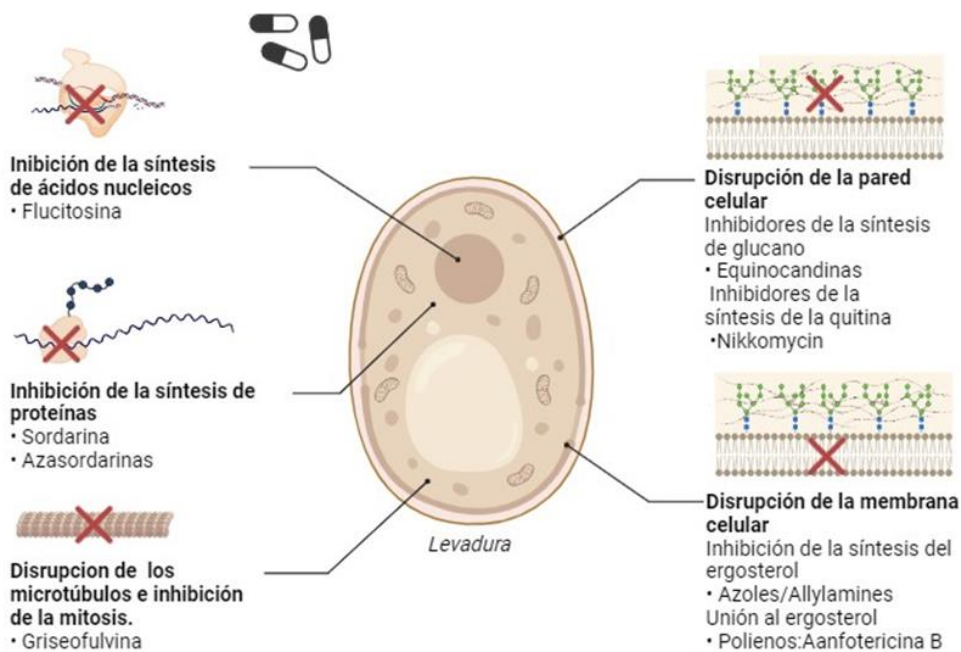
polisacárido esencial para la estructura de la pared celular de los hongos, la cual es responsable de la morfología celular, aunque sólo constituye un 1% del total. Las equinocandinas son lipopéptidos cíclicos que inhiben el complejo transmembrana glucano sintasa (Fks1), una enzima biosintética que produce 1,3- $\beta$ -D-glucano, el principal carbohidrato de la pared celular fúngica. La interrupción de la síntesis de 1,3- $\beta$ -D-glucano daña la pared celular alterando la integridad celular y finalmente la lisis y muerte de la célula.<sup>62</sup>

### Los azoles, inhibidores de la síntesis de la membrana celular

El ergosterol es fundamental para la membrana celular fúngica y está ausente en células de mamífero.<sup>63</sup> Los azoles (fluconazol, voriconazol, itroconazol y posaconazol) bloquean la 14 $\alpha$ -desmetilasa, una enzima codificada por el gen *ERG11*, reduciendo la síntesis de ergosterol a partir del lanosterol. Su efecto es fungistático más que fungicida.<sup>64</sup>

### Anfotericina B, intercalante de la membrana plasmática

El polieno anfotericina B es una molécula lipofílica que se une al ergosterol intercalándose en la membrana citoplasmática fúngica. La anfotericina B se autoensambla en oligómeros que se insertan en la membrana citoplasmática, formando poros acuosos que provocan la fuga de iones y una rápida lisis celular. Las formulaciones de administración están basadas en lípidos de anfotericina B (anfotericina B liposomas o complejos lipídicos de anfotericina B), porque se asocian con una menor nefrotoxicidad.<sup>65</sup>



**Figura 2. Mecanismos de acción de los antifúngicos utilizados en la actualidad.**

Se detallan los mecanismos de acción de los principales antifúngicos disponibles.

Los problemas de toxicidad y aparición de resistencias que presentan los antifúngicos de que disponemos,<sup>66,67</sup> junto con las dificultades de asimilación y administración, hacen necesario el desarrollo de nuevos agentes que carezcan de este tipo de inconvenientes.<sup>68,69</sup>

Las características que debería poseer un antifúngico ideal serían las de poseer una alta actividad y selectividad hacia una diana específica del hongo para no ser tóxico frente a las células del huésped, disponer de una buena farmacocinética, ser de fácil administración, y tener efecto fungicida preferiblemente al fungistático. Finalmente, sería deseable que no se seleccionaran resistencias fácilmente y fuera de bajo coste.<sup>70,55</sup>

Los antifúngicos utilizados hoy en día distan mucho de ser ideales, debido fundamentalmente a su alta toxicidad para las células del huésped en el caso de la anfotericina B y a la aparición de resistencias desarrolladas por el hongo frente a antifúngicos concretos, como los azoles.<sup>59,71</sup>

### **Nuevos antifúngicos.**

Actualmente, los antifúngicos más prometedores que se encuentran en fase de ensayos clínicos<sup>72,73</sup> para el tratamiento de la candidiasis invasiva y candidemia son<sup>74</sup>:

- Ibrexafungerp, que actúa inhibiendo la síntesis de 1,3-β-D-glucano. Tiene la misma diana que las equinocandinas.<sup>75,76</sup>
- Rezafungina, es una equinocandina de segunda generación. En enero de 2024 la Agencia europea del medicamento (EMA, *European Medicines Agency*) autorizó su uso para el tratamiento de la candidiasis invasiva en adultos.<sup>77,78</sup>
- Fosmanogepix, es un antifúngico de nueva generación perteneciente a la clase de los inhibidores de la proteína Gwt1, una enzima esencial de la síntesis de glicosilfosfatidilinositol (GPI), necesaria para el anclaje de proteínas en la membrana celular fúngica.<sup>79,80</sup> Este mecanismo de acción es novedoso lo que le confiere cierta importancia para el tratamiento de cepas resistentes a otros antifúngicos.

## **2. Características de *Candida albicans***

*C. albicans* es un microorganismo eucariota incluido taxonómicamente dentro del filo *Ascomycota*, Clase *Saccharomycetes*, Orden *Saccharomycetales*, familia *Saccharomycetaceae*, género *Candida*.<sup>81</sup>

*C. albicans* pertenece al clado CUG que es un grupo de especies que usan un código genético alternativo en el que el codón CUG codifica serina en vez de leucina. A este clado pertenecen todas las especies de *Candida* aisladas de pacientes.<sup>82</sup>

*C. albicans* es un hongo con un desarrollo predominantemente unicelular, cuyas principales características son ser diploide, polimórfico y heterocigoto.<sup>83</sup>

## 2.1 Diploidía

*C. albicans* es un microorganismo diploide con ocho pares de cromosomas por célula. Los cromosomas se nombran de 1, el de mayor tamaño, a 7 el de menor tamaño, y R los cromosomas que portan el DNA ribosómico.<sup>84</sup>

Esta especie exhibe un ciclo parasexual en el que el apareamiento produce células tetraploides que sufren un programa no meiótico de pérdida concertada de cromosomas para volver a un estado diploide o aneuploide.<sup>85-86</sup>

*C. albicans* presenta altos niveles de heterozigosidad (diferencias entre las dos copias de cada gen). Esto le permite expresar diferentes alelos bajo distintas condiciones ambientales, lo que es clave para su adaptabilidad.<sup>87,88</sup> *C. albicans* tiene un genoma diploide heterocigoto que es altamente dinámico y puede mostrar variación de pequeña a gran escala de reordenamiento cromosómico y aneuploidía, lo que tiene implicaciones en la resistencia a los fármacos, la virulencia y la patogenicidad.<sup>89</sup>

## 2.2 Polimorfismo

*C. albicans* es un microorganismo dimórfico capaz de crecer como levadura o como hifa dependiendo de las condiciones ambientales. Pero además existen otros dos tipos de morfología, pseudohifas y clamidosporas, por lo que en *C. albicans* sería más correcto hablar de polimorfismo en vez de dimorfismo<sup>86</sup>. Este polimorfismo contribuye a la virulencia, a la evasión de los fagocitos, a la diseminación en el torrente sanguíneo y a la adaptación a diferentes condiciones ambientales adversas.<sup>90</sup>

Las células levaduriformes, también llamadas **blastosporas** o blastoconidios, son la forma unicelular de la levadura que se caracteriza por un proceso de división mitótica denominado gemación, donde el núcleo se divide y la célula hija se separa. Su morfología, ovalada o esférica, es de un tamaño aproximado de 4-6  $\mu\text{m}$  de diámetro.<sup>91</sup> Las **pseudohifas** son cadenas de células levaduriformes alargadas que permanecen unidas como filamentos. Si el alargamiento es muy grande, las pseudohifas sólo son distinguibles de las verdaderas hifas por las constricciones existentes en las uniones entre blastosporas.<sup>92</sup> Las **hifas** son tubos microscópicos que contienen varias células del hongo separadas por septos paralelos. Las hifas surgen de las secciones de otras hifas o de las blastosporas. Las hifas, a su vez, pueden dar lugar a blastosporas por gemación lateral. Al conjunto de hifas, ramificaciones y yemas laterales se denomina micelio.<sup>16</sup> Las **clamidosporas** son células grandes, refringentes y de paredes gruesas que se encuentran en los extremos de hifas y pseudohifas unidas a través de las denominadas células suspensoras. Sólo *C. albicans* forma clamidosporas entre todas las especies de *Candida*, y lo hace *in vitro* y en condiciones muy especiales.<sup>93</sup>

### 2.3 Transición dimórfica

El *dimorfismo* se define como la transición reversible entre levadura e hifa que se induce en respuesta a distintos cambios ambientales. Se han descrito diversos factores que inducen la formación de hifas en *C. albicans*, como  $\text{pH} > 7$ , presencia de suero, N-acetilglucosamina, la temperatura fisiológica de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y alta concentración de  $\text{CO}_2$ .<sup>94,95</sup>

El fenómeno del dimorfismo es de gran importancia debido a que muchos hongos dimórficos son patógenos.<sup>96,97</sup> Ambas formas son importantes en la patogénesis, a pesar de que juegan un papel muy diferente en el proceso de infección.<sup>98</sup> La forma de levadura, de menor tamaño, es la responsable de la diseminación en el torrente sanguíneo,<sup>99,28,100</sup> mientras que la forma hifal favorece la invasión de tejidos y el escape de fagocitos.

Este proceso es crítico para la virulencia de *C. albicans* y está regulado por múltiples factores de transcripción y vías de señalización que responden a diversas señales ambientales. La transición morfológica está mediada por varias rutas de señalización, que incluyen las rutas MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), Ras/cAMP-PKA (Adenilato Ciclasa - Proteína Kinasa A) y factores de transcripción, como Efg1 Cph1, Nrg1 y Tec1.<sup>101</sup>

La filamentación también está regulada por sustancias autoinductoras que promueven el *quorum sensing* o comunicación entre las células, como el farnesol que inhibe la formación de hifas,<sup>102</sup> o como el tirosol y dodecanol que inducen la filamentación. Así, altas densidades de células ( $>10^7$  cel/mL) promueven el crecimiento levaduriforme, mientras que densidades celulares menores ( $<10^7$  cel/mL) favorecen el crecimiento miceliar.

### 3. Degradación de proteínas. Proteólisis

El recambio proteico es el proceso intracelular que implica un balance entre la síntesis y la degradación de proteínas. En la célula, este recambio es continuo y dinámico para mantener la proteostasis (homeostasis proteica).<sup>103</sup>

La regulación de la abundancia y la concentración de las proteínas es crucial para prácticamente todos los procesos celulares. Muchos procesos fisiológicos requieren la presencia de una o varias proteínas específicas durante un periodo de tiempo definido o bajo determinadas condiciones como mecanismo regulador de la actividad enzimática intracelular.<sup>104,105</sup>

La proteólisis o degradación de proteínas es un proceso celular que tiene diferentes finalidades.<sup>106</sup> Entre ellas se encuentra el **control de calidad** de las proteínas afectadas por estrés oxidativo u otro tipo de estrés donde se modifica la estructura y composición de las proteínas dando lugar a proteínas aberrantes o con fallos en el plegamiento.<sup>107,108,109</sup> Asimismo, la actividad enzimática se puede regular variando la abundancia de determinadas proteínas, como es el caso de la regulación metabólica ante diferentes condiciones, por ejemplo en situaciones de ayuno de nutrientes,<sup>103</sup> donde la proteólisis facilita la **flexibilidad metabólica**. También interviene en la **adaptación al medio** puesto que, ante determinados estímulos, se puede modular la

concentración de algunas proteínas para llevar a cabo una respuesta eficaz, como es el caso de las rutas de señalización celular.<sup>110</sup> Por último, otra finalidad importante de la proteólisis es la **regulación de procesos** fisiológicos como es la regulación de la progresión del ciclo celular.<sup>111,112</sup> La vida media de las proteínas (tiempo requerido para que se degrade el 50% de la cantidad de una proteína específica) dentro de las células varía ampliamente, desde minutos hasta varios días, siendo, por tanto, las tasas de degradación de proteínas un aspecto importante de la regulación celular.<sup>113</sup> Muchas proteínas que se degradan rápidamente son moléculas reguladoras, como los factores de transcripción, lo que permite que sus niveles cambien ágilmente en respuesta a estímulos externos. Además, las proteínas defectuosas o dañadas se reconocen y degradan rápidamente dentro de las células, eliminando así las consecuencias de los errores cometidos durante la síntesis de proteínas. Sin embargo, las proteínas que desempeñan funciones estructurales suelen tener una vida media más larga.<sup>114</sup>

### 3.1 Sistemas de degradación de proteínas

En las células eucariotas existen dos vías principales de proteólisis:

1. La lisosomal o vacuolar en levaduras, por endocitosis y autofagia.
2. La proteosomal, a través del proteosoma y que puede ser mediada por ubiquitina (UPS, Ubiquitin Proteasome System).

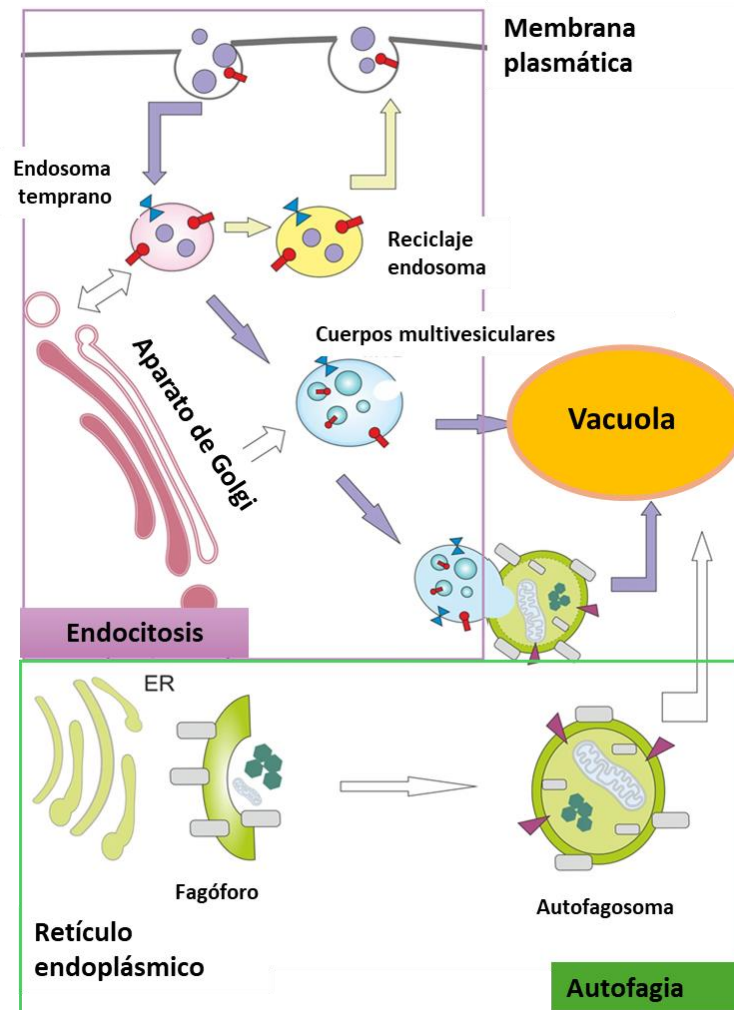
Ambos sistemas de degradación son sinérgicos en las células eucariotas, y cooperan y se complementan para mantener la homeostasis celular. Las dos vías degradativas pueden coactivarse, para degradar proteínas mal plegadas, pero también muestran efectos compensatorios cuando una de las rutas es disfuncional. Ambos sistemas pueden utilizar la ubiquitinación como señal de degradación.<sup>115,116</sup>

#### 3.1.1 Proteólisis vacuolar

Las vacuolas son orgánulos celulares rodeados de membrana y que contienen numerosas proteasas a pH ácido. Hay dos mecanismos principales de proteólisis vacuolar, por endocitosis y por autofagia, (**Figura 3**).

Las proteínas que suelen ser degradadas por el sistema lisosomal son proteínas de membrana y proteínas citoplasmáticas de vida larga. Las proteínas extracelulares también pueden ser degradadas en el lisosoma tras la entrada al interior celular por fagocitosis o endocitosis mediada por receptor, para formar vesículas intracelulares que se fusionarán con las vacuolas.<sup>117</sup> Principalmente, las proteínas acceden a las vacuolas por invaginación de las membranas mediante el proceso de **endocitosis**, que supone la fusión vesícula-membrana y la formación de cuerpos multivesiculares (MVBs) que llevan en el interior la carga para su degradación.<sup>118,119</sup> La

formación de cuerpos multivesiculares es específica porque las proteínas deben ubiquitinarse previamente.<sup>120</sup>



**Figura 3. Degradación de proteínas en levaduras por proteólisis vacuolar.**

La autofagia y la endocitosis pueden culminar en la vacuola. La endocitosis permite el transporte de sustancias desde el medio externo. Implica la invaginación de la membrana plasmática y la biogénesis de pequeñas vesículas intracelulares que contienen constituyentes de la membrana plasmática y componentes extracelulares. Estas pequeñas vesículas se fusionan y forman el compartimento denominado endosoma temprano (EE). La carga de EE puede reciclarse a la membrana plasmática a través de endosomas de reciclaje, transportarse hacia o desde el aparato de Golgi o dirigirse a las vesículas a través de cuerpos multivesiculares (MVB). Durante la macroautofagia, se forman estructuras de doble membrana llamadas autofagosomas para transportar la carga autofágica a las vacuolas o fusionarse con los MVB. Las vías de autofagia y endocíticas cooperan en algunas etapas y comparten muchos componentes de la maquinaria molecular. Modificada de Raudenska (2021).<sup>121</sup>

La **autofagia**,<sup>121</sup> por el contrario, degrada estructuras citosólicas incompatibles con la degradación proteosomal, incluidos los agregados de proteínas, los grandes complejos proteicos estables y los orgánulos. Se envuelven por una doble membrana que forma autofagosomas y llegan a los lisosomas donde son degradados.<sup>122</sup> La degradación vacuolar por autofagia, en

realidad, es específica y está mediada por el reconocimiento de un motivo definido en la proteína diana formado por la secuencia consenso KFERQ que, presumiblemente, los dirige a las vesículas como respuesta a la inanición celular.<sup>123</sup>

### 3.1.2 Degradación proteosomal

El proteosoma presenta una alta plasticidad y, aunque degrade un gran número de proteínas, es muy selectivo. Los procesos celulares en los que está implicado incluyen desde la homeostasis proteica general y la respuesta a estrés hasta el control de los procesos vitales, tales como la división celular, la replicación del DNA, la transcripción y la transducción de señal.<sup>124</sup> Se trata de una estructura que se encuentra en el citoplasma y en el núcleo de las células eucariotas, aunque también se pueden secretar al medio extracelular.<sup>125</sup> El proteosoma en levaduras es un complejo multicatalítico y multifuncional dependiente de ATP<sup>126</sup> y presenta tres actividades proteolíticas diferentes.<sup>127</sup>

La excepcional selectividad de sustratos del proteosoma se debe tanto al marcaje específico de la ubiquitina de los sustratos adecuados para su proteólisis,<sup>128</sup> como a su compleja arquitectura. A diferencia de las vacuolas, su actividad proteolítica precisa de energía dependiente de ATP.

El proteosoma funciona como el principal regulador o modulador del proteoma en eucariotas y degrada numerosas proteínas regulatorias, además de las aberrantes o dañadas e incorrectamente plegadas. El proteosoma degrada la mayoría de las proteínas intracelulares, estimándose en un 80% las proteínas intracelulares que son degradadas por el proteosoma.<sup>129</sup>

## 3.2 Estructura y función del proteosoma

El proteosoma 26S es una estructura que pesa más de 2 millones de daltons y que supone cerca del 2% del contenido proteico celular.<sup>130,131</sup> Está constituido por el proteosoma 20S de 700 kDa que presenta una forma cilíndrica semejante a un tonel, que es la unidad central y parte catalítica del proteosoma, y por la partícula reguladora 19S del proteosoma que se sitúa en un extremo del tonel o en ambos, conformando así el proteosoma 26S.<sup>132</sup>

El proteosoma 26S es una proteasa compartimentalizada de la familia de las ATPasas Asociadas con varias Actividades celulares (AAA+), ya que usa como energía la hidrólisis del ATP para romper las estructuras de los sustratos a degradar y translocar los polipéptidos desplegados a la cámara interna del proteosoma para su degradación. La unidad central 20S es la región catalítica que degrada las proteínas que entran en su interior, mientras que los anillos externos que forman la partícula 19S actúan como puertas de control de entrada de los sustratos.<sup>106,133,134</sup> (**Figura 4**).

### 3.2.1 La unidad central 20S

El núcleo catalítico 20S está formado por 28 subunidades repartidas en cuatro anillos heteroheptaméricos apilados, formados por 7 subunidades cada uno y que se ensamblan en una arquitectura  $\alpha 7\beta 7\beta 7\alpha 7$ . Así, los anillos de ambos extremos están formados por las 7 subunidades

$\alpha$ , mientras que los anillos internos están formados por las 7 subunidades  $\beta$ . Este complejo catalítico 20S puede degradar proteínas de manera independiente del 19S y actuar de forma libre.

Las proteínas de los **anillos  $\alpha$**  externos son estructurales y carecen de actividad proteolítica, pero tienen función de puerta de entrada de las proteínas al sitio catalítico del 20S. El extremo amino-terminal de las subunidades  $\alpha$  forman un poro central de 13 Å a modo de puerta y evitan el acceso a los sitios proteolíticos del lumen de los anillos  $\beta$ , previniendo así la degradación incontrolada de las proteínas. Estos extremos amino-terminales tienen una secuencia conservada YDR que forma puentes entre las subunidades  $\alpha$  para obstruir el poro de entrada. De hecho, hay activadores del proteosoma que se unen a los extremos libres de las unidades  $\alpha$  y dejan abierta esta puerta de entrada a los sustratos.<sup>135,122,136</sup>

Tres de las siete **subunidades  $\beta$**  son proteolíticamente activas. Las tres subunidades de cada anillo contienen residuos de treonina activos en su región amino-terminal, de forma que el proteosoma es una treonín-proteasa<sup>131</sup> con las siguientes actividades:

- Subunidad  $\beta$ 5, similar a quimiotripsina, que rompe las uniones peptídicas en el extremo carboxi-terminal de residuos hidrofóbicos.
- Subunidad  $\beta$ 2, similar a tripsina, que rompe las uniones peptídicas en el extremo carboxi-terminal de residuos básicos (post-básico).
- Subunidad  $\beta$ 1, también llamada actividad similar a caspasa (rotura de las uniones peptídicas en el extremo carboxi-terminal de residuos ácidos), que lleva a cabo la hidrólisis del peptidil glutamil-péptido.

El resto de las subunidades tienen función estructural, siendo la subunidad  $\beta$ 4 objeto de estudio de esta tesis.

El proteosoma 20S supone aproximadamente el 50 % de las especies de proteosomas en células de mamífero,<sup>137</sup> y parece jugar un papel de emergencia celular, contribuyendo a la supervivencia bajo condiciones de estrés fisiológico. En estrés oxidativo y en hipoxia es el proteosoma 20S, el que actúa en solitario, sin necesidad de ubiquitinación previa de los sustratos.<sup>138</sup> El proteosoma 20S es resistente al estrés por oxidación y persiste como un complejo estable ante estas condiciones.<sup>139</sup> Sin embargo, ante el estrés, el 26S sufre un desensamblaje, se puede ubiquitinar y se puede acumular en gránulos o sufrir proteofagia.<sup>109</sup>

### 3.2.2 La estructura reguladora 19S

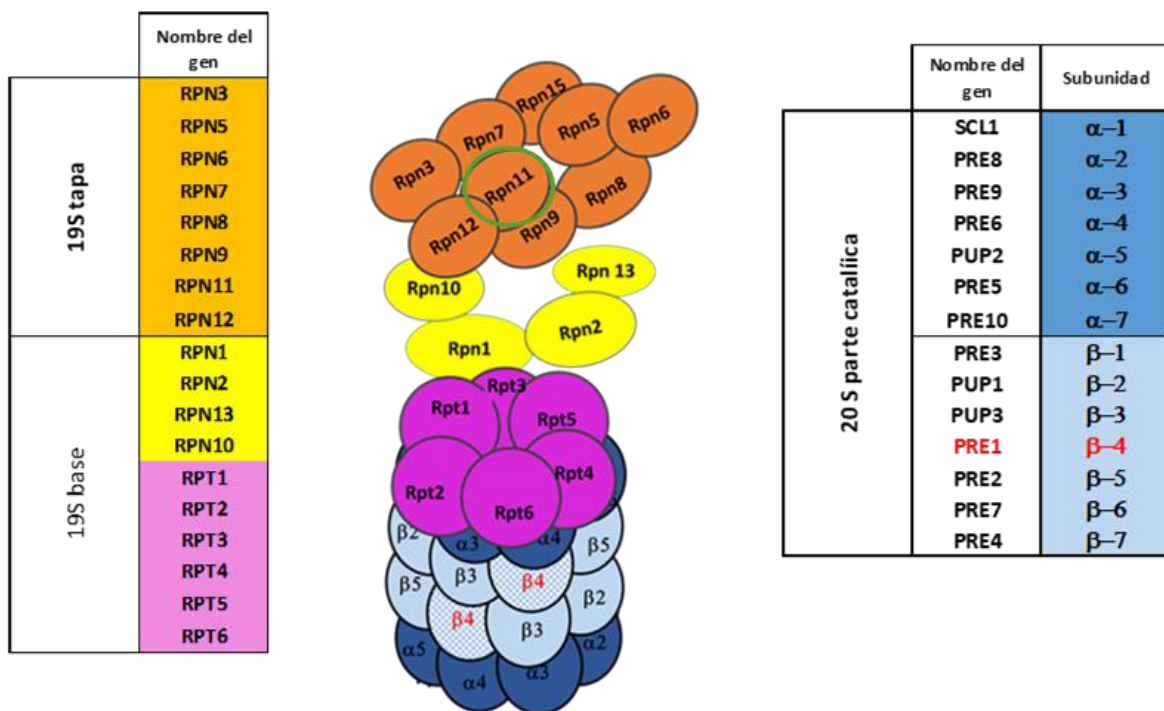
La partícula reguladora 19S se separa bioquímicamente en 2 subcomplejos, **tapa y base**, que pueden estar en ambos extremos del 20S.<sup>140</sup> Es la parte encargada de unir los sustratos ubiquitinados, desplegarlos y translocarlos mecánicamente al complejo 20S catalítico para su posterior degradación.

**El subcomplejo de la tapa**, con un peso molecular de 400 kDa, está formado por las siguientes subunidades sin actividad ATPasa: Rpn3, Rpn5 a 9, Rpn11 y Rpn12. Rpn 11 es una enzima

desubiquitinasa (DUB), encargada de quitar las cadenas de ubiquitina unidas al sustrato a degradar.<sup>141</sup>

El subcomplejo de la base está formada por seis subunidades con actividad de ATPasa (Rpt1-Rpt6) formando un anillo hexagonal y tres unidades sin actividad ATPasa (Rpn1, Rpn2 y Rpn13) y Rpn1 y Rpn13 que poseen múltiples sitios de unión a ubiquitina y a proteínas similares a ubiquitinas (UBLs).<sup>142</sup> Existe otra subunidad receptora de ubiquitina, Rpn10, que une ambos subcomplejos para el ensamblaje de la partícula 19S.<sup>143</sup>

Las 6 subunidades ATPasas, Rpt1 a Rpt6, se agrupan en forma de trímero de dímeros (Rpt1/Rpt2, Rpt6/Rpt3 y Rpt4/Rpt5), y forman el motor heterohexamérico del proteosoma.<sup>144</sup> Este motor es el encargado de aplicar una fuerza mecánica para el desplegamiento de las proteínas y su translocación al interior del complejo 20S a través del poro que forman los bucles de las proteínas Rpt, utilizando la energía química de la hidrólisis del ATP.<sup>122,145</sup>



**Figura 4. Subunidades que componen el proteosoma 26 S: la parte reguladora 19S y la parte catalítica 20S.**

Descripción de las subunidades y sus funciones. En la parte de la tapa del complejo 19S, en verde, se destaca Rpn11 con actividad desubiquitinasa. En la base del complejo 19S, Rpn1, Rpn13 y Rpn10 se unen a la ubiquitina. Los anillos  $\alpha$  del parte 20S tiene función estructural y forman un canal a modo de puerta para la entrada de los sustratos. Los anillos  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 5 tienen actividad cataítica, y el resto tiene función estructural. En rojo, la subunidad  $\beta$ 4, objeto del presente trabajo. Modificada de Tanaka K. (2009).<sup>127</sup>

### 3.3 Mecanismo de acción del proteosoma

El proceso de degradación proteica mediado por el proteosoma principalmente comienza por el reconocimiento de las proteínas ubiquitinadas por la partícula 19S del proteosoma, que son desplegadas y desubiquitinadas para permitir su paso hacia el canal central del 20S donde las subunidades catalíticas las degradan en pequeños péptidos.

Hay 4 pasos en el procesamiento de los sustratos, (**Figura 5**):

1. Reconocimiento del sustrato.
2. Desubiquitinación.
3. Translocación y desplegamiento (ATP dependiente).
4. Degradación proteolítica.

#### 3.3.1 Requerimientos del sustrato para ser degradado por el proteosoma

Aunque los sustratos para ser degradados por el proteosoma son muy variados, de ahí la versatilidad del proteosoma, deben poseer dos características esenciales:

- a) Una señal de marcaje para su degradación, que es la ubiquitinación.<sup>146</sup>
- b) Una región de iniciación no estructurada.<sup>147,148</sup>

a) Una vez que la proteína sustrato sufre el proceso de ubiquitinación puede ser reconocida por el complejo 19S, debido a que hay 3 receptores intrínsecos **Rpn10**, **Rpn13** y **Rpn1**, con motivos que interaccionan con la ubiquitina.

b) Sin embargo, algunas proteínas no requieren unión a ubiquitina para ser degradadas por el proteosoma 20S.<sup>149</sup> El complejo 20S, cuando actúa como complejo libre, no tiene dominios de unión a ubiquitina ni subunidades ATPasas y sus sustratos son proteínas no estructuradas, desplegadas o mal plegadas. En la proteína que se va a degradar, el segmento o polipéptido no estructurado es intrínseco y suele estar protegido o estabilizado por una chaperona.<sup>150</sup> Estas proteínas se llaman IDPs (*Intrinsically Disordered Proteins*).<sup>151,152</sup> Algunos sustratos naturales que tienen afinidad intrínseca por el proteosoma 20S libre y no se ubiquitan son **Rpn10** y **Rad23**.<sup>153</sup> La región no estructurada puede estar en el extremo amino terminal, con una longitud de 30 aminoácidos o en un bucle interno flexible. En levaduras, las proteínas que no contienen la región flexible de iniciación son desplegadas por **Cdc48**, una proteína hexamérica,<sup>147</sup> que las expone al proteosoma.<sup>154,155</sup>

#### 3.3.2 Desubiquitinación

Las enzimas desubiquitinadas (DUBs) son las encargadas de escindir la ubiquitina o cadenas de ubiquitinas de las proteínas ubiquitinadas para ser degradadas. Estas enzimas se catalogan en 2 clases:

- a) Hidrolasas carboxiterminales de ubiquitina, que eliminan la ubiquitina de su fusión con las proteínas a degradar.

- b) Proteasas específicas de ubiquitina, que rompen la unión de las ubiquitinas de las cadenas de ubiquitina, (UBPs, *UBiquitin-specific Proteases*). Estas UBPs pueden salvar a las proteínas de la degradación.

La actividad de las proteínas desubiquitininasas (DUBs) aumenta cuando interaccionan con el proteosoma y viceversa, de manera que las funciones catalíticas, la actividad ATPasa, la apertura de la puerta, y la degradación del sustrato por parte del proteosoma son activadas en presencia de las DUBs.<sup>156</sup> El proteosoma tiene actividad UBP que rompe las cadenas largas de multi-ubiquitina en las proteínas diana. En levaduras hay 19 DUBs, de ahí su presumible importancia en la regulación de la proteólisis. Algunas participan en procesos celulares específicos, ya que una vez que una proteína está marcada por multiubiquitinación, parece tener una vida media corta en la célula y se degrada rápidamente en el proteosoma.

Las DUBs tienen actividad isopeptidasa, como Rpn11, Ubp6 y Uch37.<sup>146</sup> **Rpn11** es esencial para la función del proteosoma 26S y para la viabilidad celular. Está adyacente al receptor de ubiquitina, Rpn10, hidrolizando la unión de la lisina del sustrato y el carboxi-terminal de la primera ubiquitina. **Ubp6** es una proteasa ubiquitin específica (USP), que interacciona con Rpn1 de la base y quita las cadenas supernumerarias de ubiquitina de los sustratos,<sup>157</sup> no es esencial para la viabilidad celular,<sup>158</sup> estimula la actividad ATPasa y la apertura de la puerta similar a la acción de **Uch37**.<sup>159,160</sup> Esta última DUB está asociada a Rpn13 y es capaz de quitar las cadenas distales de ubiquitina de los sustratos,<sup>161</sup> pudiendo ambas influir en el estado conformacional del proteosoma 26S.<sup>162</sup>

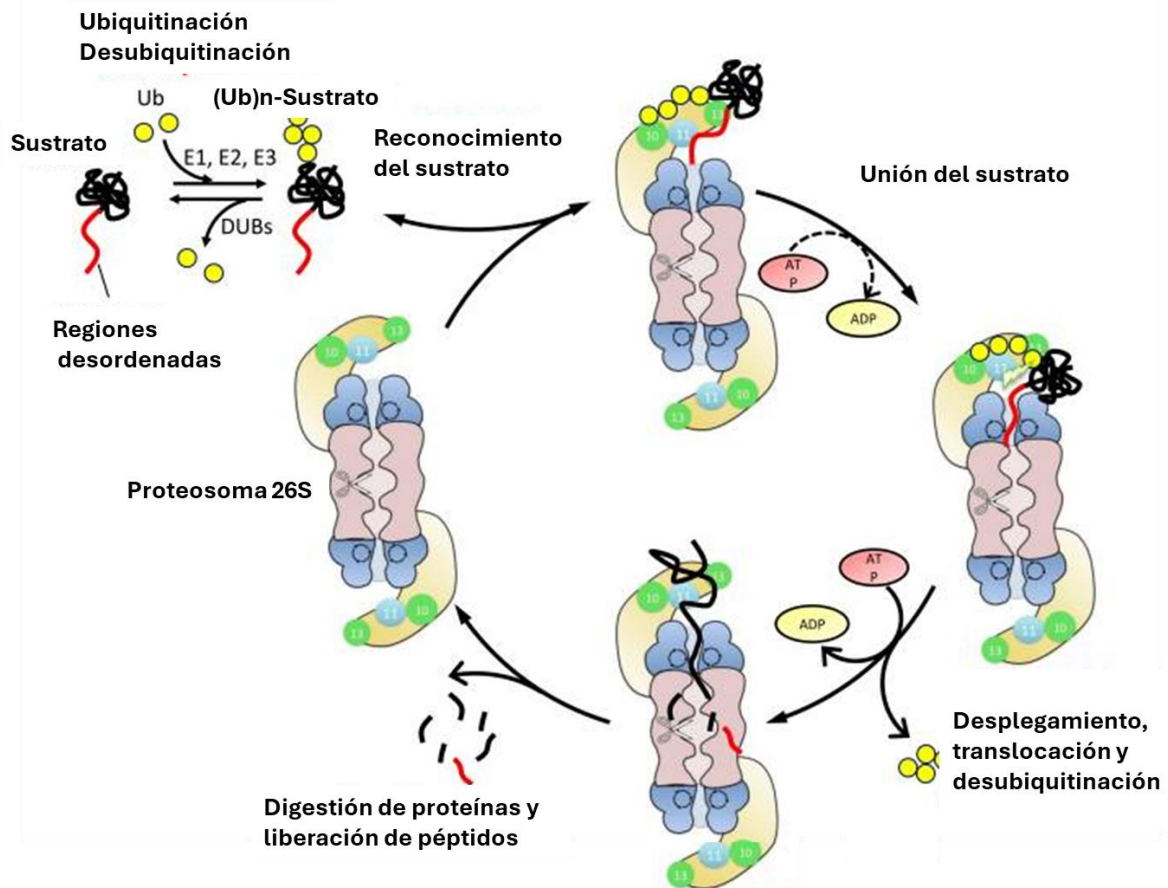
### 3.3.3 Translocación y desplegamiento dependiente de ATP

La estructura del proteosoma 20S libre, es decir, con la partícula 19S ausente, presenta su cámara hidrolítica cerrada a su entorno, ya que este sitio está ocupado por las colas N-terminales cortas y altamente conservadas de las siete subunidades  $\alpha$  del anillo superior. El canal de translocación se encuentra en estados abiertos y cerrados que pueden ser interconvertidos. Cuando la partícula 19S se une al proteosoma 20S, se coloca sobre el canal axialmente y abre la puerta <sup>163</sup>. A pesar de ello, el canal de translocación es, de por sí, muy estrecho lo que garantiza que, incluso en su estado abierto, las proteínas celulares correctamente plegadas no puedan entrar en él. Para atravesar el canal, los sustratos normalmente deben ser desplegados por las seis ATPasas que se encuentran en la base de la partícula 19S (el anillo Rpt) y son impulsados mecánicamente para su translocación al canal, dependiente de ATP.<sup>164,165</sup>

### 3.3.4 Degradación

Después de que el sustrato entre en la cámara central del 20S, el polipéptido es digerido por sus seis subunidades  $\beta$  con sitios proteolíticos en la cara interna de los anillos beta. La proteólisis de los sustratos genera péptidos de una longitud de 3 a 23 aa. Esta proteólisis es diferente si ocurre en el proteosoma 20S o en el 26S, respecto al tipo, abundancia y tamaño de los péptidos.<sup>166</sup> El

20S genera péptidos que suelen ser menores de 8 residuos.<sup>124</sup> Los péptidos liberados por el proteosoma sólo existen en la célula durante segundos, ya que son convertidos rápidamente en aminoácidos por las abundantes endopeptidasas y aminopeptidasas citosólicas. Los aminoácidos pueden reutilizarse para sintetizar nuevas proteínas o metabolizarse, produciendo energía.<sup>167</sup>



**Figura 5. Mecanismo de acción del proteosoma 26S.**

Esquema de los 4 pasos del proceso de degradación de proteínas por el proteosoma 26S. 1) Reconocimiento del sustrato; 2) Desubiquitinación; 3) Translocación y desplegamiento (ATP dependiente); y 4) Degradación y liberación de péptidos. Modificada de Inobe,T (2014).<sup>168</sup>

### 3.4 Ruta de la ubiquitinación de la proteólisis intracelular

Las proteínas intracelulares se marcan para la degradación mediante la unión covalente de cadenas de ubiquitina en un proceso denominado **ubiquitinación**. Muchas proteínas se fosforilan antes de la ubiquitinación, por lo que su regulación está mediada además de por la ubiquitinación, por la actividad de las quinasas y cascadas de señalización.<sup>169</sup> Muchas proteínas ubiquitinadas se degradan en el proteosoma localizado en el núcleo y en el citosol, como son las ciclinas y factores de transcripción.<sup>170</sup> Otras, como polipéptidos anormales o dañados, incluso los del retículo endoplásmico que se traslocan fuera, son ubiquitinados y degradados por el proteosoma en el medio extracelular.<sup>171</sup>

La ubiquitina solo se encuentra en eucariotas. Tiene forma compacta, globular, es de pequeño tamaño (76 aminoácidos) y debe su nombre a su amplia distribución en la célula. Se une mediante un enlace isopeptídico, entre el grupo carboxilo de la glicina 76 de la ubiquitina y el grupo  $\epsilon$ -amino de la cadena lateral de una lisina de la proteína a degradar o bien de otra ubiquitina.<sup>172</sup> La ubiquitina tiene siete residuos de lisina, y en la Lys 48 se forman cadenas de ubiquitinas de al menos 4 unidades.

Hay un grupo de proteínas como ubiquitinas, SUMO (*Small Ubiquitin-like MOdifier*). La sumoilación de las proteínas puede prevenir su degradación por evitar la ubiquitinación.<sup>173, 174</sup>

La ubiquitinación es una modificación post-traducciona y un proceso secuencial que consiste en diferentes pasos donde intervienen 3 enzimas E1, E2 y E3. (**Figura 6**).<sup>175</sup> El primer paso es el único dependiente de ATP.<sup>176</sup>

### 1. Activación de la ubiquitina.

La enzima activadora de ubiquitina (E1) produce la formación de ubiquitin-adenilato y forma una unión tiol-éster entre el grupo carboxilo de la glicina C- terminal de la ubiquitina y una cisteína de la enzima E1, con liberación de AMP. **Uba1** es la única enzima E1 en levaduras.

### 2. Conjugación de la ubiquitina.

A continuación, se produce la transferencia de la ubiquitina desde E1 a una enzima conjugadora (E2), también formando un tiol-éster con una cisteína de esta enzima. Existen diversas enzimas E2s y en el caso de las levaduras se trata de las UBCs (UBiquitin Conjugating) que constituyen una familia de 11 proteínas de conjugación de ubiquitina o transportadoras de ubiquitina, Ubc1 a 8, Ubc10, Ubc11 y Ubc13.

### 3. Unión a la proteína.

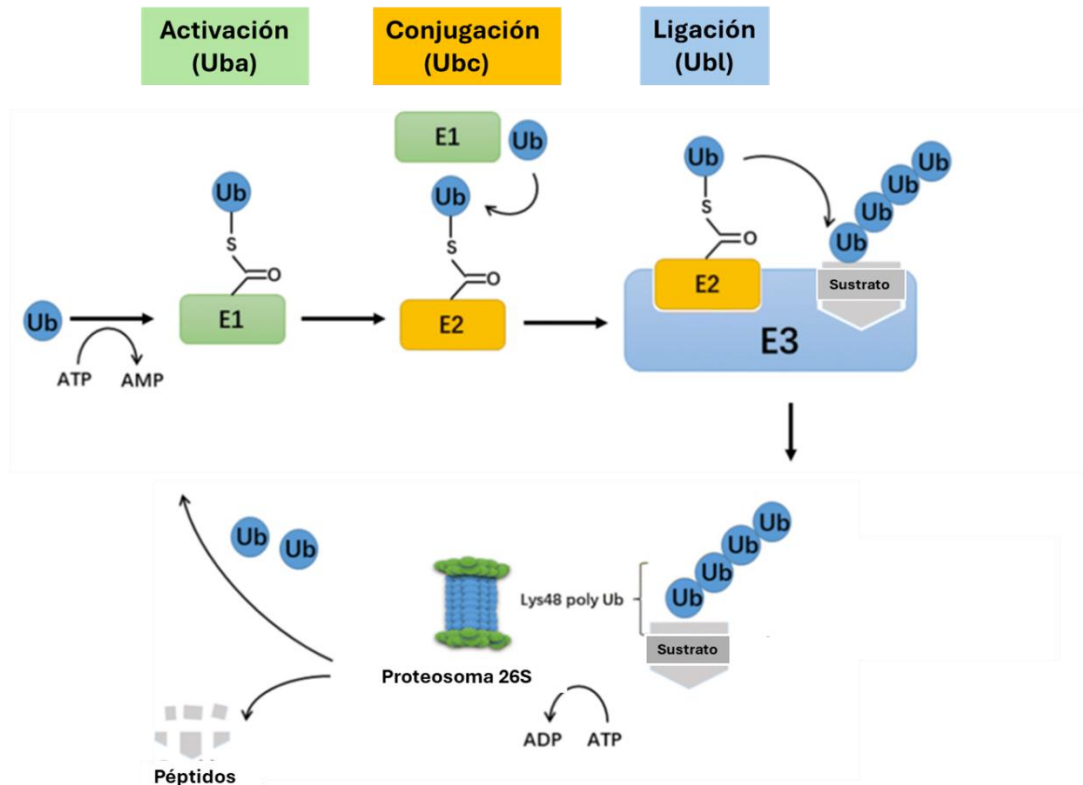
Se transfiere la ubiquitina activada desde E2 a la proteína diana formando una unión isopeptídica entre el extremo carboxi-terminal de la ubiquitina y un grupo épsilon amino de un residuo de lisina de la proteína diana a marcar. Esta transferencia es mediada por las E3s o proteínas ligasas de ubiquitina. Estas ligasas reconocen la proteína diana y a las proteínas E2 cargadas con ubiquitina y forman un complejo para ubiquitinar a los sustratos. En este momento, la ubiquitina se puede unir a la proteína diana o a residuos de lisina de una ubiquitina unida anteriormente, formándose así cadenas de ubiquitinas (multiubiquitinación). En este proceso de multiubiquitinación se ha descubierto la participación de otra enzima, E4, que actúa como factor de ensamblaje de las cadenas de ubiquitina.<sup>177</sup>

La multiubiquitinación está intensamente relacionada con la degradación de proteínas por el proteosoma, mientras que la monoubiquitinación<sup>178</sup> se postula como un proceso de regulación para la degradación vía endocitosis.<sup>179</sup>

Parece ser que la especificidad de la maquinaria de degradación depende de las ligasas E3.<sup>171, 180</sup>

En eucariotas, las N-recoginas (como Ubr1) son E3 Ub-ligasas que se unen a N-degrones (aminoácidos amino terminales desestabilizadores) específicos, formando un complejo con su

enzima E2 conjugadora, marcando así con ubiquitina estas proteínas para su degradación por el proteosoma 26S.



**Figura 6. Ruta de ubiquitinación.**

La ubiquitina se transfiere primero a E1, de forma dependiente de ATP, y posteriormente la ubiquitina activada se transfiere a E2. Finalmente, la ubiquitina se une covalentemente a la proteína diana mediante la ubiquitina ligasa E3, lo que da lugar a la formación de una cadena de poliubiquitina. La proteína K48 poliubiquitinada es reconocida por el proteosoma 26S y se degrada en moléculas peptídicas. Modificada de Gong et al.,(2020).<sup>175</sup>

### 3.5 Ruta de la regla del amino terminal

La proteólisis es un proceso regulado cuya selectividad depende del reconocimiento de señales específicas de degradación presentes en las proteínas diana, denominadas **degrones**.<sup>181</sup> La ruta de la regla del extremo amino terminal relaciona la vida media de una proteína, es decir, su estabilidad, con la identidad del aminoácido ubicado en la posición amino terminal.<sup>182</sup>

Existen residuos que pueden ser modificados o eliminados (Pro-N-degrones) para generar un aminoácido desestabilizante en el extremo amino terminal, conocido como N-degrón.<sup>183,184,185</sup>

Estas modificaciones incluyen oxidación, arginilación, deamidación y acetilación (**Figura 7**).

Hay diferentes tipos de N degrones y de modificaciones de los Pro-N degrones.<sup>186</sup>

- **Residuo Ndp:** un residuo **N**-terminal **d**esestabilizador **p**rimario (p), es decir, un residuo N-terminal no modificado que es reconocido directamente por una N-recognina, que es una enzima E3, ubiquitin-ligasa que reconoce esa proteína para ser degradada. (Arg, Lys, His; Phe, Trp, Tyr, Leu, Ile y Met)

- Residuo **Nds**: un residuo **N**-terminal **d**esestabilizador **s**ecundario (s), es decir, un residuo cuya actividad desestabilizadora requiere una modificación específica previa, como, por ejemplo, la arginilación N-terminal (Nt-arginilación) (Asp y Glu).
- Residuo **Ndt**: residuo **N**-terminal **d**esestabilizador **t**erciario (t), es decir, un residuo cuya actividad desestabilizadora requiere dos modificaciones sucesivas (Asn y Gln).

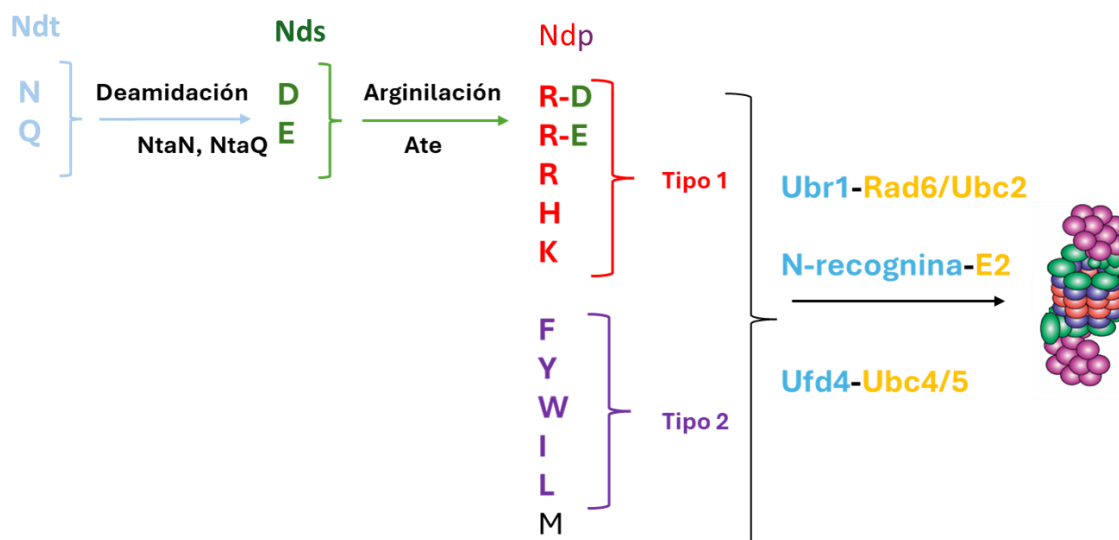
En levaduras hay diferentes rutas de la regla del amino terminal, según la identidad del aminoácido para convertirlo en N-degrón:

- a) Ruta de la arginilación del amino-terminal: la arginilación de sustratos proteicos cuyos residuos N-terminales son voluminosos hidrofóbicos y básicos.
- b) Ruta de la acetilación del amino-terminal: implica la acetilación de proteínas nativas cuyos N-terminales llevan metionina o pequeños residuos no cargados: Ala, Val, Ser, Thr, Gly y Cys. Estos residuos se convierten en N-degrones tras la eliminación de la metionina por acción de las aminopeptidasas de metionina<sup>187</sup> y posterior acetilación (**Figura 7**).

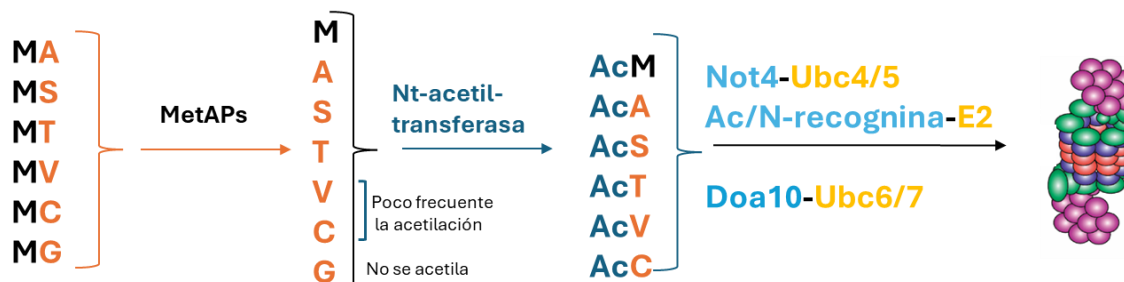
En eucariotas, la ruta de la regla N-terminal forma parte del sistema dependiente de proteosoma UPS, mediante la conjugación de ubiquitina. Los componentes responsables del reconocimiento de esta vía se denominan N-recogninas<sup>182</sup> que, en eucariotas, son E3 Ub-ligasas que se unen a N-degrones específicos para su degradación por el proteosoma 26S.

Los residuos desestabilizadores primarios cargados positivamente (Arg, Lys e His; tipo 1) e hidrofóbicos voluminosos (Phe, Trp, Tyr, Leu e Ile; tipo 2)<sup>188,189,190</sup> son reconocidos y unidos directamente por la N-recognina **Ubr1**, una E3 ligasa de 225 kDa. Tras el reconocimiento del sustrato, Ubr1 media la poliubiquitinación del sustrato formando parte de un complejo con la enzima conjugadora Rad6/Ubc2 E2, lo que marca el sustrato para su degradación proteosomal.<sup>186</sup> Doa10, una E3 ligasa, junto con las enzimas Ubc6 o Ubc7 (E2), funciona como un nuevo tipo de N-recognina que media en la poliubiquitinación de N-degrones acetilados (AcN-degrones). La N-recognina Gid4<sup>191</sup> reconoce los residuo de prolina en el extremo amino terminal o en segunda posición.<sup>192,193,194</sup> Esta regla del amino terminal (**Figura 7. Rutas del sistema del amino-terminal**, está muy conservada en eucariotas.<sup>195,196,183</sup>

## A. Ruta de Arginilación-amino-terminal



## B. Ruta de Acetilación-amino-terminal



**Figura 7. Rutas del sistema del amino-terminal.**

**A. La ruta Arg-N-terminal** reconoce sustratos proteicos a través de sus residuos N-terminales (Nt) no acetilados. Las proteínas se sintetizan con Nt-Met, pero las metioninas-peptidasas pueden exponer nuevos residuos Nt. Determinados residuos Nt actúan como residuos primarios (residuos básicos de tipo 1, en rojo, y residuos hidrofóbicos de tipo 2, en morado) y son ubiquitinados por unión a Arg/N-recogninas (Ubr1 o Ufd4) y a una enzima conjugadora de ubiquitina (Rad6 o Ubc4 o Ubc5) antes de su degradación por el proteosoma 26S. El Asn (N) y el Gln (Q) son residuos terciarios de la vía de la regla Arg/N-terminal que primero deben ser deamidados a Asp y Glu por Nt-amidasas específicas de Asn o Gln (NtaN/NtaQ). Alternativamente, se pueden exponer los residuos secundarios Asp (D) o Glu (E), que luego son arginilados por arginil-ARNt-transferasas para producir Arg/N-degrones primarios.

**B. La ruta de Acetilación/N-terminal** reconoce residuos Nt específicos que han sido acetilados (Ac) por Nt acetiltransferasas (NATs). Los residuos Nt que pueden ser acetilados antes de ser reconocidos por las Ac/N-recogninas se muestran en naranja. La metionina acetilada es objeto de degradación por la regla Ac/N-terminal cuando va seguido de un residuo hidrofóbico voluminoso (F), por lo que el Nt-Met-F puede ser degradado selectivamente tanto por la vía Arg/ como por la vía Ac/N-terminal dependiendo de su estado de acetilación (su capacidad para ser regulado por ambas vías se indica en amarillo). Se utilizan códigos de aa de una sola letra para representar los residuos de Nt.

#### 4. Proteómica cuantitativa: visión global e integrada de los procesos biológicos

El término “proteoma” fue utilizado por primera vez en 1995 por Mark Wilkins,<sup>197</sup> para describir el conjunto de PROTEÍNAS expresadas por un genOMA, una célula o un tejido, en un momento determinado y bajo unas condiciones específicas. La proteómica es una disciplina central en la biología molecular y celular, que permite obtener una visión global e integrada de los procesos celulares y estudiar a gran escala la expresión diferencial de varios genomas en determinadas condiciones. Dado que las proteínas son los principales efectores de las funciones celulares, la caracterización precisa y cuantitativa de los proteomas es fundamental para comprender procesos biológicos complejos, identificar biomarcadores de pronóstico, diagnóstico y terapéuticos. El análisis proteómico conduce a la identificación de la composición proteica de un sistema biológico. El catálogo de las proteínas presentes en un sistema constituye una información valiosa que, sin embargo, para tener una información detallada de nuestro sistema biológico de estudio no es suficiente saber qué proteínas lo componen sino la abundancia de cada una de ellas, mediante la metodología de proteómica cuantitativa, así como las modificaciones post-traduccionales.

Uno de los pilares fundamentales de la proteómica es la espectrometría de masas, técnica que consiste en medir la relación masa/carga de los péptidos previamente ionizados y su intensidad relativa (MS), para después fragmentar estos iones peptídicos aislados (precursores) y obtener espectros de fragmentación (MS/MS) que proporcionan información de la secuencia de aminoácidos o estructura primaria del péptido analizado.

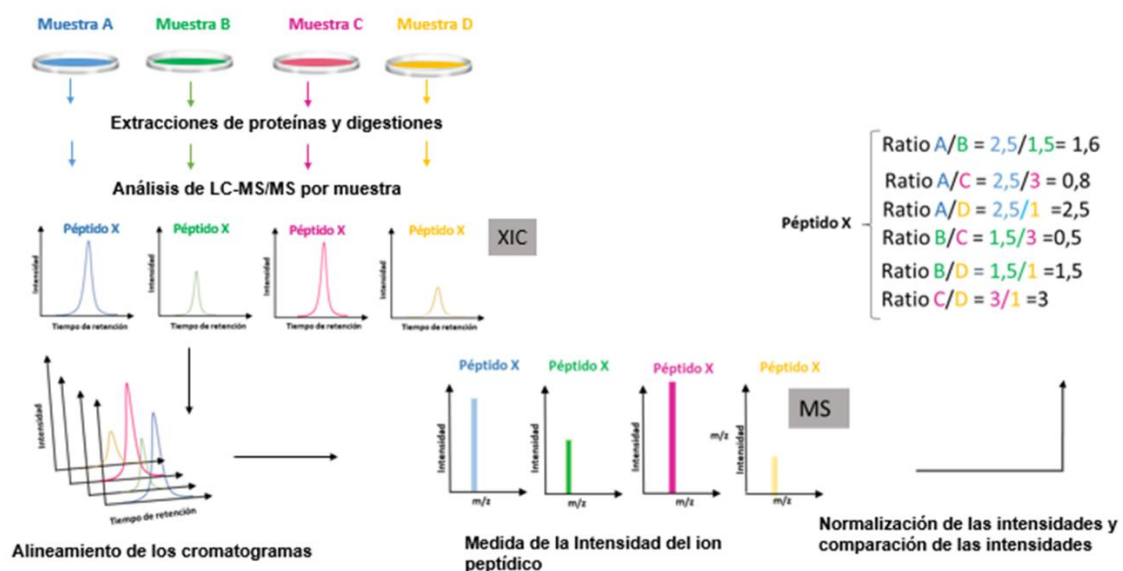
La espectrometría de masas no es, por naturaleza, una técnica cuantitativa. Por este motivo, se han desarrollado múltiples estrategias para obtener datos cuantitativos a partir de análisis proteómicos. En general, se puede distinguir entre dos tipos de cuantificación según el objetivo del estudio. Por un lado, la **cuantificación relativa** (inter-muestras) permite comparar los niveles de una misma proteína entre diferentes muestras o condiciones experimentales, arrojando información sobre posibles aumentos o disminuciones en su abundancia, por ejemplo, entre una cepa mutante y la silvestre. Por otro lado, la **cuantificación absoluta** (intra-muestra) se centra en determinar la cantidad o concentración de una proteína específica dentro de una muestra concreta, proporcionando información sobre su abundancia en el contexto del total de proteínas presentes en la muestra.

Desde el punto de vista metodológico, las estrategias de cuantificación se dividen en dos grandes grupos: aquellas que emplean algún tipo de marcaje isotópico y aquellas que prescinden de él (*label-free*). Las técnicas con marcaje se basan en la incorporación de isótopos estables, que generan una diferencia de masa detectable entre péptidos o proteínas de distintas muestras, pero sin alterar su comportamiento químico. Este marcaje puede realizarse *in vivo*, como el marcaje metabólico por incorporación de aminoácidos marcados con isótopos pesados (<sup>15</sup>N y <sup>13</sup>C) durante el crecimiento celular del método SILAC (*Stable Isotope Labelling Aminoacids Cell*

*culture*). También puede realizarse *in vitro*, después de la digestión proteica, como ocurre con iTRAQ™ (*Isotope Tag Relative and Absolute Quantitation*) o TMT™ (*Tandem Mass Tags*), que se marcan directamente los péptidos.<sup>197,198</sup>

Una ventaja importante de los métodos con marcaje es la posibilidad de analizar simultáneamente varias muestras dentro de una misma carrera de espectrometría de masas. Esto se conoce como multiplexado. Por ejemplo, SILAC puede analizar hasta tres condiciones en paralelo, mientras que técnicas como TMT pueden llegar a analizar múltiples muestras (incluso 32) en un solo análisis.

En cuanto a la etapa del análisis en la que se realiza la cuantificación, algunas técnicas como SILAC o los enfoques *label-free* se basan en la intensidad de los iones peptídicos precursores (MS). En cambio, en métodos como iTRAQ o TMT, la cuantificación se realiza en el nivel de fragmentación (MS/MS), aprovechando la liberación de reporteros isotópicos específicos.



**Figura 8. Estrategia de cuantificación proteómica sin marcaje (*label-free*).**

Cada muestra del estudio se digiere con tripsina y se analiza por nano-cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en *tándem* de manera independiente. Los cromatogramas correspondientes se tienen que alinear, para comparar las mismas señales, y se mide la intensidad de los iones peptídicos en el espectro MS. Se normalizan las intensidades respecto al total de los péptidos de la muestra y se calculan las ratios de las intensidades para cada péptido.

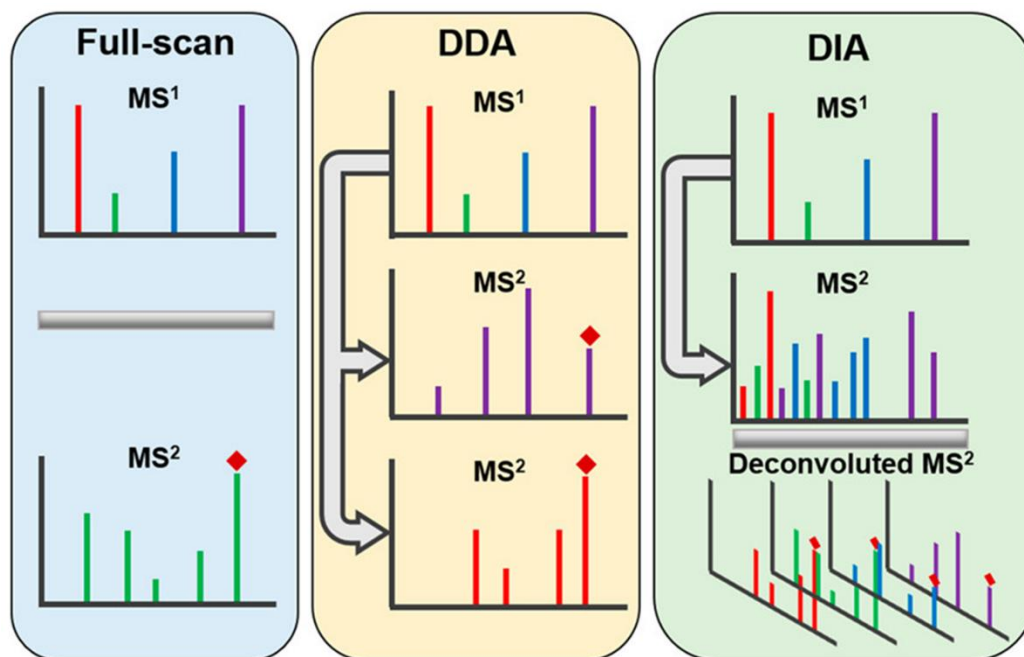
La proteómica cuantitativa *label-free* (LFQ, Label Free Quantification) destaca por su flexibilidad y la capacidad para analizar muestras biológicas sin la necesidad de marcadores isotópicos o etiquetas químicas, facilitando estudios comparativos a gran escala con una alta resolución cuantitativa y una amplia cobertura proteica.<sup>199</sup> **(Figura 8). Estrategia de cuantificación proteómica sin marcaje (*label-free*).**

Cada muestra del estudio se digiere con tripsina y se analiza por nano-cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en *tándem* de manera independiente. Los cromatogramas correspondientes se tienen que alinear, para comparar las mismas señales, y se mide la intensidad de los iones peptídicos en

el espectro MS. Se normalizan las intensidades respecto al total de los péptidos de la muestra y se calculan los ratios de las intensidades para cada péptido. Esta metodología se basa en la medición de las intensidades de iones peptídicos obtenidas mediante espectrometría de masas (MS), lo que permite comparar la abundancia relativa de proteínas entre distintas condiciones o tratamientos experimentales. Esto exige, en primer lugar, una correcta alineación de los cromatogramas y una normalización precisa del tiempo de retención y del  $m/z$ . Debido a la mayor variabilidad inherente a este tipo de análisis, se recomienda utilizar réplicas biológicas para poder aplicar análisis estadísticos robustos. Una ventaja destacada del enfoque *label-free* es que no hay un límite en el número de muestras a comparar, lo que lo hace especialmente útil en estudios con muchos grupos experimentales.<sup>200</sup>

La cuantificación *label-free* ha evolucionado gracias a los avances en la instrumentación de espectrometría de masas y en el desarrollo de software bioinformático, mejorando la reproducibilidad y sensibilidad del análisis proteómico.<sup>201</sup>

En la espectrometría de masas, la adquisición de datos es un paso crítico que determina la calidad y profundidad del análisis proteómico. Dos de las estrategias más empleadas para la adquisición de datos son la adquisición dependiente de datos o DDA (*Data-Dependent Acquisition*) y la adquisición independiente de datos o DIA (*Data-Independent Acquisition*) (Figura 9).



**Figura 9. Métodos de adquisición de datos en espectrometría de masas.**

Los tres métodos más comunes de adquisición de datos son: *Full-scan*, DDA y DIA. En el *Full-scan*, se adquieren los datos en  $MS$  de todos los iones que eluyen en un tiempo determinado y se selecciona uno de ellos para fragmentar y tener su  $MS/MS$  o  $MS^2$ . En DDA, a partir del  $MS$  se selecciona un número determinado de iones para fragmentar y se generan varios  $MS/MS$ . En DIA, se hace un barrido del  $MS$ , pero se seleccionan todos los iones detectados, por ventanas de masa, para fragmentar, y así en el mismo espectro  $MS/MS$  hay iones fragmentos de todos los precursores que se han fragmentado en esa ventana. (Figura de Guo et al. 2020).<sup>202</sup>

**Adquisición dependiente de datos (DDA):** Esta técnica selecciona de manera dinámica los iones peptídicos más abundantes en un espectro MS para su fragmentación y análisis MS/MS. El objetivo es la identificación precisa de péptidos, aunque presenta limitaciones en términos de reproducibilidad y cobertura de proteomas complejos por su naturaleza estocástica, que puede generar sesgos hacia los péptidos más abundantes.<sup>203</sup>

**Adquisición independiente de datos (DIA):** DIA, a diferencia del anterior, fragmenta sistemáticamente todos los iones dentro de rangos de masas predefinidos, garantizando una adquisición completa y reproducible de la información de todos los péptidos presentes.<sup>204</sup> Esto aumenta la profundidad de cobertura y la consistencia entre muestras, facilitando un análisis cuantitativo más robusto y sensible, especialmente en muestras complejas o con abundancias proteicas muy variables, es decir con un rango dinámico muy amplio.<sup>205,202</sup>

La incorporación a la espectrometría de una trampa de movilidad iónica o tims (*tims, Trapped Ion Mobility Spectrometry*) ha supuesto una revolución tecnológica en la proteómica.<sup>206</sup> El equipo tims-TOF<sup>207</sup> (*TOF, Time Of Flight*) integra la movilidad iónica con espectrometría de tiempo de vuelo (*TOF*), añadiendo una dimensión extra de separación basada en la movilidad diferencial de los iones en un campo eléctrico.<sup>208</sup>

Esta separación adicional mejora la resolución y la selectividad en la detección de péptidos, incrementando la sensibilidad y reduciendo el ruido de fondo. Además, el equipo *timsTOF* facilita una alta tasa de adquisición de espectros MS/MS con elevada resolución temporal, optimizando tanto las estrategias DDA como DIA para obtener un análisis proteómico más profundo, rápido y reproducible.<sup>206</sup>

Tanto DDA como DIA constituyen pilares fundamentales en la proteómica cuantitativa *label-free*, y la elección entre uno u otro depende de múltiples factores, incluyendo la complejidad de la muestra, los objetivos experimentales y los recursos analíticos disponibles. El enfoque DDA destaca por su simplicidad experimental y facilidad de análisis, siendo especialmente útil en estudios exploratorios o con muestras menos complejas. Sin embargo, tiende a presentar mayor variabilidad y pérdida de información en proteínas de baja abundancia.<sup>209</sup> El enfoque DIA, por su parte, ofrece ventajas significativas en términos de profundidad de cobertura y reproducibilidad, siendo particularmente adecuado para estudios comparativos a gran escala. Su principal desventaja radica en la necesidad de herramientas computacionales avanzadas y en el esfuerzo analítico que requiere la deconvolución de los datos y la necesidad de tener una librería de espectros del proteoma analizado, bien sea creada experimentalmente o *in silico* a partir de bases de datos de proteínas.

## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

---



Cuando se inició este trabajo en 1996, nuestro Departamento estaba interesado en el estudio de la pared celular como posible diana de nuevos antifúngicos y se disponía de un mutante de *Candida albicans* defectuoso en la biogénesis de la pared celular y auxótrofo de histidina, denominado CA9.<sup>210</sup> El rastreo de una genoteca de *C. albicans* utilizando esta cepa como huésped condujo a la clonación por complementación del marcador genético *HIS1* de *C. albicans*, responsable de esta auxotrofia, que codifica una ATP fosforibosil transferasa implicada en el primer paso de la ruta de biosíntesis de histidina en levaduras. El análisis de la región 3' de este gen reveló la existencia de otros marcos abiertos de lectura, como el gen *PRE1*, cuyo estudio ha sido el punto de partida de este trabajo. Tras la clonación del gen *PRE1* por *serendipia* se propusieron los siguientes objetivos para este trabajo:

1. Clonación del gen *CaPRE1* de *C. albicans* y análisis funcional en *S. cerevisiae*.
2. Estudio de la esencialidad del gen *CaPRE1* de *C. albicans*. Construcción de mutantes condicionales para el estudio de su función.
3. Identificación de sustratos de degradación vía proteosoma en *C. albicans* mediante una aproximación de proteómica cuantitativa.
4. Análisis de los procesos biológicos, rutas metabólicas y funciones principales en las que está implicado el gen *CaPRE1*, mediante análisis bioinformático y caracterización fenotípica de un mutante condicional viable.
5. Desarrollo de un ensayo competitivo positivo para la búsqueda de nuevos antifúngicos cuya diana sea el gen *CaPRE1* mediante la construcción de una cepa de *S. cerevisiae* humanizada y *candidizada*.
6. Desarrollo de un sistema de búsqueda de nuevos antifúngicos basado en la degradación de proteínas mediante la construcción de diferentes sustratos de proteólisis. Estudio de la estabilidad de una proteína de *C. albicans* en la levadura modelo *S. cerevisiae* siguiendo la regla del extremo amino-terminal.
7. Estudio *in silico* del amino-terminoma y los N-degrones en *C. albicans*.



# MATERIALES Y MÉTODOS





## 1. Microorganismos y medios de cultivo

### 1.1 Microorganismos utilizados

Los microorganismos empleados en este trabajo se detallan en la **Tabla 1**. Las construcciones genéticas obtenidas fueron integradas en el genoma de las distintas cepas de *C. albicans* o expresadas en *S. cerevisiae*, mediante plásmidos centroméricos o episómicos obtenidos y amplificados en la cepa DH5αF' de *Escherichia coli*.

**Tabla 1. Microorganismos utilizados en este trabajo.**

Micro-organismo	Nombre de la cepa	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i>	Dh5αF'	F <sup>-</sup> <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20</i> φ80 <i>dlacZΔM15 Δ (lacZYA- argF)</i> U169, <i>hsdR17(rK<sup>-</sup>mK<sup>+</sup>), λ<sup>-</sup></i>	211i
<i>C. albicans</i>	SC5314	Aislamiento clínico	212
<i>C. albicans</i>	CAI4	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	213
<i>C. albicans</i>	CAF2	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434-URA3</i>	213
<i>C. albicans</i>	CNC1	[CAI4]; <i>Capre1Δ::hisG-CaURA3-hisG/CaPRE1</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CNC2	[CNC1]; <i>Capre1Δ::hisG/CaPRE1</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	RM2	[CAI4]; <i>Cahis1Capre1Δ::hisG-CaURA3-hisG/CaHIS1 CaPRE1</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	RM20	[RM2]; <i>Cahis1Capre1Δ::hisG/CaHIS1CaPRE1</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	RM200	[RM20]; <i>Cahis1Capre1Δ::hisG /Cahis1Δ:: hisG-CaURA3-hisG, CaPRE1</i>	Este trabajo <sup>ii</sup>
<i>C. albicans</i>	ML2000	[RM200]; <i>Cahis1Capre1Δ::hisG/ Cahis1Δ::hisG CaPRE1</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	HS10	[CNC2]; <i>Capre1Δ::hisG/PCK<sup>PR</sup>-CaPRE1-CaURA3</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	HS20	[ML2000]; <i>PCK<sup>PR</sup>-CaPRE1</i>	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i>	WCG4a	<i>MATa ura3 leu2-3,112 his3-11,15</i>	214
<i>S. cerevisiae</i>	WCG11a	<i>MATa ura3 leu2-3,112 his3-11,15 pre1-1</i>	214
<i>S. cerevisiae</i>	WCG4Δ1a/α	<i>MAT a/α his3/his3 ura3/ura3 leu2/leu2 pre1Δ::URA3/PRE1</i>	214
<i>S. cerevisiae</i>	CEN-PK2	<i>MATa/α ura3Δ52/ ura3Δ52/ura3Δ52 leu2-3,112/leu2-3,112 his3Δ1/his3Δ1 trp1-289/trp1-289</i>	EUROFAN
<i>S. cerevisiae</i>	YN11	[WCG4Δ1a]; <i>[CaPRE1] LEU2</i>	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i>	YN13	[WCG4Δ1a]; <i>[HsC7-I] LEU2</i>	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i>	YFN60	[CENPK2]; <i>pre1::HIS3 [TET:CaPRE1 URA3]</i>	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i>	YFN639	[CENPK2]; <i>PRE1 [TET:CaPRE1 URA3]</i>	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i>	YFN60LG	[YFN60]; <i>LEU2-ACT<sup>PR</sup>- yEGFP</i>	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i>	YFM140	[CENPK2]; <i>pre1::HIS3 [TET: HsC7-I URA3]</i>	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i>	YFM140L	[YFM140]; <i>LEU2-ACT<sup>PR</sup></i>	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i>	CEN2	<i>MAT a, trp1-Δ63 ura3-52 his3-Δ200 leu2-3, 112 lys2-801</i>	215
<i>S. cerevisiae</i>	JD55	[CEN2]; <i>ubr1Δ::HIS3</i>	215
<i>C. albicans</i>	CAI4-pNRUe	[CAI4]; <i>CaADH1/Caadh1::tTA-TET<sup>PR</sup>-myc-CaURA3</i>	216
<i>C. albicans</i>	ASR1	[CAI4]; <i>CaADH1/Caadh1::tTA-TET<sup>PR</sup>-CaPRE1-myc-URA3</i>	TFG-Alejandro Sanz
<i>C. albicans</i>	ML1113	[ASR1]; <i>Capre1::SAT1/Capre1::HygB</i>	Este trabajo

## 1.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivos para el crecimiento tanto de levaduras como de bacterias se detallan en la **Tabla 2**. Para su preparación, los componentes se disuelven en agua destilada (sistema de purificación Millipore, Merck) y se esterilizan en autoclave (20 minutos a 121 °C) o mediante filtración (filtros de 0.22 µm), cuando alguno de los componentes es termosensible. Los medios sólidos se han obtenido mediante la adición de un 2 % (p/v) de agar-agar.

**Tabla 2. Medios de cultivo usados en este estudio.**

Medio	Composición	Utilidad	Referencia
YPD	2 % Glucosa; 2 % Peptona 1 % Extracto de levadura	Medio rico usado para el crecimiento de levaduras.	217
LB	1 % Triptona 0,5 % Extracto de levadura 0,5 % NaCl	Medio rico usado para el crecimiento de bacterias. Se añade ampicilina (100 µg/mL) o cloranfenicol (20 µg/mL) para la selección de transformantes que contienen un plásmido con el gen de resistencia correspondiente.	211
SD o MM	2 % Glucosa 0,17 % Base nitrogenada de levadura (YNB) 0,5 % Sulfato de amonio SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Medio mínimo usado para el crecimiento de levaduras. Se puede suplementar con los aminoácidos necesarios para el crecimiento de las cepas auxótrofas.	217
MMS	2 % succinato o 2% sacarosa se reemplazan por el 2% de glucosa en el medio MM	Medio mínimo usado para el crecimiento de levaduras bajo el control del promotor del gen <i>CaPKC1</i>	217
YNBS	2 % succinato o 2% sacarosa se reemplazan por el 2% de glucosa en el medio YNB	Medio rico usado para el crecimiento en forma de hifas suplementado con GlcNac.	217

## 2. Condiciones y métodos para ensayos fenotípicos y bioquímicos

### 2.1 Ensayos de crecimiento microbiano

Para los ensayos de crecimiento microbiano en medio líquido, se tomaban las lecturas de las densidades ópticas (D.O.) de los cultivos a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640 a lo largo del tiempo. Las lecturas de las absorbancias de las placas multipocillo se realizaron a 600 nm en un lector de microplacas Bio-Rad 680.

Para los estudios de crecimiento microbiano en medio sólido, se realizaron ensayos en dilución en gota a partir de suspensiones celulares ajustadas a D.O.=0,8 (2 x10<sup>7</sup> células/mL) preparadas a partir de cultivos en fase logarítmica tras 16 horas de crecimiento. Posteriormente, se depositaban 5 µl

de diluciones decimales seriadas, correspondientes a  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  y  $10^2$  células sobre los distintos medios de estudio.

## 2.2 Estudios de cinéticas de viabilidad

El análisis de la viabilidad en cinética de crecimiento se llevó a cabo a partir de células en fase logarítmica de crecimiento y se analizaba la viabilidad celular de la población mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFCs). Los cultivos de las cepas se crecían en fase logarítmica en medio líquido y eran transferidos a las condiciones restrictivas, según el ensayo. Se sembraban 10  $\mu$ L sobre placas de agar de las distintas muestras a los tiempos indicados y a las diluciones adecuadas para su recuento tras 24-48 horas de incubación a 37 °C. El porcentaje de viabilidad se calcula considerando como el 100% el número de UFCs antes del cambio de condiciones de crecimiento del cultivo.

## 2.3 Estudios de filamentación en medio líquido

La inducción de la filamentación se llevó a cabo a partir de cultivos O/N, los cuales fueron diluidos a una D.O.=0,025 en 2 mL de YNBS suplementado o no con el medio inductor de la filamentación, que se compone de N-Acetil glucosamina (10g/L) al 10 % en un medio YNBS con un 5% de MOPS. Los cultivos se incubaron a 37 °C y 180 r.p.m. y a las 6 horas se tomaron muestras para su observación al microscopio.

## 3. Técnicas de biología molecular

Los métodos y técnicas de Biología Molecular utilizados en el presente trabajo, han sido obtenidos básicamente de los manuales *Methods in yeast genetics*,<sup>217</sup> *Current Protocols in Molecular Biology*,<sup>218</sup> DNA clonning<sup>219</sup> y *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*.<sup>220</sup> Los protocolos utilizados pueden haber sido modificados en alguna ocasión, lo cual se especificará convenientemente.

### 3.1 Plásmidos, oligonucleótidos y genotecas

Los plásmidos y los oligonucleótidos (cebadores) utilizados a lo largo de este trabajo se recogen en la **Tabla 3** y **Tabla 4**, respectivamente.

Asimismo, se utilizó una genoteca con cDNA procedente de células HeLa clonada en la diana *Bst*XI del plásmido pDB20 proporcionada por el Dr. Guarente.<sup>221</sup>

Tabla 3. Lista de plásmidos usados en este estudio

Tabla 3. Lista de plásmidos usados en este estudio. Plásmido	Características	Huésped	Referencia /Origen
pUC19	ori bla lacZ (MCS)	<i>E. coli</i>	Comercial CLONTECH
YEp352	ori 2 $\mu$ bla lacZ (MCS) URA3	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	222
YEp13	ori 2 $\mu$ bla lacZ (MCS) LEU2	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	222
pYEUra3	ori ARS1 CEN4 bla URA3 lacZ (MCS) GAL1 <sup>PR</sup> -GAL10 <sup>PR</sup>	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	Comercial CLONTECH
pRM21	Plásmido que porta el inserto HISX de 5,3 kpb, aislado de la genoteca después de la transformación de la cepa CA9.	<i>E. coli/C. albicans</i>	223
YEpHISX	Plásmido que porta el inserto HISX de 5,3 kpb, aislado de la genoteca subclonado en un vector YEp352	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	223
pUCHISX	Plásmido que porta el inserto HISX de 5,3 kpb, aislado de la genoteca subclonado en un vector pUC19	<i>E. coli</i>	Este trabajo
pCUB6	Construcción <i>hisG</i> -CaURA3- <i>hisG</i> en un vector pUC19	<i>E. coli</i>	213
pCAR1	Plásmido que porta el fragmento <i>SmaI</i> - <i>PstI</i> del inserto HISX aislado de la genoteca subclonado en un vector pUC19	<i>E. coli</i>	224
pCAR2	Proviene del pCAR1, reemplazando todo el gen CaPRE1 (fragmento <i>BglII</i> - <i>Sall</i> ) por la construcción <i>hisG</i> -CaURA3- <i>hisG</i>	<i>E. coli</i>	224
pHP1	Proviene de pUCHISX, subclonando en la diana de restricción <i>BglII</i> , el casete de interrupción <i>hisG</i> -CaURA3- <i>hisG</i> , deleccionando el gen <i>HIS1</i> y parte del CaPRE1	<i>E. coli</i>	Este trabajo
pHP4	Proviene de pUCHISX, subclonando en la diana de restricción <i>EcoRV</i> , el fragmento <i>hisG</i> -CaURA3- <i>hisG</i> , donde solo está deleccionado el gen CaHIS1	<i>E. coli</i>	Este trabajo
pCAO1	<i>PCK1</i> <sup>PR</sup> de <i>C. albicans</i> en un vector pUC19	<i>E. coli</i>	225
pCAO1ub	Proviene de pCAO1 y CaURA3	<i>E. coli</i>	Este trabajo
pPCKPRE1a	Proviene de pCAO1ub subclonando en <i>BglII</i> - <i>StuI</i> el gen CaPRE1 amplificado por PCR	<i>E. coli</i>	Este trabajo
pCAR29	CaURA3- <i>PCK1</i> <sup>PR</sup> -CaPRE1 se subclona en el plásmido pCAR2 en las dianas <i>BglII</i> - <i>Sall</i>	<i>E. coli</i>	Este trabajo
pUCpACT1	<i>ACT1</i> <sup>PR</sup> de <i>S. cerevisiae</i> en un vector pUC19	<i>E. coli</i>	Este trabajo
pUCH7A	<i>HsC7-I</i> amplificado por PCR en un vector pUC19	<i>E. coli</i>	Este trabajo
pUCpACTC7	ScACT <sup>PR</sup> <i>HsC7-I</i> en un vector pUC19i	<i>E. coli</i>	Este trabajo
EpACTi2a	ori 2 $\mu$ LEU2 ScACT1 <sup>PR</sup> - <i>HsC7-I</i>	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	Este trabajo
YEpHISXLEU	ori 2 $\mu$ HISX LEU2	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	Este trabajo
pT7blue	ori 2 $\mu$ abierto con <i>EcoRV</i> y añadidas timinas en 3' de los extremos libres	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	NOVAGEN
pT7CaPre1	CaPre1 amplificado por PCR en pT7blue	<i>E. coli</i>	Este trabajo
pT7ScPre1	ScPre1 amplificado por PCR en pT7blue	<i>E. coli</i>	Este trabajo
P34HsCHIS3	pUC19 con el gen <i>SCHIS3</i>	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	226
pINT3	<i>SCHIS3</i> en el sitio <i>HindIII</i> de pT7ScPRE1	<i>E. coli</i>	Este trabajo

<b>pINT5</b>	<i>PRE1:: SchIS3</i> en vector pUC19	<i>E. coli</i>	Este trabajo
<b>pCM189</b>	Sistema de tetraciclina	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	<sup>227</sup>
<b>TETC7i1</b>	pUCpACTiC7 en <i>BamHI-PstI</i> de PCM189	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	Este trabajo
<b>TETCPRE</b>	pT7CaPRE1 en <i>BamHI-PstI</i> de PCM189	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	Este trabajo
<b>pYGFP3</b>	pUC19 <i>HindIII-PstI</i> en <i>HindIII-PstI</i> de YGFP3	<i>E. coli</i>	<sup>228</sup>
<b>PACTGFP</b>	PUCPACT <i>HindII-PstI</i> en <i>HindIII-PstI</i> de pYGFP3	<i>E. coli</i>	Este trabajo
<b>PAGL1</b>	pACTGFP <i>PstI</i> en <i>PstI</i> de YEp13	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	Este trabajo
<b>PAL2</b>	pUCpACT <i>PstI</i> en <i>PstI</i> de YEp13	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	Este trabajo
<b>pLGSD5-ATG</b>	ori 2 $\mu$ <i>bla GAL<sup>PR</sup> lacZ URA3</i>	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	<sup>221</sup>
<b>pUB23_Leu</b>	ori 2 $\mu$ <i>bla GAL<sup>PR</sup> UBI1-lacZ URA3</i>	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	<sup>221</sup>
<b>LEUTETH1</b>	pCM189 <i>PvuII</i> con fragmento <i>PvuII</i> de YEp13	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	Este trabajo
<b>PLTETURA</b>	LEUTETH1 <i>PstI-HindIII</i> con <i>URA3 PstI HindIII</i>	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	Este trabajo
<b>PTLUBURA</b>	PLTETURA <i>BamHI HindIII</i> con <i>UBI1 BamHI HindIII</i>	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	Este trabajo
<b>pINTLEU</b>	pINT5 <i>HindII</i> en <i>HpaI</i> de PAL2	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	Este trabajo
<b>PINTAGL2</b>	pINT5 <i>HindII</i> en <i>Scal-PvuII</i> de PAGL1	<i>E. coli/S. cerevisiae</i>	Este trabajo

**Tabla 4. Lista de oligonucleótidos usados en este trabajo.**

Cebador	Secuencia ( 5'-3' )	Utilidad
<b>Ohis1</b>	GCTGTA <del>ACT</del> TATTGAGTGGTGCCG'	Comprobación de integración en el <i>locus CaPRE1</i>
<b>Ohg1</b>	GTTCCGCCATCGCAATCAGGC	Comprobación de integración en el <i>locus CaPRE1</i>
<b>Ouracr</b>	GTGTTACGAATCAATGGCACTACAGC	Comprobación de integración en el <i>locus CaPRE1</i>
<b>Oybr7</b>	AACAGTGTCCGAGAAATGTGCCG	Comprobación de integración en el <i>locus CaPRE1</i>
<b>Capreup</b>	AGGATCCGTCGACA <del>AT</del> GGATATTATTTAGG	Amplificación de <i>CaPRE1</i>
<b>Caprelo</b>	TCGCGAATTCAATTTGACTCAATCTGTC	Amplificación de <i>CaPRE1</i>
<b>Scpreup</b>	AAGCTTCTAGAAATGGATATTATCTGGG'	Amplificación de <i>ScPRE1</i>
<b>Scprelo</b>	TCGCGAATTCCTGTGCCTGGAAGTC'	Amplificación de <i>ScPRE1</i>
<b>Upc-7</b>	AGGATCCGTCGACA <del>AT</del> GGAGTACCTCATCGGTATCCAAGG	Amplificación de <i>HsC7-I</i>
<b>Loc-7</b>	GAATTCGCGATTAGGAGCCCTGTTGGGGAAGGAAGGAAATGTTATCC	Amplificación de <i>HsC7-I</i>
<b>Oubiup</b>	GGTATGCAAATCTTTGTTAAA <del>ACT</del> TAACTGGTAAGACAGG	Amplificación de <i>ScUBI1</i>
<b>Oubilow</b>	ACGTTTNNNACCCTCTCAATCCCAA	Amplificación de <i>ScUBI1</i>
<b>Oura3up</b>	AAAGCTTATATGACAGTCAAC	Amplificación de <i>CaURA3</i>
<b>Oura3low</b>	TGTTAGTTTCTCCTGGAAGATCT	Amplificación de <i>CaURA3</i>

### 3.2 Manipulación de DNA

El aislamiento de DNA de *E. coli*, comprobación en geles de agarosa, determinación de su concentración y pureza, y otros procesos de manipulación de DNA se llevaron a cabo siguiendo los protocolos estándar.<sup>220</sup> Las reacciones de PCR han sido utilizadas para la clonación de genes mediante la utilización de oligonucleótidos, la amplificación de fragmentos de DNA y la comprobación de la interrupción de un gen determinado. Más información sobre la técnica puede encontrarse en el manual *PCR tools, a guide to methods and applications*.<sup>229</sup> Se utilizó para ello un *DNA Thermal Cycler* de Perkin Elmer Cetus.

### 3.3 Transformaciones genéticas

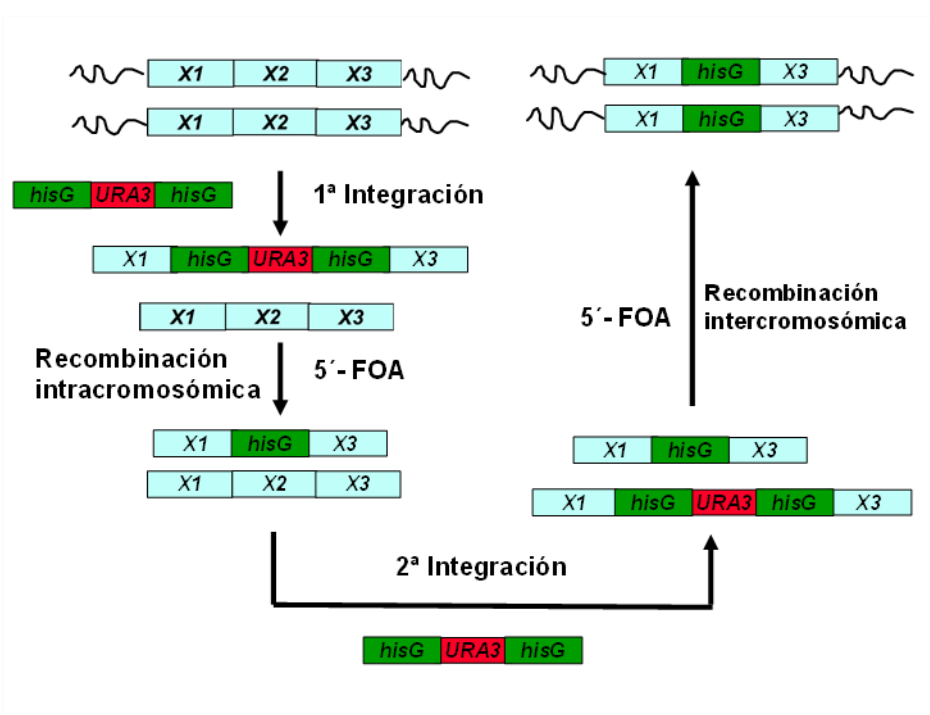
Las transformaciones genéticas en *E. coli* se realizaron mediante el método de Inohue<sup>230</sup> o Hanahan<sup>211</sup> y mediante electroporación. El electroporador utilizado fue el *Electro Cell Manipulator 600* (BTX Electroporation System).

Las transformaciones genéticas de *S. cerevisiae* se llevaron a cabo siguiendo un procedimiento con acetato de litio.<sup>231</sup>

Para *C. albicans*, se ha utilizado el método de electroporación<sup>232</sup> o, en la mayoría de los casos, el método de transformación de esferoplastos,<sup>233</sup> con algunas modificaciones. Se obtuvieron protoplastos de células procedentes de un cultivo fresco de *C. albicans* en fase exponencial, mediante el tratamiento con glucosidasa. Se lavan los protoplastos cuidadosamente y se mantienen en soluciones con sorbitol 1M. Se transforman los protoplastos con el DNA, procediendo posteriormente a regenerar la pared antes de plaquear los transformantes en un medio mínimo suplementado con sorbitol 1M como estabilizante osmótico, lo que permitía el aislamiento de un número significativo de transformantes sin suponer demasiado estrés osmótico. Las placas eran incubadas a la temperatura adecuada hasta la aparición de colonias.

### 4. Construcción de cepas genéticamente modificadas de *C. albicans*

*C. albicans*, al ser un microorganismo diploide, requiere la interrupción o delección de ambas copias del gen de interés para obtener mutantes homocigotos. Para ello, se utilizó una estrategia de eliminación secuencial del gen de interés desarrollada por Irwin & Fonzi,<sup>213</sup> que consiste en el uso de una construcción genética en la que se inserta el gen *URA3* de *C. albicans* flanqueado por dos copias del gen *hisG* de *Salmonella typhimurium*, y con zonas homólogas al gen que se desea interrumpir o deleccionar a ambos lados del casete, por donde tendrá lugar la recombinación.



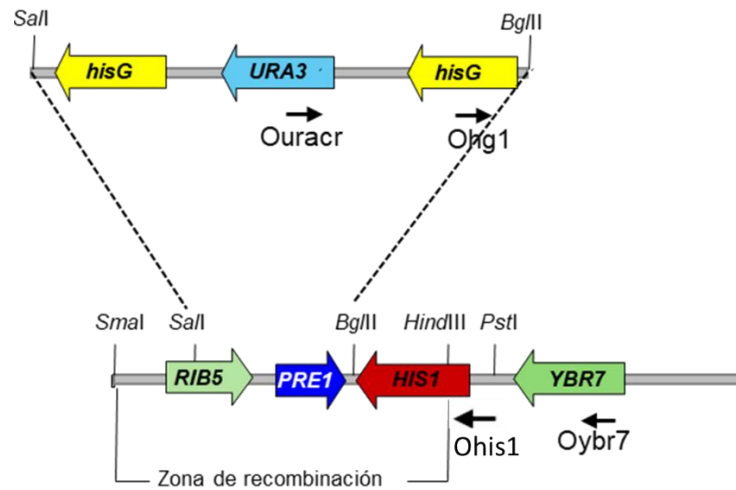
**Figura 10. Estrategia de interrupción o delección de genes en *C. albicans*.**

Se muestra el esquema de los distintos pasos necesarios para la delección del del gen *X2* descrita por Irwin & Fonzi.<sup>213</sup>

Esta construcción permite no sólo la selección de los mutantes recombinantes adecuados, sino la recuperación de la auxotrofia inicial tras un paso de recombinação intracromosómica y posterior selección con el antimetabolito 5-FOA, permitiendo así interrumpir el segundo alelo del gen con la misma construcción (**Figura 10. Estrategia de interrupción o delección de genes en *C. albicans*.**).

#### 4.1 Delección de un alelo del gen *CaPRE1*

Para realizar la delección del gen *CaPRE1* se diseñó una construcción de delección a partir del plásmido pCAR1 (plásmido que porta el fragmento *SmaI-PstI* del inserto *HIS1-PRE1-RIB5* de 2,7 Kpb aislado de la genoteca, subclonado en un vector pUC19), donde todo el gen *CaPRE1* (fragmento *Sall-BglII*) fue reemplazado por la construcción *hisG*-*CaURA3*-*hisG* procedente del fragmento *Sall-BglII* del plásmido pCUB6, resultando el plásmido pCAR2. El plásmido pCAR2 fue digerido con las enzimas de restricción *HindIII-SmaI*, dando lugar a la construcción de delección linealizada, que fue utilizada para transformar la cepa CAI4 de *C. albicans* (**Figura 11. Construcción de delección del gen *PRE1* en *C. albicans*.**).



**Figura 11. Construcción de delección del gen *PRE1* en *C. albicans*.**

Se muestra el fragmento linealizado de 3,8 kpb del plásmido pCAR2 digerido con *Sall/BglII* que porta ambos lados del casete *hisG*-*CaURA3*-*hisG* una zona homóloga al DNA genómico del locus adyacente a *CaPRE1*, de aproximadamente 1,8 kpb de longitud, para permitir la recombinación homóloga en la región cromosómica *PRE1*.

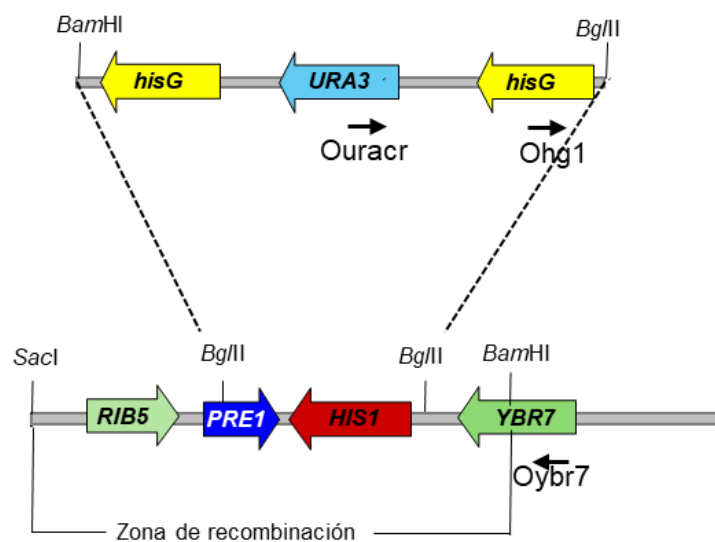
Los transformantes protótrofos para uracilo ( $Ura^+$ ) se analizaron por PCR, para verificar la correcta delección del gen, con los oligonucleótidos *Ohis1* (secuencia homóloga al DNA genómico cercano a donde se debería producir la integración y exterior a la construcción de delección) y *Ohg1* (situado en el gen *hisG*) y con otra pareja de oligonucleótidos, *Ohis1* y *Ouracr* (situado en *CaURA3*). De los clones analizados, seis amplificaron una banda de 1,05 kb y otra banda de 2,1 kb respectivamente, que no aparecía en la cepa silvestre CAI4.

#### 4.2 Delección de un alelo del gen *CaHIS1* y del gen *CaPRE1* en la cepa CAI4

Con el objetivo de deleccionar simultáneamente *PRE1* y el gen adyacente *HIS1*, se procedió a obtener el plásmido pHP1. Para ello, a partir del plásmido pUCHISX, un vector tipo pUC donde está subclonado el fragmento *KpnI* del plásmido YEpHISX,<sup>223</sup> se subclonó en la diana de restricción *BglII*, el casete de interrupción *hisG*-*CaURA3*-*hisG*, eliminando el fragmento de 1,35 kpb que contiene el gen *HIS1* en su totalidad y parte del gen *CaPRE1*, obteniéndose el plásmido pHP1. Este plásmido se linealizó con las enzimas *SacI*-*BamHI*, dejando 730 pb y 2170 pb a ambos lados para favorecer la recombinación homóloga, y se utilizó para transformar la cepa CAI4. Los transformantes  $Ura^+$  fueron analizados mediante PCR para comprobar su correcta integración en el locus adecuado, utilizando las parejas de cebadores *Oybr7*-*Ohg1* y *Oybr7*-*Ouracr*. El oligonucleótido, *Oybr7* se encuentra fuera del locus silvestre del gen *HIS1* por lo que se puede comprobar la delección del locus *HIS1* por la construcción de interrupción. Como se observa en la **Figura 12**, si tiene lugar una correcta recombinación, se obtiene un producto de amplificación de un tamaño de 1 kb, con los

cebadores Oybr7- Ohg1, y de 2 kb, con los cebadores Oybr7- Ouracr. Así se generó la cepa RM2, donde se había deleciónado solo uno de los alelos de ambos genes (ver Los **microorganismos** empleados en este trabajo se detallan en la **Tabla 1**). Las construcciones genéticas obtenidas fueron integradas en el genoma de las distintas cepas de *C. albicans* o expresadas en *S. cerevisiae*, mediante plásmidos centroméricos o episómicos obtenidos y amplificados en la cepa DH5αF' de *Escherichia coli*.

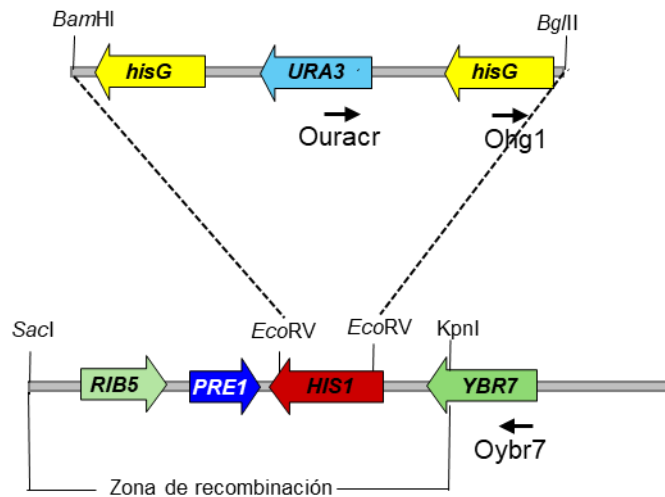
).



**Figura 12.** Esquema de la construcción de deleción del gen *HIS1* y *PRE1* en *C. albicans*.

### 4.3 Deleción del segundo alelo del gen *CaHIS1*.

A partir de la cepa RM20, proveniente de la cepa RM2 con la pérdida del marcador *URA3* por selección con 5-FOA, se procedió a su transformación con una construcción para la deleción del segundo alelo del gen *CaHIS1*. Tal y como se presenta en resultados, no fue posible la obtención de transformantes en los que se hubieran deleciónado ambos alelos de *CaHIS1* y *CaPRE1*. Para deleciónar la segunda copia del gen *CaHIS1*, se subclonó en la diana de restricción *EcoRV* del plásmido pUCHISX el fragmento *hisG-CaURA3-hisG*, obteniendo el plásmido pHP4. Este plásmido, se linearizó con las enzimas de restricción *SacI-BamHI* y se utilizó para transformar la cepa RM20, para obtener la cepa RM200. La correcta recombinación se comprobó por PCR con la amplificación de una banda de 2,1 kb, con los cebadores Oybr7- Ohg1, y de 1,1 kb, con la pareja de cebadores Oybr7- Ouracr (**Figura 13**).



**Figura 13.** Esquema de la construcción de delección del gen *HIS1* en *C. albicans*

#### 4.4 Obtención de un mutante condicional *pre1* de *C. albicans*

A partir del plásmido pCAO1, vector tipo pUC con el promotor del gen *PCK1*, se construyó el plásmido pCAO1ub mediante la subclonación del gen *CaURA3*, como marcador de selección, amplificado por PCR con los oligonucleótidos *Oura3up* y *Oura3low*, digerido con *HindIII*, y subclonado en la diana *HindIII* de pCAO1.

El ORF del gen *CaPRE1* fue amplificado mediante PCR con los oligonucleótidos *Capreup* y *Caprelo* y, tras la digestión del producto de PCR con las enzimas *BamHI-HindII*, fue subclonado en las dianas *BglII-StuI* de pCAO1ub, de manera que *CaPRE1* queda situado bajo el control del promotor regulable de *PCK1*. El plásmido resultante, pPCKPRE1a, fue digerido posteriormente con las enzimas de restricción *SpeI* y *BglI*, y tratado con la enzima Klenow. El fragmento *CaURA3-PCK1<sup>PR</sup>-CaPRE1* así obtenido se subclona en el plásmido pCAR2 entre sus dianas *BglII-SalI*, sustituyendo así el casete *hisG-CaURA3-hisG* por este fragmento, de manera que en sus extremos quedan zonas homólogas al DNA genómico del locus *PRE1*, dando lugar al plásmido pCAR29. Este plásmido, una vez linearizado con la enzima de restricción *SphI*, se utilizó para transformar las cepas CNC2 y ML2000 (**Figura 14**).

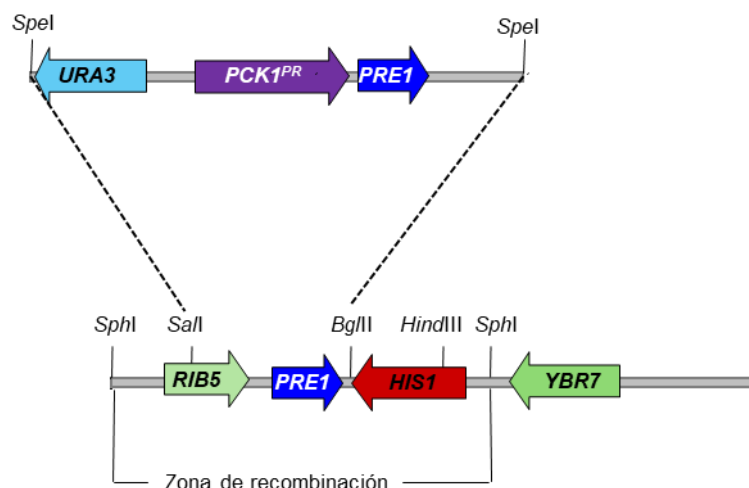


Figura 14. Estrategia de obtención del mutante condicional en CaPRE1 de *C. albicans*.

## 5. Aislamiento y clonación del gen HsC7-I homólogo humano de CaPRE1

A partir de la secuencia nucleotídica del gen HsC7-I, homólogo humano de CaPRE1, depositada en las bases de datos, se diseñaron los oligonucleótidos UPC-7 y LOC7 para su amplificación, utilizando como molde una genoteca de cDNA obtenida de células HeLa y cedida por el Dr. Guarente.<sup>221</sup> El producto de PCR se trató con la enzima Klenow, para hacer romos los extremos, y se subclonó en el sitio *SmaI* del vector pUC19, para obtener el plásmido pUCH7A. El gen fue secuenciado en el Centro de Genómica de la UCM, para comprobar la ausencia de mutaciones en la secuencia. Un fragmento *Sall-Sall*, que comprende el gen entero HsC7-I fue subclonado en el sitio *Sall* del plásmido pUCpACT (cedido por el Dr. Sanz) bajo el control del promotor del gen *ACT1* de *S. cerevisiae*, fuerte y constitutivo, generando el plásmido pUCpACTC7.

## 6. Construcción de cepas de *S. cerevisiae* genéticamente modificadas

### 6.1 Construcción de plásmidos episómicos usados en la complementación del fenotipo *pre1Δ* de *S. cerevisiae*

El plásmido EpAC7i2a se obtuvo subclonando el fragmento *BamHI* de pUCpACTC7 en el sitio *BamHI* del vector YEp13, plásmido episómico con marcador de selección *LEU2*. Por su parte, el plásmido YEpHISXLEU fue construido subclonando el fragmento *SphI* de YEpHISX en *SphI* del YEp13.

Ambos plásmidos se utilizaron para transformar la cepa WCG4Δ1a/α de *S. cerevisiae*.

La comprobación del genotipo de la cepa de *S. cerevisiae* haploide para asegurarnos de la ausencia de *ScPRE1* se realizó mediante PCR con los cebadores Scpreup y Scprelo.

## 6.2 Construcción de cepas de *S. cerevisiae* con expresión controlada de *PRE1*

Para ensayar todos los genes de *PRE1* bajo las mismas condiciones, se amplificaron mediante PCR *ScPRE1* y *CaPRE1*, a partir de DNA genómico de cada especie con la pareja de oligonucleótidos Scpreup-Scprelo y Capreup-Caprelo, respectivamente. Los amplicones se clonaron directamente en pT7Blue, y dos clones independientes de cada gen se utilizaron para construir los plásmidos pT7ScPre1 y pT7CaPre1, que se utilizaron en los ensayos de interrupción del gen y de complementación, en cada caso.

Se procedió a interrumpir el gen *PRE1* de *S. cerevisiae* en otro fondo genético diferente. Para ello se eligió la cepa de *S. cerevisiae* CEN-PK2, una cepa diploide utilizada en el proyecto europeo EUROFAN auxótrofa para uracilo, leucina, histidina y triptófano. Para ello, fue necesaria la construcción del plásmido pINT3, con marcador de selección *HIS3*, mediante la subclonación del fragmento *SmaI-SmaI* de 1,8 kpb del plásmido p34HScHIS3, que porta el gen *HIS3*, en el sitio *HindIII* del plásmido pT7ScPre1. A partir del plásmido pINT3 se obtuvo un fragmento *SmaI-EcoRI*, que contiene la construcción de interrupción con zonas homólogas flanqueando el marcador de selección *HIS3*, y se clonó en las dianas *EcoRI* y *HindIII* de un pUC19 obteniendo el plásmido de interrupción pINT5. El plásmido pINT5 digerido con las enzimas de restricción *EcoRI-XbaI* fue utilizado para transformar *S. cerevisiae* y promover la integración por homología de sus extremos en el locus *PRE1* de esta levadura. Los transformantes heterocigotos His<sup>+</sup> obtenidos se transformaron finalmente con los plásmidos TETC7i1 y TETCPRE1, que expresaban los genes *CaPRE1* o *HsC7-I* bajo el control del sistema de la tetraciclina, respectivamente.<sup>227</sup>

Dichos plásmidos se obtuvieron subclonando en *BamHI* y *PstI* del PCM189, que porta el sistema de control de la expresión génica por tetraciclina y el marcador *URA3*, el fragmento *BamHI-PstI* de pT7CaPre1 o de pUCpACTC7.

Finalmente, las cepas haploides Ura<sup>+</sup> His<sup>+</sup> fueron verificadas mediante PCR a partir de DNA genómico obtenido de las esporas humanizadas (YFM140) y de las esporas *candidizadas* (YFN60), utilizando los oligonucleótidos Scpreup/Scprelo (para *ScPRE1*), Capreup/Caprelo (para *CaPRE1*), o UPC-7/LOC-7 (para *HsC7-I*).

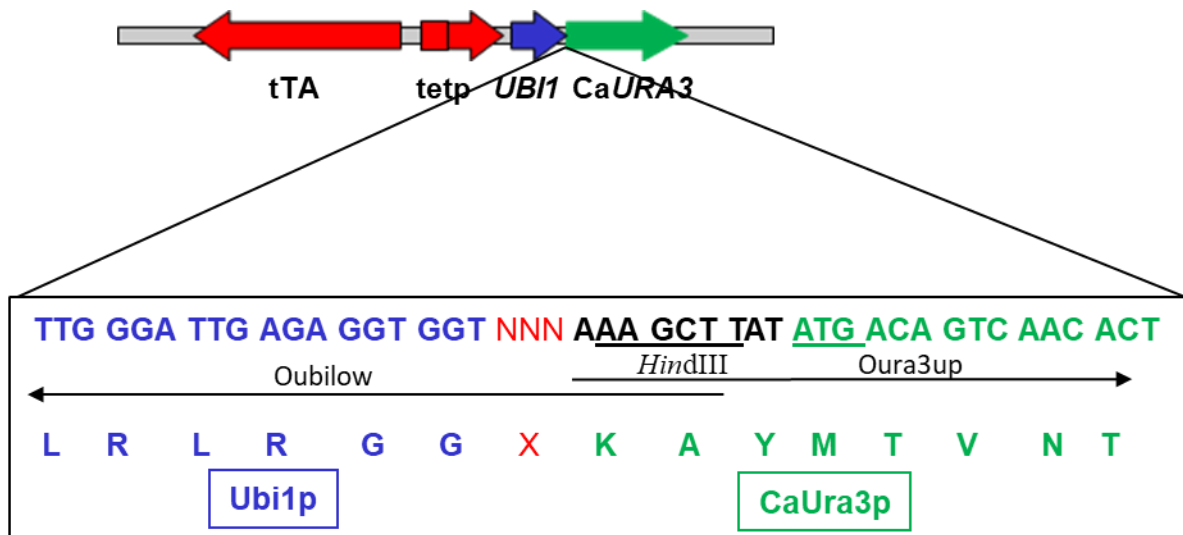
### 6.2.1 Marcaje de la cepa *candidizada* con proteína verde y en el locus de *LEU2*

Con el objetivo de generar una cepa marcada con GFP (proteína verde fluorescente) para los ensayos competitivos de búsqueda de nuevos antifúngicos dirigidos a *PRE1* como diana, fue necesaria la construcción del plásmido PAGL1. Para ello, un fragmento *HindIII-PstI* del plásmido *yEGFP3*<sup>228</sup> se subclonó en un vector pUC19 para construir el plásmido pYGF3, y el inserto *HindIII-PstI* que porta la proteína verde fluorescente se subclonó en el plásmido pUCpACT en las dianas *HindIII-PstI*, para colocar su expresión bajo el control del promotor de la actina en la construcción pACTGFP. Un fragmento *PstI* de pACTGFP se subclonó en el vector YEp13 para generar el plásmido PAGL1, que al linearizarse con *EcoRV* se integró en el locus de *LEU2* de la cepa YFN60 para marcarla

con proteína verde fluorescente, obteniendo la cepa YFN60LG. Esta cepa se utilizó en los ensayos competitivos de búsqueda de nuevos antifúngicos cuya diana fuera el gen *CaPRE1*. Como control se transformó con el plásmido PAL2 que procede del inserto *PstI* de pUCpACT, que solo porta el promotor de actina en la diana *PstI* de YEp13.

## 7. Construcción de sustratos proteolíticos

Se amplificó por PCR el gen que codifica una unidad de ubiquitina de *S. cerevisiae*, *UBI1*, a partir de DNA genómico y utilizando los cebadores Oubilow y Oubiup. Con estos cebadores, se eliminaba su codón de parada y se sustituía el último residuo fenilalanina por un codón degenerado susceptible de ser traducido en cada uno de los 20 aminoácido. Además, se insertaba una timina y una diana para la enzima de restricción *HindIII*, para que la fusión entrara en fase de lectura (Error! Reference source not found.). De forma similar, el gen *CaURA3* se amplificó mediante PCR a partir de DNA genómico de *C. albicans* utilizando los cebadores Oura3up y Oura3low, para introducir una diana *HindIII* y añadir una adenina, para que la fusión entre en fase de lectura con el orf del gen *URA3*. El producto de la PCR del amplificado del gen *URA3* se subclonó en las dianas *PstI-HindIII* del vector centromérico de *S. cerevisiae* LEUTETH1, que porta el sistema de tetraciclina y el marcador de selección *LEU2*, resultando el plásmido pLTETURA., donde el gen *URA3* está bajo control del sistema de la tetraciclina. Los diferentes productos de amplificación de la PCR del gen *UBI1* se subclonaron en las dianas *PstI-HindIII* del plásmido pLTETURA para que esté en fusión con *CaURA3* y bajo el promotor de la tetraciclina, resultando el plásmido pTLUBURA.



**Figura 15. Detalle de la construcción de las fusiones *UBI1-X-CaURA3*.**

El aminoácido amino-terminal está nombrado como X. Está subrayada en negro la secuencia de la diana *HindIII* y en verde el codón de iniciación del gen *CaURA3*. Se han incorporado los aa, lisina (K), alanina (A) y tirosina (Y) para entrar en fase con el gen *URA3*. Las flechas indican los cebadores Oubilow y Oura3up

## 8. Obtención de muestras proteicas de *C. albicans*

### 8.1 Obtención de extractos citoplasmáticos

Las células de *C. albicans* se recogieron por centrifugación a 2500 r.p.m. a 4 °C. Se realizaron 3 lavados con PBS frío, para eliminar los restos de medio de cultivo, y las células se resuspendieron en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 10 % glicerol) en presencia de 1 mM PMSF (fenilmetilsulfonilfluorida) (Fluka) y 1% de una mezcla de inhibidores de proteasas (Pierce™). Para la ruptura mecánica de las células, se añadió el mismo volumen de bolitas de vidrio de 1 mm de diámetro (Glasperlen, Germany). Para ello, se utilizó una Fastprep24 (MP Biomedicals), aplicando 5 ciclos de pulsos de 30 segundos a fuerza 5,5 y enfriando los tubos eppendorf entre pulsos durante 5 min. Finalmente, tras la centrifugación a 13.000 r.p.m. durante 15 min. a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a un nuevo eppendorf. Las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su preparación para el análisis proteómico.

### 8.2 Precipitación, cuantificación y digestión de proteínas

La preparación de muestras proteicas para su análisis mediante espectrometría de masas fue similar para las muestras analizadas mediante DDA y DIA.

#### 8.2.1 Precipitación de proteínas con acetona

Las proteínas de las muestras se precipitaron con acetona, mediante la adición de 5 volúmenes de acetona fría, posterior agitación e incubación a -20 °C durante 16 horas. Finalmente, las muestras se centrifugaron, para la eliminación de la acetona.

#### 8.2.2 Precipitación de proteínas con metanol/cloroformo

Al sobrenadante de extractos proteicos de cada muestra, se añadieron 3 partes de metanol y una parte de cloroformo, que se sometió a agitación en *vortex* y se añadieron tres partes de agua, que también se agitaron en *vortex*. Todo el proceso se lleva a cabo a 4 °C. Se centrifugaron a 10000 r.p.m. durante 5 min. desechando la parte superior acuosa, sin perturbar ni arrastrar la interfase. Se añadieron tres partes de metanol, y tras agitación en *vortex* se centrifugó 5 min. a 10000 r.p.m. Se eliminó el sobrenadante y el resto de metanol se dejó secar al aire.

#### 8.2.3 Digestión en gel

Las proteínas presentes en las bandas del gel se digirieron con tripsina. Para ello, las proteínas fueron reducidas con 10 mM de DTT a 56 °C durante 30 min. y luego se alquilaron con 35 mM de Iodacetamida durante 20 min. en oscuridad. Finalmente se añadió en una proporción 1/25 (w/w)

Tripsina recombinante grado secuenciación (Roche Molecular Biochemicals) en bicarbonato amónico 25 mM (pH 8.5) a la muestra y se incubó durante toda la noche a 37 °C.

Se realizaron dos extracciones de péptidos del gel durante 10 min., primero con acetonitrilo (ACN) al 50%, TFA 0.1% y finalmente con ACN al 100%. Se secaron por centrifugación a vacío (SpeedVac, Savant), se reconstituyeron en 15 µl de 2% ACN, 0.1% Acido Fórmico (AF), se midió la concentración de péptidos por fluorimetría (Qubit 3.0, Thermo Fisher Scientific) y se conservaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

### 8.2.4 Digestión en líquido con el kit iST de Preomics

Las proteínas precipitadas de las muestras se digirieron usando el kit iST de Preomics (<https://www.preomics.com/products/ist>), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras secas se resuspendieron en 50 µl del tampón LYSE y se incubaron a 95 °C durante 10 min. para solubilizar, reducir y alquilar las proteínas. A continuación, se añadieron 50 µl de solución DIGEST, que contiene la mezcla de las proteasas Tripsina y Lisina-C, y se incubaron 16 horas a 37 °C y 500 r.p.m. A continuación, se paró la digestión con 100 µl de tampón STOP y se transfirió a una microcolumna. A continuación, el digerido se lavó en primer lugar con 100 µl de tampón WASH1, y en segundo lugar con 100 µl de tampón WASH 2, y finalmente se procedió a la elución en dos veces con 100 µl de tampón ELUTE. Tras lo cual, la muestra se secó a vacío en *SpeedVac* (Savant) y se reconstituyó en 20 µl de tampón LC-LOAD. La concentración de péptidos se midió mediante fluorimetría, en el fluorímetro Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific).

Los péptidos de cada una de las muestras fueron analizados por nano-cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución.

## 9. Análisis por espectrometría de masas acoplada a nano-cromatografía líquida.

Este análisis proteómico consiste en obtener los extractos proteicos de cada muestra, tras la lisis celular y precipitar las proteínas totales. Estas proteínas se digieren con tripsina, y los péptidos resultantes se analizan por espectrometría de masas de alta resolución acoplada a una nano-cromatografía líquida de fase reversa. Con los datos extraídos del cromatograma y espectros, se identifican y cuantifican los péptidos, y se infieren a las proteínas correspondientes. Estos datos de cuantificación se tratan estadísticamente para obtener la relación de la abundancia de cada proteína en cada grupo de muestras a comparar. Para llevar a cabo la cuantificación, se suman las intensidades de los iones precursores de los espectros que identifican un péptido único, y estos se normalizan con el total de intensidades de los iones peptídicos de esa muestra. A continuación, los péptidos identificados se infieren a las proteínas correspondientes y, para calcular la abundancia de cada proteína, se suman las intensidades de sus péptidos. Se calcula la relación (*ratio*) de abundancia de cada proteína dividiendo entre muestras a comparar.

## 9.1 Separación de péptidos por nano-cromatografía en fase reversa

Aproximadamente 400 ng de los péptidos de las muestras fueron cargados y concentrados en punta (Evot Pure, Evosep, (<https://www.evosep.com>), según las instrucciones del fabricante, separados por nano-cromatografía líquida (EvoSep One), y analizados en el espectrómetro de masas de alta resolución timsTOF Pro2 (*Trapped Ion Mobility Spectrometry -Time Of Flight*) (Bruker). Los péptidos fueron separados en una columna analítica (Bruker Daltonics) de 15 cm (EV-1109, PepSep C18, 15cm x 150  $\mu\text{m}$  ID y 1,9  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula) usando un método cromatográfico de 15 SPD (*samples per day*) correspondiente a un gradiente de 88 min/muestra, y se ionizaron por electrospray en la fuente *captiveSpray* del espectrómetro de masas timsTOF Pro2, usando un flujo de 0,22  $\mu\text{l}/\text{min}$  y con adquisición en modo positivo.

## 9.2 Análisis mediante espectrometría de masas de adquisición dependiente de datos (DDA)

En espectrómetro de masas timsTOF Pro2 (Bruker), se adquirieron los espectros en modo DDA (*Data Dependent Acquisition*) en un rango de masas de 350 a 1700 Da. y un rango de movilidad iónica de 0,6 a 1,6  $1/\text{K0}$  a lo largo de 10 rampas. En cada rampa se seleccionaron hasta 10 precursores (carga entre  $2^+$  y  $5^+$ ) para su fragmentación CID (Collision-Induced Dissociation), y se adquirieron los espectros MS/MS correspondientes.

## 9.3 Análisis mediante espectrometría de masas de adquisición independiente de datos (DIA)

En espectrómetro de masas timsTOF Pro2 (Bruker), se adquirieron los espectros en modo DIA-PASEF (*Parallel Accumulation Serial Fragmentation*) en un rango de masas de 400 a 1200  $m/z$  y un rango de movilidad iónica de 0,60 a 1,43  $1/\text{K0}$  a lo largo de 32 rampas y con un tiempo de ciclo estimado de 1,80 s. La ventana de aislamiento de los espectros MS/MS fueron adquiridos en modo positivo con una energía de colisión de 20 a 59 eV con un método de adquisición independiente de la información DIA-PASEF.

# 10. Identificación de proteínas mediante datos de espectrometría de masas

## 10.1 Análisis de datos crudos por método DDA

El fichero generado en el análisis DDA (. d) se procesó en el software<sup>234</sup> *MSFragger v3.8* contenido en *FragPipe v20.0* y se utilizó como base de datos, el proteoma de la cepa de referencia SC5314 de *C. albicans* anotado en *Candida Genome Database* (<http://www.candidagenome.org/>), con 6218 secuencias, añadiendo las secuencias de los contaminantes habituales y la base de datos

reversa necesaria para la validación por la tasa de falsos descubrimientos (FDR, *False Discovery Rate*).

Se utilizó la configuración por defecto del módulo *MSFragger* con los siguientes cambios: longitud del péptido de 8 a 35 aminoácidos, y rango de masa del péptido de 800 a 4000 Da. Los parámetros de búsqueda utilizados fueron como modificaciones fijas, carbamidometilación de cisteína, y como modificaciones variables, oxidación de metionina y escisión de metionina en N-terminal. Tolerancia de masa de precursor: 0,02 Da, tolerancia de masa de fragmento: 20 ppm, sitios de corte perdidos  $\leq 2$  (*missed cleavage*) y 3 como número máximo de modificaciones variables en péptidos. La validación de espectros que identifican un péptido (PSMs) se realizó con el algoritmo *Percolator* y la inferencia de proteínas con *PeptideProphet* filtrando a un FDR  $\leq 0,01$ .

## 10.2 Análisis de datos crudos por método DIA y cuantificación sin marcaje

Los archivos crudos (.d) para los experimentos de la comparativa DIA se analizaron en el programa *DIA-NN v2.0.0*,<sup>235</sup> a partir de las secuencias de las proteínas anotadas en las bases de datos. Se utilizó una librería espectral predicha *in silico* (1286281 precursores), permitiendo, como modificaciones fijas, la carbamidometilación de cisteína, y como modificaciones variables: la escisión de metionina N-terminal y la oxidación de metionina. Un número máximo de 3 modificaciones variables y 1 sitio de corte perdido. La librería espectral se generó a partir del proteoma de referencia de *C. albicans* SC5314 (anotado en *Candida Genome Database* (<http://www.candidagenome.org/>) (6218 secuencias). En la búsqueda en el programa DIA-NN se incluyeron los siguientes parámetros: *Protein inference, Genes; Neural Network Classifier, Single pass mode; Quantification strategy, Any LC (high accuracy); Cross-run normalisation, RT-dependent; Library Generation, Smart Profiling; y Speed y RAM usage, Optimal results*. Se establecieron los parámetros *Mass accuracy* y *MS2 accuracy* como 17 ppm y 1 ppm respectivamente. Finalmente se seleccionaron *MBR, No shared spectra, y Heuristic protein inference*. Los datos generados se filtraron a un nivel de FDR  $\leq 0,01$ .

## 10.3 Análisis de datos de DIA y cuantificación sin marcaje por *TraianProt*

El análisis de los resultados de los análisis de cuantificación relativa se llevó a cabo en el programa *TraianProt*,<sup>236</sup> desarrollado por Samuel de la Cámara en la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid. En primer lugar, se aplica el filtro para preservar las proteínas que aparecen en al menos dos de las tres réplicas por condición. No se lleva a cabo imputación (se trabaja con valores perdidos *missing values* para cada grupo de muestras). El método de inferencia de proteínas es Heurístico basado en genes, utilizando solo péptidos proteotípicos para la identificación. El análisis de expresión diferencial, para determinar las proteínas que exhiben cambios significativos en su abundancia relativa, se realiza aplicando la prueba T de Student para

muestras independientes, utilizando el paquete *limma* (v3.54) y estableciendo un  $\log_2FC \geq 0,585$  y un  $\log_2FC \leq 0,585$  con un valor de *q value*  $\leq 0.05$ .

## 11. Identificación del complejo del proteosoma

### 11.1 Separación de complejos mediante electroforesis nativa (*blue native*)

Para realizar el ensayo de separación de complejos por *blue-native*, la lisis celular y la extracción de proteínas, se realizó del mismo modo que para los descritos anteriormente en el apartado 8.1 Obtención de extractos citoplasmáticos pero modificando la composición del tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, EDTA y sin inhibidores de proteasas). Una vez obtenidos los lisados, se tomaron 10  $\mu$ l de muestra y se adicionó 7,5  $\mu$ l de *sample buffer* (Novex, life technologies Thermo), 0,3  $\mu$ l de azul de *Coomassie G-250* al 5% y 2% del detergente *nonidet P-40*. Para preparar la electroforesis, se utilizaron dos tampones: el tampón ánodo (*Native Page Running Buffer*), diluido 1:20, y el tampón cátodo (*Native Page Catode buffer*), diluido 1:10. La preparación del gel nativo de poliacrilamida consistió en un lavado con tampón ánodo, montaje del gel en el marco, vaciado de los pocillos, cargando 5  $\mu$ l del marcador de peso molecular M10 *Native Mark*, y las distintas muestras, dejando un pocillo libre entre muestras para evitar contaminación, y se rellenaron todos los pocillos con buffer cátodo. La electroforesis se desarrolló a 150 V durante 2 horas. Tras la electroforesis se procedió a la tinción del gel que consistió en los siguientes pasos, fijación de gel con metanol: agua: fosfórico (50:48:2), dos lavados con agua *Milli-Q* (*Millipore Milli-Q Gradient A10*) durante 10 min., equilibrado de 30 min. con agua: metanol: ácido fosfórico: sulfato amónico (47:33:3:17). Se añadieron 300  $\mu$ l de azul de *Coomassie* al 5% en metanol, y se dejó teñir O/N a temperatura ambiente. Se lavó con agua *Milli-Q* y se escaneó el gel para obtener la imagen.

### 11.2 Cuantificación relativa de proteínas por recuento de espectros

En este tipo de experimentos, se asignan los espectros a los péptidos que se identifican, y luego se infieren a las proteínas correspondientes, de forma que se supone que hay correspondencia entre el número de veces que se detecta el espectro de un ion precursor de un péptido con su abundancia o concentración en la muestra. Así, si se realiza un recuento de los espectros asignados a un péptido (*Peptide Spectrum Matching*, PSM), a mayor número de espectros, mayor abundancia de ese péptido en la muestra. Cuando se infieren a la proteína, se suman todos los espectros de los péptidos pertenecientes a esa proteína. Se deberán seleccionar solo los péptidos únicos para esa proteína, para no asignar o cuantificar péptidos compartidos con más de una proteína. El número de espectros totales que identifican la proteína (SC, *Spectral Count*) se normaliza con la longitud de la proteína (número de aminoácidos) y se obtiene una cuantificación intra-muestra basada en el recuento de espectros, ya que una proteína mayor tendrá más péptidos y por tanto

más espectros que una más pequeña. El recuento de espectros depende directamente de la concentración del péptido en la muestra y si se normaliza con el total de los SAF (*Spectral Abundance Factor*) de las proteínas, se obtendrá una estimación de la abundancia relativa de las proteínas de una muestra NSAF (*Normalized Spectral Abundance Factor*) y se puede hacer una cuantificación entre las proteínas de varias muestras siendo una cuantificación inter-muestras.

## 12. Técnicas de microscopía y citometría de flujo

Las tinciones celulares de *C. albicans* se analizaron mediante microscopía de fluorescencia y, en el caso de la tinción con yoduro de propidio, también se realizó por citometría de flujo en un citómetro *FACScan* de Becton Dickinson, en la Unidad de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la UCM. La microscopía de contraste de interferencia diferencial, DIC, se utilizó para observar la morfología celular y la microscopía de fluorescencia para visualizar las siguientes tinciones de las células de *C. albicans* en un equipo LSCM Leica SP8 (Leica).

### 12.1 Tinción con blanco de calcoflúor

Para la tinción de quitina de la pared celular con blanco de calcoflúor se utilizaron células incubadas en MM O/N a 37 °C. Se recogieron  $1,5 \times 10^7$  células en 1 mL de PBS y se tiñeron con 5 µg/mL de blanco de calcoflúor, durante 10 min. en hielo y oscuridad. Se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con formaldehído al 4%.

### 12.2 Tinción con yoduro de propidio.

Con el fin de evaluar la muerte celular de *C. albicans* se empleó yoduro de propidio (Sigma-Aldrich), un marcador capaz de entrar en la célula de unirse al ADN, solo cuando la membrana ha perdido su permeabilidad selectiva, indicando pérdida de viabilidad. Las células de *C. albicans* en las diferentes condiciones de estudio fueron incubadas con 5 µl de yoduro de propidio, a una concentración de 50 µg/mL, durante 5 min. a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron dos lavados con PBS antes de su análisis.

### 12.3 Tinción con dihidrorodamina 123

Se partió de células crecidas en MM O/N a 37 °C y se recogieron  $1,5 \times 10^7$  células. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se realizó mediante marcaje fluorescente con dihidrorodamina (DHR) 123 (Sigma),<sup>237</sup> a una concentración de 5 µg/mL, durante 90 min. a 30 °C en agitación a 900 r.p.m. y en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados con PBS.

## 12.4 Tinción con DAPI

La tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) (Thermo Fisher) se utilizó para visualizar los núcleos de la célula. Se utilizó a una concentración de 1 mg/mL y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación se realizaron dos lavados con PBS, antes de su análisis.

## 12.5 Tinción con FM4-64

La tinción con el fluorocromo FM4-64, N-(3-trietilamoniopropil)-4-(6-(4-(dietilamino) fenilo) hexatrienilo) piridinio dibromuro) (Thermo Fisher) tiñe selectivamente las membranas vacuolares de levadura con fluorescencia roja (excitación/emisión ~515/640 nm). Este tinte lipofílico es una importante herramienta para visualizar la dinámica y la morfología de los orgánulos vacuolares, para estudiar la ruta de la endocitosis.<sup>238</sup> Se utilizó a una concentración de 0.3  $\mu$ L /mL y se incubó a 30 °C durante 90 min. y en agitación a 900 r.p.m. Pasado el tiempo de incubación se realizaron dos lavados con PBS.

## 13. Herramientas bioinformáticas

- *oprof* (<https://epd.expasy.org/ssa/oprof.php>): análisis de la secuencia de DNA.
- *Alphafold* (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>): estructura de las proteínas.
- *BLAST*, Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>): alineamiento de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos.
- *Candida Genome Database* (CGD) (<http://www.candidagenome.org/>): base de datos de genes y proteínas de *C. albicans*.
- *Cloning*: programa de diseño de plásmidos.
- *Bruker Compass Hi-Star v6.3*: adquisición de espectros en el espectrómetro de masas timsTOF Pro2.
- *MSFragger* (<https://msfragger.arsci.com/>): herramienta de identificación de péptidos y proteínas a partir de datos de espectrometría de masas mediante búsqueda en base de datos.
- *Fragpipe-Analyst* (<http://fragpipe-analyst.nesvilab.org/>): análisis de datos de proteómica cuantitativa para estudio de expresión diferencial.
- *DiaNN* (<https://github.com/vdemichev/DiaNN>): análisis de datos de proteómica mediante el método DIA.
- *TraianProt* (<https://github.com/SamueldelaCamaraFuentes/TraianProt>): análisis de datos de proteómica que admite todos los formatos.
- *NSAFF-calculator* (<https://github.com/SamueldelaCamaraFuentes/NSAFF-calculator>): cálculo de valores de factores de abundancia espectral normalizados.

- *FungiFun* (<https://fungifun3.hki-jena.de/>): análisis ontológico de procesos biológicos y componente celular.
- *Kegg* (<https://www.genome.jp/kegg/mapper/>): análisis de rutas metabólicas.
- *PathoYeasttract* (<https://yeastract-plus.org/pathoyeasttract/calbicans>): herramienta para buscar información de los promotores de los genes.
- *Perseus* (<https://maxquant.net/perseus/>): análisis de datos de proteómica.
- *String* (<https://string-db.org>): análisis de interacciones moleculares.
- *ComplexPortal* (<https://www.ebi.ac.uk/complexportal>): base de datos de complejos proteicos.
- *XLStat* (<https://www.xlstat.com/>): análisis estadístico para excel.
- *WebLogo* (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>): alineamiento de secuencias con logos.
- *Degronopedia* (<https://degronopedia.com/>): base de datos de degrones.
- *PeptideAtlas* (<https://db.systemsbiology.net/sbeams/cgi/PeptideAtlas>): *compendium* de acceso público de péptidos identificados por espectrometría de masas en tándem.
- *RStudio* (v4.5.0) (<https://cran.r-project.org/bin/windows/base/>): editor de código para análisis de datos.
- *LASX Leica* (Leica): adquisición y procesamiento de las imágenes obtenidas por microscopía.
- *Pubmed* (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>): base de datos con literatura científica de la Librería Nacional de medicina de Estados Unidos (NLM).
- *Zotero* (<https://www.zotero.org/>): gestor de referencias bibliográficas.
- *Biorender* (<https://biorender.com/>): herramienta online para la creación de figuras en ciencias.
- *Biovenn* (<https://www.biovenn.nl/>): realiza diagramas proporcionales basados en listas de genes u otros elementos.
- *ProteomeXchange Consortium* (<https://www.proteomexchange.org/>): repositorio público de datos de espectrometría.
- *Git Hub* (<https://github.com/>): plataforma de proyectos de código abierto GitHub es un servicio basado en la nube que aloja un sistema de control de versiones (VCS) llamado Git, de código abierto. Para almacenar las aplicaciones que se desarrollan. Éste permite a los desarrolladores colaborar y realizar cambios en proyectos compartidos, a la vez que mantienen un seguimiento detallado de su progreso.
- <https://github.com/MLHernaez/candida-gene-tools/>: herramienta para el conversor de descriptores de genes de *C. albicans* desarrollada por M<sup>a</sup> Luisa Hernández.
- <https://.shinyapps.io/>: aplicación para implementar los programas en la web.
- *H-Convorsor* (<https://mlhernaez.shinyapps.io/candida-gene-app/>): programa de acceso público para convertir los identificadores de los genes de *C. albicans*.



## RESULTADOS

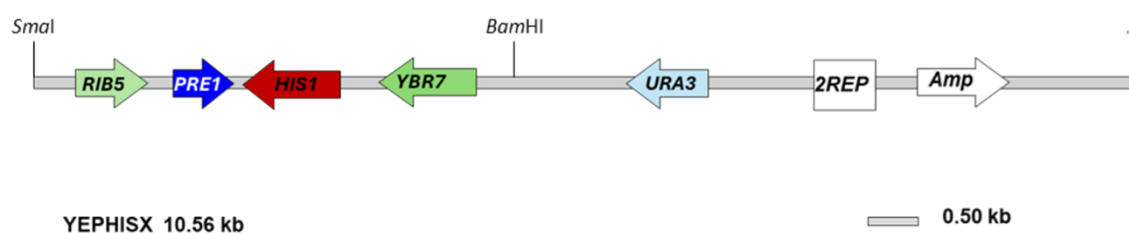




## 1. Clonación del gen *PRE1* de *C. albicans*

### 1.1 Análisis *in silico* de la región 3' del inserto que comprende el gen *HIS1*

La complementación de la auxotrofia de un mutante *his1* de *C. albicans* con una genoteca de DNA genómico de este microorganismo en un plásmido de *C. albicans* permitió aislar un inserto de 4,5 kbp (HISX) que contenía, entre otros, el gen *HIS1*.<sup>223</sup> Tras la subclonación de dicho fragmento (*Bam*HI-*Sma*I) en el vector pUC19 para generar el plásmido pUCHISX, su secuenciación condujo a la identificación de tres marcos abiertos de lectura (ORFs, *Open Reading Frames*) en su interior. Para su identificación, se procedió a comparar dichas secuencias con la base de datos Genbank mediante la aplicación BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). El primero de los ORFs presentaba similitud con el gen *RIB5* de *S. cerevisiae*, que codifica la riboflavina sintasa; el segundo de ellos presentaba una alta similitud con *PRE1*, que codifica la subunidad  $\beta$ 4 del protososoma; y el tercero de ellos con *YBR7*, así denominado en su día y que corresponde al gen *RER2*, que codifica una posible cis-prenil-transferasa involucrada en la síntesis de dolicol.<sup>239</sup> Posteriormente, ese fragmento fue subclonado en el vector episómico bifuncional YEp352 para poder realizar estudios funcionales en la levadura *S. cerevisiae* (YEpHISX, **Figura 16**).<sup>223</sup>



**Figura 16. Plásmido YEpHISX.**

En la figura se muestra la localización de los genes *HIS1*, *PRE1*, *RIB5* e *YBR7* (*RER2*) contenidos en el fragmento HISX.

### 1.2 Análisis de la secuencia nucleotídica y aminoacídica

El análisis de la secuencia de nucleótidos adyacente al extremo 3' del gen *HIS1* mediante el algoritmo informático Oprof (<https://epd.expasy.org/ssa/oprof.php>) reveló la existencia de una pauta abierta de lectura adicional de 588 pb. La traducción de este gen mostró un elevado grado de similitud con el gen *PRE1* de *S. cerevisiae*,<sup>214</sup> por lo que se decidió denominar al gen clonado *CaPRE1*.

El análisis de la región promotora llevó a la identificación de una secuencia rica en adeninas y timinas, localizada entre las posiciones -75 a -130, que se ha implicado en el inicio de la transcripción. Se han identificado unas posibles cajas TATA en las posiciones -30 y -35, donde tendría lugar la interacción con la RNA polimerasa.

Analizando el promotor con la información depositada en PathoYeasttract (<https://yeastract-plus.org/pathoyeasttract/calbicans/>)<sup>240</sup> se ha localizado una secuencia consenso 5'-GAAGGCAA-3' denominada PACE (*Proteasome-Associated Control Element*)<sup>241,242</sup> en las posiciones -50 y-58. Esta secuencia es reconocida por el factor de transcripción Rpn4 y es diferente a la secuencia consenso descrita en *S. cerevisiae*.<sup>243</sup>

En la secuencia de la zona 3' de dicho ORF, tras el codón de parada, se observa una secuencia de terminación de la transcripción entre las bases 760-790, TGA...TAAGT...TTT, idéntica a la secuencia consenso propuesta por Zaret y Sherman,<sup>244</sup> como terminación de la transcripción en *S. cerevisiae*. No se observaron señales de procesamiento de intrones (al menos según las secuencias consenso descritas en *S. cerevisiae*), lo que sugiere su ausencia en este gen.

El gen *CaPRE1* de *C. albicans* codifica una proteína de 196 aa de tamaño, con un peso molecular teórico de 22 kDa, que contiene residuos aminoácidos cargados en su extremo C-terminal. La estructura de la proteína se puede observar con AlphaFold,

(<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q5AJZ5>).<sup>245,246</sup>

La secuencia aminoácida deducida a partir de la secuencia nucleotídica del gen *CaPRE1* se comparó con secuencias de proteínas de distintas bases de datos mostrando un elevado grado de similitud con otras subunidades del proteosoma de diferentes organismos. Así, comparte una identidad del 70% con la proteína Pre1 de *S. cerevisiae*, y del 44,79% con la humana. Todos estos porcentajes de identidad han sido obtenidos mediante el programa BLASTp (<https://sky-blast.com/blast/p>).

Con respecto a la utilización de codones, *CaPRE1* no presenta ningún codón CTG, que se traduciría por leucina según el código genético universal, pero que en *C. albicans* se traduce por serina,<sup>247</sup> por lo que no supone una desventaja a la hora de expresar esta proteína en *S. cerevisiae* (ver más adelante).

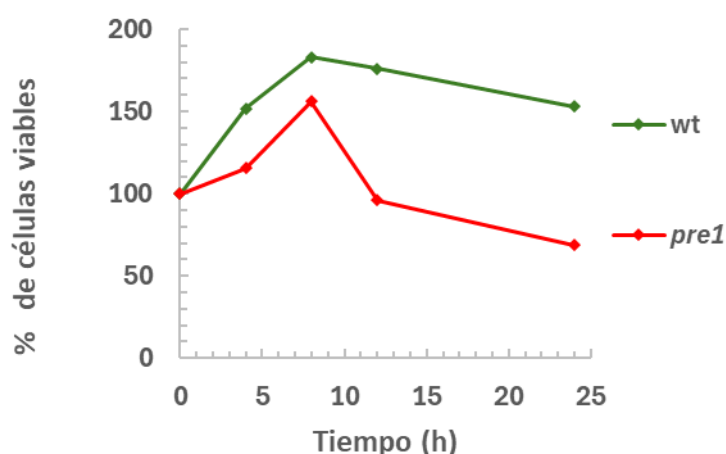
Los datos obtenidos del análisis de la secuencia del inserto de DNA genómico de *C. albicans* que porta el plásmido YEpHISX (**Figura 16**) indican que uno de los genes incluidos en dicho fragmento es homólogo a nivel de secuencia nucleotídica y aminoácida al gen *PRE1* de *S. cerevisiae*. Este gen codifica la subunidad 4 perteneciente a la familia de las subunidades  $\beta$  del proteosoma (*PRoteosomE*, en inglés) o *PR*oteinasa *YScE*, que fue clonado por su capacidad de restaurar la actividad proteolítica en mutantes defectivos de esta actividad en levaduras.

## 2. *CaPRE1* es el homólogo funcional en *C. albicans* del gen *PRE1* de *S. cerevisiae*

Una de las estrategias más utilizadas para clonar genes de *C. albicans* es la complementación funcional de mutantes de *S. cerevisiae* con defectos en el gen de interés.<sup>223</sup> Dado que el gen no fue obtenido utilizando esta estrategia, y con el objetivo de conocer su funcionalidad, se decidió estudiar el grado de complementación fenotípica del gen *CaPRE1* de *C. albicans* en mutantes *pre1-1* de *S. cerevisiae*.<sup>214</sup>

Los mutantes *pre1-1* tienen un fenotipo pleiotrópico que se manifiesta, entre otros, por el aumento de sensibilidad a diferentes condiciones que supongan un estrés para la célula, tales como la presencia de L-canavanina (aminoácido no-proteínico análogo a la arginina) o una temperatura elevada. En ambos casos, se forman proteínas incorrectamente plegadas o aberrantes, bien por la incorporación de la canavanina en lugar de arginina en la proteína recién sintetizada o por un incorrecto plegamiento. Estas serán reconocidas por la maquinaria de degradación proteolítica de la misma y degradadas, ya que serían tóxicas para la célula. Los mutantes *pre1-1* también se caracterizan, obviamente, por una deficiente degradación de proteínas y la acumulación de conjugados de proteínas ubiquitinadas previas a la degradación celular controlada.<sup>214</sup>

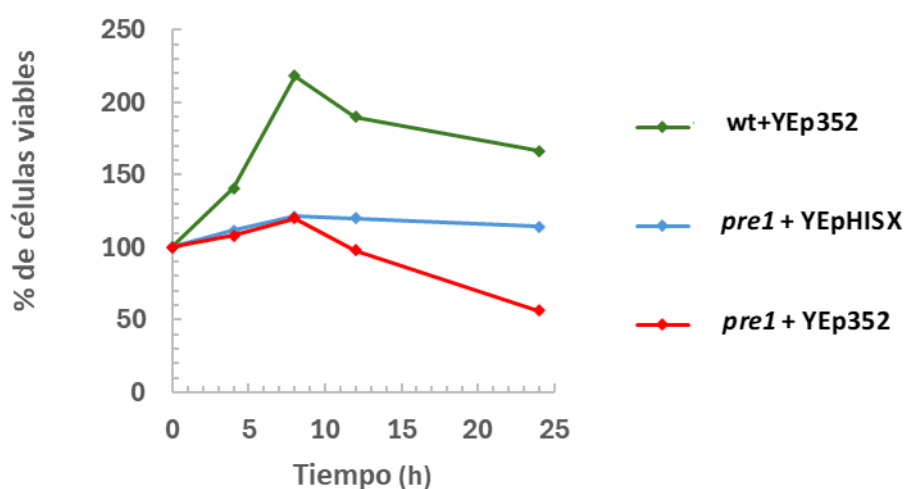
Con el fin de comprobar la capacidad de Ca*PRE1* de complementar el fenotipo del mutante *pre1* de *S. cerevisiae* se estudiaron los fenotipos de termosensibilidad a 38 °C o presencia de la canavanina. En primer lugar, se comparó el comportamiento del mutante *pre1* y su correspondiente cepa silvestre (WCG11a y WCG4, respectivamente, ver Error! Reference source not found.) en fase exponencial y sometidos a un incremento de temperatura (de 30 °C a 38 °C). La viabilidad celular se analizó a lo largo del tiempo mediante recuento de unidades formadoras de colonias (UFCs). Así, tal y como se observa en la **Figura 17**, a partir de las 12 horas, la viabilidad de la cepa mutante decrecía alcanzando un porcentaje de células viables del 68% a las 24 horas. Por otro lado, la menor viabilidad del mutante *pre1* se acentuó cuando el cambio de temperatura se realizó en cultivos a menor densidad óptica inicial (datos no mostrados).



**Figura 17. *PRE1* es esencial para la viabilidad celular ante un incremento de temperatura.**

Se muestra el porcentaje de viabilidad obtenido mediante recuento de UFCs de las cepas WCG4a (wt) y WCG4-11a (*pre1*) ante un cambio de la temperatura de incubación (de 30 °C a 38 °C) a lo largo del tiempo. El porcentaje se ha calculado considerando como 100% el número de UFCs a tiempo 0, antes del cambio de temperatura.

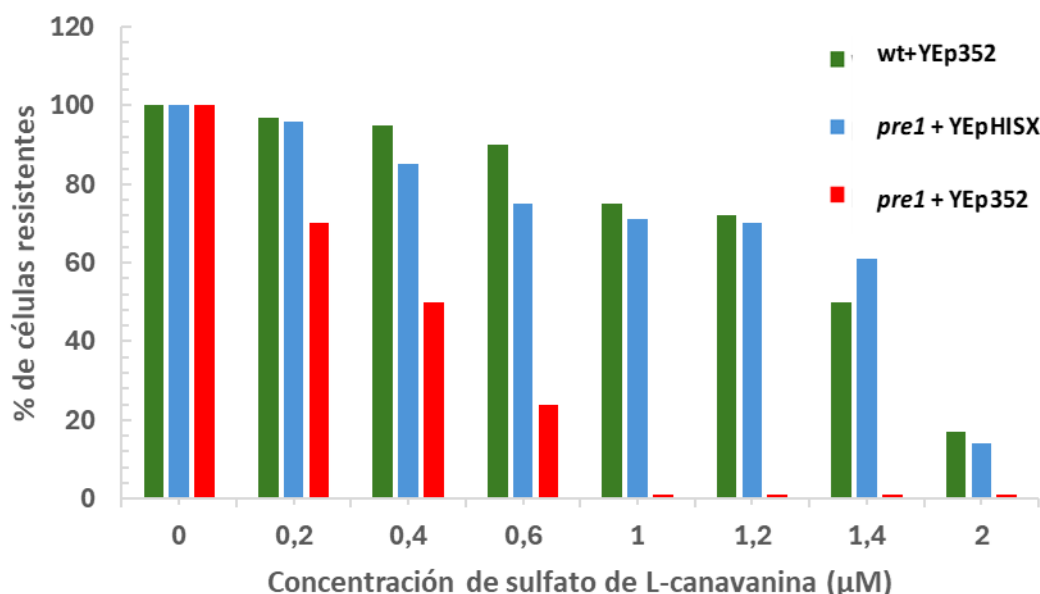
Para determinar la capacidad del gen de *C. albicans* *CaPRE1* de rescatar este fenotipo de termosensibilidad, se comparó la viabilidad ante un cambio de temperatura de 30 °C a 38 °C del mutante *pre1* transformado con el plásmido YEp352 vacío (control) o con YEpHISX que porta el inserto de *C. albicans* donde *CaPRE1* se expresa bajo el control de su propio promotor. Como control, se utilizó la cepa WCG4a (wt) transformada con el plásmido vacío (wt+YEp352). Como se puede observar, la cepa mutante transformada con el plásmido YEpHISX fue capaz de complementar el fenotipo termosensible del mutante *pre1*, mientras que el mutante *pre1* transformado con YEp352 deja de crecer a las 8 horas mostrando una viabilidad decreciente con el tiempo (**Figura 18**).



**Figura 18. Complementación del fenotipo termosensible del mutante *pre1* de *S. cerevisiae* por el inserto HISX de *C. albicans* que porta el gen *CaPRE1*.**

Ensayo de viabilidad de las cepas WCG4a (wt) y WCG4-11a (*pre1*) transformadas con el vector vacío YEp352 y/o el plásmido YEpHISX que contiene el gen *CaPRE1*. El ensayo se ha realizado en medio mínimo líquido (suplementado con His y Leu) a D.O. inicial de 0,18. Las células crecieron durante 16 horas a 30 °C tras lo cual fueron transferidas a 38 °C, y se tomaron muestras para el recuento de UFCs a lo largo del tiempo.

Cuando se analiza la capacidad del gen *CaPRE1* para complementar el fenotipo de sensibilidad a sulfato de L-canavanina se observa que, mientras el mutante con el vector YEp352 vacío no puede crecer a concentraciones de 1  $\mu$ M de sulfato de L-canavanina, la presencia del inserto HISX recupera la capacidad de crecimiento de la cepa wt hasta concentraciones de 2  $\mu$ M (**Figura 19**).



**Figura 19. Complementación del fenotipo de sensibilidad a sulfato de L-canavanina del mutante *pre1* de *S. cerevisiae* por el gen *CaPRE1*.**

Ensayo de sensibilidad a sulfato de sulfato de L-canavanina de las cepas WCG4a (wt) y WCG4-11a (*pre1*) transformadas con el vector vacío YEp352 y/o con YEpHISX. El ensayo se realizó en medio mínimo sólido suplementado con histidina y leucina y diferentes concentraciones de sulfato de sulfato L-canavanina (desde 0 a 2 μM). A continuación, se sembraron el mismo número de células en superficie, contándose las colonias formadas tras 48 horas de incubación a 38 °C. El número de células totales se obtuvo contando unidades formadoras de colonias (UFCs). El porcentaje de células resistentes se calculó considerando como 100 % el número de UFCs sin sulfato de L-canavanina.

En base a su homología en secuencia y a su capacidad de complementar los fenotipos de termosensibilidad y sensibilidad a sulfato de L-canavanina del mutante *pre1* de *S. cerevisiae*, *CaPRE1* de *C. albicans* es el homólogo funcional del gen *PRE1* de *S. cerevisiae*.

### 3. El gen *CaPRE1* es esencial en *C. albicans*

Para determinar la funcionalidad de *CaPRE1* y su posible implicación en la degradación de proteínas, el primer paso era obtener un mutante *pre1* en *C. albicans* con ambas copias del gen delecionadas, dado que se trata de una levadura diploide. Para ello, se siguió la estrategia desarrollada por Irwin & Fonzi<sup>213</sup> (descrita en Materiales y Métodos, ver **Figura 10**).

Para realizar la deleción del gen *CaPRE1* se diseñó una construcción de deleción donde todo el gen fue reemplazado por la construcción *hisG-CaURA3-hisG* y una zona homóloga al DNA genómico del locus adyacente a *CaPRE1* de ≈ 1,8 kpb de tamaño suficiente para que tuviera lugar la recombinación homóloga con eficiencia. Se procedió a transformar la cepa de *C. albicans* CAI4, auxótrofa para uracilo (Error! Reference source not found.) con la construcción indicada, seleccionando protótrofos para uracilo en medio MM Ura<sup>-</sup>. A partir de uno de los clones (cepa CNC1), tras la eliminación del marcador *URA3* se obtuvo la cepa Ura<sup>-</sup> (CNC2) que fue

transformada con la construcción de delección ya utilizada para deleccionar el primer alelo de *CaPRE1*. Se analizaron 78 transformantes, ninguno de los cuales había eliminado la copia silvestre restante del gen *CaPRE1*, habiendo sufrido recombinación homóloga en el alelo ya deleccionado en la mayoría de los casos (74). El resto de los clones (4) habían integrado la construcción en regiones diferentes del genoma.

La imposibilidad de lograr una cepa de *C. albicans* deleccionada en ambos alelos del gen *CaPRE1*, así como el hecho de que la delección cromosómica de *PRE1* es letal en *S. cerevisiae*, sugería que *PRE1* era esencial en *C. albicans*, al menos en las condiciones de laboratorio testadas.

### 3.1 Obtención de un doble mutante *his1 pre1*

Con el objetivo de demostrar la posible esencialidad del gen *CaPRE1*, y dada su proximidad cromosómica con el gen *HIS1*, se diseñó una estrategia basada en la delección de este último, bien solo o de manera simultánea a *CaPRE1*.

Para ello, se integró el casete *hisG-URA3-hisG* en la cepa CAI4 eliminando *HIS1* y parte de *CaPRE1*, obteniendo la cepa *Ura<sup>+</sup> RM2* (Error! Reference source not found.). Tras la expulsión del marcador *URA3* y selección en 5-FOA, se obtuvo la cepa *Ura<sup>-</sup> RM20* (Error! Reference source not found.). A partir de esta cepa, que tiene un alelo deleccionado de *HIS1* y *PRE1*, se procedió a deleccionar con la misma construcción el segundo alelo de ambos genes conjuntamente. Tras el análisis de más de 500 transformantes seleccionados en medio mínimo *Ura<sup>-</sup>* no se logró obtener el doble mutante *his1 pre1* auxótrofo para histidina.

Paralelamente, y haciendo uso de otra construcción de delección para *HIS1* (Materiales y Métodos), se deleccionó la segunda copia solo del gen *HIS1* en la cepa RM2. En este caso, un 25% de los clones seleccionados en *Ura<sup>-</sup>* presentaron un fenotipo *His<sup>-</sup>*, obteniendo así la cepa RM200 (homocigota para *HIS1* y heterocigota para *CaPRE1*) y, tras la expulsión del marcador *URA3*, se obtuvo la cepa ML2000 que ha sido utilizada para comprobar la esencialidad de *CaPRE1* en *C. albicans*.

Ante la imposibilidad de obtener dobles mutantes *his1pre1*, pero conseguir una cepa homocigota para *HIS1* y heterocigota para *CaPRE1*, se puede confirmar la esencialidad del gen *CaPRE1* en *C. albicans*.

### 3.2 Construcción de un mutante condicional *pre1* de *C. albicans*

Ante la imposibilidad de obtener un mutante homocigoto en *PRE1*, se generaron mutantes condicionales para, de esta forma, tener una herramienta con la que abordar el estudio de la degradación de proteínas en *C. albicans*.

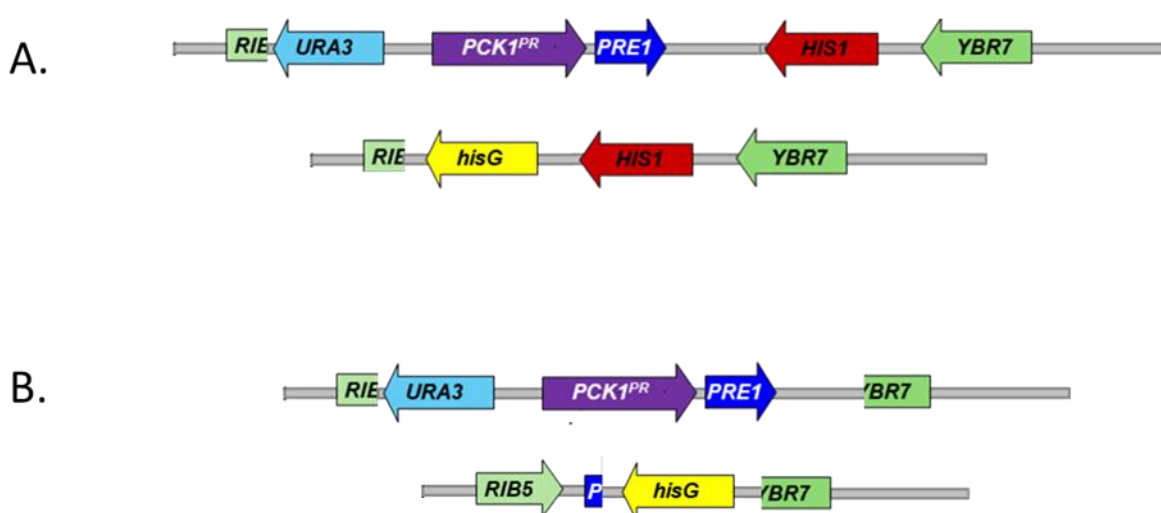
El continuo desarrollo de nuevas herramientas para la manipulación genética en *C. albicans* por algunos de los grupos de investigación de esta levadura patógena posibilitó, en 1997, elegir una

estrategia de obtención de mutantes condicionales fundamentada en el uso de promotores regulables. En aquel momento, se habían descrito algunos como los de los genes *GAL1*,<sup>248</sup> *MAL2*,<sup>249</sup> *HEX1*<sup>250</sup> y *PCK1*.<sup>225</sup>

El promotor del gen *PCK1*<sup>225</sup> de *C. albicans* es un promotor regulable por diferentes fuentes de carbono, de manera que en presencia de glucosa se reprime la expresión del gen, mientras que su expresión se induce en presencia de otras fuentes de carbono, como sacarosa, succinato o etanol. Esto se debe a que el gen *CaPCK1* codifica la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa de *C. albicans*, enzima que participa en la ruta de la gluconeogénesis y en la biosíntesis de carbohidratos, catalizando la descarboxilación del oxalacetato para rendir fosfoenolpiruvato y dióxido de carbono.<sup>251</sup>

La estrategia elegida requería, en primer lugar, la subclonación del ORF de *CaPRE1* bajo el control del promotor del gen *CaPCK1* y, en segundo lugar, integrar esta construcción en la región *CaPRE1* de las cepas CNC2 (heterocigota para *PRE1*) y ML2000 (homocigota para *HIS1* y heterocigota para *PRE1*). Esto conduciría a la generación de cepas letales condicionales donde la expresión del gen *PRE1* es dependiente de la fuente de carbono.

La selección de los transformantes se realizó en MM Ura<sup>-</sup> a 30 °C con sacarosa como única fuente de carbono (condiciones de expresión) para, posteriormente, seleccionar aquellos que no crecían en medios con glucosa como fuente de carbono (condiciones de represión del promotor *PCK1*). Así, se obtuvieron las cepas HS10 (fondo CNC2) y HS20 (fondo ML2000), las cuales fueron utilizadas para los posteriores estudios de caracterización fenotípica y de funcionalidad de *CaPRE1* en *C. albicans* (Figura 20).



**Figura 20** Esquema del genotipo de mutantes condicionales *pre1* de *C. albicans*.

Se muestra la región genómica de *PRE1* de la cepa HS10 (A) y la cepa HS20 (B) en las que se ha integrado la copia de *CaPRE1* bajo el promotor regulable de fuente de carbono (*PCK1<sup>PR</sup>*).

### 3.2.1 Caracterización fenotípica de mutantes *pre1*

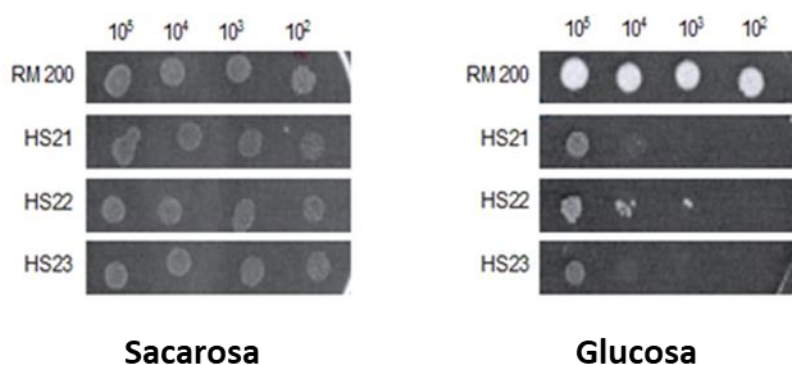
Para abordar el estudio del papel que juega el proteosoma en la ruta de degradación proteolítica en *C. albicans* se llevó a cabo, en primera instancia, la caracterización funcional de los mutantes condicionales generados. Para facilitar el seguimiento del lector, en la siguiente **Tabla 5** se muestran las cepas utilizadas en este apartado (el genotipo completo puede consultarse en la **Tabla 1**).

**Tabla 5. Mutantes condicionales en el gen *CaPRE1* y sus correspondientes cepas parentales.**

Cepa	Características	Fenotipo	Utilidad
CNC1	Heterozigota <i>CaPRE1</i>	His <sup>+</sup> Ura <sup>+</sup>	Control en ensayos con HS10
CNC2	Heterozigota <i>CaPRE1</i>	His <sup>+</sup> Ura <sup>-</sup>	Parental de HS10
<b>HS10</b>	Expresa <i>PRE1</i> bajo el control <i>PCK1</i> <sup>PR</sup>	His <sup>+</sup> Ura <sup>+</sup>	<b>Mutante condicional</b>
RM200	Homozigota <i>CaHIS1</i> y heterozigota <i>CaPRE1</i>	His <sup>-</sup> Ura <sup>+</sup>	Control en ensayos con HS20
ML2000	Homozigota <i>CaHIS1</i> y heterozigota <i>CaPRE1</i>	His <sup>-</sup>	Parental de HS20
<b>HS20</b>	Expresa <i>PRE1</i> bajo el control <i>PCK1</i> <sup>PR</sup>	His <sup>-</sup> Ura <sup>+</sup>	<b>Mutante condicional</b>

#### *La represión de *PRE1* provoca defectos en crecimiento*

Para comprobar el fenotipo condicional, se realizó un ensayo de gotas en medio mínimo sin uracilo, en presencia de sacarosa o glucosa como fuentes de carbono, a partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento. Tras 24 horas de incubación a 37 °C, como se puede observar en la **Figura 21** en condiciones de expresión (sacarosa) todas las cepas crecen igual. Sin embargo, en condiciones de represión de *CaPRE1* (glucosa) el crecimiento del mutante condicional se redujo drásticamente en los distintos clones analizados.

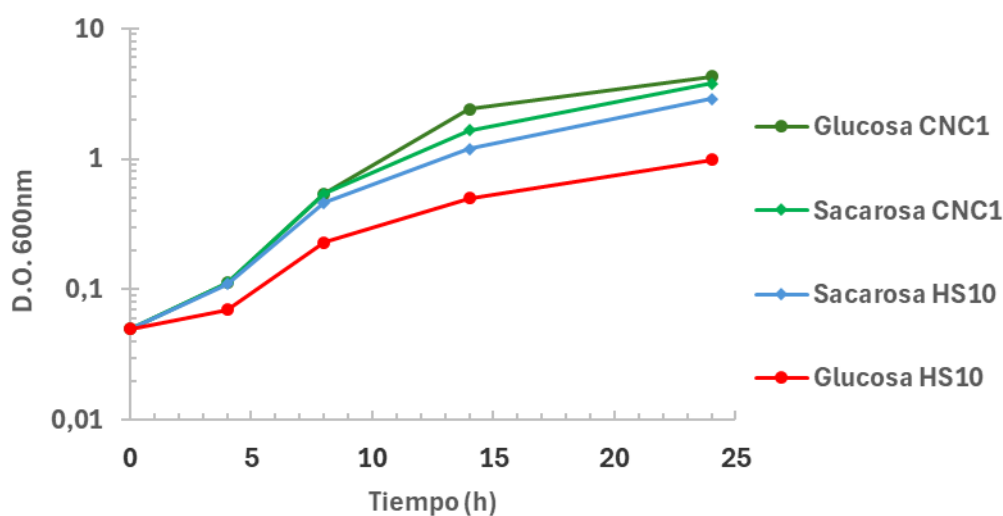


**Figura 21. Crecimiento en medio sólido de un mutante condicional en *CaPRE1* dependiente de la fuente de carbono.**

Diferencias de crecimiento en medio sólido de 3 clones independientes del mutante condicional (cepa HS20) y la cepa parental (RM200) en condiciones de represión (glucosa) o expresión (sacarosa) de *CaPRE1* tras de 24 h de crecimiento a 37 °C.

### Estudio de la capacidad de crecimiento en medio líquido

Dado el defecto en crecimiento en medio sólido, se planteó evaluar si la carencia de la subunidad proteosomal CaPre1p afectaba a la capacidad de crecimiento en medio líquido. Para ello, se realizaron medidas de absorbancia a lo largo del tiempo de cultivos de las cepas HS10 y CNC1 en medio SD líquido en condiciones de inducción (glucosa) o represión (sacarosa) a 37 °C. Como se puede observar en la **Figura 22**, las absorbancias alcanzadas tras 24 h de crecimiento fueron similares en la cepa parental CNC1 (independientemente del medio de cultivo) y el mutante en condiciones de expresión (sacarosa). Sin embargo, en condiciones de represión (glucosa), el mutante muestra defectos en crecimiento con Tg mayores (240 min. vs 160 min., en glucosa y sacarosa respectivamente), y no llega a alcanzar D.O.  $_{600\text{ nm}}$  de 1. Como era de esperar, el crecimiento de la cepa control no se vio alterado por la fuente de carbono del medio, mostrando Tg similares al mutante en condiciones de inducción (135 min. vs 140 min., en glucosa y sacarosa). Estos resultados sugieren que la represión de CaPRE1 parece tener un efecto fungistático en las condiciones ensayadas en el laboratorio.



**Figura 22. Capacidad de crecimiento del mutante condicional HS10.**

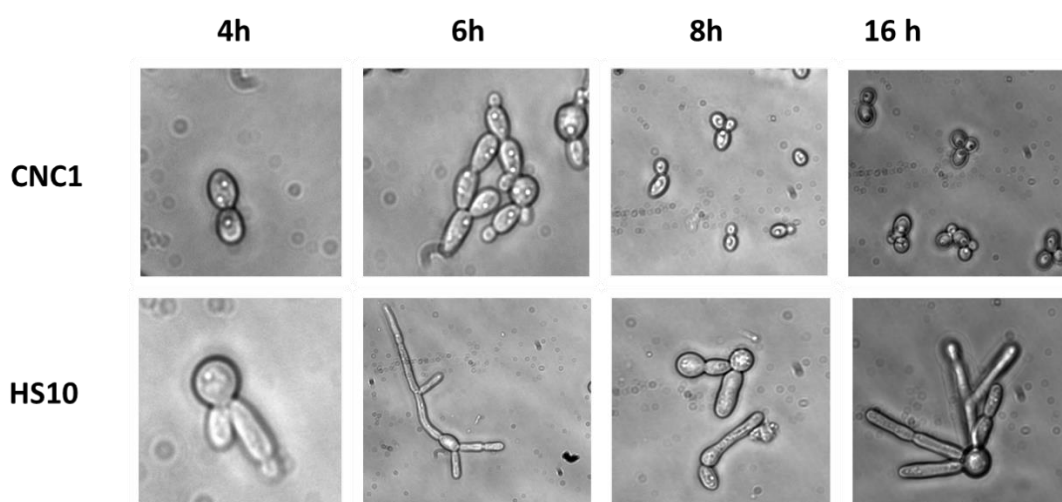
Se muestran las medidas de absorbancias a lo largo del tiempo de cultivos del mutante condicional HS10 y de la cepa parental CNC1 inoculados a D.O.  $_{600\text{ nm}}$  inicial de 0,01 en SD glucosa (represión) y SD sacarosa (inducción).

### La represión de PRE1 afecta a la morfología celular de *C. albicans*

Otro de los aspectos que se analizó, fue el efecto de la represión de PRE1 en la morfología celular, que fue evaluado mediante microscopía óptica. Tras 16 horas de crecimiento a 37 °C en condiciones de inducción (SD sacarosa), las células del mutante condicional (HS10) y su correspondiente cepa parental (CNC1) se diluyeron D.O.  $_{600\text{ nm}}$  de 0,1 en condiciones de represión

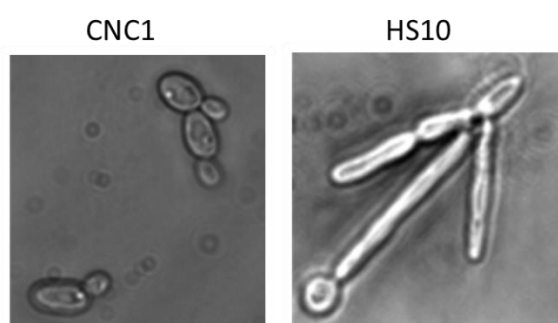
(SD glucosa) y se incubaron a 37 °C, evaluando su morfología a lo largo del tiempo. Como se puede observar en las imágenes (**Figura 23**), mientras que la cepa silvestre muestra un fenotipo levaduriforme, la represión de *PRE1* induce un fenotipo muy característico, observándose una morfología celular aberrante y donde existen varios puntos de filamentación simultáneos.

Para poder determinar si dicha alteración era reversible, tras 8 horas de cultivo en condiciones de represión (glucosa), se tomaron muestras y, tras una dilución en PBS (1:10), se inocularon en medio con sacarosa. Como se puede observar (**Figura 24**), tras 18 horas de crecimiento en condiciones de inducción se mantuvo la morfología celular aberrante, lo que sugiere que se trata de un fenotipo irreversible.



**Figura 23. Morfología celular del mutante condicional *PRE1* en condiciones de represión.**

Imágenes de microscopía óptica del mutante condicional HS10 y la cepa parental heterocigota CNC1 de *C. albicans* en condiciones de represión del gen *CaPRE1* (glucosa) a diferentes tiempos.



**Figura 24. La morfología celular del mutante condicional es irreversible.**

Imágenes de microscopía óptica del mutante condicional HS10 y la cepa parental heterocigota CNC1 procedentes de cultivos en condiciones de represión (glucosa) y tras 18 horas en condiciones de inducción (sacarosa).

La construcción de mutantes condicionales dependientes de fuente de carbono en *CaPRE1* permitió observar como la deficiencia de la subunidad beta-4 del proteosoma afecta al crecimiento celular en medio sólido y en medio líquido, mostrando un efecto fungistático, y originando una morfología celular aberrante e irreversible.

#### 4. Estudio funcional de *CaPRE1* en un mutante condicional dependiente de doxiciclina

Con el objetivo de estudiar y caracterizar la función del proteosoma en *C. albicans*, el mutante condicional generado no parecía la mejor opción, dado que la expresión de *CaPRE1* dependía de un cambio en la fuente de carbono. Esto puede afectar a diferentes vías metabólicas, y podría enmascarar o influir en análisis funcionales posteriores.

Por ello, llegados a este punto, se generaron nuevos mutantes, donde la regulación de la expresión dependía de la presencia o ausencia de doxiciclina. La obtención de estas cepas se llevó a cabo por la Dra. Elvira Román, que forma parte del grupo de investigación que dirige el Dr. Jesús Pla, mediante CRISPR y haciendo uso del sistema de expresión<sup>252</sup> *TET<sup>OFF</sup>*, con el que tienen amplia experiencia.<sup>253</sup> Este sistema permite expresar cualquier gen de manera constitutiva en ausencia de doxiciclina y reprimir su expresión en presencia de doxiciclina.

En un primer paso se integró, en el locus de *ADH1*, la construcción *TET<sup>OFF</sup>-PRE1-URA3*, que permitía expresar ectópicamente *CaPRE1* dependiente de tetraciclina. Posteriormente, se procedió a delecionar ambos alelos del gen expresando una guía de RNA por fuera del ORF (para evitar el corte en *PRE1* ectópico) en presencia de Cas9 y de dos DNA donadores con distintos marcadores de selección (*SAT1*, que confiere resistencia a noursotricina, e *HygB*, que confiere resistencia a higromicina B). Ambos marcadores son dominantes, por lo que esta estrategia permite la delección del gen en aislamientos clínicos o cepas que no tengan ninguna auxotrofia. La cepa así generada, que se denominó ML1113 (Error! Reference source not found.), ha sido caracterizada y utilizada para el estudio del papel funcional del proteosoma en *C. albicans*. A partir de ahora para facilitar la lectura de esta memoria, nos referiremos a la cepa ML1113 en condiciones de represión de la expresión del gen *PRE1* (presencia de doxiciclina) como *PRE1<sup>OFF</sup>*, y en condiciones de inducción de la expresión de *PRE1* (ausencia de doxiciclina), como *PRE1<sup>ON</sup>* (Tabla 6).

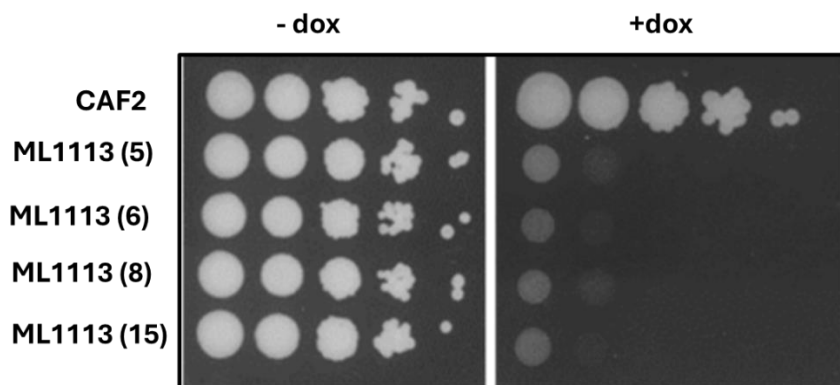
**Tabla 6. Nomenclatura de cepas y condiciones de inducción/represión**

Cepa	Condiciones	Nombre abreviado
CAF2	- doxiciclina 10 µg/mL	Wt
CAF2	+ doxiciclina 10 µg/mL	Wt + dox
ML1113	- doxiciclina 10 µg/mL	<i>PRE1<sup>ON</sup></i>
ML1113	+ doxiciclina 10 µg/mL	<i>PRE1<sup>OFF</sup></i>

##### 4.1 La represión de *CaPRE1* afecta al crecimiento celular

Como primera aproximación, se comprobó si el mutante generado presentaba los fenotipos asociados a la deficiencia de Pre1 observados en el mutante condicional donde *PRE1* se expresa

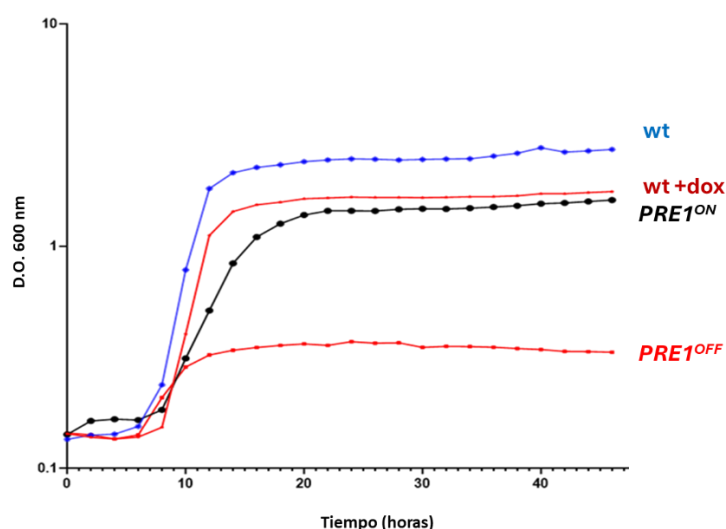
bajo el control del promotor regulable de *PCK1*. Por ello, en primer lugar, se evaluó el defecto de Pre1 en el crecimiento, tanto en medio sólido como en medio líquido.



**Figura 25. Ensayo de crecimiento en gota de mutantes condicionales *PRE1*.**

Diluciones seriadas a partir de una suspensión a D.O.= 0,8 se depositaron sobre placas de YPD suplementado o no con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de doxiciclina (+/- dox). Las placas se incubaron a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Se analizaron 4 clones de la cepa ML1113.

Tal y como se puede observar en la **Figura 25**, en presencia de doxiciclina (condiciones de represión) se inhibe el crecimiento de distintos clones del mutante condicional mientras que el crecimiento de la cepa silvestre isogénica (CAF2) no se ve afectado ni en presencia ni en ausencia de doxiciclina. Este mismo efecto se observó cuando se analizó el crecimiento en medio líquido (Error! Reference source not found.). Para ello, se evaluó la cinética de crecimiento a 37  $^{\circ}\text{C}$  en medio YPD suplementado o no con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de doxiciclina, mediante medidas de densidad óptica a lo largo del tiempo.

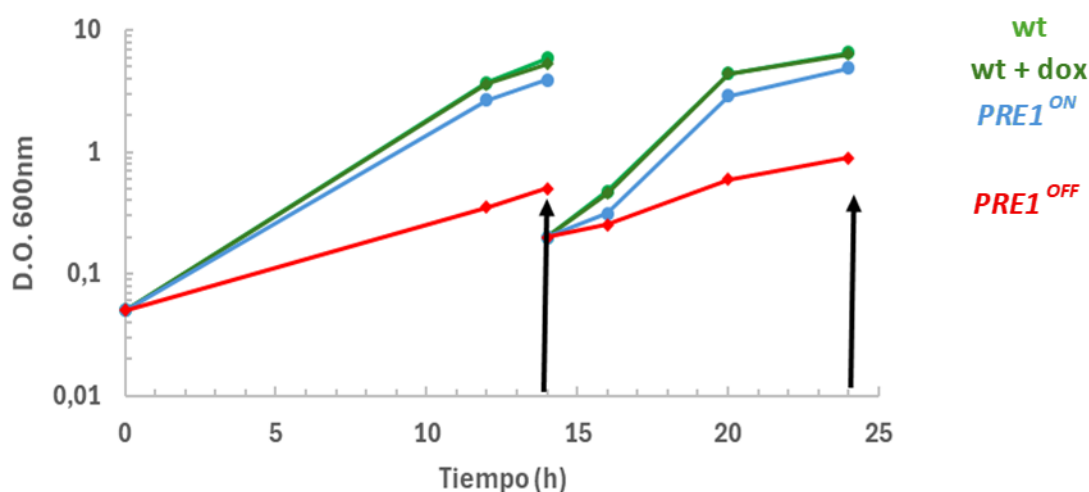


**Figura 26. Crecimiento en medio líquido en condiciones de expresión/represión de *PRE1*.**

Las células de las cepas indicadas fueron inoculadas en placa multipocillo a D.O. inicial de 0,1 en medio YPD suplementado o no con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de doxiciclina (+dox) e incubadas a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Se realizaron mediciones de la absorbancia a  $\lambda$  600 nm cada 60 minutos. Se muestran en escala logarítmica la media de tres experimentos independientes.

Como se puede observar, el mutante condicional en ausencia de doxiciclina ( $PRE1^{ON}$ ) tiene mayor tiempo de generación, estimándose en 97 min, que la cepa parental CAF2 cuyo tiempo de generación fue de 90 min. En condiciones de represión (+ doxiciclina), el tiempo de generación del mutante condicional ( $PRE1^{OFF}$ ) fue mayor, estimándose de 145 minutos, y los valores de densidad óptica fueron mucho menores (no alcanza densidades ópticas de 1).

A continuación, debido a que la expresión del gen  $CaPRE1$  está regulada y al ser un gen esencial, fue necesario establecer unas condiciones de crecimiento y los tiempos adecuados para todos los experimentos que se comentan en adelante. Como se indica en la **Figura 27**, las células se inoculaban a una D.O. inicial de 0,05 en medio MM con o sin doxiciclina y se incubaban a 37 °C durante 14 horas, momento en el que se recogían las células o se diluían a una D.O. de 0,2 en condiciones de expresión o represión del gen y se incubaban a 37 °C durante 10 horas.



**Figura 27. Puesta a punto de las condiciones idóneas para el estudio del mutante condicional  $pre1$ .**

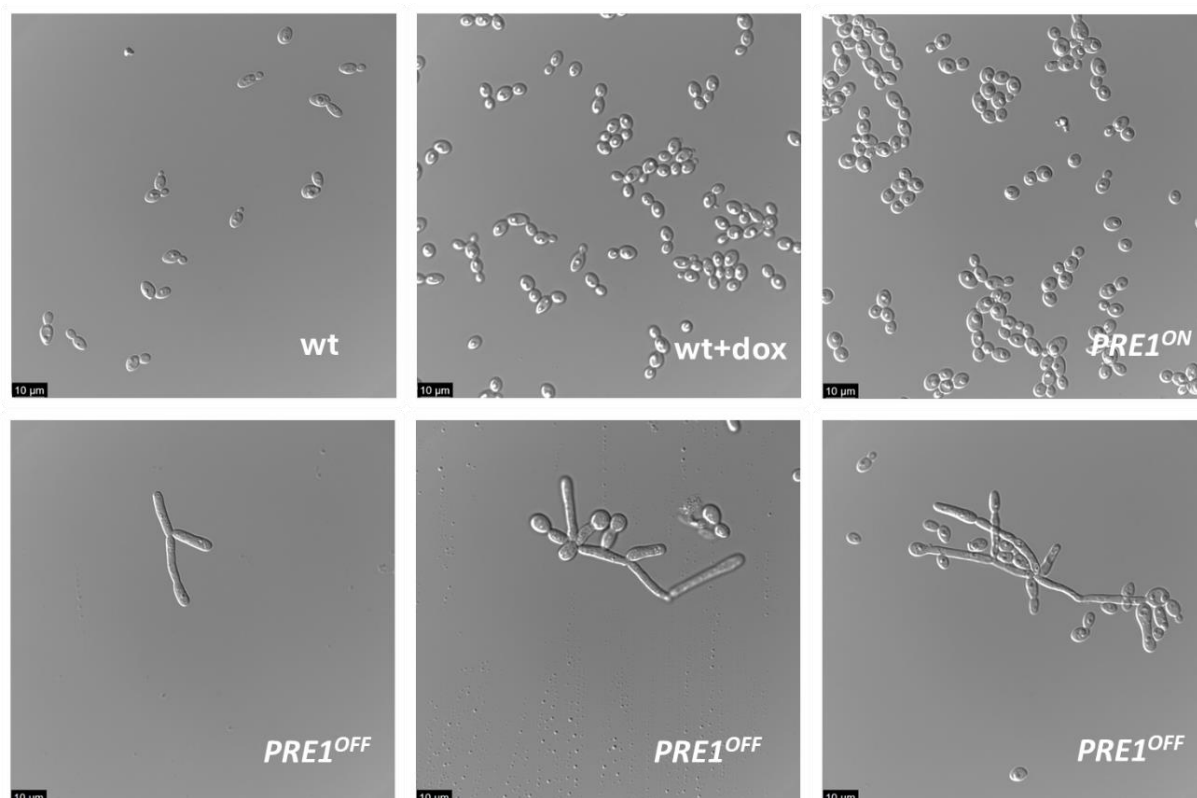
Se han establecido las condiciones de crecimiento del mutante condicional (ML1113) y de la cepa parental (CAF2) en MM  $\pm$  10  $\mu$ g/mL de doxiciclina (dox), con un inóculo inicial con a una D.O.600 nm de 0,05 y a 37 °C. Los datos se representan en escala logarítmica y se señalan, con una flecha, los tiempos elegidos para la toma de muestras.

#### 4.2 La represión de $CaPRE1$ produce una morfología celular aberrante

Para confirmar el fenotipo aberrante que se había observado en los mutantes condicionales dependientes de fuente de carbono, se analizó la morfología celular del mutante condicional durante el crecimiento en medio líquido en condiciones de represión o expresión constitutiva.

En todos los experimentos se utilizó como control la cepa silvestre CAF2, para evaluar el efecto de la doxiciclina en la población celular.

Cuando se analizan las células por microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC), en condiciones de represión ( $PRE1^{OFF}$ ) se puede observar una población heterogénea, con predominio de morfologías filamentosas. Las células, además, son de mayor tamaño, con crecimiento no controlado, alargadas, con formas aberrantes y defectos en la separación celular, y presentan, en algunos casos, más de una yema. El crecimiento de hifas es desproporcionado y los filamentos presentan compartimentos celulares de anchura variable y formas aberrantes. Por su parte, en el caso de la cepa silvestre se observaron células en forma levaduriforme tanto en presencia como en ausencia de doxiciclina como en el caso de  $PRE1^{ON}$  (Figura 28).

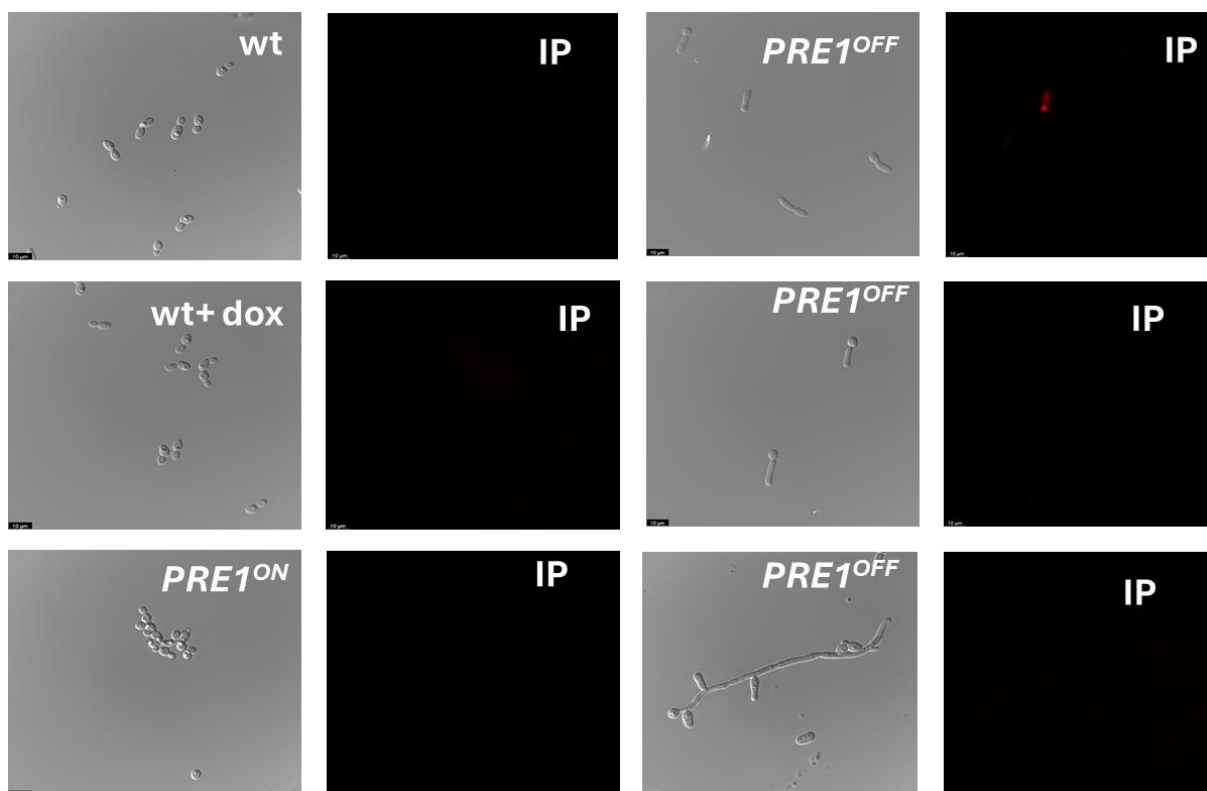


**Figura 28. Caracterización morfológica del mutante condicional en condiciones de inducción y represión de CaPRE1.**

Células incubadas en medio MM  $\pm$  doxiciclina (dox) a 37 °C durante 14 horas y observadas en fresco mediante microscopía DIC. La barra de escala (en negro) corresponde a un tamaño de 10  $\mu$ m.

A continuación, para determinar si el fenotipo aberrante observado estaba asociado a una pérdida de viabilidad celular se realizó una tinción con yoduro de propidio (IP), fluorocromo que solo penetra en células en las que la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática se ha perdido.

Los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia (Figura 29) muestran que, en estas condiciones de ensayo, la mayor parte de las células son viables ya que no se observan células IP positivas. En el mutante condicional ( $PRE1^{OFF}$ ), se observaron algunas células IP<sup>+</sup>, pero el porcentaje no es significativo.



**Figura 29. Estudio de viabilidad celular de *PRE1*<sup>OFF</sup>.**

Tras 14 horas de crecimiento a 37 °C en medio MM +/- doxiciclina (dox), las células de las cepas indicadas se tiñeron con ioduro de propidio (IP) y se observaron mediante microscopía DIC y de fluorescencia. La barra de escala (en negro) corresponde a un tamaño de 10 µm.

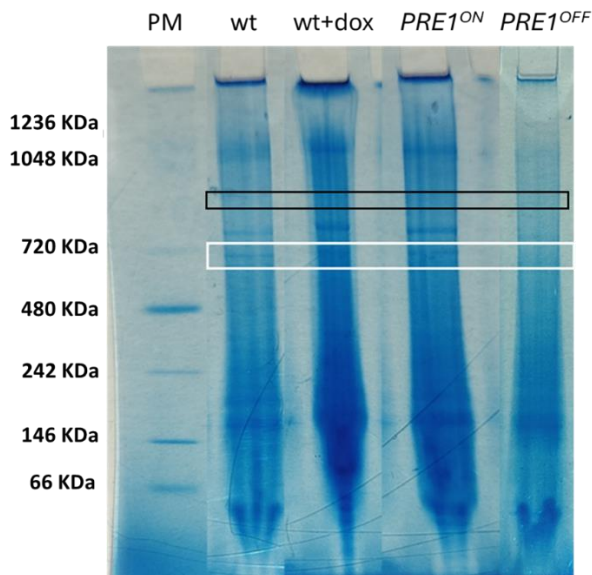
La subunidad beta-4 del proteosoma es esencial para el crecimiento celular de *C. albicans*. La presencia de doxiciclina no afecta al crecimiento ni a la morfología celular de la cepa silvestre, por lo que el fenotipo aberrante y filamentoso del mutante condicional se debe exclusivamente a la represión de Ca*PRE1*, sin afectar a la viabilidad celular en los tiempos y condiciones de ensayo.

## 5. Ensamblaje del complejo 20S del proteosoma cuando se reprime la expresión de Ca*PRE1*

Con el fin de comprobar el estado del complejo del proteosoma cuando hay una deficiencia de Pre1, cepa de estudio *PRE1*<sup>OFF</sup>, se llevó a cabo un experimento de electroforesis nativa *Blue-Native* (BN-PAGE), que es la técnica de elección para la separación y caracterización de complejos proteicos e interacciones entre proteínas. Esta electroforesis nativa en gel de poliacrilamida no utiliza el detergente SDS, para evitar desnaturalizar las proteínas, y hace uso del colorante azul de Coomassie, para otorgar una carga negativa al complejo proteico y estabilizarlo. De esta manera, la migración de los complejos dependerá únicamente de su peso molecular.<sup>254</sup>

Tal y como se ha comentado en el apartado de Introducción, el núcleo del proteosoma 20S, compuesto por 28 subunidades organizadas en cuatro anillos, tiene un peso molecular aproximado de 700 kDa,<sup>140</sup> mientras que la partícula reguladora 19S, que se subdivide en base y tapa, tiene un peso molecular cercano a los 900 kDa.<sup>255</sup> Cuando el núcleo 20S se asocia con una o dos unidades 19S, se forma el proteosoma 26S y 30S, respectivamente, con un peso molecular total estimado entre 1.4 y 2.5 MDa.<sup>256,257</sup>

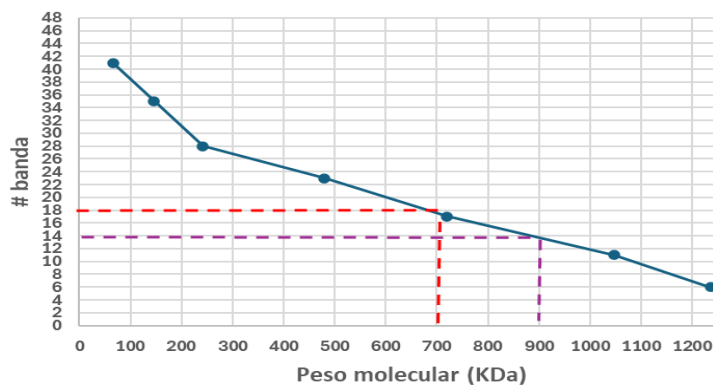
Se cargaron en el gel, los extractos proteicos de las cepas CAF2 y ML1113, tras 14 horas de crecimiento a 37 °C, en medio MM líquido en ausencia y en presencia de doxiciclina, que se separaron mediante BN-PAGE. La cepa ML1113 se analizó por triplicado en ambas condiciones (Figura 30).



**Figura 30. Separación de complejos proteicos mediante electrofóresis nativa (BN-PAGE).**

La banda correspondiente al complejo catalítico 20S del proteosoma se indica con un rectángulo blanco; la correspondiente a la parte reguladora del proteosoma 19S con un rectángulo de color negro. PM, peso molecular.

A continuación, teniendo en cuenta el marcador de pesos moleculares y los pesos teóricos de los complejos 20S y 19S, se realizó un análisis de regresión lineal (Figura 31). Según este análisis, se decidió analizar las bandas 14 y 18 del gel nativo.



**Figura 31. Localización de los complejos del proteosoma 20S y 19S en el gel nativo.**

Utilizando los marcadores de peso molecular (PM) y dividiendo cada carril del gel en 48 bandas, se generó un modelo de regresión lineal para poder estimar el intervalo de pesos moleculares de los complejos 20S (rojo, banda 18) y 19S (morado, banda 14).

A continuación, para identificar los componentes proteicos de estas bandas, se siguió el protocolo de digestión de proteínas en gel y posterior análisis por espectrometría de masas de alta resolución (timsTOF) acoplado a nanocromatografía líquida y en modo de adquisición DDA (*Data Dependent Analysis*).

Según el análisis de los resultados de espectrometría de masas, se identifican los componentes del complejo 26 del proteosoma, aunque por su gran tamaño no se puede aislar este complejo completo y ensamblado.

**Tabla 7. Datos del análisis de proteómica de espectrometría de masas de los complejos de proteosoma.**

Factor de abundancia de espectros normalizado (NSAF) de cada subunidad del proteosoma en las muestras de las cepas *PRE1<sup>ON</sup>*, y *PRE1<sup>OFF</sup>* y la cepa parental en presencia (wt dox) y ausencia de doxiciclina (wt). Los valores de NSAF se marcan en color degradado desde el mayor en rojo a menor en verde. La relación del recuento de espectros que indican la *ratio* de la abundancia, se ha marcado en escala de tamaño (de mayor, en rojo, a menor, en azul)

	Nombre del gen	Subunidad	NSAF wt	NSAF wt dox	NSAF <i>PRE1<sup>ON</sup></i>	NSAF <i>PRE1<sup>OFF</sup></i>	<i>Ratio PRE1<sup>OFF</sup>/PRE1<sup>ON</sup></i>
20 S parte catalítica	<i>SCL1</i>	$\alpha$ -1	12,03	11,40	14,68	1,64	0,11
	<i>PRE8</i>	$\alpha$ -2	7,24	9,19	8,92	1,17	0,13
	<i>PRE9</i>	$\alpha$ -3	6,30	8,74	11,42	1,64	0,14
	<i>PRE6</i>	$\alpha$ -4	7,09	6,94	8,77	1,17	0,13
	<i>PUP2</i>	$\alpha$ -5	11,65	12,39	13,78	0,07	0,01
	<i>PRE5</i>	$\alpha$ -6	7,63	7,81	8,94	1,87	0,21
	<i>PRE10</i>	$\alpha$ -7	8,11	8,61	9,26	1,64	0,18
	<i>PRE3</i>	$\beta$ -1	4,49	6,65	6,49	0,70	0,11
	<i>PUP1</i>	$\beta$ -2	2,28	4,27	3,13	0,70	0,22
	<i>PUP3</i>	$\beta$ -3	7,88	8,10	8,69	1,40	0,16
	<i>PRE1</i>	$\beta$ -4	2,94	3,92	4,00		
	<i>PRE2</i>	$\beta$ -5	3,60	5,05	4,87	1,17	0,24
	<i>PRE7</i>	$\beta$ -6	9,51	8,28	9,68	0,06	0,01
	<i>PRE4</i>	$\beta$ -7	10,38	9,89	8,86	1,40	0,16
19S base	<i>RPT1</i>		3,27	2,59	4,16	7,61	1,83
	<i>RPT2</i>		2,25	1,75	2,86	7,14	2,50
	<i>RPT3</i>		3,45	2,03	3,73	7,14	1,91
	<i>RPT4</i>		2,84	3,18	3,86	7,14	1,85
	<i>RPT5</i>		3,30	2,87	4,65	9,51	2,05
	<i>RPT6</i>		4,29	2,50	3,94	7,61	1,93
	<i>RPN1</i>		2,41	1,33	1,70	14,27	8,40
	<i>RPN2</i>		0,46	0,99	1,19	9,51	8,01
	<i>RPN13</i>						
	<i>RPN10</i>						
19S tapa	<i>RPN3</i>		3,51	2,00	3,98	9,51	2,39
	<i>RPN5</i>						
	<i>RPN6</i>		0,70	0,29	0,70	2,85	4,08
	<i>RPN7</i>		0,25	0,42	0,33	1,90	5,83
	<i>RPN8</i>						
	<i>RPN9</i>		2,12	0,75	2,21	6,18	2,80
	<i>RPN11</i>		0,43	0,60	0,60	1,43	2,38
	<i>RPN12</i>						

En el análisis de la banda correspondiente a 900 KDa, se identificaron las proteínas de la región 19S del proteosoma en todas las muestras analizadas, a excepción de las proteínas Rpn10 y

Rpn13 de la base y las proteínas Rpn5, Rrpn8 y Rpn12 de la tapa. En cuanto a la parte catalítica 20S del proteosoma, se identificaron las 14 subunidades del proteosoma 20S, tanto las 7 subunidades alfa como las 7 subunidades beta, incluyendo la subunidad beta-4 que codifica el gen *CaPRE1*. Sin embargo, en las muestras procedentes del mutante *PRE1<sup>OFF</sup>*, no se detectó la subunidad  $\beta$ -4 codificada por el gen *CaPRE1*, y se identificaron en cantidades insignificantes las subunidades  $\alpha$  5 y  $\beta$ -6.

Como el complejo parece no estar completo cuando el gen *PRE1* está reprimido, se realizó un análisis de cuantificación en cada cepa y condición para estudiar la estequiometría de las subunidades que conforman el proteosoma. Cuando se cuantifica relativamente por NSAF (*Normalized Spectral Abundance Factor*) (Tabla 7), se puede observar claramente cómo en el mutante condicional en condiciones de represión, los componentes del complejo 20S son mucho menos abundantes que cuando el gen *CaPRE1* tiene expresión constitutiva o en la cepa parental, según la *ratio* *PRE1<sup>OFF</sup>/PRE1<sup>ON</sup>* (*ratio* en azul) con valores entre 0,01 y 0,24. Además, curiosamente, la parte reguladora 19S está significativamente aumentada en la cepa *PRE1<sup>OFF</sup>*, según la *ratio* *PRE1<sup>OFF</sup>/PRE1<sup>ON</sup>* (*ratio* en rojo) con valores de *ratios* desde 1,83 hasta 8,40. Los valores de abundancia de la cepa parental fueron similares en ausencia y presencia de doxiciclina, corroborando que la doxiciclina no afecta al ensamblaje del proteosoma, siendo similares a los valores de abundancia de *PRE1<sup>ON</sup>*.

Es reseñable, que en estas condiciones de represión de la expresión de *CaPRE1*, el proteosoma 20S no está ensamblado completamente: hay 2 subunidades muy poco expresadas ( $\alpha$ 5 y  $\beta$ 6), la subunidad  $\beta$ 4 es indetectable, y además el resto de las subunidades son menos abundantes que cuando el proteosoma se está expresando en condiciones normales. A diferencia, las subunidades del complejo regulador 19S están aumentadas en abundancia cuando se reprime la expresión de *PRE1*.

## 6. Análisis proteómico del efecto de la represión del gen *CaPRE1*

Para profundizar en el conocimiento de la degradación de proteínas vía el proteosoma y determinar qué proteínas son sustratos de este sistema de degradación proteica, así como los mecanismos y las rutas que se ven afectadas si este está inhibido, se realizó una aproximación proteómica cuantitativa a gran escala.

Como estrategia proteómica cuantitativa, se optó por la proteómica de expresión diferencial *label free* (exenta de marcaje), y la metodología DIA (*Data Independent Analysis*), que permite una mejor caracterización y cuantificación del proteoma y es más reproducible. Se utilizó para su análisis un equipamiento de espectrometría de masas de última generación (timsTOF).

Una vez obtenida toda la información, el tratamiento bioinformático de todos estos datos proporcionará una visión general e integrada de los mecanismos de degradación de proteínas

por la vía proteosomal en la levadura *C. albicans* y permitirá determinar si Pre1p puede postularse como posible diana para el desarrollo de nuevos antifúngicos.

El análisis de proteómica cuantitativa se llevó a cabo con el mutante condicional (ML1113), analizando el efecto de la represión de CaPRE1 mediante el cálculo de las *ratios* de abundancia para cada proteína entre  $PRE1^{OFF}$  y  $PRE1^{ON}$  ( $PRE1^{OFF}/PRE1^{ON}$ ). De esta manera, las proteínas con abundancias aumentadas serán aquellas que se acumulan en la cepa con la subunidad codificada por  $PRE1$  reprimida ( $PRE^{OFF}$ ) y serán potenciales sustratos (directos o indirectos) de la degradación por la vía proteosomal. Esto, en última instancia, permitirá obtener un catálogo de proteínas reguladas y degradadas por el complejo del proteosoma.

Se han analizado 3 réplicas biológicas de la cepa generada ML1113 en ambas condiciones, al tiempo seleccionado de 14 horas de incubación en MM a 37 °C en fase exponencial. Se comparan relativamente las proteínas de  $PRE1^{OFF}$  y  $PRE1^{ON}$ , para: 1) analizar el efecto de la represión del proteosoma con un diseño no pareado, ya que son muestras obtenidas de forma independiente; y 2) calcular las *ratios*, considerando solo aquellas proteínas que estén presentes al menos en dos réplicas de un grupo y con más de 1 péptido identificado. Los datos obtenidos del análisis proteómico se muestran en la **Tabla 8**. El número de proteínas identificadas fueron 4945 proteínas, con un FDR<0,01. De estas, 4780 (el 97%) se han cuantificado, lo que consolida la estrategia cuantitativa DIA-MS como una metodología potente para las aproximaciones proteómicas cuantitativas.

**Tabla 8. Datos de los resultados del análisis de proteómica cuantitativa mediante DIA de la cepa ML1113**

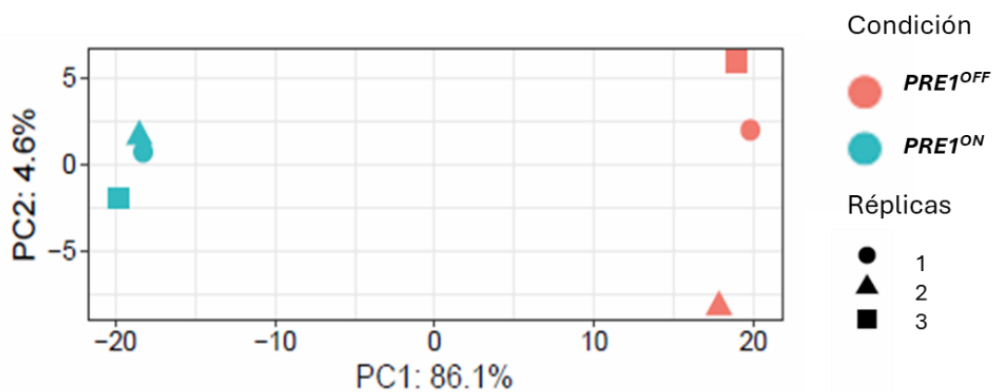
Proteínas	Número	Porcentaje del total
Identificadas	4945	79,5 % de los ORFs de la base de datos
Cuantificadas	4780	97% de las proteínas identificadas
Cuantificadas ( $\geq 2$ péptidos)	4319	87% de las proteínas identificadas
Significativas	1838	43% de las proteínas cuantificadas
No significativas	2481	57% de las proteínas cuantificadas

Para determinar las proteínas con abundancia diferencial significativa se aplicaron los siguientes criterios: *q-value* (*p-value* ajustado) <0,05;  $\log_2$  *ratio* > 0,58 (1,5 número de veces mayor) en la muestra como indicativo de proteínas aumentadas en condiciones de represión  $PRE1^{OFF}$ ;  $\log_2$  *ratio* <0,58 (1,5 número de veces menor) como indicativo de proteínas con abundancia disminuida en  $PRE1^{OFF}$ . El 42% de las proteínas cuantificadas son significativamente diferenciales en abundancia, mientras que un 58% no presentaron cambios de abundancia en condiciones de represión.

Estos datos indican que se han identificado casi un 80 % de las proteínas que hay anotadas en la base de datos de secuencias aminoácidas de la CGD ([www.candidagenome.org](http://www.candidagenome.org)), donde hay

anotados 6218 ORFs traducidos. Por tanto, se trata de la primera vez que se obtiene un rendimiento tan alto en el análisis del proteoma de *C. albicans* en un único experimento.

El análisis exploratorio de datos de componentes principales o PCA (Principal Component Analysis) indica la proporción de la varianza entre los grupos a comparar y entre las réplicas biológicas de cada tipo de muestras. Los resultados de este análisis (**Figura 32**) muestran una varianza de más del 85% entre las muestras tratadas y sin tratar con doxiciclina, que se explica con el primer componente. Es decir, que las muestras procedentes de las condiciones de represión de *CaPRE1* ( $PRE1^{OFF}$ ) se diferencian perfectamente de las correspondientes a un proteosoma funcional ( $PRE1^{ON}$ ). Si bien es cierto, que las réplicas procedentes de las muestras de  $PRE1^{ON}$  se dispersan menos y son más similares entre ellas que las correspondientes a  $PRE1^{OFF}$ .

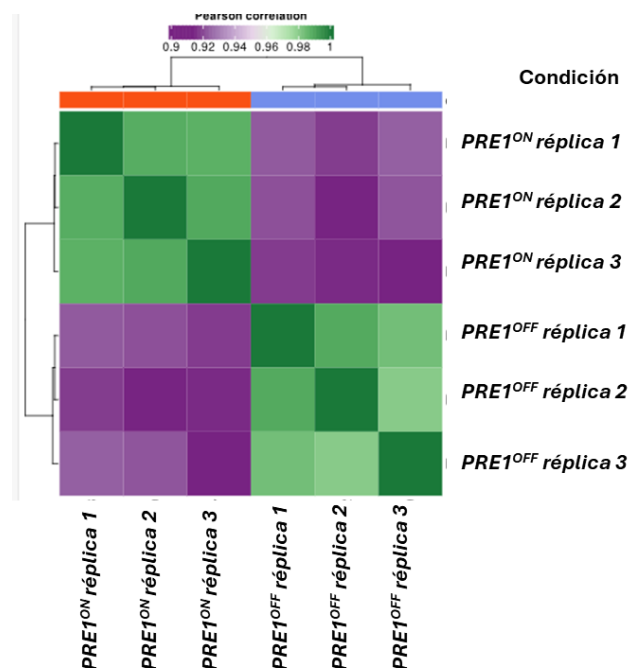


**Figura 32. Análisis de componentes principales (PCA).**

Se muestra el análisis de los componentes principales de 3 réplicas biológicas procedentes del mutante condicional en condiciones de expresión ( $PRE1^{ON}$ ) o represión ( $PRE1^{OFF}$ ). 86% total de varianza con el componente principal 1 entre  $PRE1^{OFF}$  y  $PRE1^{ON}$ .

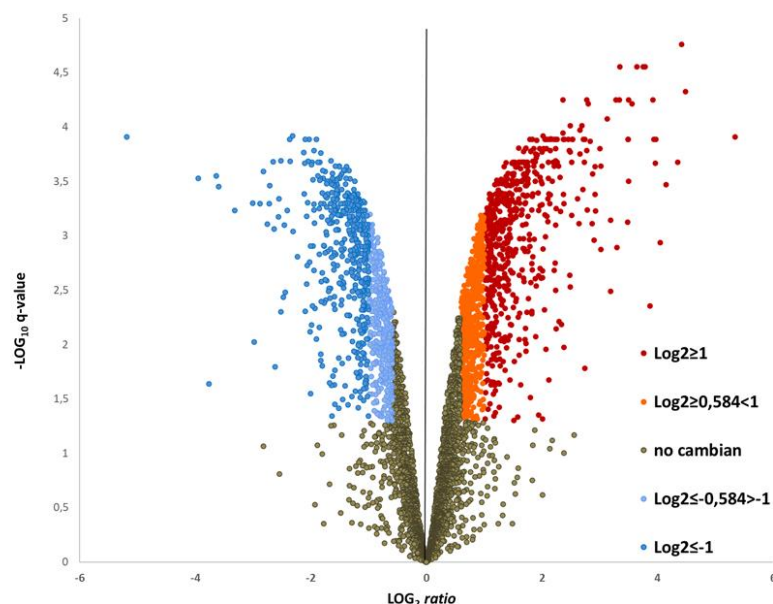
En la **Figura 33**, se muestra la matriz de correlaciones de Pearson que hay entre las muestras, situándolas en filas y columnas. Este tipo de análisis se basa en los datos de cuantificación de las proteínas, y calcula el coeficiente de correlación que existe entre cada par de muestras, aplicando un color según el valor de dicho coeficiente. Tal y como se puede observar, los resultados son similares a los obtenidos por PCA, ya que entre las condiciones de expresión y represión de *CaPRE1* el grado de relación o dependencia es mínimo, mientras que es máximo en cada grupo entre sí.

A continuación, se representaron los datos obtenidos en diagramas de volcán (**Figura 34**). Este tipo de diagramas de dispersión permite reconocer rápidamente cambios en grandes conjuntos de datos y muestran la distribución de las *ratios* de cada proteína frente a la significancia del cambio ( $-\log_{10}(q\text{ value})$ ). Los gráficos obtenidos a partir de los datos muestran que éstos siguen una distribución normal, y que la mayoría no presentan cambios ( $ratio=1$  o  $\log_2\text{ ratio}=0$ ).



**Figura 33. Matriz de correlación de Pearson.**

De las 6 muestras del estudio, se correlacionan las réplicas de cada uno de los grupos de estudio ( $PRE1^{OFF}$  y  $PRE1^{ON}$ ). Este coeficiente toma valores desde 0,9 (en morado), donde el grado de correlación es el mínimo, hasta 1 (en verde), que corresponde a la máxima correlación.



**Figura 34. Ratios de la abundancia de proteínas  $PRE1^{OFF}/PRE1^{ON}$ .**

Los resultados se representan mediante un diagrama de tipo volcán y muestran la abundancia de las proteínas: en rojo y naranja se marcan las que aumentaron significativamente ( $-\log_{10} q\text{-value} > 1,3$ ;  $\log_2 \text{ ratio} > 0,584$ ); en azul y azul claro, las que disminuyeron significativamente ( $-\log_{10} q\text{-value} > 1,3$ ;  $\log_2 \text{ ratio} < -0,584$ ) y en gris las que no cambiaron.

Tras observar la distribución de datos en el diagrama de volcán, se decidió seleccionar unos criterios menos estrictos para considerar las proteínas con cambios de abundancia significativos, por lo que se aplicó el criterio de las  $\log_2 \text{ratio} > 0,584$  y  $\log_2 \text{ratio} < -0,584$  (mayor de 1,5 número de veces y menor de 0,67 número de veces). Como se ha comentado previamente, el número de proteínas cuantificadas ha sido muy elevado, lo que facilita tener una visión muy amplia de los procesos biológicos afectados por la represión del proteosoma. Además, se identificaron como proteínas exclusivas de cada estado, aquellas en las que se presentan datos de abundancia (intensidad del precursor) en las tres muestras del grupo y no se detecta esa proteína en las otras 3 muestras del grupo a comparar y con más de 1 péptido cuantificado.

En la **Tabla 9** se muestra el número de proteínas que aumentan y disminuyen su abundancia, así como los criterios tenidos en cuenta para esta clasificación.

A continuación, se seleccionaron las proteínas que cambian en su abundancia de manera significativa cuando *CaPRE1* se reprime. Se eligieron conjuntamente las proteínas que cambian ( $q\text{-value} \leq 0,05$ ), resultando un total de 1069 proteínas que aumentaban su abundancia ( $\text{ratio} \geq 1,5$  número de veces) en el estado de *PRE1<sup>OFF</sup>* y 769 proteínas que disminuían ( $\text{ratio} \leq 0,66$  número de veces) en el estado de *PRE1<sup>OFF</sup>*. Entre las proteínas que cambian su abundancia diferencialmente (1838 proteínas), las que aumentan suponen un 57% de los cambios observados y las que disminuyen son un 43% de las que cambian en abundancia.

**Tabla 9. Resumen numérico de las proteínas cuantificadas y los cambios de abundancia observados.**

Se muestra la abundancia de las proteínas aplicando los siguientes criterios:  $-\log_{10} \text{valor } q > 1,3$ ;  $\log_2 \text{ratio} > 0,584$ , proteínas que aumentaron significativamente y  $-\log_{10} \text{valor } q > 1,3$ ;  $\log_2 \text{ratio} < -0,584$ , proteínas que disminuyeron significativamente.

Abundancia	# proteínas
Proteínas cuantificadas	4319
Sin cambios	2481
Presentes en <i>PRE1<sup>OFF</sup></i>	15
Ausentes en <i>PRE1<sup>OFF</sup></i>	5
$q \text{ value} < 0,05$	1838
Aumentadas en <i>PRE1<sup>OFF</sup></i>	1069
$\log_2 \text{ratio} \geq 1$	545
$\log_2 \text{ratio} \geq 0,58 \leq 1$	524
Disminuidas en <i>PRE1<sup>OFF</sup></i>	769
$\log_2 \text{ratio} \leq -1$	414
$\log_2 \text{ratio} \leq -1 \geq -0,58$	355

El análisis proteómico muestra una mayor proporción de proteínas que aumentan su abundancia en condiciones de represión *PRE1<sup>OFF</sup>* respecto a las que disminuyen en abundancia (1069 vs 769). Estos datos sugieren que la deficiencia en la subunidad  $\beta 4$  del proteosoma produce una acumulación de sustratos directos o indirectos del sistema de degradación proteosomal.

### 6.1 Proteínas cuantificadas que aumentan su abundancia en condiciones de represión de *CaPRE1*

Para poder determinar qué procesos biológicos están regulados por el sistema de degradación mediante el proteosoma y el análisis de los componentes celulares donde se localizan mayoritariamente, se llevó a cabo un análisis detallado de enriquecimiento ontológico de los procesos biológicos en los que están implicadas las proteínas que aumentan su abundancia cuando se reprime el gen *CaPRE1*. Estos análisis se realizaron con la herramienta *FungiFunv3* (<https://elbe.hki-jena.de/fungifun/>). Además, para comprobar si existe una especial incidencia en algunas rutas metabólicas, se realizó un análisis haciendo uso del programa Kegg (<https://www.genome.jp/kegg/mapper/>).<sup>258,259</sup>

En la **Tabla 10** se enumeran los procesos biológicos principales afectados por la represión del proteosoma. El número de proteínas componentes que se han cuantificado y también se muestra el porcentaje que supone respecto a las proteínas clasificadas en esa categoría según la base de datos de CGD (<http://www.candidagenome.org/>).

La primera categoría que destaca es la que engloba procesos relacionados con el **catabolismo de las proteínas**, especialmente el **dependiente de ubiquitina mediado por proteosoma (UPS)**. Asimismo, también se encuentran incrementadas las proteínas implicadas en la degradación de proteínas por el retículo endoplásmico, una de cuyas funciones es la degradación de complejos grandes u orgánulos y que, al igual que el proteosoma, degrada también las proteínas con defectos en el plegamiento. Uno de los procesos biológicos afectados por la represión de la subunidad  $\beta$ -4 del proteosoma es precisamente la parte **19S del proteosoma**, la parte reguladora, tanto las 6 subunidades AAA<sup>+</sup>-ATPasas (Rpt1-6) como las 4 subunidades no ATPasas (Rpn1, Rpn2, Rpn10 y Rpn13) que componen la base. En el caso de la tapa, compuesta por 8 subunidades no ATPasas (Rpn3, Rpn5-Rpn9, Rpn11, Rpn12), las abundancias también estaban aumentadas.

Algunas **subunidades del proteosoma 20S** también parecen ser sustratos del propio proteosoma, como las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 4$ - $\alpha 7$ , y las subunidades del anillo  $\beta$ :  $\beta 2$  y  $\beta 3$ , ya que se acumulan en el mutante *PRE1<sup>OFF</sup>*.

**Tabla 10. Clasificación de los procesos biológicos de las proteínas enriquecidas en *PRE1<sup>OFF</sup>* mediante la herramienta bioinformática *FunfiFunv3*.**

Proceso Biológico	# proteínas	% genes/categoría
<b>Proceso catabólico de proteínas</b>		
Proteólisis	56	33
Ensamblaje de la partícula reguladora de la proteosoma	10	100
Ensamblaje del proteosoma	12	71
Dependiente de ubiquitina	199	51
Dependiente de ubiquitina mediado por proteasoma	268	48
Dependiente de ubiquitina asociado a la mitocondria	8	67
Dependiente de ubiquitina asociado al RE	28	62
Ubiquitinación de proteínas	21	38
Poliubiquitinación de proteínas	20	54
Desubiquitinación de proteínas	14	64
<b>Transporte</b>		
Transporte de proteínas	39	34
Exportación de ATP	11	69
Transporte del Golgi a la vacuola	67	33
Transporte de proteínas a la vacuola	82	35
Transporte de carbohidratos	148	25
Transporte a la vacuola mediante cuerpos multivesiculares	14	70
Transporte del endosoma a la vacuola	16	67
Transporte retrógrado de proteínas del RE al citosol	6	86
<b>Respuesta a estrés</b>		
Respuesta a estrés oxidativo	10	59
Organización de peroxisomas	39	32
Importe de las proteínas al peroxisoma	8	57
Homeostasis del redox celular	57	30
Procesos de oxidación-reducción	73	23
<b>Transcripción y traducción</b>		
Regulación positiva del ensamblaje del complejo de preiniciación transcripcional de la ARN polimerasa II	9	75
Reparación de la excisión de nucleótidos	26	41
Acetilación de histonas	68	30
Regulación de la transcripción	69	27
Regulación negativa de la transcripción por la ARN polimerasa II	31	28
Regulación negativa de la actividad de la telomerasa	4	100
<b>Autofagia</b>		
Ensamblaje del autogagosoma	22	49
Reticulofagia	12	50
Microautofagia del nucleo	21	38
Ruta CVT (citoplasma to vacuola targeting)	50	34
Macroautofagia	21	60
<b>Ciclo celular</b>		
División celular	13	48
Regulación positiva de la transición G2/M del ciclo celular mitótico	6	75
Mitosis	12	43
<b>Crecimiento celular</b>		
Crecimiento hifal	98	22
Regulación de la citoquinesis	5	71
Localización del parche de actina cortical	41	25

La represión catalítica del proteosoma sugiere la acumulación de sustratos ubiquitinados, observándose aumentadas proteínas implicadas en la **ubiquitinación** (Ufd2, Ubx5, Ubr2, Ubi3, Uba1, Tom1, San1, Rfa1, Rad7, Pib1, Pex4, Pex10, Mub1, Hrd1, Hex3, Fyv10, Cdc4, Cdc27 y Apc2) y **poliubiquitinación** (Bul1, Cdc34, Grr1, Met30, Not4, Rad6, Rmd5, Ubc6). También se encontraron aumentadas proteínas implicadas en la **desubiquitinación** (Yuh1, Ubp8, Ubp6, Ubp2, Ubp15, Ubp14, Ubp1, Rup1 y Otu1). Es de destacar la mayor abundancia de las proteínas Sts1 (que se requiere para la localización de los proteosomas al núcleo), Doa1 (que juega un papel importante en el control de los niveles de ubiquitina en la célula) y de Ddi1 (que lleva los sustratos a la parte reguladora del proteosoma).

Se han cuantificado como proteínas más abundantes en *PRE1<sup>OFF</sup>*, proteínas del **transporte de la vacuola a la membrana** (Apl2, Apl5, Aps3, Gga2, Pep7, Tgl2 y Vps53), del **transporte retrógrado del retículo endoplásmico al citoplasma y al aparato de Golgi**, donde algunas presentan función de ubiquitin ligasas (Sft2, Vps35, Vps51 y Vps53).

Como se ha mencionado anteriormente, el proteosoma es clave cuando la célula está sometida a estrés por degradar proteínas mal plegadas o dañadas. Según el análisis realizado, la respuesta a estrés celular, principalmente a **estrés oxidativo**, se incluye entre los procesos que aumentan cuando se reprime el proteosoma. Así, se observa una acumulación de proteínas reguladas por el factor de transcripción **Cap1**, el cual también se acumula junto con proteínas con actividad oxidorreductasa (Cip1, Ebp1, Ebp7, Ifr2, Glx3, Glr1, Gpx3, Oye32) e Ybp1, que se une y estabiliza el factor de transcripción Cap1 en respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. También aumentan proteínas implicadas en la respuesta a ROS (*Reactive Oxygen Species*) como son las tiorredoxinas (Trx1 y Trx2) y algunas quinasas en respuesta a estrés celular (Cmk2, Pos5, Mps1 y Chk1).

Asimismo, se encontraron aumentadas proteínas implicadas en autofagia. Entre ellas, proteínas que regulan **el ensamblaje de la vacuola autofagocitaria** (Atg1, Atg3, Atg4, Atg8, Atg17, Shp1 y Spo72), componentes del **transporte CVT** de citoplasma a vacuola (Atg20, Tlg2, Snx4, Cog2, Atg13, Atg21, Cog8, Atg1, Cog7, Vps45, Apg7, Vps11 y Pep7), y Cdc48, una ATPasa microsomal que se localiza en la membrana plasmática.

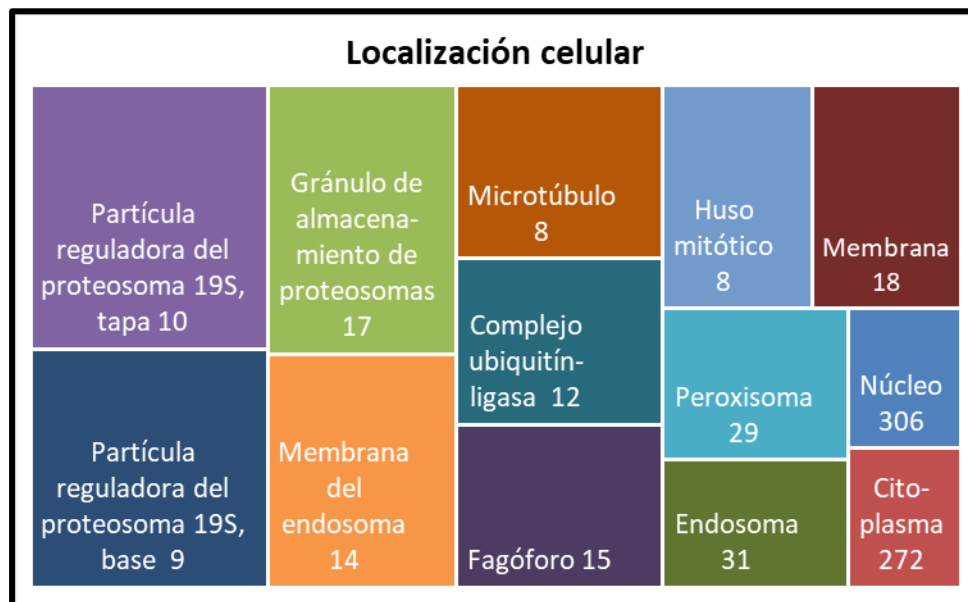
Además, se observa un aumento de proteínas del **ciclo celular**, siendo las más abundantes las de fase G2/M (Cdc34, Cdc4, Clb2, Clb4, Cmk2, Hsl1, Kin3, Mih1, Pin4, Shp1 y Skp1) y las que intervienen en la regulación negativa dependiente de ciclinas (Cdc14, Sol1, Cdc20 y Cdh1).

Aparecen también aumentadas proteínas implicadas en **la morfogénesis** en *C. albicans*, como factores de transcripción que regulan la filamentación (Ace2, Adr1, Cas5, Cdc24, Cph2, Cta1, Ctn3, Fgr15, Gcn4, Gln3, Ppr1, Rca1, Rfx2, Rim101, Rob1, Stp2, Tec1, Tfg1 y Zcf14), quinasas implicadas en el crecimiento de hifas (Cdc5, Chk1, Fab1, Gin4, Hsl1, Nik1 y Yak1), o la MAPK y la MAPKK Cek1 y Hst7, respectivamente.

Otros procesos enriquecidos en el estudio de *PRE1<sup>OFF</sup>* son la **regulación de la citoquinesis** (Sli15, Cdc5, Bud14, Vrp1 e Ipl1), la **localización del parche de actina cortical** (Arc18, Bnr1, Cdc34, Cnb1,

Cta9, Fab1, Ino1, Lro1, Mhp1, Mns1, osm1, Pin3, Pos5, Prd1, Rim15, Rob1, rot2, Spo72, Spt23, Stb3, Stp2; Vps70 y Vrp1), la **regulación de la transcripción** (Adr1, Bud14, Cap1, Cas1, Cas4, Cas5, Chk1, Cph1, Cph2, Fcr3, Fgr15, Gcn4, Hac1, Lys152, Mdm3, Msn4, Nik1Ppr1, Rim15, Set3, Sip5, Sln1, Snt1, Soh1, Srr1, Sua71, sua72, Tec1, Zcf14 y Zfc15) y la **regulación negativa de la transcripción del promotor de la RNA polimerasa II** (Cas5, Efh1, Ess1, Gcn5, Lap3, Med2, Mtl1, Rfx2, Rim101, Rtf1, Spt10 y Srb8).

El análisis mediante enriquecimiento ontológico del componente celular de las proteínas identificadas mediante la herramienta bioinformática *FungiFun v3*, determinó que la mayoría de las proteínas afectadas se localizaban en el citoplasma (272) o el núcleo (306). Se encontraron además proteínas que se localizan en la membrana (18), el cuerpo del polo del huso mitótico (8), el peroxisoma (29), el endosoma (31) y su membrana (14), los microtúbulos (8), y el complejo de la ubiquitín-ligasa (12). Hay 17 proteínas que se localizan en gránulos de almacenamiento de proteosomas (17), 10 subunidades de la tapa y 9 de la base del complejo 19S del proteosoma, lo que completan el 100 % de las proteínas categorizadas en este componente celular (**Figura 35**).



**Figura 35. Análisis de enriquecimiento en componente celular de las proteínas aumentadas significativamente en *PRE1<sup>OFF</sup>*.**

Se representa el análisis realizado mediante el programa *FungiFun v3*. El tamaño de los rectángulos es proporcional al porcentaje de proteínas cuantificadas respecto al total anotado en su categoría de componente celular.

## 6.2 Proteínas cuantificadas que disminuyen su abundancia en condiciones de represión de CaPRE1

El número de proteínas cuya abundancia disminuyó fue inferior al de las que aumentaron su abundancia en condiciones de represión de la expresión de CaPRE1 (846). Como en el apartado anterior, se realizó el análisis detallado de enriquecimiento ontológico de las proteínas que disminuyeron su abundancia relativa significativamente en *PRE1<sup>OFF</sup>* y así, destacar los principales procesos biológicos alterados (Tabla 11).

**Tabla 11. Clasificación ontológica de los procesos biológicos enriquecidos de las proteínas que disminuyen su abundancia cuando se reprime el gen CaPRE1.**

Se muestra la relación del número de proteínas implicadas respecto al número de componentes de la misma categoría de proceso biológico, mediante la herramienta *FungiFunv3*.

Proceso biológico	# proteínas	% de genes por categoría
Traducción	237	48
Traducción mitocondrial	28	80
Ensamblaje de la subunidad grande del ribosoma	45	42
Ensamblaje de la subunidad pequeña del ribosoma	10	53
Biogénesis de ribosomas	22	51
Procesamiento rRNA	39	35
Cadena respiratoria mitocondrial complejo I	10	67
Cadena respiratoria mitocondrial complejo III	8	100
Ensamblaje de citocromo c oxidasa mitocondrial (IV)	12	48
Ensamblaje del complejo ATP sintasa mitocondrial	7	78
Glicolisis	10	63
Proceso de oxidación-reducción	65	21
Metilación	16	46
Procesos metabólicos de aminoácidos	10	45

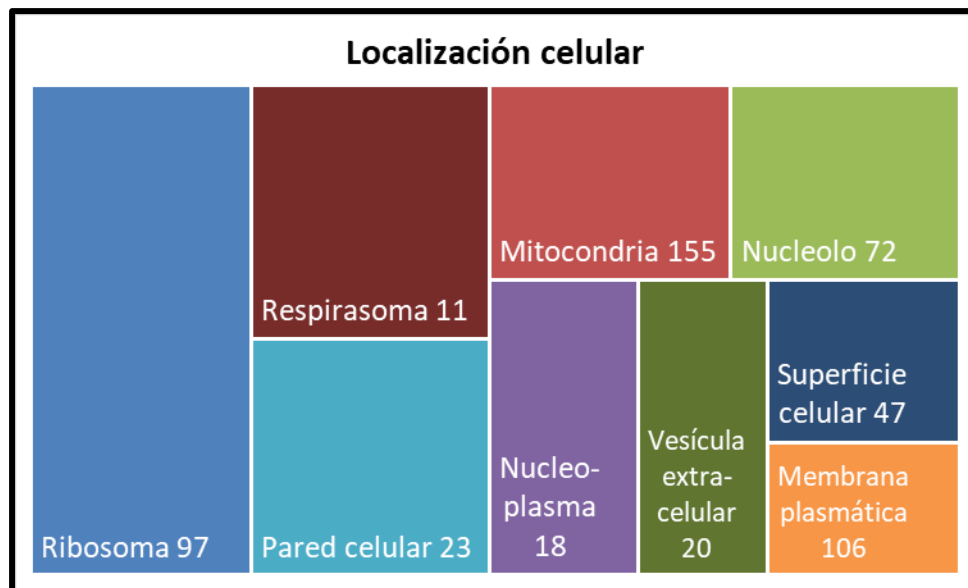
Como se podría presuponer, uno de los procesos más significativos alterados es la **traducción**, con 237 proteínas disminuidas, lo cual supone el 48% de los genes que componen este término, así como la **traducción mitocondrial** (28 proteínas). También se vio alterada la **biogénesis y el ensamblaje de las subunidades grande** (Cic1, Csi2, Mak21, Mrt4, Noc2, Nog1, Nop15, Pes1, Rpl1, Rpf1, Rpl3, Rpl5-6, Rpl10-12, Rpl25, Rpp0, Rrs1, Sda1 e Ytm1) y **pequeña del ribosoma** (Rps12, Nep1, Rps7a, Rps19, Hbr3 e Yst1).

Es remarcable el nivel de afectación observado correspondiente a la fosforilación oxidativa, con la disminución de los componentes de la **cadena respiratoria mitocondrial del complejo I** (10 proteínas), del **complejo III** (8, que supone el 100% de los genes anotados en esa categoría), del

complejo IV o **citocromo c oxidasa mitocondrial** (12 proteínas), así como de la **ATPasa mitocondrial** (7 proteínas).

En cuanto al **metabolismo de aminoácidos y a la glicolisis**, también observamos una disminución de la abundancia en las condiciones de represión del proteosoma.

El resultado del análisis de enriquecimiento ontológico de las proteínas que disminuyen su abundancia en *PRE1<sup>OFF</sup>* en cuanto al componente celular en el que se encuentran, está en concordancia con los procesos biológicos que ya hemos descrito (**Figura 36**). Así, hay un enriquecimiento en el ribosoma (97), la mitocondria (155) y el nucleolo (72). Otras localizaciones enriquecidas son el respirasoma (11), la pared celular (23), la superficie celular (47), las vesículas extracelulares (20) y la membrana plasmática (106).



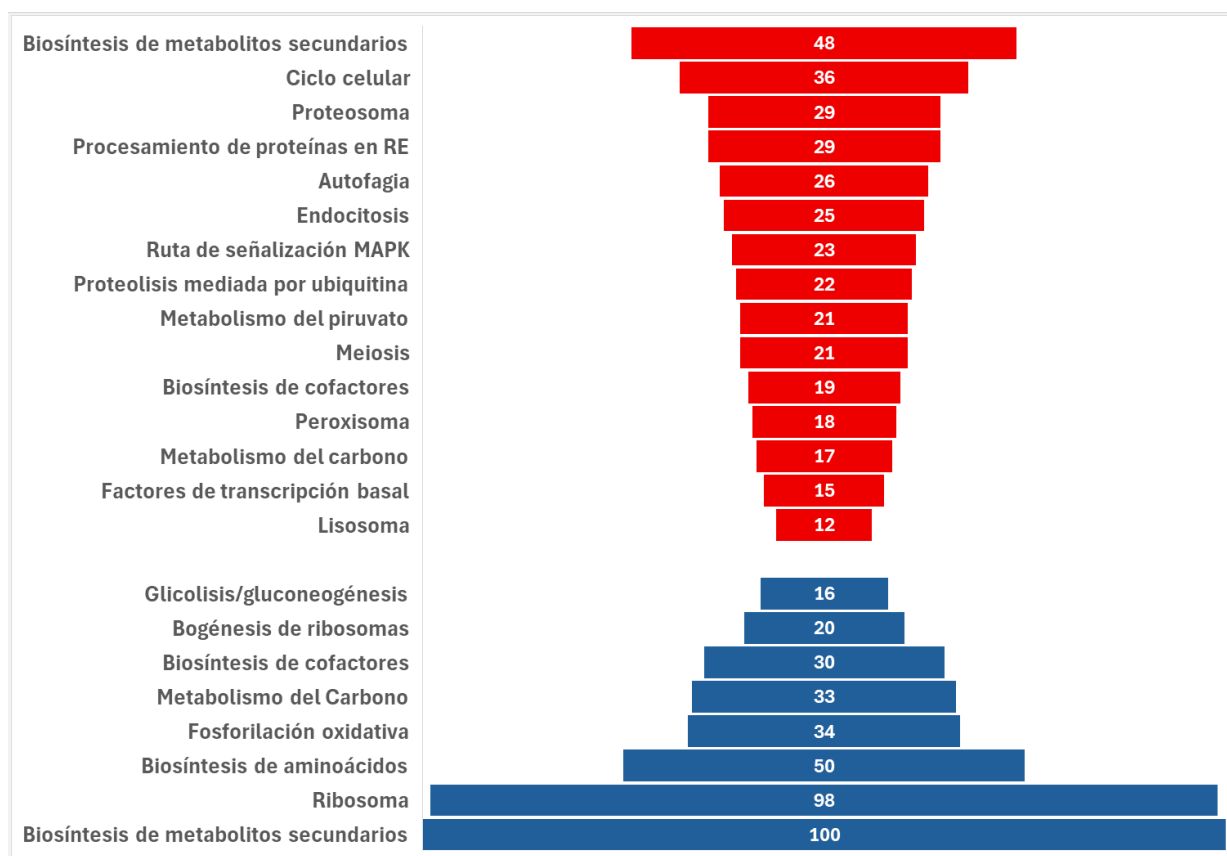
**Figura 36. Clasificación del componente celular enriquecido de las proteínas menos abundantes cuando se reprime el gen *CaPRE1*.**

Se representa el análisis realizado mediante el programa *FungiFun v3*. El tamaño de los rectángulos es proporcional al porcentaje de proteínas cuantificadas respecto al total anotado en su categoría de componente celular.

### 6.3 Rutas metabólicas alteradas cuando se reprime el gen *CaPRE1*

A continuación, se realizó un estudio de las rutas en las que estaban implicadas todas las proteínas cuantificadas. Para ello se utilizó el programa de acceso libre *KEGG mapper* (<https://www.genome.jp/kegg/mapper/>).

Las rutas implicadas en condiciones de inhibición del proteosoma se muestran en la siguiente figura, donde se representan sus componentes aumentados (en rojo) o disminuidos (en azul).



**Figura 37. Análisis de rutas implicadas y enriquecidas en las proteínas aumentadas o disminuidas cuando se reprime CaPRE1.**

Se ha utilizado la herramienta *KEGG mapper*. Se muestra en rojo, los componentes aumentados, y en azul, los que disminuyen. En cada ruta se indica el número de las proteínas cuantificadas.

Este análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas es importante, ya que concuerda con los datos presentados de procesos biológicos clasificados por GO (*Gene Ontology*)

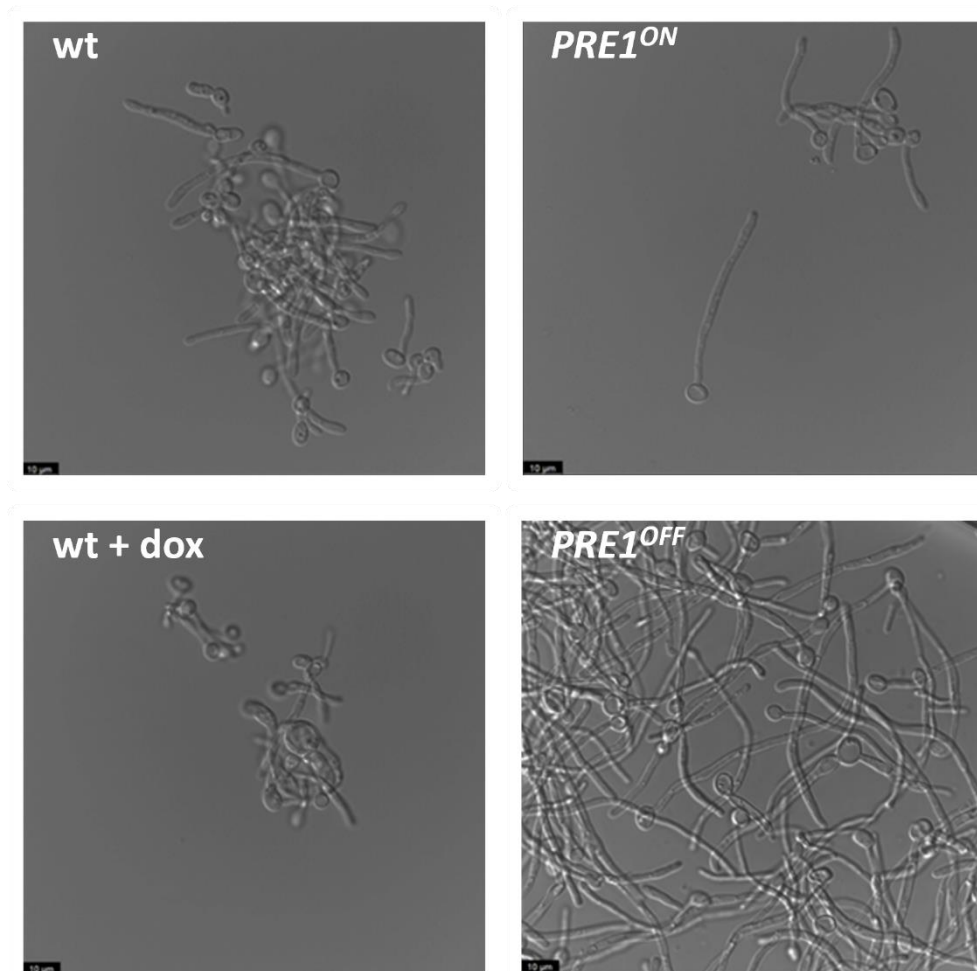
El análisis proteómico combinado con un análisis de enriquecimiento de términos de ontología génica (GO) y de rutas metabólicas, muestra un número significativo de proteínas implicadas en varios procesos celulares cuando se reprime la expresión de CaPRE1 en *C. albicans*. Entre los procesos enriquecidos destacan la autofagia, la endocitosis y el tráfico vesicular hacia la vacuola, lo que sugiere una activación de rutas catabólicas y de reciclaje celular. Además, se observa una disminución en la abundancia de proteínas asociadas con la fosforilación oxidativa, lo que sugiere un compromiso en la función mitocondrial o una reprogramación del metabolismo energético en respuesta a la alteración del proteosoma.

En conjunto, estos resultados evidencian el papel central del proteosoma en el mantenimiento de la homeostasis celular en *C. albicans*.

## 7. Caracterización fenotípica de procesos celulares afectados cuando *CaPRE1* está reprimido

### 7.1 Efecto de la represión del gen *CaPRE1* en la transición levadura-hifa

Ante los resultados observados, se estudió el efecto de la inhibición del proteosoma en la capacidad de transición de levadura a hifa. Para ello, se utilizó como estímulo inductor de filamentación la N-acetilglucosamina (NAG), analizando por microscopía DIC el comportamiento de la cepa silvestre y el mutante condicional en ausencia y presencia de doxiciclina. Tal y como se muestra en la **Figura 38**, la represión de *PRE1* (*PRE1<sup>OFF</sup>*) genera un fenotipo de hiperfilamentación y una mayor longitud de los filamentos en comparación con el fenotipo de *PRE1<sup>ON</sup>* y la cepa parental (en presencia y ausencia de doxiciclina).

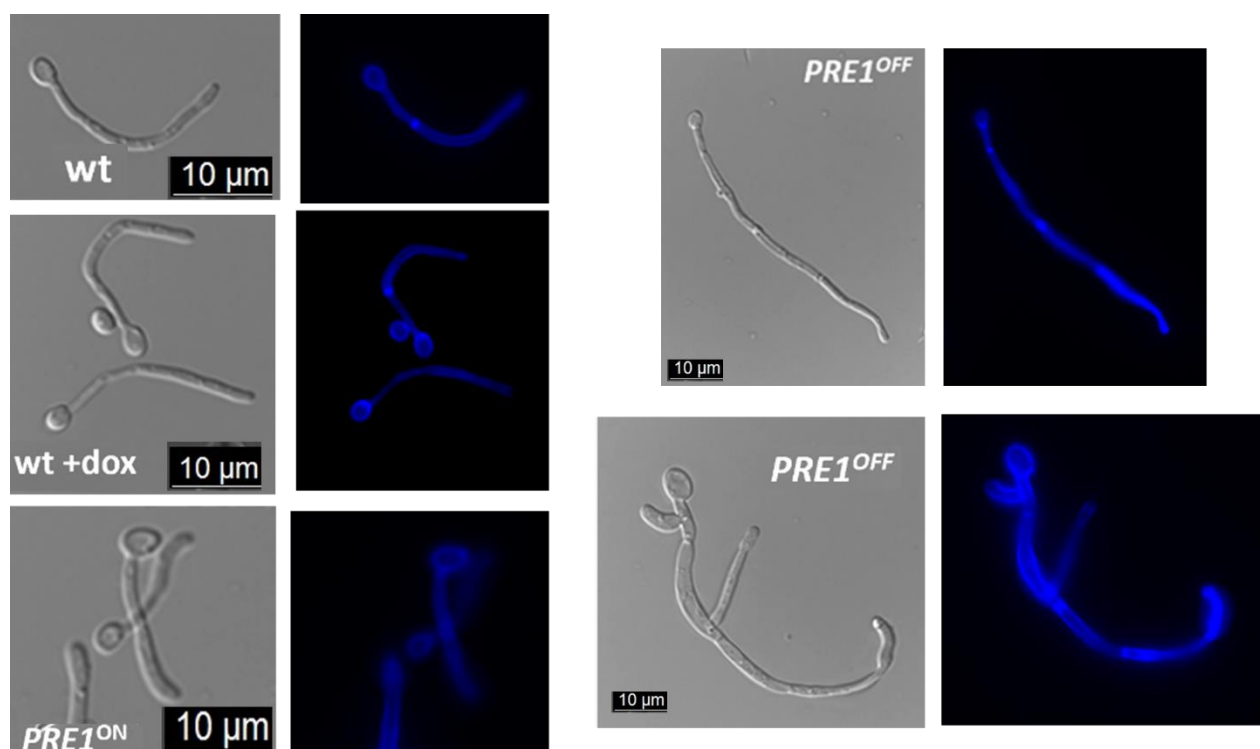


**Figura 38. Inducción de la filamentación con el inductor N-acetilglucosamina.**

Se muestran imágenes representativas procedentes de cultivos de las cepas indicadas en medio YNBS suplementado con NAG en ausencia o presencia de doxiciclina (+ dox) tras 6 h de incubación a 37 °C.

Estas mismas células se tiñeron con blanco de calcoflúor y se analizaron por microscopía de fluorescencia (**Figura 39**). Esta tinción fluorescente tiene afinidad por la quitina, la cual se localiza en la capa interna de la pared celular en contacto con la membrana plasmática, y se acumula en las cicatrices de la yema y en los septos de separación de células madre y célula hija.

Tal y como se observa en la figura, en condiciones de inducción de filamentación y represión de *CaPRE1* (*PRE1<sup>OFF</sup>*), aparecen deposiciones de quitina no homogéneas y en zonas que no se corresponden con cicatrices de la gemación. Este fenotipo no se aprecia en la cepa silvestre, ni en el mutante condicional en ausencia de doxiciclina (*PRE1<sup>ON</sup>*).



**Figura 39. Microscopía de fluorescencia de las células teñidas con blanco de calcoflúor.**

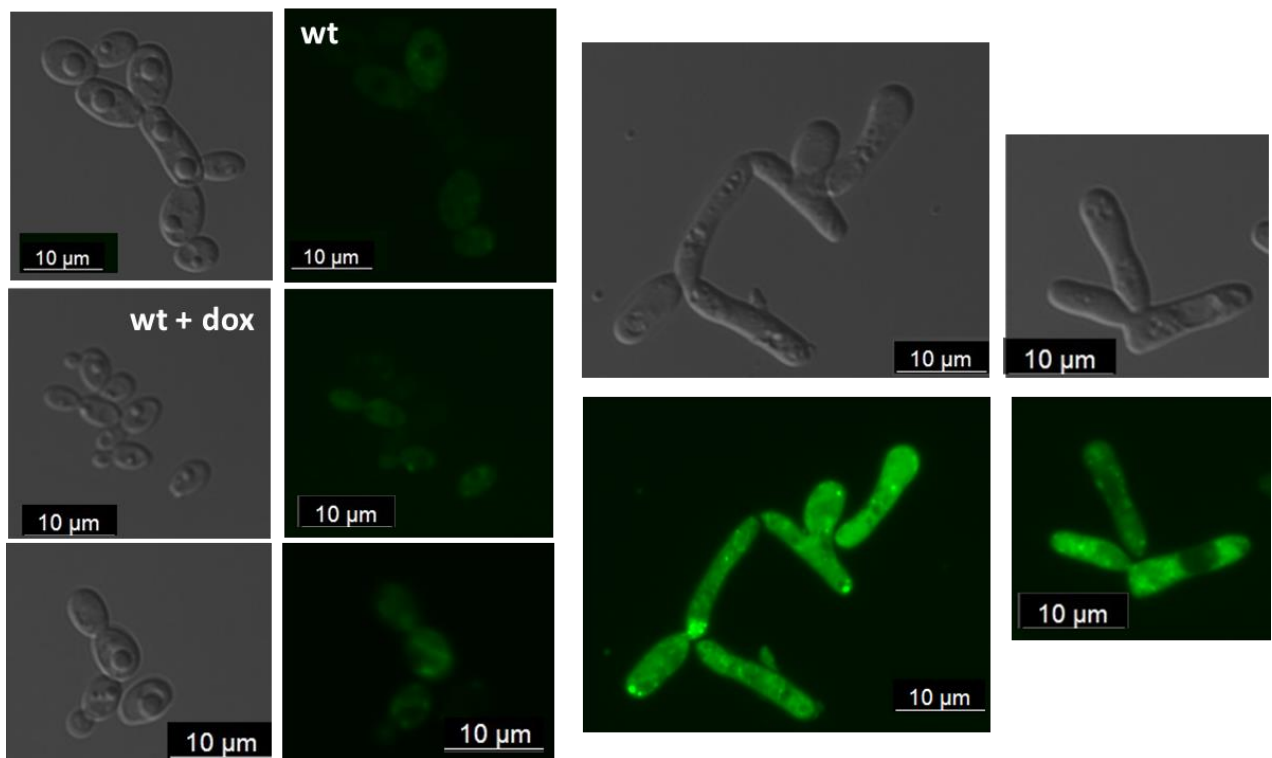
Muestras procedentes de cultivos creciendo en YNBS con NAG en presencia o ausencia de doxiciclina (+dox) fueron sometidas a tinción con blanco de calcoflúor durante 10 min. en oscuridad. Se muestran imágenes representativas de las distintas cepas analizadas.

La represión de *CaPRE1* en condiciones inductoras de filamentación da lugar a un fenotipo hiperfilamentoso más acusado que en condiciones de expresión constitutiva. En estas condiciones, en deficiencia de Pre1p las células hijas no se separan correctamente de la célula madre y se observa una alteración en la cantidad de quitina, que se acumula en los extremos de las hifas.

## 7.2 Análisis de especies reactivas de oxígeno y estado de la mitocondria

Los resultados de proteómica pusieron de manifiesto un aumento de proteínas implicadas en respuesta a estrés oxidativo. Por ello, se planteó analizar el efecto de la deficiencia de Pre1p en

la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante tinción con dihidrorodamina 123 (DHR 123). Se trata de un colorante no fluorescente permeable a membrana, la DHR 123 se acumula en la mitocondria donde se oxida a rodamina 123 por la presencia de ROS, emitiendo fluorescencia verde cuya intensidad es proporcional a la cantidad de ROS. Esta propiedad posibilita detectar el estrés oxidativo en las células y analizar la activación de las mitocondrias.



**Figura 40. Microscopía de fluorescencia de las células teñidas con DHR123.**

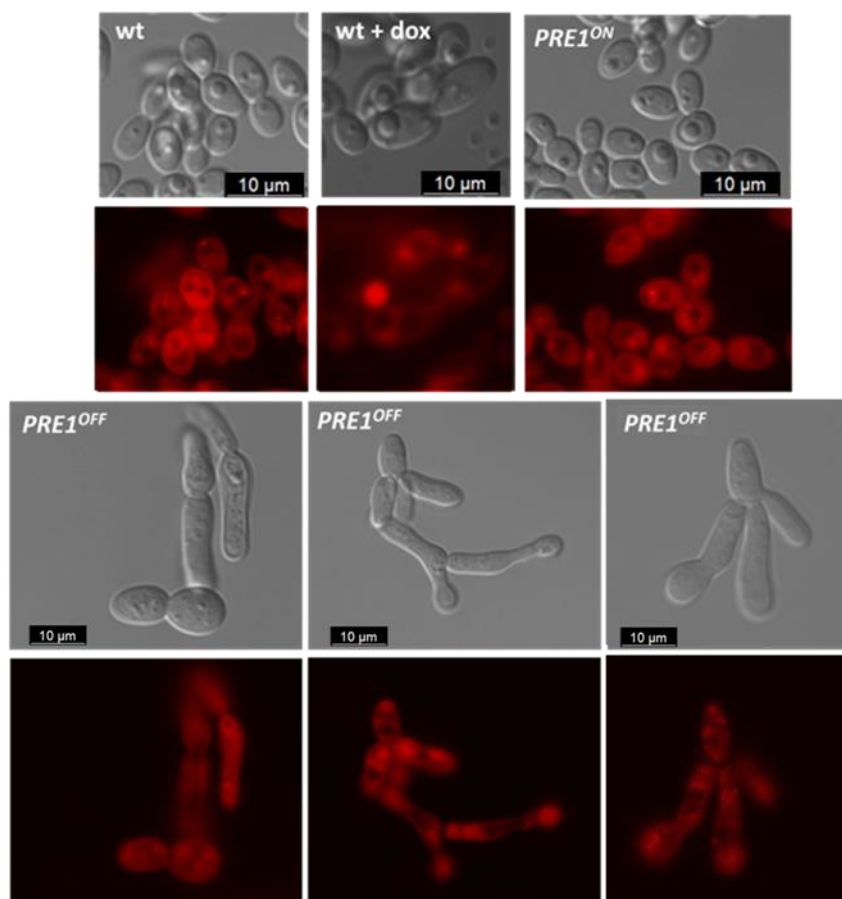
Se muestran imágenes representativas de la cepa wt y el mutante condicional *PRE1* en presencia y ausencia de doxiciclina tras una tinción con el indicador de ROS, dihidrorodamina 123.

Tal y como se puede observar en las imágenes tomadas por microscopía de fluorescencia (**Figura 40. Microscopía de fluorescencia de las células teñidas con DHR123.**) la señal de fluorescencia en las células *PRE1<sup>OFF</sup>* fue de mayor intensidad y se presenta en depósitos o acúmulos por toda la célula.

El estudio por microscopía de la intensidad y disposición de la fluorescencia en el mutante condicional revela que las células *PRE1<sup>OFF</sup>* sufren estrés oxidativo y presentan mayor producción de ROS que las células control.

### 7.3 Análisis del transporte endocítico

Los resultados del análisis proteómico pusieron de manifiesto un enriquecimiento de proteínas relacionadas con el transporte de la vacuola a la membrana, del transporte retrógrado del RE al citoplasma y al Golgi, entre otros.



**Figura 41. Microscopía de fluorescencia de las células teñidas con el fluorocromo FM4-64.**

Células en fase exponencial de crecimiento de las cepas indicadas se teñeron durante 90 min. a 30 °C y en agitación con FM4-64 previo a su visualización por microscopía de fluorescencia. Se muestran imágenes representativas del ensayo.

Por ello, se analizó mediante microscopía de fluorescencia el tráfico intracelular desde la membrana externa hasta la formación de vacuolas mediante tinción con el compuesto lipofílico FM4-64. Este colorante tiñe la membrana, las vacuolas y los endosomas en levaduras.<sup>238,260</sup>

Para ello, a partir de cultivos de las cepas en estudio en fase de crecimiento exponencial las células se incubaron con el colorante FM4-64, durante 90 min. a 37 °C y en agitación. Como se observa en la **Figura 41**, tanto en la cepa silvestre (en presencia y en ausencia de doxiciclina) como en el mutante condicional en condiciones de inducción (*PRE1<sup>ON</sup>*) se observa claramente la internalización del colorante y la formación de vacuolas, aunque en algunas células sigue teñida la membrana plasmática. En el caso de *PRE1<sup>OFF</sup>*, se observan también vacuolas, de menor tamaño, y el colorante se localiza en endosomas u otros compartimentos endocíticos por todo el interior celular. Este experimento, es preliminar, y necesita un estudio más profundo y ensayos longitudinales en el tiempo, para poder observar si hay diferencias claras en el transporte vesicular.

## 8. Desarrollo de un ensayo competitivo y positivo para la búsqueda de nuevos antifúngicos cuya diana sea el gen *CaPRE1*

Los modelos de levadura humanizada, principalmente basados en *S. cerevisiae*, constituyen una herramienta muy valiosa para el estudio de enfermedades humanas, así como en la identificación y desarrollo de nuevos antimicrobianos, entre otras muchas aplicaciones. El hecho de que *CaPRE1* codifique una proteína cuya función es esencial en *C. albicans*, al igual que otras subunidades del proteosoma, convierte a este complejo en una potencial diana para el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos dirigidos a inhibir su función. Sin embargo, su presencia en todas las células eucariotas requiere determinar las diferencias entre la proteína del hongo y la humana con el objeto de evitar posibles problemas de especificidad y, en consecuencia, de toxicidad. En este apartado, se describe el desarrollo de un sistema de rastreo de nuevos antifúngicos dirigidos a inhibir de manera específica el gen *CaPRE1* utilizando como plataforma cepas humanizadas o *candidizadas* de *S. cerevisiae*.

### 8.1 Aislamiento y complementación del gen humano *HsC7-I* homólogo a *PRE1*

El gen humano homólogo a *PRE1* fue clonado mediante un escrutinio genético usando un cDNA de *Ratus norvegicus* homólogo a *PRE1*, *RnC7-I*,<sup>261</sup> y se denominó<sup>262</sup> *HsC7-I*. Para poder realizar los siguientes estudios, en primer lugar, se procedió a su amplificación y clonación en vectores para su expresión en levadura multicopia y monocopia y bajo el control de diferentes promotores, tanto constitutivos como regulables (ver Materiales y Métodos).

#### 8.1.1 Complementación funcional de un mutante de *S. cerevisiae* deleciónado en *PRE1*

Para determinar si *HsC7-Ip* era capaz de sustituir la función de *Pre1p* en *S. cerevisiae*, se abordó la complementación funcional de un mutante de *S. cerevisiae* deleciónado en el gen *ScPRE1*. Se decidió no utilizar el mutante termosensible *pre1-1*, por si pudiera haber algún problema de competencia entre las subunidades de levadura y humanas en el ensamblaje de la estructura proteosomal.

Para realizar estos estudios, se transformó una cepa diploide heterocigota de *S. cerevisiae* *WCG4Δ1a/α* (*MAT a/α pre1Δ::URA3/PRE1 His<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup>*),<sup>214</sup> con el plásmido *EpAC7i2a* (con el gen humano *HsC7-I* bajo el control del promotor de actina) y por otro lado, con *YEpHISXLEU* (con el gen *CaPRE1* bajo el control de su propio promotor). Las células diploides obtenidas tras las transformaciones fueron inducidas a esporular, y las ascas fueron aisladas y diseccionadas para obtener sus ascosporas. De 14 ascas diseccionadas de las células diploides transformadas con *HsC7-I* sólo 13 esporas fueron viables y, de estas, solo 6 *Leu<sup>+</sup> Ura<sup>+</sup>*. De 20 ascas diseccionadas de las células diploides transformadas con *CaPRE1*, 15 esporas fueron viables y 6 *Leu<sup>+</sup> Ura<sup>+</sup>*.

La posibilidad de obtener estas cepas indica que tanto el gen *PRE1* de *C. albicans* como HsC7-1 de *Homo sapiens* son homólogos funcionales del gen *PRE1* de *S. cerevisiae*, al menos cuando *PRE1* está presente en multicopia.

## 8.2 Construcción de cepas de *S. cerevisiae* con expresión controlada de *PRE1*

Con el fin de estandarizar éste y otros futuros sistemas de búsqueda de nuevos agentes antifúngicos, se decidió construir cepas de *S. cerevisiae* delecionadas en el gen *ScPRE1* que expresaran bajo un promotor regulable por doxiciclina el homólogo humano HsC7-1 (cepa humanizada) o el de *C. albicans* *CaPRE1* (cepa *candidizada*). El sistema utilizado permite, en ausencia de doxiciclina, la expresión del gen, mientras que en presencia de esta se reprime y no crece en medio sólido. (datos no mostrados).

La posibilidad de obtener las cepas *candidizada* y humanizada, y la falta de crecimiento en presencia de doxiciclina, sugieren que *a priori* ambas cepas son aptas para realizar bioensayos en búsqueda de nuevos antifúngicos cuya diana sea específicamente CaPre1p.

### 8.2.1 Análisis fenotípico de las cepas de *S. cerevisiae* *candidizada* y humanizada

Para desarrollar un ensayo competitivo y positivo era imprescindible, en primer lugar, determinar si las tasas de crecimiento en ambas cepas eran similares y, así, poder asociar la inhibición al compuesto testado y no a un menor crecimiento de alguna de las cepas.

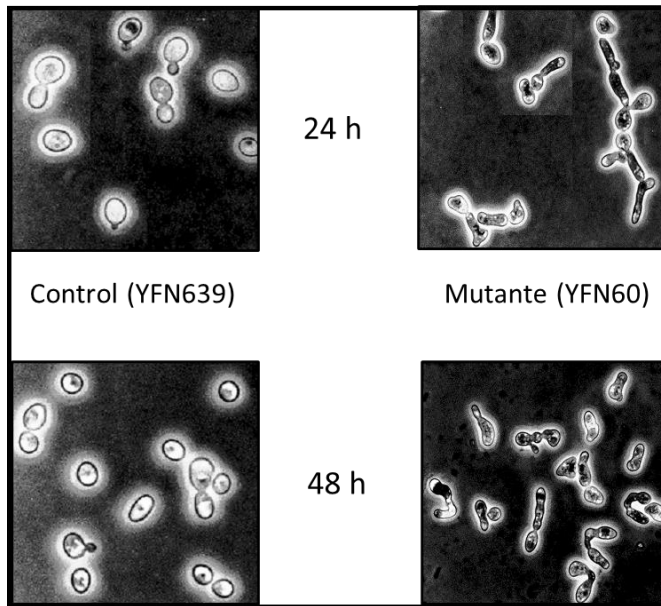
Por ello, se realizaron curvas de crecimiento en medio rico (YPD) y en medio mínimo (SD). Tanto la tasa de crecimiento como el tiempo de generación de la cepa humanizada (YFM140) y de la cepa *candidizada* (YFN60) fueron similares, en ambos medios y en ausencia de doxiciclina. Como control de wt usamos la cepa YFN639, espora hermana de YFN60, transformada con *CaPRE1* pero con *PRE1* de *S. cerevisiae* sin interrumpir (**Tabla 12**).

**Tabla 12. Tiempos de generación (Tg) de las cepas de *S. cerevisiae* humanizada y *candidizada*.**

Cepa	Característica	Tg en SD	Tg en YPD
YFN639 (wt para <i>PRE1</i> )	wt para <i>PRE1</i> + <i>CaPRE1</i>	162 min	138 min
YFN60 ( <i>candidizada</i> )	Mutante <i>pre1</i> + <i>CaPRE1</i>	195 min	176 min
YFM140 (humanizada)	Mutante <i>pre1</i> + HsC7-1	207 min	182 min

En segundo lugar, se quiso corroborar los fenotipos descritos en el apartado de complementación funcional del mutante de *S. cerevisiae* termosensible *pre1-1* con esta construcción de *CaPRE1* bajo el sistema regulable de tetraciclina Tal y como se observa en la **Figura 42**, tras 24 y 48 horas de crecimiento a 30 °C, la represión de *CaPRE1* en presencia de doxiciclina condujo a la aparición de los defectos morfológicos característicos ya descritos. Como era de esperar, no se observaron

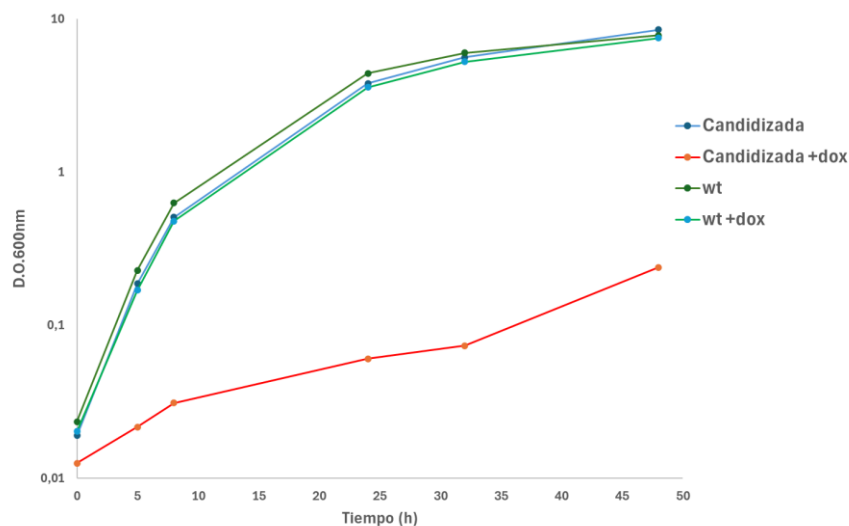
alteraciones en la morfología celular en la cepa parental en presencia de doxiciclina, lo que indica que el efecto es debido a la represión de *CaPRE1*.



**Figura 42. Morfología celular de la cepa *candidizada*.**

Imágenes representativas tomadas por microscopía óptica de una cepa wt y mutantes *Scpre1* de *S. cerevisiae* que expresan *CaPRE1* en condiciones de represión (4  $\mu\text{g/mL}$  doxiciclina).

A continuación, se analizó el crecimiento a lo largo del tiempo en presencia y ausencia de doxiciclina (Error! Reference source not found.). Como era de esperar, la cepa *candidizada* en presencia de doxiciclina mostró un retraso en el crecimiento en comparación cuando está en ausencia de doxiciclina y respecto a la cepa control YFN639 (wt), donde estaba presente el gen *PRE1* de *S. cerevisiae*.



**Figura 43. Curva de crecimiento de la cepa *candidizada* en condiciones de inducción/represión.**

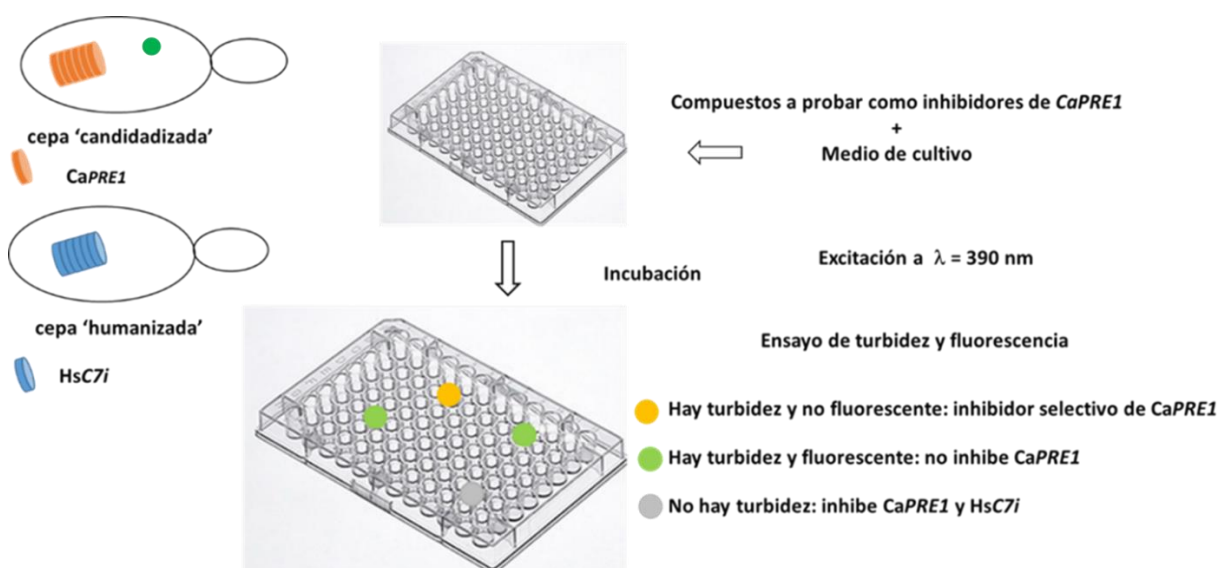
Crecimiento del mutante *pre1* de *S. cerevisiae* expresando o no *CaPRE1* (-/+ doxiciclina, dox). Como control se utilizó la cepa YFN639 portadora del mismo plásmido pero con *ScPRE1*.

Para determinar si este fenotipo se debía a un efecto de inhibición de crecimiento (fungistático) o muerte celular (fungicida), se estudió la viabilidad celular tras 24 y 48 horas de crecimiento en SD. La evaluación de la viabilidad se realizó mediante tinción con yoduro de propidio y posterior análisis por citometría de flujo. Los resultados obtenidos en condiciones de represión de *CaPRE1* mostraron una viabilidad superior al 80 % (datos no mostrados).

Por lo tanto, se corrobora que en el efecto de la represión de la expresión de *CaPRE1* tiene un efecto fungistático en la célula de la levadura bajo estas condiciones de ensayo.

### 8.2.2 Diseño de un ensayo competitivo y positivo para el rastreo de antifúngicos

Para poder diferenciar de manera inequívoca cuál de las cepas (*candidizada* o humanizada) estaba creciendo o no en presencia de un determinado compuesto con potencial antifúngico, era necesario desarrollar una herramienta para determinar (y cuantificar) dichas diferencias de crecimiento cuando ambas cepas se encontraban en el mismo pocillo (competición) de una manera directa y sencilla.



**Figura 44. Bioensayo basado en el marcaje diferencial de las cepas humanizada y *candidizada*.**

Se muestra, en esquema, los pasos a seguir para el rastreo de compuestos con actividad antifúngica selectiva frente a CaPre1p. Se basa en la utilización en un mismo pocillo de 2 cepas (una *candidizada* marcada con proteína verde fluorescente y otra humanizada sin marcar) que serían enfrentadas a una colección de compuestos con potencial actividad antifúngica. La detección de turbidez y ausencia de fluorescencia indicaría que el compuesto testado inhibe de manera selectiva la proteína de *C. albicans* pero no la humana.

La estrategia elegida se basaba en el marcaje diferencial de ambas cepas. Para ello, y tal y como se describe en Materiales y Métodos, se procedió a construir los plásmidos PAGL1 (contiene la variante de GFP *yGFP3* bajo control del promotor de *ACT1*) y pAL2 (control vacío). Estos plásmidos fueron utilizados para marcar de manera integrativa en el locus *LEU2* la cepa *candidizada* (PAGL1,

en verde) y la humanizada (control sin fluorescencia). Los plásmidos y los genotipos de las cepas generadas se encuentran descritos en las **Tabla 1** y **Tabla 3**.

De esta manera, mediante un sencillo examen de la señal de fluorescencia tras su excitación con luz UV de las placas multipocillo donde se procedería a realizar el ensayo se podría *a priori* determinar en qué pocillos existe crecimiento de la cepa *candidizada*. Un posible inhibidor selectivo para CaPre1 debiera, por tanto, manifestarse como un pocillo con crecimiento (turbidez) pero sin fluorescencia, indicativo de la inhibición del crecimiento de la cepa *candidizada* pero no de la cepa humanizada. El esquema del diseño se muestra en la Error! Reference source not found.

Finalmente, para validar el bioensayo desarrollado, se procedió al análisis por citometría de flujo del porcentaje de células que emitían fluorescencia. El análisis de los perfiles de citometría de flujo mostró una cierta fluorescencia residual en la cepa humanizada sólo se observaba mientras que la cepa *candidizada* emitía fluorescencia en un 80% de las células de la población. Este ensayo se llevó a cabo en las instalaciones de GSK, Madrid (datos no disponibles por acuerdo de confidencialidad).

Se ha desarrollado un ensayo competitivo y positivo basado en cepas de *S. cerevisiae* modificadas genéticamente suficientemente discriminatorio para un primer rastreo de posibles inhibidores de la subunidad Pre1 de *C. albicans* con potencial antifúngico.

## 9. Desarrollo de un sistema de búsqueda de nuevos antifúngicos basado en la degradación de proteínas

La degradación de proteínas es una de las principales funciones esenciales de la célula, ya que interviene en el recambio de las proteínas celulares y controla su actividad afectando a su vida media<sup>263,264</sup> La ruta no lisosomal de degradación de proteínas, en la que está implicado el proteosoma, es un proceso complejo que comprende diferentes pasos, siendo el primero (y previo a la degradación propiamente dicha) el marcaje de las proteínas que serán degradadas mediante el proceso de ubiquitinación, que es realizado por enzimas conjugadoras de ubiquitina (UBC).

Como se ha comentado en la introducción, algunas proteínas relacionadas con este proceso de ubiquitinación son esenciales en *S. cerevisiae* como, por ejemplo, Uba1p<sup>265</sup> y Uba2p.<sup>266</sup> Por esta razón, como estrategia alternativa, se ha abordado el desarrollo de un sistema de rastreo de antifúngicos enfocado en el proceso de etiquetaje para degradación de proteínas intracelulares. Entre los procesos mejor estudiados y caracterizados, tal y como se comenta en el apartado de Introducción, se encuentra el sistema de reconocimiento de sustratos para degradación mediado por el aminoácido presente en el extremo N-terminal de las proteínas, la denominada regla o

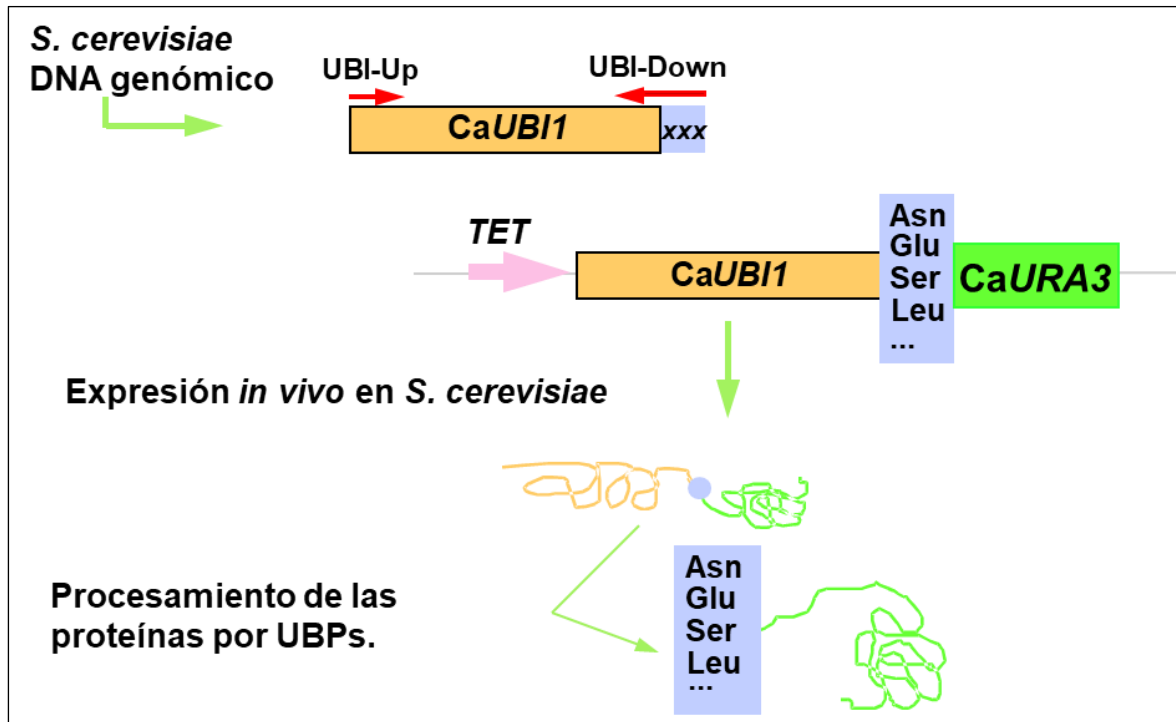
sistema del extremo N-terminal (*N-end rule*).<sup>189</sup> Dado que la semivida de algunas proteínas depende del aminoácido en esa posición, se planteó generar sustratos degradables por esta ruta que permitiera detectar sustancias que inhibieran dicha vía.

Con el interés de obtener un ensayo positivo, en el que solo sobrevivieran las células en presencia de la sustancia inhibidora, la estrategia a seguir era desarrollar un sustrato que permitiera **sobrevivir a las células únicamente cuando la proteína (sustrato) no fuera degradada**. Es decir, los posibles antifúngicos detectables deberían inhibir la degradación de la proteína testada, entre otras, alcanzando un equilibrio que permitiría vivir a las células, ya que un bloqueo total de la degradación intracelular de proteínas es letal para la célula.

### 9.1 Construcción de sustratos de proteólisis

De acuerdo con la regla del extremo N-terminal,<sup>189</sup> la vida media de una proteína depende del aminoácido localizado en el extremo N-terminal. Los aminoácidos pueden clasificarse en estabilizantes (mayor semivida) o desestabilizantes (menor semivida). Dado que la traducción siempre comienza en metionina, Varshavsky et al.<sup>186</sup> diseñaron un sistema en el que la proteína a estudiar se fusiona a Ubi1p,<sup>267</sup> una proteína, la ubiquitina, implicada en el reconocimiento o señalización de los sustratos que van a ser degradados por el proteosoma 26S. Cuando estas fusiones se expresan, las proteasas procesadoras específicas de proteínas (UBPs) son capaces de romper dichas fusiones antes del residuo N-terminal por el último residuo de glicina de la ubiquitina, lo cual permite generar diferentes proteínas que difieren exclusivamente en su aminoácido inicial. Por lo tanto, la introducción de estas construcciones en *S. cerevisiae* generaría proteínas que comienzan en diferentes aminoácidos y presentan diferentes tiempos de semivida, que pueden ser medidos si la proteína generada es fácilmente detectable o cuantificable.

La estrategia para el desarrollo de un ensayo positivo se basó en utilizar el gen *CaURA3* de *C. albicans* como indicador cuantificable, y como sistema de regulación de la expresión génica el sistema de la tetraciclina, en el que en su presencia se reprime la expresión del gen que se encuentra bajo su control.<sup>268</sup> En la **Figura 45** se muestra el esquema del flujo de trabajo que se ha seguido para desarrollar el ensayo.



**Figura 45** Generación de sustratos de la proteólisis según la regla del extremo amino-terminal.

Esquema del flujo de trabajo seguido para validar un sistema de rastreo de moléculas con actividad antifúngica basado en la construcción de sustratos degradables según la regla del N-terminal. Se basa en la construcción de un plásmido regulable por tetraciclina que controle la expresión de una fusión génica *UBI1-X-CaURA3*. Para ello, es necesaria la eliminación del último aa y el codón de parada de *UBI1* (en amarillo), que se sustituye por un codón degenerado (X, en morado) que pueda traducirse en los 20 aa. La construcción expresada en *S. cerevisiae* generará distintas versiones del marcador *URA3* susceptibles de ser procesadas por las UBPs (proteasas procesadoras específicas de proteínas).

Con este propósito, se construyeron una serie de fusiones génicas del tipo *UBI1-X-CaURA3*, en las que las proteínas resultantes solo difieren en el residuo amino terminal de *CaURA3*. El diseño de estas construcciones se describe en detalle en la sección de Materiales y Métodos (**Figura 15**). Una vez obtenidas y secuenciadas las construcciones se clasificaron las fusiones resultantes en tres categorías: **residuos estabilizantes** (serina y cisteína), **residuos desestabilizantes** (leucina, lisina o valina), y **residuos con estabilidad intermedia** (como isoleucina), según su impacto en la semivida de la proteína *CaUra3p*.<sup>269,175</sup>

## 9.2 Expresión de los sustratos de proteólisis

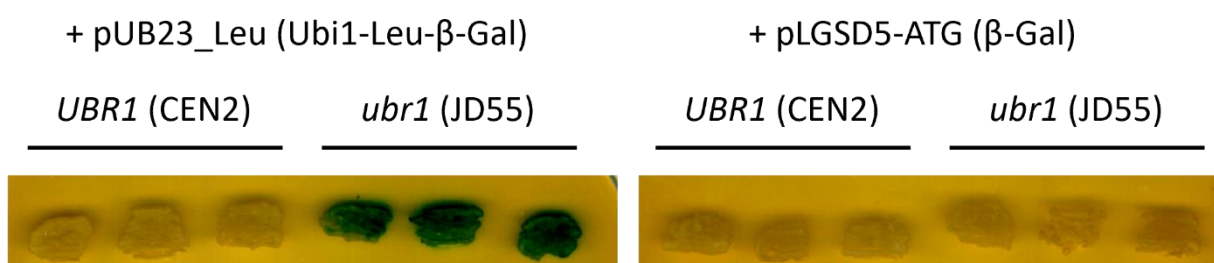
Una vez obtenidas las construcciones, se transformaron en las cepas *S. cerevisiae* CEN2 (cepa silvestre haploide) y JD55 (mutante *ubr1 Ura<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>*).

En primer lugar, para validar la estrategia diseñada, se comprobó el fenotipo del mutante *ubr1*. *UBR1* codifica una N-recognina, una E3 ligasa que reconoce residuos desestabilizantes en el extremo N-terminal de las proteínas, marcándolas para su ubiquitinación y posterior degradación

por el proteosoma. Por tanto, la delección de *UBR1* inactiva la vía de la regla del N-terminal, lo que permite validar si las construcciones obtenidas son realmente sustratos de esta ruta.

Para comprobar el fenotipo del mutante *ubr1*, se transformó la cepa wt CEN2 y la cepa JD55 (*ubr1*) con las construcciones genéticas pUB23\_Leu y pLGSD5-ATG (**Tabla 3**). pUB23\_Leu permite la expresión de una fusión *UBI1-lacZ* bajo el control del promotor de galactosa, generando un sustrato artificial de la ruta N-terminal, ya que la  $\beta$ -galactosidasa posee un residuo leucina en su extremo N-terminal y posee una vida media corta ya que, tras la escisión de la ubiquitina en una cepa silvestre, se degrada rápidamente. Sin embargo, en mutantes *ubr1*, donde la E3 ligasa está ausente, la ruta del N-terminal es defectuosa y, por lo tanto, se acumularía la  $\beta$ -galactosidasa que no se degrada. Este efecto se puede detectar fácilmente utilizando un medio sólido con galactosa como fuente de carbono y el sustrato cromogénico de la  $\beta$ -galactosidasa, X-Gal, que cuando es hidrolizado, se oxida y produce una coloración azul en las colonias. Se realizó el ensayo con varios transformantes de ambos fondos genéticos (wt o *ubr1*). Como se observa en la **Figura 46**, en un fondo wt todas las colonias analizadas portadoras tanto del plásmido vacío como del vector que expresa la fusión permanecen blancas, debido a que no se hidroliza el X-Gal. Sin embargo, en mutantes *ubr1*, las colonias adquieren color azul intenso, como consecuencia de la acumulación de la proteína de fusión, al estabilizarse y no degradarse la enzima  $\beta$ -galactosidasa, hidrolizando el sustrato X-Gal.

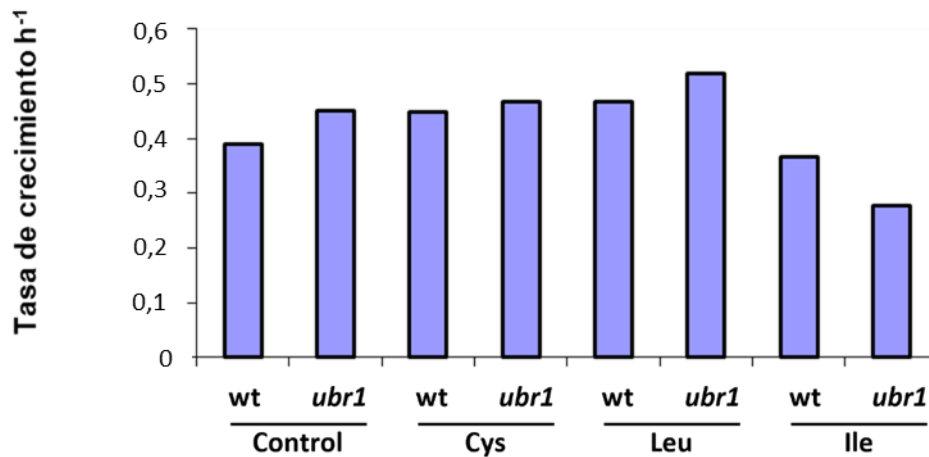
A continuación, una vez comprobado que el sistema reportero funcionaba, se utilizó esta cepa huésped para comprobar si las fusiones construidas con la proteína Ura3p eran sustratos genuinos de la ruta de la regla del N-terminal. Para ello, se transformaron dichas construcciones en las cepas CEN2 y JD55, y la expresión de estas fusiones se analizó mediante la medida de la tasa de crecimiento en medio líquido (a partir datos de D.O.  $_{600nm}$ ) y en medio sólido, en ausencia de leucina (para seleccionar el plásmido) y ausencia de uracilo (para poder medir la estabilidad de la proteína CaUra3p).



**Figura 46. Estudio del fenotipo de la cepa *ubr1* $\Delta$  de *S. cerevisiae* en medio sólido.**

Crecimiento en medio con sólido con galactosa y X-Gal de transformantes en fondo wt y *ubr1* portadores del plásmido control pLGS5-ATG (expresión de  $\beta$ -galactosidasa) o el vector pUB23\_Leu (expresión de una fusión Ubi1-Leu- $\beta$ -galactosidasa). El color azul se debe a la hidrólisis del sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa por la estabilización de esta enzima cuando la ruta N-terminal está ausente.

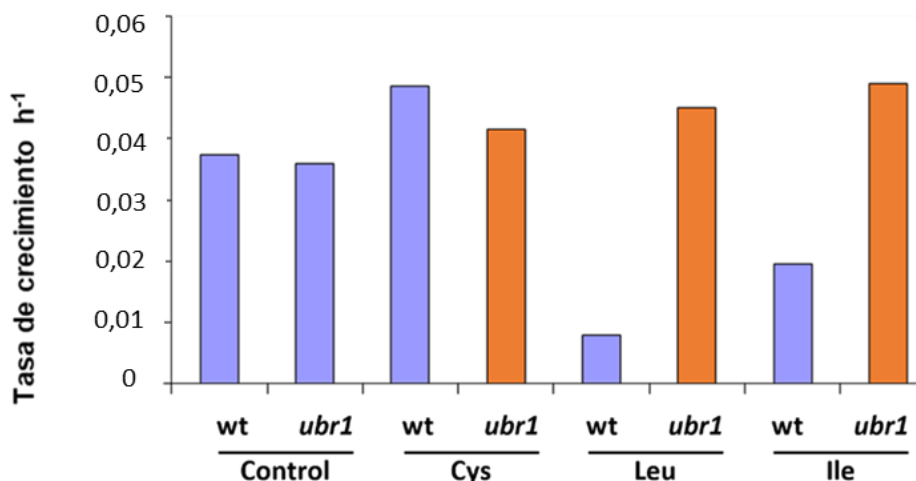
Tal y como se puede observar en la Error! Reference source not found., en ausencia de doxiciclina (condiciones de expresión), el crecimiento tanto en la cepa silvestre como en el mutante *ubr1* fue similar.



**Figura 47. Estudio del crecimiento en medio líquido en condiciones de expresión.**

Se muestran los valores de tasa de crecimiento de la cepa silvestre CEN2 (wt) y el mutante *ubr1* portadores del gen URA3(control) y los que permiten la expresión de diferentes sustratos de la vía del N-terminal en ausencia de doxiciclina.

Sin embargo, en presencia del represor doxiciclina (condiciones de represión), se observaron diferencias de crecimiento entre los transformantes en fondo silvestre y fondo *ubr1* (**Figura 48**). En fondo silvestre, el crecimiento fue más lento en aquellos transformantes que portaban una fusión con el residuo N-terminal Leucina (residuo desestabilizante) o Isoleucina (residuo intermedio), con un fenotipo menos acusado, mientras que no se afectó el crecimiento cuando se expresaba Cisteína (residuo estabilizante). Como era de esperar, en la cepa en la que está inactiva la ruta de la regla del extremo N-terminal (*ubr1*), no se observaron cambios, lo que confiere una validez genética al ensayo.



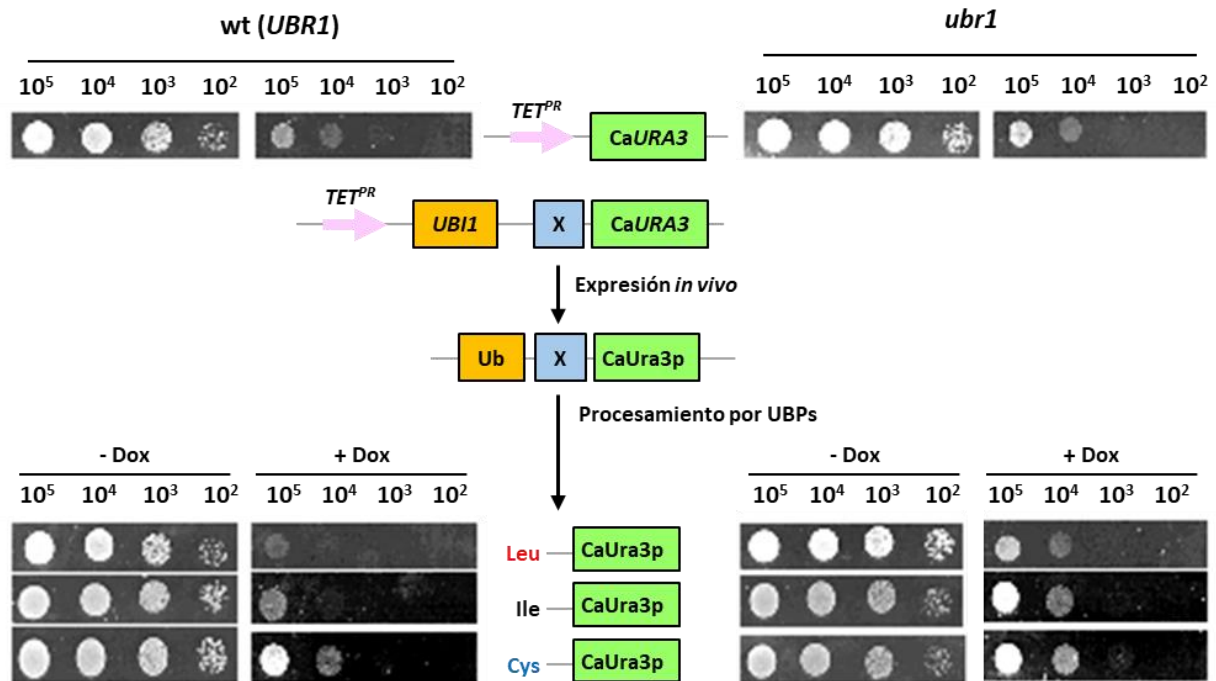
**Figura 48. Estudio del crecimiento en medio líquido en condiciones de represión.**

Se muestran los valores de tasa de crecimiento de la cepa silvestre CEN2 (wt) y el mutante *ubr1* portadores de *CaURA3* sin la fusión de *UBI1* (control) y los que permiten la expresión de diferentes sustratos de la vía del N-terminal en presencia de 2 µg/mL doxiciclina.

Cuando se lleva a cabo los estudios en medio sólido, SD suplementado con aminoácidos excepto leucina y uracilo. De acuerdo con los resultados expuestos en la **Figura 49**, la expresión de la fusión que contiene un residuo desestabilizante como la leucina en el extremo amino terminal de *CaUra3p* confiere un fenotipo  $\text{Ura}^-$  en la cepa silvestre (como resultado de una vida corta de la proteína), mientras que la misma fusión muestra un fenotipo  $\text{Ura}^+$  en la cepa *ubr1* en condiciones de represión, lo que conduce a un análisis apropiado de la semivida de la proteína testada.

La degradación de la proteína testada por la ruta de la regla del extremo amino terminal tiene como consecuencia la producción de niveles reducidos de la proteína en la cepa silvestre, excepto cuando la fusión es estabilizante (*Ubi1p-Cys-CaUra3p*), mientras que en la cepa *ubr1Δ* los niveles de *CaUra3p* están estabilizados.

Obviamente, estas construcciones son sustratos de la ruta de la regla amino terminal, por lo que probablemente permitan la búsqueda de nuevos agentes que afecten o inhiban diferentes procesos implicados en la degradación de las proteínas y regidos por esta ruta.

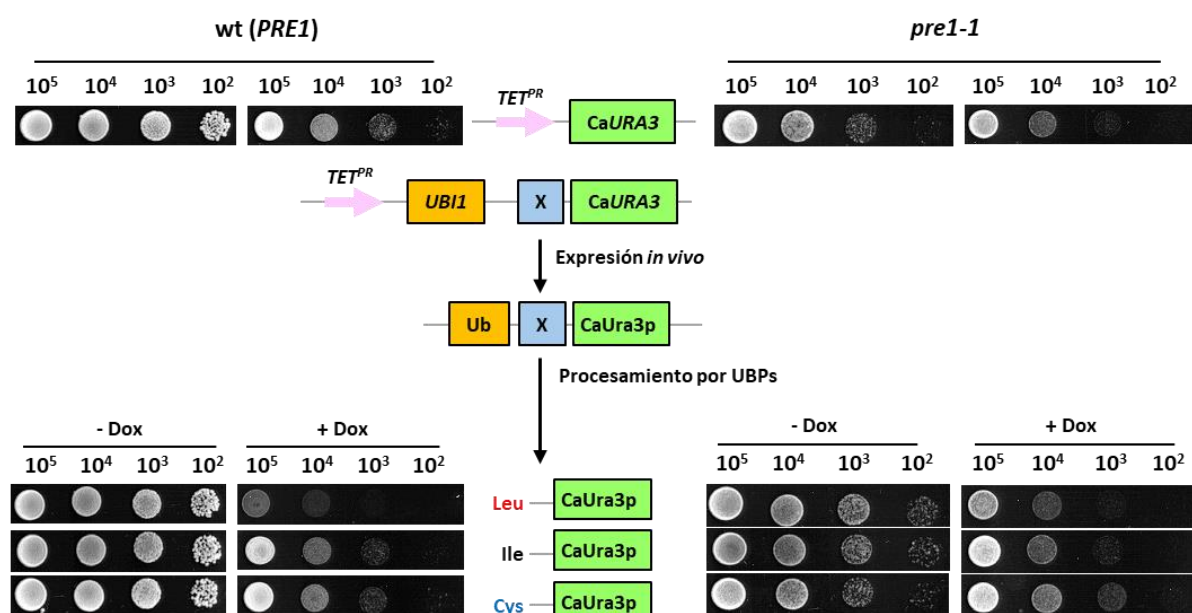


**Figura 49. Ensayo en gota del crecimiento en medio sólido de variantes de CaUra3p.**

Se muestra el crecimiento en SD Ura-Leu- tras 24 h de crecimiento a 37 °C en presencia o ausencia de 0,2 µg/mL doxiciclina (-/+ Dox). Los distintos clones se diferencian en el fondo genético (*wt* o *ubr1*) y en el vector que portan, dando lugar a la expresión de fusiones a CaUra3p destabilizante (*Leu*, en rojo), intermedia (*Ile*, en negro) o estabilizante (*Cys*, en azul). Arriba se muestra como control el crecimiento de las cepas transformadas con el gen *CaURA3* sin la unidad de ubiquitina, (*Ub*).

Llegados a este punto, una vez validado genéticamente el ensayo en las cepas deficientes en la N-recognina, se analizaron estos sustratos en una cepa de *S. cerevisiae* con defectos en el proteosoma. Para ello, se utilizó la cepa WCG4-11a (con la mutación termosensible *pre1-1*) y se transformó esta y su cepa parental isogénica WCG4 con el vector vacío y los que portan los tres tipos de sustratos construidos. Una vez aislados los transformantes a temperaturas no permisivas (38 °C), se evaluó la capacidad de crecimiento de estos en medio sólido, como anteriormente se ha descrito, tanto en condiciones de represión (+ 0,2 µg/mL de doxiciclina) como en condiciones de expresión constitutiva (- doxiciclina).

Como se puede observar (Error! Reference source not found.), en presencia de doxiciclina, la proteína CaUra3p con el aminoácido N-terminal inestable (leucina) se estabilizaba en el mutante *pre1-1*, lo que demuestra la implicación del proteosoma en la degradación de estos sustratos.



**Figura 50. Crecimiento en medio sólido de variantes de CaUra3p en mutantes en proteosoma.**

Se muestra el crecimiento, en las mismas condiciones que la Figura 49, de transformantes en fondo wt y *pre1-1* portando los distintos sustratos de proteólisis. CaUra3p desestabilizante (Leu, en rojo), intermedia (Ile, en negro) o estabilizante (Cys, en azul). Arriba se muestra como control el crecimiento de las cepas transformadas con el vector vacío (sin la unidad de ubiquitina, Ub).

Este efecto, a nivel genético, sería similar al que se espera encontrar en un rastreo a gran escala de compuestos con actividad antifúngica que actuaran como inhibidor de estos sustratos, ya que el posible antifúngico debe 1) estabilizar también esta fusión en condiciones represivas y 2) permitir observar el fenotipo Ura<sup>+</sup>, ya que el sistema se ha diseñado como un ensayo positivo.

## 10. Estudio *in silico* de los N-degrones en *C. albicans*

Como se ha introducido en esta memoria, según las rutas del sistema del amino terminal, los residuos amino-terminales de las proteínas codifican unas señales denominadas N-degrones, **Tabla 13** y su identidad está relacionada con la estabilidad de la proteína

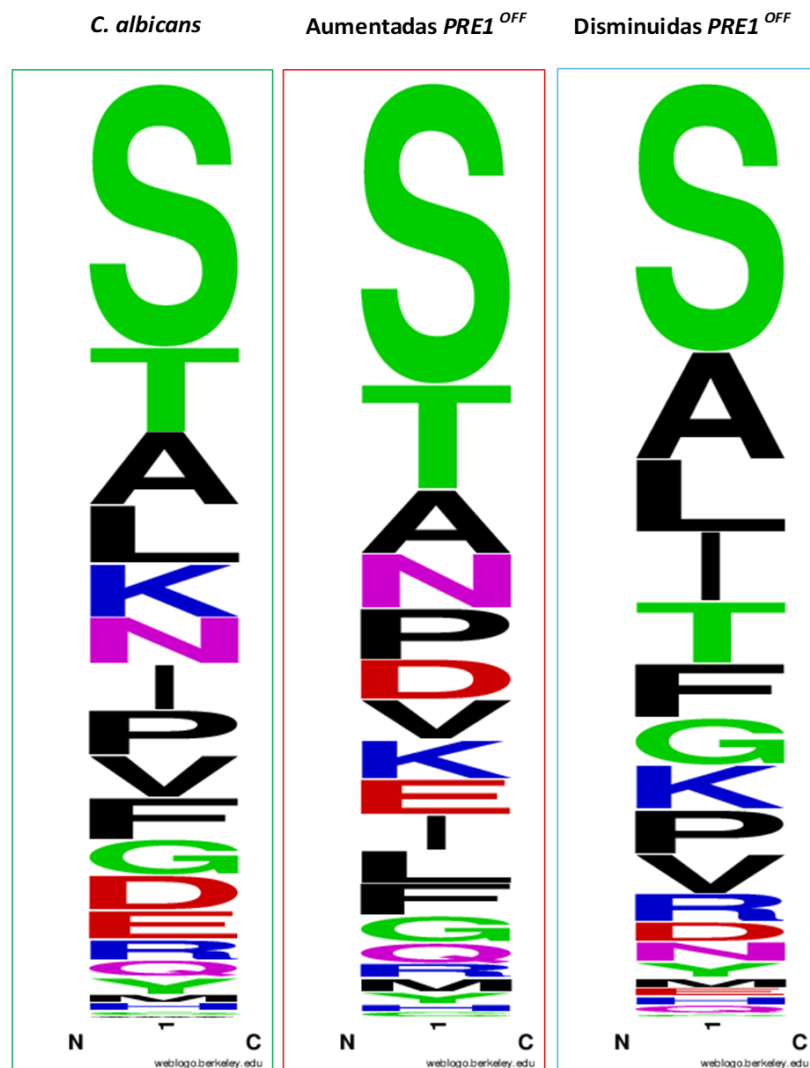
**Tabla 13. Clasificación de los N-degrones según la ruta del N-terminal.**

En azul, los aa tipo primario, en verde los secundarios, en naranja los terciarios y en rojo lo que se acetilan (<sup>a</sup>).

<b>N-terminal</b>	F	W	Y	I	L	R	H	K	D	E	N	Q	C	A	G	M	P	S	T	V
<b>Ruta amino terminal</b>	1 <sup>o</sup>	1 <sup>o</sup>	1 <sup>o</sup>	1 <sup>o</sup>	1 <sup>o</sup>	1 <sup>o</sup>	1 <sup>o</sup>	1 <sup>o</sup>	2 <sup>o</sup>	2 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup>	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.

Se ha centrado el estudio en la ruta de la regla de la arginilación del amino terminal, donde se clasifican los residuos amino terminales como recogninas (degrones reconocidos por la N-recognina Ubr1).

Se planteó estudiar el “N-terminoma” de *C. albicans* y compararlo con las proteínas que cambian su abundancia cuando está disfuncional el proteosoma. Para esto, se seleccionaron los aa que estaban en segundo lugar (el primero, que es metionina, no se consideró) de la base de datos de las proteínas de *C. albicans* depositada en CGD y se representaron como una secuencia alineada de logos, con la herramienta WebLogo (<https://weblogo.berkeley.edu/>) (Figura 51).



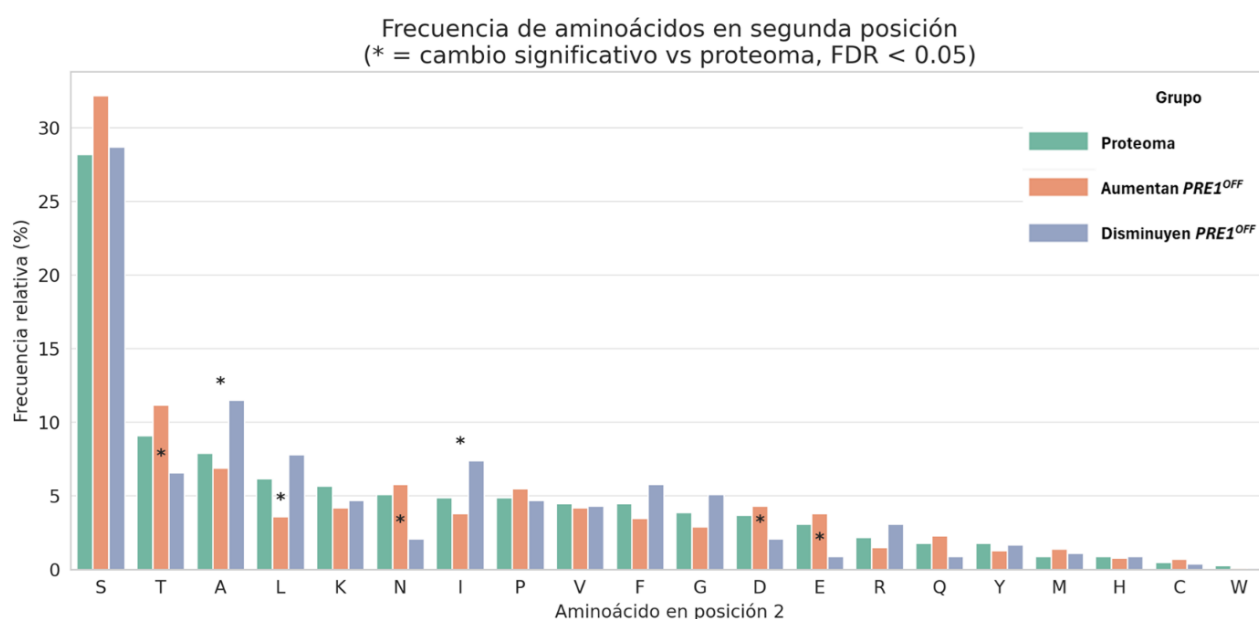
**Figura 51. Representación gráfica de la frecuencia de aa en 2<sup>a</sup> posición del N-terminoma en *C. albicans*.**

Se representa la secuencia de logos alineados de los residuos N-terminales del proteoma de *C. albicans*, y de las proteínas con cambios significativos cuando se reprime la expresión del gen *PRE1*.

En este tipo de representación, el tamaño de la letra del aa es proporcional a su frecuencia en esa segunda posición de la secuencia N-terminal. Se puede observar como en los tres grupos

analizados, el aminoácido amino terminal (sin metionina) más frecuente es la serina, que según se puede comprobar en la **Tabla 13**, es un N-degrón que debe sufrir una acetilación para ser degradado por el proteosoma. Los demás aminoácidos van cambiando su frecuencia entre grupos por eso se decidió hacer un análisis de frecuencia relativa de cada aminoácido en esa posición, para comprobar que cambios entre grupos eran significativos. Se aplicó el test de Fisher para comparar las que aumentan y las que disminuyen respecto a las del proteoma y se calculan los valores de p ajustados (FDR) para evaluar significancia. Valores < 0,05 se consideran significativos.

Los porcentajes de frecuencia relativa de cada aminoácido, y entre los tres grupos analizados, se muestran en la **Figura 52**. **Frecuencia relativas de los aminoácidos N-terminales en segunda posición del proteoma de *C. albicans* y de las proteínas con cambios significativos cuando se reprime la expresión del gen *PRE1***. Los aminoácidos N-terminales que más varían en *PRE1*<sup>OFF</sup> respecto al proteoma de *C. albicans* fueron: En las proteínas que aumentan, treonina (T), asparagina (N), ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E); en las que disminuyen, alanina (A), leucina (L) e isoleucina (I).



**Figura 52. Frecuencia relativas de los aminoácidos N-terminales en segunda posición del proteoma de *C. albicans* y de las proteínas con cambios significativos cuando se reprime la expresión del gen *PRE1*.**

Los asteriscos (\*) indican las diferencias que fueron estadísticamente significativas (FDR < 0,05) respecto al proteoma de *C. albicans*.

## 11. Desarrollo de una aplicación para convertir identificadores de genes y proteínas de *C. albicans*

Para facilitar la conversión de identificadores de ORF a nombres de genes en *Candida albicans*, he desarrollado una aplicación *web* interactiva utilizando el paquete **Shiny** de R. La aplicación utiliza un archivo de mapeo (*candida\_gene\_mapping.csv*), disponible públicamente en el repositorio de GitHub asociado al proyecto, el cual contiene la correspondencia entre ORF IDs y los nombres comunes de genes. La interfaz permite ingresar listas de ORFs y devuelve una tabla con los nombres correspondientes, con opción de descarga. Una vez validado el funcionamiento localmente en RStudio, la *app* fue publicada mediante el servicio **shinyapps.io**, lo que permite su acceso público sin requerir conocimientos de programación ni instalación de software adicional.

En la **Figura 53. H-Convorsor, desarrollado por M<sup>a</sup> Luisa Hernández.** se muestra el diseño del logo creado para esta aplicación y el código QR generado con StudioR, para facilitar su acceso.

El enlace de acceso es: <https://mlhernaez.shinyapps.io/candida-gene-app/>.



**Figura 53. H-Convorsor, desarrollado por M<sup>a</sup> Luisa Hernández.**

Herramienta en línea y gratuita desarrollada en este trabajo que permite interconvertir los descriptores de las proteínas de *C. albicans*. Se muestra el logo de la aplicación y el código QR. <https://mlhernaez.shinyapps.io/candida-gene-app/>

## DISCUSIÓN





La degradación de proteínas en eucariotas es un proceso de vital importancia para la célula, cuyo objetivo es mantener un balance proteico dependiente de la síntesis de proteínas. Una de las principales finalidades de la proteólisis es la degradación de aquellas proteínas aberrantes debidas a un error en la síntesis o a condiciones de estrés celular, y así proteger a la célula de estos productos anómalos. Además, se ha descrito su papel regulatorio en algunos procesos celulares, modulando los niveles de proteínas específicas que están implicadas en diferentes rutas biológicas. En eucariotas existen dos vías principales de degradación de proteínas: la vacuolar o endocítica y la proteosomal. Esta segunda vía está mediada por un complejo multifuncional, el proteosoma, cuya caracterización funcional ha sido el objeto de este trabajo.

## 1. *PRE1* es un gen esencial para la viabilidad celular en *C. albicans*

El descubrimiento casual del gen *PRE1* de *Candida albicans* durante el desarrollo de herramientas de manipulación genética en este hongo en el grupo de investigación del Dr. Jesús Pla, nos incitó a profundizar en el proceso de la degradación celular controlada de proteínas en este microorganismo.

Su clonación e identificación por similitud frente a bases de datos de DNA y de proteínas, y su capacidad de complementar algunos de los fenotipos descritos del mutante termosensible *pre1* de *S. cerevisiae* (**Figura 18. Complementación del fenotipo termosensible del mutante *pre1* de *S. cerevisiae* por el inserto HISX de *C. albicans* que porta el gen *CaPRE1*.**), ha permitido demostrar que se trata del homólogo funcional en *C. albicans*. En otras especies de *Candida* se ha identificado el ortólogo a *CaPRE1* pero no ha sido caracterizado, según los datos mostrados en CGD.

¿Cuál es su importancia en la fisiología de este patógeno oportunista? La explicación más obvia, por similitud con lo que ocurre en *S. cerevisiae*, es que se trataba de un gen esencial. Sin embargo, hoy en día, ni siquiera la base de datos CGD (*Candida Genome Database*) reconoce abiertamente a este gen como “esencial”. Esta base de datos, utilizando datos de 4 estudios genómicos y transcriptómicos a gran escala,<sup>270,271,272,273</sup> calculan una puntuación de esencialidad para cada gen anotado (*Net essentiality score*). Como resultado de ese análisis, de los 5894 genes analizados en CGD, sólo 1195 (20% del total) se describen como esenciales, mientras que en un 6% del total (347) no existen suficientes datos. Pues bien, *CaPRE1* se encuentra dentro de ese 6% del que no existe suficiente información para considerarlo como gen esencial. Por tanto, el trabajo presentado en esta Tesis Doctoral proporciona una información muy relevante para comprender la biología de este microorganismo y para completar la información depositada en las bases de datos de *C. albicans*.

¿Es posible estudiar los defectos que tienen lugar en un microorganismo cuando un gen es esencial? En este trabajo se optó por generar dos tipos de mutantes condicionales, basados en el uso de promotores regulables (*PCK1* y el sistema dependiente de tetraciclina), ya que el cambio

del medio de cultivo provoca cambios metabólicos que podrían alterar la interpretación de los resultados obtenidos.

En ambos casos, los resultados ponen de manifiesto que en condiciones de represión del gen *CaPRE1*, el crecimiento se reduce drásticamente, tanto en medio líquido como en medio sólido, a los tiempos y en las condiciones de estudio, lo que sugiere que la inhibición del proteosoma por represión de este gen tiene, en un primer momento, un **efecto fungistático** en la célula. Cuando se observa al microscopio las células del mutante en condiciones de represión, la morfología celular es claramente aberrante, con predominio de crecimiento filamentososo, y donde las células hijas no llegan a separarse completamente de célula madre, que, como veremos más adelante, se corrobora tras el análisis proteómico realizado. Este fenotipo aberrante, además, resultó ser irreversible ya que se mantiene cuando las células se transfieren a condiciones de inducción del gen, y que, al no observarse muerte celular a esos tiempos, podrían indicar un proceso apoptótico. Estos resultados están en concordancia con lo descrito posteriormente al inicio de este trabajo. Así, el grupo de Leah E. Cowen, en un análisis sistemático de las 33 subunidades del proteosoma puso de manifiesto que 28 de ellas actúan como represores de la morfogénesis en *C. albicans*, y en otras especies del mismo género, y que la inhibición farmacológica del proteosoma con dos compuestos diferentes, MG132 y bortezomib, da lugar a un fenotipo hiperfilamentososo.<sup>274</sup> Los filamentos generados con estos compuestos se asemejan, no solo a los inducidos por la inhibición de Hsp90,<sup>275</sup> sino también a los que se describen en este trabajo, mostrando una formación de septo y un contenido nuclear aberrantes. Por otro lado, el grupo de Alistair J. P. Brown demostró<sup>276</sup> que la inactivación o el agotamiento de la poliubiquitina Ubi4 afectaba a la morfología celular de *C. albicans* promoviendo la aparición de morfologías celulares mixtas (con hifas verdaderas y pseudohifas), reforzando las observaciones de Roig y Gozalbo,<sup>277</sup> y sugiriendo el papel de la poliubiquitinación en la ejecución normal del ciclo celular, particularmente durante el crecimiento filamentososo. Además, se ha descrito como la virulencia del mutante *ubi4* está significativamente atenuado.

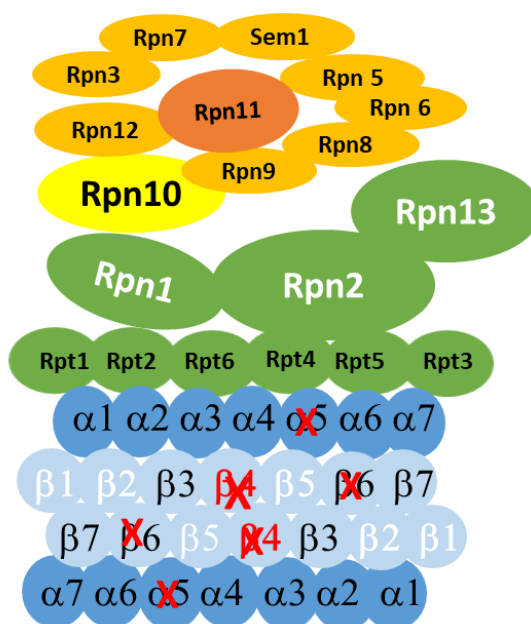
Otro de los fenotipos caracterizados en condiciones de represión de *CaPRE1*, y que derivan de los procesos alterados identificados con la aproximación proteómica, son los relacionados con el proceso de endocitosis y el estrés oxidativo. Al tratarse de gen esencial, los estudios fenotípicos en medio sólido adicionado con diferentes agentes inhibidores fueron descartados, ya que la lectura de los resultados requiere tiempos largos de incubación. Los análisis por microscopía haciendo uso de diferentes fluorocromos para cada uno de los procesos en estudio han permitido corroborar los datos proteómicos, aunque no ha sido posible realizar una cuantificación de la fluorescencia de una manera sencilla, debido a las formas aberrantes y filamentosas que muestran las células del mutante *PRE1<sup>OFF</sup>*. En este sentido, a pesar de la heterogeneidad de la población (probablemente debido al carácter esencial del gen y encontrarse en distintas fases de crecimiento o muerte celular), los resultados muestran un aumento de ROS, lo que confirma el

estrés oxidativo, probablemente por disfunción mitocondrial. De hecho, recientemente hemos demostrado que la ausencia de Prn1, una proteína de función desconocida en *C. albicans*, en situaciones de estrés oxidativo acumula mayores niveles de ROS, muestra porcentajes superiores de muerte por apoptosis, y entre las proteínas cuya abundancia se ve aumentada se encuentran proteínas de la subunidad reguladora del proteosoma (Phb2, Rpt3, Rpn3 y Rpt4).<sup>278</sup>

## 2. Impacto de la disfunción de *PRE1* ( $\beta$ 4) sobre el ensamblaje del proteosoma 26S

Con el objetivo de estudiar la funcionalidad del proteosoma en las células *PRE1*<sup>OFF</sup> nos planteamos si los complejos 20S y el 26S estaban ensamblados correctamente y, por tanto, eran funcionales cuando eran deficitarios en la subunidad  $\beta$ 4 del proteosoma 20S.

El aislamiento del complejo del proteosoma en *C. albicans* mediante la técnica de la separación por electroforesis nativa (blue-native) ya había sido reportado por nuestro grupo de investigación,<sup>279</sup> con la identificación del complejo del proteosoma en vesículas extracelulares de hifas, pero no en las de levaduras.



**Figura 54. Cambios observados en el ensamblaje de las subunidades del proteosoma 19 S y 20S.**

Marcadas en azul las subunidades de la parte catalítica 20S que disminuyen en *PRE1*<sup>OFF</sup> y con una x en rojo las que no están presentes, o están en mínima cantidad en *PRE1*<sup>OFF</sup>. Las subunidades  $\beta$ 4 están marcadas en rojo. Las subunidades con función catalítica están marcadas en blanco. Todas las subunidades identificadas del 19S están aumentadas. La parte de la base indicada en color verde y la parte de la tapa en color naranja y amarillo

La disfunción de  $\beta$ 4 probablemente impide la incorporación ordenada de otras subunidades, comprometiendo así la simetría del barril proteolítico y, en consecuencia, impidiendo la

dimerización de las subunidades del proteosoma y generando complejos intermedios inestables. Nuestros datos del análisis del complejo del proteosoma son compatibles con que la parte catalítica 20S del proteosoma no está totalmente ensamblada o con un déficit de la cantidad de proteosomas ensamblados, ya que en el mutante *PRE1<sup>OFF</sup>* todas las subunidades del núcleo 20S son menos abundantes respecto al *PRE1<sup>ON</sup>*, algunas de ellas en cantidades mínimas (subunidades  $\alpha 5$  y  $\beta 6$ ) (**Figura 54**). En eucariotas, las subunidades del proteosoma 20S, incluyendo la  $\beta 4$ , se ensamblan de forma jerárquica con el soporte de chaperonas específicas que aseguran su correcto plegamiento y una incorporación ordenada de las subunidades.<sup>280</sup> El 20S, como complejo catalítico, puede actuar de manera independiente y en solitario, para degradar proteínas no ubiquitinadas.<sup>281,111</sup>

Otra de las observaciones derivadas del análisis proteómico es que, en ausencia de Pre1, se produce un aumento significativo de subunidades del complejo regulador 19S, lo que sugiere una respuesta compensatoria frente a la disfunción del núcleo catalítico. Esta sobreexpresión de subunidades del 19S podría reflejar un intento de mantener la capacidad de reconocimiento y procesamiento de proteínas ubiquitinadas, aun cuando el componente catalítico del sistema (20S) esté comprometido o a que son sustratos propios del proteosoma y se en esta situación. Este hecho es compatible con que en organismos eucariotas, cuando el ensamblaje del 20S es defectuoso, el sistema celular puede recurrir a la degradación de estos complejos incompletos, incluso antes de que se integren completamente al sistema 26S por autofagia.<sup>280</sup>

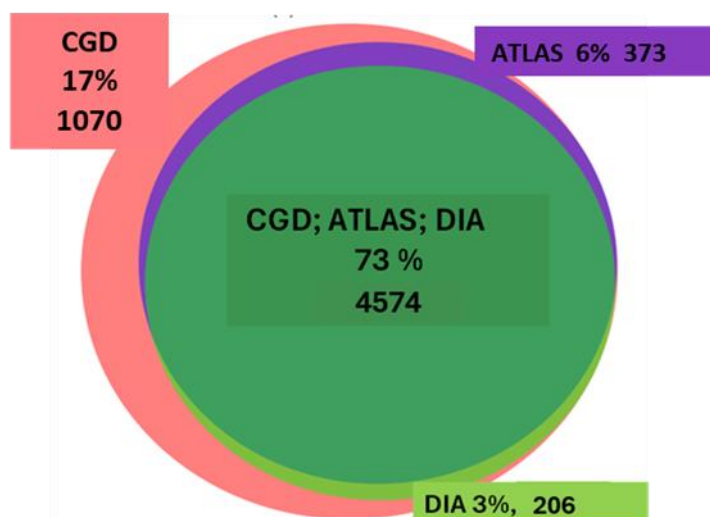
En conjunto, estos datos apoyan un modelo en el que la pérdida de función de Ca*PRE1* no solo compromete la actividad catalítica del proteosoma, sino que induce el desacoplamiento del 26S, del 20S como núcleo catalítico y conlleva la acumulación de la parte reguladora del proteosoma 19S.

### 3. Aproximación proteómica para estudio del proteoma en *C. albicans*

El análisis proteómico realizado en este trabajo nos ha permitido la caracterización del complejo del proteosoma en *C. albicans* y valida la aproximación proteómica como una poderosa herramienta para obtener una perspectiva global de los cambios que se producen a nivel celular. La estrategia cuantitativa DIA combina alta sensibilidad, reproducibilidad y profundidad de análisis, siendo una herramienta poderosa para estudios proteómicos cuantitativos de alta calidad.

Las proteínas identificadas en este trabajo (4780) con al menos 2 péptidos suponen casi un 77% del total de proteínas anotadas en la base de datos del proteoma total en CGD (6218) (**Figura 55**). En el repositorio público de proteínas identificadas y validadas de *Peptide Atlas* para *C. albicans*.<sup>282,283</sup> hay 4942 proteínas, lo que supone un 79,5% de las proteínas canónicas anotadas en CGD. Así, los resultados obtenidos muestran un total de 4574 proteínas comunes a

los datos públicos anotados en Peptide Atlas y en el análisis aquí presentado por DIA, mostrando 373 no identificadas en el análisis DIA y 1070 proteínas en la base de datos de CGD sin identificar en ningún caso. Lo que resulta en un 17% de proteínas restantes anotadas en CGD y proteómicos. Es destacable que, en un único experimento de análisis de 6 muestras, se han identificado 206 proteínas que no están recogidas en el *Peptide Atlas*, lo cual podría ser debido a que se ha construido con todos los datos de espectrometría de masas (excepto DIA) que se encuentran en el repositorio público de PRIDE. Esto supone un 3% más de proteínas no anotadas anteriormente en ningún experimento de espectrometría de masas de acceso público. Por lo tanto, estos datos validan la aproximación proteómica DIA como una herramienta poderosa para profundizar en el proteoma y caracterizarlo a gran escala.



**Figura 55. Diagrama de Venn comparativo de proteínas identificadas**

Se comparan las proteínas del análisis DIA (verde claro), con las proteínas anotadas en la base de datos CGD (rosa) y las de Peptide Atlas (morado).

### 3.1 Proteómica cuantitativa: visión integradora de la degradación de proteínas por el proteosoma en *C. albicans*

El estudio de proteómica cuantitativa de la cepa ML1113 en condiciones de represión *PRE1*<sup>OFF</sup> permitió cuantificar un gran número de proteínas, 4319, detectando cambios significativos en un 42,5 % de ellas (1838). De estas, 1069 aumentaron su abundancia en condiciones de represión de *PRE1* (58%) frente a las 769 proteínas que disminuyeron. Esta gran cantidad de datos disponibles nos ha permitido realizar un análisis completo de las proteínas diferenciales y, en base a ello, de los procesos biológicos que se encuentran alterados.

El uso del mutante condicional *PRE1* nos ha permitido validar estudios previos donde la función del proteosoma se veía comprometida en distintas situaciones.<sup>274</sup>

La identificación de sustratos directos o indirectos del proteosoma, que normalmente se degradarían por el proteosoma se acumularían a priori en *PRE1<sup>OFF</sup>*, lo que permite generar un **catálogo de potenciales sustratos** del proteosoma en *C. albicans*.

En segundo lugar, dado que el proteosoma no solo degrada sustratos específicos, sino que regula la homeostasis proteica general, nuestro análisis permite una **comprensión del impacto global del proteosoma en la proteostasis**. En este sentido, este trabajo pone de manifiesto cómo la disfunción del proteosoma afecta a diversos procesos celulares, como el estrés oxidativo, la autofagia, las rutas de señalización, el ciclo celular, entre otros, que se comenta más adelante.

En tercer lugar, nos ha permitido caracterizar las **vías compensatorias o de respuesta** ante una disminución de la actividad del proteosoma. Estos cambios se reflejaron en un incremento del número de proteínas implicadas en la autofagia y la ruta endocítica, o en una reducción de la abundancia de aquellas implicadas en la traducción y biogénesis de ribosomas, así como una menor actividad de la fosforilación oxidativa.

Además, permite elaborar un **catálogo de proteínas de vida corta**. En este sentido, nuestros resultados corroboran estudios previos donde, haciendo uso del mutante condicional dependiente de fuente de carbono generado en este trabajo, ponen de manifiesto que los niveles de la MAPK Cek1 están regulados por la degradación proteica.<sup>224</sup>

Por último, la identificación de proteínas cuya degradación dependa del proteosoma puede ser de gran utilidad para la **identificación de biomarcadores o dianas en terapia antifúngica** basados en el proteosoma.

### 3.2. Una deficiente función proteosomal altera importantes procesos biológicos en *C. albicans*

El balance entre la síntesis y la degradación de proteínas es el principal determinante de la homeostasis de la célula. En concordancia, los datos obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto que la deficiencia en la subunidad  $\beta 4$  del proteosoma 20S al reprimir *CaPRE1* afecta la proteostasis celular y, además, al ser deficiente la degradación de proteínas, se acumulan proteínas que denotan el estrés proteotóxico al que la célula se somete, por acumulación de sustratos ubiquitinados y proteínas aberrantes, mal plegadas o modificadas por estrés. Todo ello provoca alteraciones en la actividad de las diversas rutas moleculares que gobiernan la biología de la célula. Entre estas, se discuten algunas de ellas destacando aquellas proteínas que incrementan (en rojo) o disminuyen (en azul) su abundancia en el mutante *PRE1<sup>OFF</sup>*.

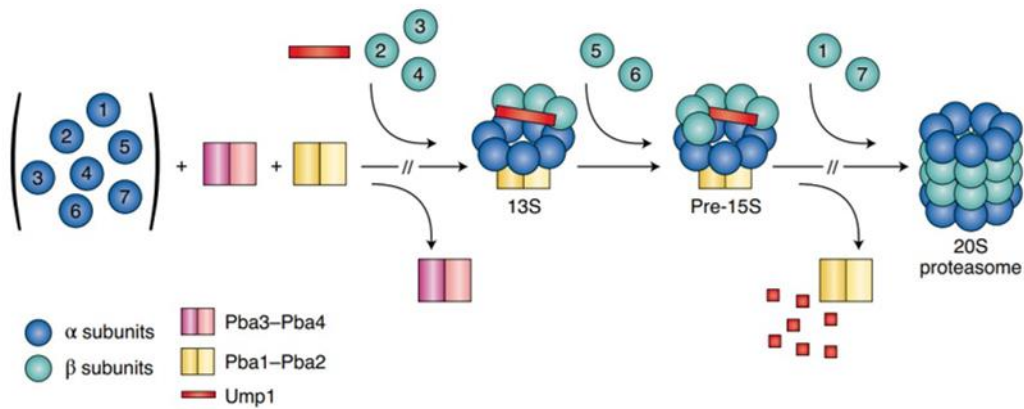
### 3.2.1 Proteosoma

El proteosoma está sujeto a un control en todas sus etapas, desde la transcripción (Rpn4), el ensamblaje (chaperonas específicas), hasta la actividad funcional y la degradación selectiva (proteofagia). Esto garantiza una respuesta adecuada del sistema UPS (sistema ubiquitin-proteosoma), según las condiciones celulares, el estrés al cual esté sometido la célula, o las necesidades proteostáticas de la célula.

**La biosíntesis del proteosoma** 26S es energéticamente muy costosa para la célula debido a su complejidad y abundancia, por eso tanto la síntesis de las subunidades que lo componen como de las proteínas asociadas supone un proceso con una regulación muy coordinada, donde el factor de transcripción Rpn4 tiene un papel esencial, ya que activa la transcripción de genes del proteosoma<sup>284</sup> Rpn4 se degrada rápidamente por el propio proteosoma, previa ubiquitinación llevada a cabo por las proteínas Rad6 y Ubr2).<sup>242</sup> Sin embargo, cuando el proteosoma está comprometido, Rpn4 se estabiliza, se acumula y activa la transcripción, generando un sistema compensatorio, tal y como observamos en el mutante *PRE1<sup>OFF</sup>*. La expresión de Rpn4 está integrada en una red regulatoria de respuesta a estrés, por varios factores de transcripción como son Hsf1<sup>285</sup> (alias Cta8, en CGD) o Cap1 (Yap1 en *S. cerevisiae*).<sup>286</sup>

La formación del complejo central 20S<sup>287</sup> comienza con el **ensamblaje** (Figura 54. **Cambios observados en el ensamblaje de las subunidades del proteosoma 19 S y 20S.** del anillo de subunidades  $\alpha$ , mediado por dos complejos chaperonas heterodiméricos, Pba1-Pba2 (*Proteasome Assembly chaperone 2*) y Pba3-Pba4.<sup>280</sup> Una vez completado el anillo  $\alpha$ , las subunidades  $\beta$  del 20S se incorporan en un orden específico, comenzando con  $\beta$ 2, seguida de  $\beta$ 3,  $\beta$ 4,  $\beta$ 5,  $\beta$ 6 y  $\beta$ 1, lo que da lugar a la formación secuencial de los intermedios 13S, 15S y del medio proteosoma.<sup>288</sup> El ensamblaje del anillo  $\beta$  es asistido por la chaperona Ump1,<sup>289</sup> y el medio proteosoma resultante es cubierto por Blm10<sup>290</sup> (Blm3, en CGD). A continuación, se produce la incorporación de la subunidad  $\beta$ 7, lo que promueve la asociación de dos medios proteosomas para la generación de un 20S completo. La eliminación autocatalítica de los propéptidos de las subunidades  $\beta$  activa el 20S y conduce a la degradación de Ump1.<sup>289</sup> La base de la partícula reguladora 19S se ensambla a partir de tres módulos de chaperonas separados, Nas2-Rpt4-Rpt5, Nas6-Rpt3-Rpt6-Rpn14, y Hsm3-Rpt1-Rpt2-Rpn1. Estos módulos se asocian entre sí, de manera ordenada, para construir el anillo Rpt, al que sigue la incorporación de Rpn2, Rpn13, y, finalmente, Rpn10, formándose la base completa. La tapa del 19S se ensambla en gran medida de forma espontánea, comenzando con la dimerización de Rpn8 y Rpn11, seguida por el reclutamiento secuencial de Rpn6, Rpn5, Rpn9, un complejo trimérico (Rpn3-Rpn7-Sem1) y, por último, Rpn12. A continuación, la tapa y la base se combinan para formar un 19S completo. Una vez completados el 20S y el 19S, ambos subcomplejos se asocian para formar el proteosoma 26S

maduro. Finalmente, tiene lugar una verificación de la correcta asociación CP-RP (Parte Catalítica-Parte Reguladora), mediada por **Ecm29**.



**Figura 56. Ensamblaje de la partícula catalítica 20S del proteosoma.**

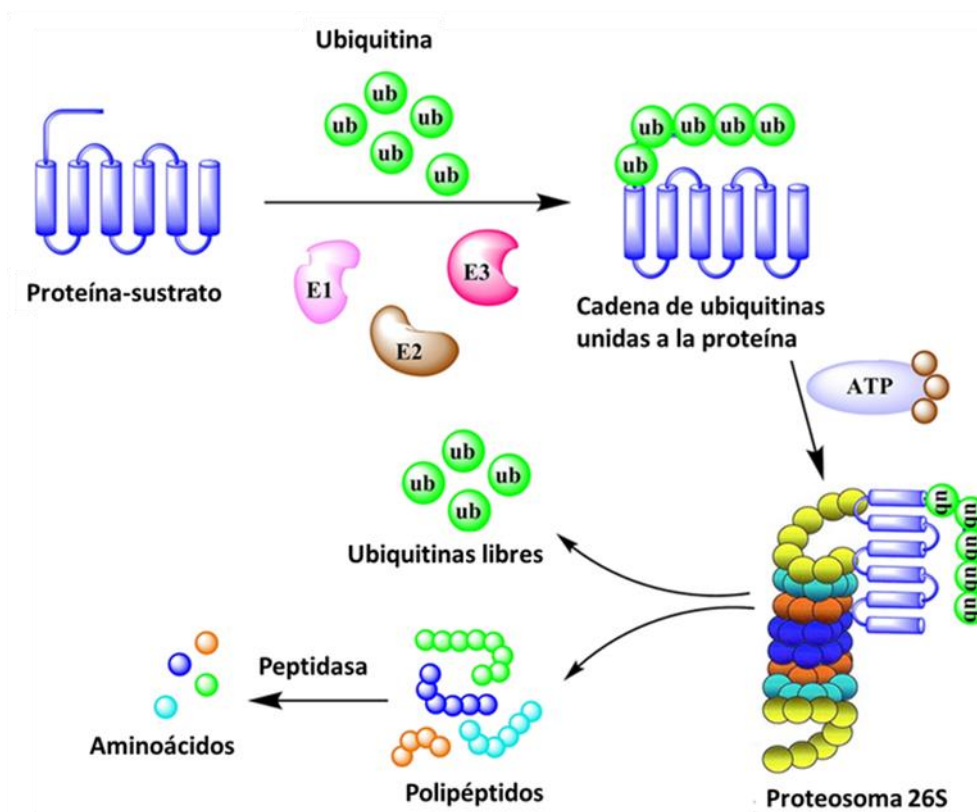
Imagen tomada de Morris,EP, 2021<sup>287</sup>

El proceso de degradación de las proteínas por el proteosoma (**actividad**) (**Figura 57**), como ya se ha comentado, no solo elimina proteínas aberrantes y/o mal plegadas, sino que juega un papel importante en respuesta a distintos tipos de estrés, regula el ciclo celular, degrada proteínas de vida corta, y provee una importante fuente de aminoácidos para la síntesis *de novo* de proteínas, y de unidades de ubiquitina.<sup>291</sup> En el estado *PRE1<sup>OFF</sup>*, la ruta de biosíntesis de aminoácidos está disminuida y al acumularse una gran cantidad de proteínas, se detecta una disminución de las **proteínas ribosomales** y las implicadas en **traducción** ya que se ve disminuida la síntesis de proteínas.

En el paso final (**degradación**), las subunidades no funcionales del proteosoma (las no ensambladas en estado libre) se degradan por el propio sistema UPS (*Ubiquitin Proteasome System*), previa ubiquitinación. La proteína **Hsp42** media esta degradación, secuestrando estas subunidades en depósitos citoplasmáticos como los IPODs (*Insolubles Protein Deposits*). Esta podría ser la razón del aumento de la abundancia de algunas subunidades α y β y todas las del 19S, ya que al ser sustratos del propio proteosoma (no funcional) se acumulan en la condición *PRE1<sup>OFF</sup>*.

Los proteosomas, como complejos 26S, también son degradados por la vía vacuolar siendo eliminados mediante **autofagia selectiva**, en un proceso conocido como proteofagia. **Cue5** (en otros eucariotas es **Rpn10**) actúa como unión entre los proteosomas ubiquitinados y la membrana, mediante un receptor de la autofagia selectiva (**Atg8**).<sup>292</sup> La función exacta de **Snx4** (también aumentada) en la autofagia del proteosoma,<sup>293</sup> y en otras formas de autofagia selectiva, aún no está del todo clara. Snx4 podría estar facilitando el transporte de membranas

desde el aparato de Golgi hasta el autofagosoma, o de las proteínas necesarias para la autofagia dentro de la célula.



**Figura 57. Esquema de la actividad proteolítica del proteosoma.**

La degradación de proteínas ubiquitinadas por el complejo 26S, es una fuente de aminoácidos libres y unidades de ubiquitina. Figura modificada de Bhatia et al., 2021.<sup>291</sup>

### 3.2.2. Degradación vacuolar y rutas compensatorias

Otro de las conclusiones que se derivan del estudio proteómico es que la disfunción proteosomal generada por la represión de *CaPRE1* activa respuestas compensatorias, consecuencia del compromiso severo de la degradación proteica.

Entre ellas, se observa el aumento en abundancia de las proteínas de rutas asociadas al tráfico vesicular, la autofagia, la degradación vacuolar y la endocitosis, las cuales actuarían conjuntamente para mantener la proteostasis y mitigar el estrés proteotóxico.

La **autofagia** es un proceso muy conservado a lo largo de la evolución que permite la degradación masiva y no selectiva de componentes celulares. La formación de autofagosomas, su fusión con la vacuola, y la posterior degradación por hidrolasas lisosomales, permite la eliminación de proteínas agregadas y orgánulos o complejos del citoplasma disfuncionales, como un proteosoma no ensamblado.<sup>294</sup> Por ello, no es de extrañar que en el mutante *PRE1<sup>OFF</sup>*, hayamos

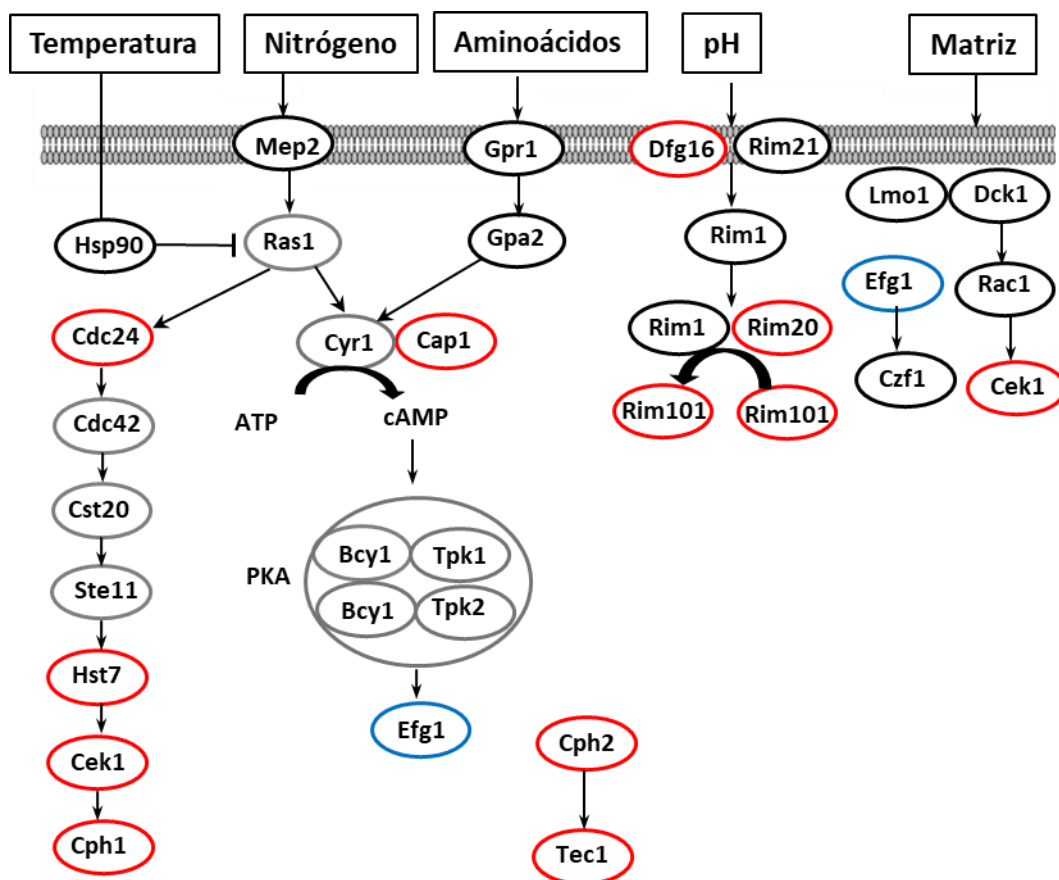
observado una acumulación de proteínas relacionadas con la autofagia y el transporte vacuolar, lo que sugiere una intensificación del catabolismo lisosomal como vía alternativa al UPS. Asimismo, se observa un aumento de la **endocitosis** y del transporte entre el retículo endoplásmico (RE), el aparato de Golgi y las vesículas, posiblemente como estrategia para remover receptores de membrana mal conformados y reducir, así, el estrés asociado a proteínas aberrantes. Algunas proteínas implicadas en estos procesos, como **End3**, tienen un papel esencial en la integridad de la pared celular, la secreción de proteínas, la formación de hifas y procesos relacionados con la virulencia.<sup>295</sup>. La disfunción del proteosoma en el mutante *pre1* de *Candida albicans* sugiere una sobrecarga en los sistemas celulares encargados del control de calidad proteico, incluyendo el sistema de **degradación asociada al retículo endoplasmático** (ERAD, por sus siglas en inglés). Este sistema permite el reconocimiento, retrotranslocación y eliminación de proteínas mal plegadas que se acumulan en el lumen o en la membrana del retículo endoplasmático. En *C. albicans*, el sistema ERAD detecta las proteínas anómalas, facilita su direccionamiento hacia el canal de retrotranslocación para, una vez en el citosol, ser ubiquitinadas por enzimas como **Ubc6** (E2) y **Doa10** (E3) para su degradación por el proteosoma. La extracción de estas proteínas del RE depende del complejo ATPasa (**Cdc48**) y sus cofactores **Ufd1** y **Npl4**. En conjunto, el sistema de degradación asociada al retículo endoplasmático (ERAD) funciona como un componente esencial de la respuesta del retículo endoplasmático al estrés y sugiere estar altamente demandado en el contexto de la alteración proteostática inducida por la represión del gen *PRE1*, contribuyendo de esta manera a la activación de rutas compensatorias como la autofagia y la posible apoptosis por estrés prolongado.

### 3.2.3 Morfogénesis

En *C. albicans*, tal y como se ha comentado, la transición morfológica juega un papel muy importante en los procesos de infección y en su virulencia. Este proceso se induce en respuesta a diferentes condiciones del huésped y está regulada por rutas de señalización muy complejas y diferentes procesos celulares. Nuestros datos proteómicos están en concordancia con estudios previos donde muestran que la alteración en la progresión del **ciclo celular** o en la homeostasis proteica dan lugar a formas filamentosas,<sup>111</sup> poniendo de manifiesto el papel del proteosoma como regulador negativo de la transición levadura-hifa (**Figura 58**). Además, el hecho de que **Efg1** aparezca disminuido en nuestro análisis, corrobora los estudios previos donde se demuestra que la inhibición farmacológica del proteosoma induce un fenotipo de filamentación independiente de Efg1. En este sentido, el aumento en la abundancia de varios de los factores de transcripción que regulan la expresión de genes de filamentación, como **Tec1**, **Cph2** y **Cph1**, y de varios de los miembros de la ruta de señalización MAPK mediada por Cek1 en *C. albicans*, como **Cdc24**, **Hst7**, **Cek1**, y el mencionado factor de transcripción **Cph1**, postulan estas rutas como las responsables del fenotipo filamentosos aberrante observado en condiciones de represión de *CaPRE1*. Este

patrón apunta a una posible reprogramación de la red reguladora de la morfogénesis en el mutante, donde la vía MAPK toma un rol predominante frente a la vía cAMP-PKA-Efg1. Esta compensación refleja la plasticidad de la regulación morfogénética en *C. albicans* y su capacidad para mantener o potenciar la filamentación mediante vías paralelas.

Otras de las proteínas cuya abundancia se incrementa, y que directa o indirectamente están relacionadas con la regulación de morfogénesis en este hongo, son **Rim101**, factor de transcripción activado por **Rim20** y la proteína de membrana **Dfg16**, que actúa como sensor de pH, regulando la expresión de otros genes que regulan la morfogénesis ante una señal de cambio de pH.<sup>96,296</sup>



**Figura 58. Esquema de diferentes vías de regulación de la filamentación.**

En rojo, se muestran las proteínas con abundancia aumentada en condiciones de represión de *CaPRE1*; en azul, las que aparecen con abundancia disminuida; en gris, las que no presentan cambios. Imagen tomada de Höfken, T. (2013).<sup>296</sup>

### 3.2.4 Factores de transcripción

Otra de las observaciones derivada del análisis de los resultados de proteómica en el mutante *PRE1<sup>OFF</sup>*, es que se produce un aumento coordinado de la abundancia de múltiples factores de

transcripción. Estas proteínas juegan un papel esencial en la regulación de procesos como la morfogénesis, la respuesta a estrés y el metabolismo celular, lo que sugiere que la alteración en la función del proteosoma desencadena una reprogramación global y afecta a diversas rutas regulatorias. Además, el aumento en la abundancia de factores relacionados con el estrés indica una respuesta celular para manejar la acumulación de proteínas o daños asociados a la disfunción proteosomal. Factores como **Gcn4**, **Hac1**, **Msn4** y **Rim15**, y otros implicados en la respuesta a estrés nutricional, estrés asociado al retículo endoplasmático o estrés oxidativo, también están aumentados, lo que sugiere que la disfunción del proteosoma induce una respuesta adaptativa al estrés. Factores poco caracterizados o con funciones regulatorias amplias, como muchos factores **Zcf** (*Zinc Cluster Family*), **Bud14**, **Cas1**, **Set3** y **Sip5**, podrían estar modulando diversos procesos celulares, que van desde el control del ciclo celular hasta la remodelación de la cromatina o cambios metabólicos como mecanismo de adaptación al medio.<sup>273</sup>

### 3.2.5 Respuesta a estrés y adaptación metabólica

Por último, es relevante cómo la actividad mitocondrial se ve afectada, manifestándose con una marcada disminución en la abundancia de las proteínas asociadas con la **fosforilación oxidativa**. Esta represión sugiere una pérdida de funcionalidad mitocondrial, posiblemente debido a la acumulación de proteínas mal plegadas en su interior, lo que genera estrés mitocondrial<sup>276</sup> y un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS),<sup>138</sup> corroborando los fenotipos observados en el mutante (**Figura 40. Microscopía de fluorescencia de las células teñidas con DHR123**). Así, el incremento de ROS observado mediante tinción con dihidrorhodamina 123, podría estar actuando como señal para activar mecanismos de defensa, incluyendo la autofagia, la apoptosis y la biogénesis de peroxisomas.<sup>297</sup> En este sentido la inducción de la apoptosis queda de manifiesto por el aumento en abundancia de algunas proteínas previamente descritas como marcadores de apoptosis o muerte regulada en *C. albicans*, como son **Oye2** y **Oye32**.<sup>298,299</sup>

Ante esta deficiencia energética, la célula parece reconfigurar su metabolismo hacia rutas compensatorias. Se observa un aumento en abundancia de proteínas asociadas a **peroxisomas**,<sup>300</sup> como **Pex5**, **Pex6**, **Pex7**, **Djp1**, **Mdh1** y **Adr1**, lo que indica una intensificación de la  **$\beta$ -oxidación de ácidos grasos** y un refuerzo de la señalización redox. Esta vía permite generar acetil-CoA a partir de lípidos, una fuente energética alternativa que no depende del ciclo mitocondrial.<sup>301</sup> Al mismo tiempo, se activa el **ciclo del glioxilato**,<sup>302</sup> con aumento de **Icl1** y **Mls1**, lo que permite convertir derivados lipídicos en precursores gluconeogénicos y facilitar, así, la supervivencia en condiciones de baja eficiencia respiratoria.<sup>303</sup>

Finalmente, esta reprogramación refleja una respuesta adaptativa similar a lo descrito en situaciones de estrés nutricional o durante la supervivencia intracelular en macrófagos. La disminución energética, combinada con el estrés oxidativo, también podría ser un estímulo

adicional para la activación de la autofagia, con el fin de reciclar componentes celulares y mantener la homeostasis.<sup>304</sup>

En conjunto, estos resultados muestran que *C. albicans*, al perder la funcionalidad del sistema UPS por represión de *PRE1*, adopta una estrategia metabólica alternativa basada en lípidos, que incluye la activación coordinada de peroxisomas, el ciclo del glioxilato y mecanismos autofágicos, como vía de adaptación al estrés proteotóxico y energético.

#### 4. Desarrollo de un ensayo competitivo y positivo para la búsqueda de nuevos antifúngicos cuya diana sea el gen *PRE1*

A pesar de las diferencias morfológicas y celulares, y de más de mil millones de años de evolución divergente, las levaduras y los seres humanos comparten más de 2000 genes (30 % del genoma de la levadura). Estos genes codifican procesos celulares fundamentales, cuya disfunción en humanos está asociada a diversas enfermedades.<sup>305</sup> La extraordinaria conservación funcional de genes entre humanos y los de levaduras pone de manifiesto el valor de organismos modelo evolutivamente distantes para el estudio de procesos biológicos humanos.<sup>306,307</sup> Además, el DNA genómico es fácilmente manipulable mediante herramientas genéticas (hoy en día, principalmente por CRISPR/Cas) y su elevada tasa de recombinación homóloga facilita las modificaciones genómicas. Su rápido crecimiento en condiciones de laboratorio, su capacidad de alternar entre formas haploides y diploides, y la disponibilidad de numerosos marcadores de selección y de colecciones de mutantes, hace que la levadura *S. cerevisiae* sea un modelo ideal para pruebas funcionales a gran escala de genes humanos ortólogos.<sup>308</sup>

En este trabajo, hemos obtenido cepas de *S. cerevisiae* humanizada y *candidizada* donde la expresión del ortólogo humano *HsC7-I* y de *CaPRE1* bajo el sistema de regulación de la tetraciclina, demuestran una homología funcional de ambos genes, por ser este esencial en *S. cerevisiae*. Los ensayos de viabilidad y crecimiento mostraron que en ninguna de las cepas se comprometía la viabilidad, con cinéticas de crecimiento muy similares a las de la cepa silvestre, indicando que ambos genes podían reemplazar funcionalmente a su homólogo en *S. cerevisiae*. Estos resultados fueron esenciales para poder desarrollar un **ensayo competitivo y positivo** entre ambas cepas para el cribado de nuevos compuestos con potencial actividad antifúngica, basándonos en un marcaje diferencial de la cepa *candidizada* con la proteína verde fluorescente. Así, la ausencia de fluorescencia pero presencia de turbidez (crecimiento) indicaría que el compuesto en concreto 1) no es tóxico para una levadura que porta el gen humano y 2) sí lo es para una que porta el correspondiente de *C. albicans* y, por tanto, podría utilizarse como antifúngico (**Figura 44. Bioensayo basado en el marcaje diferencial de las cepas humanizada y *candidizada*.**

Esta plataforma desarrollada para la búsqueda de nuevos antifúngicos presenta ventajas significativas: permite ensayos rápidos, ya que el ciclo de generación es corto, ( $\approx$  2 horas por duplicación) y no necesita incubación prolongada. Además reduce costes, porque el medio de cultivo es económico (SD), sin necesidad de instalaciones de nivel de bioseguridad BSL2/3 ni equipamiento especializado.

## 5. Desarrollo de sistema de cribado para la búsqueda de antifúngicos basado en la degradación de proteínas

Una de las rutas mejor caracterizadas en eucariotas es la del sistema del N-terminal (anteriormente denominada “regla del extremo N-terminal”), en la que determinados residuos N-terminales actúan como señales de degradación reconocidas por recogninas específicas, que dirigen las proteínas hacia el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) o a la autofagia selectiva (ALS). En particular, la vía del Arg/N-degrón reconoce residuos mediante ligasas E3 de la familia UBR, como Ubr1 o Ufd4 en *S. cerevisiae*.

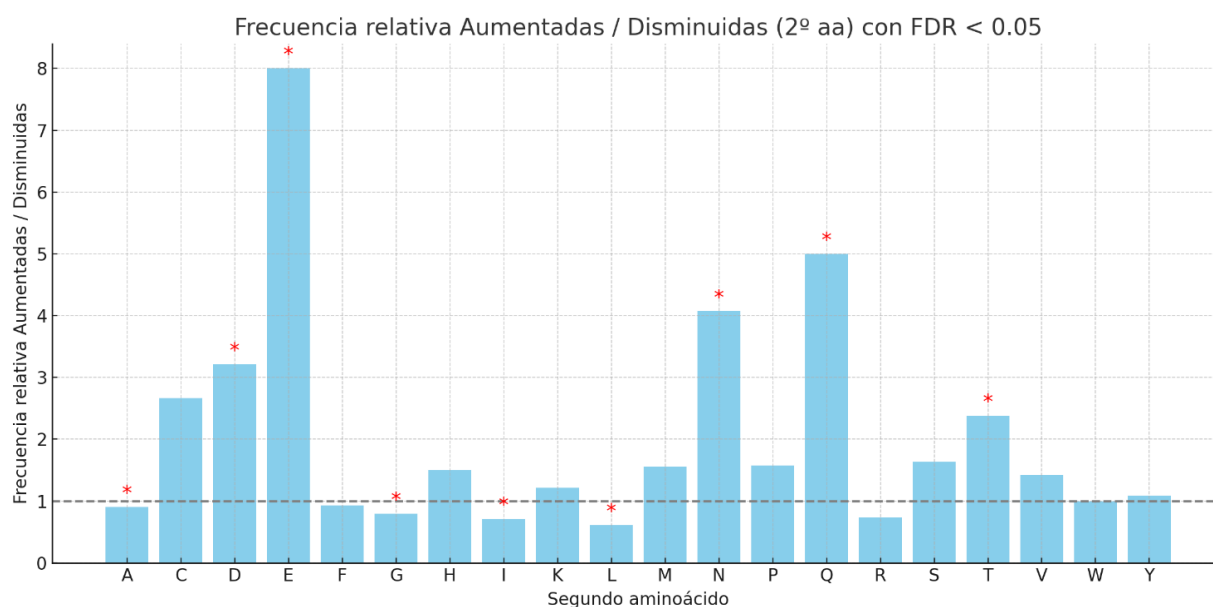
En este contexto, este trabajo ha desarrollado **otro ensayo funcional** para la búsqueda de nuevos antifúngicos frente a *C. albicans* basado en la degradación de proteínas mediada por señales N-terminales (**N-degrones**), **alternativo** al anterior y **positivo**. En este caso, como sistema reportero hemos utilizado la proteína Ura3 de *C. albicans* que, mediante una fusión a residuos N-terminales desestabilizantes (Leu, Ile) y a la proteína Ubi1 para su marcaje y posterior degradación, permitiera evaluar la estabilidad proteica en función de la actividad de la ruta del extremo N-terminal, dependiente de la ubiquitin-ligasa Ubr1. La validez del ensayo se comprobó cuando, en ausencia de la recognina Ubr1 (mutante *ubr1*), observamos una estabilización significativa de Ura3, confirmando que la degradación es específica y dependiente de dicha vía. Por tanto, se confirma que este tipo de ensayo constituye una plataforma sencilla que posibilite rastrear compuestos que interfieran con la degradación proteica mediada por N-degrones a gran escala. En este sentido, hemos comprobado los mismos sustratos Ura3 en el mutante *pre1-1* de *S. cerevisiae*, observando cómo se estabilizaba Ura3 cuando tenía como N-degrón la leucina y la isoleucina, residuos que proporcionan una semivida de 3 y 30 minutos, respectivamente, en *S. cerevisiae*<sup>189</sup> y al estabilizarse, no se degradan tan rápidamente.

Estos resultados, junto con la estrategia anterior, amplían las estrategias terapéuticas frente a *C. albicans* y podrían ser una alternativa frente al incremento de resistencias frente al arsenal de antifúngicos que existe actualmente.

## 6. Estudio del N degrón *in silico*

Otra de las conclusiones que derivan de los campos de estudio que se han abordado en este trabajo es la importancia de estudiar las secuencias N-terminales no solo como elementos

estructurales, sino como regiones clave para la regulación postraduccional y funcional de las proteínas. El análisis de la frecuencia relativa de los segundos aminoácidos N-terminales entre las proteínas aumentadas y disminuidas en abundancia en el mutante *PRE1<sup>OFF</sup>* reveló patrones significativos de enriquecimiento. Los aminoácidos más frecuentes en las proteínas aumentadas (relación > 1, FDR < 0,05) fueron ácido glutámico (E), glutamina (Q), asparagina (N), aspartato (D), y treonina (T), lo que sugiere una posible asociación entre estas secuencias N-terminales y una mayor estabilidad o acumulación proteica en el contexto del mutante. Por el contrario, aminoácidos como la alanina (A), isoleucina (I), leucina (L) y arginina (R) tendieron a estar más representados en las proteínas disminuidas, aunque sin alcanzar significancia estadística en todos los casos. Estos resultados apuntan a que la identidad del segundo aminoácido podría influir en la estabilidad, procesamiento o destino de las proteínas en este fondo genético alterado (**Figura 59**).



**Figura 59. Frecuencia relativa del aminoácido en segunda posición de las proteínas que aumentan su abundancia o disminuyen en *PRE1<sup>OFF</sup>*.**

Las barras marcadas con asterisco rojo (\*) indican una significancia estadística con FDR < 0,05 según el test de Fisher. La línea en el valor 1, indica el límite del cambio.

El análisis de las secuencias N-terminales de las proteínas identificadas en este estudio puso de manifiesto que la **serina es el segundo aminoácido más frecuente tras la iniciación de la traducción**. Esta observación se da tanto en *C. albicans* como en *S. cerevisiae*, a diferencia de lo que ocurre en humanos, donde es la alanina el aminoácido más frecuente en segunda posición (datos no mostrados),<sup>195</sup> y tiene importantes implicaciones para las modificaciones otraduccionales, especialmente la *Nt-acetilación*.<sup>309</sup> La serina, al ser un residuo pequeño y polar, favorece la acción de diversas N-acetiltransferasas (NATs), como NatA, que actúan sobre secuencias iniciadas con la metionina eliminada seguida de un residuo pequeño (como Ser, Ala,

Thr o Gly). Por tanto, la alta frecuencia de serina en esta posición puede reflejar un diseño evolutivo que favorece la acetilación cotraduccional, con posibles consecuencias en la estabilidad, la localización y/o la degradación de las proteínas. Además, el hecho de que esta tendencia se conserve entre dos especies evolutivamente relacionadas, como *C. albicans* y *S. cerevisiae*, sugiere que se trata de un sistema regulador conservado, posiblemente relacionado con la eficiencia de traducción, el reconocimiento por chaperonas, o el control proteolítico a través del sistema Ac/N-degron.

## 7. Inhibidores del proteosoma como agentes terapéuticos

Los inhibidores del proteosoma representan una clase terapéutica consolidada en el tratamiento del mieloma múltiple y otros cánceres hematológicos. Su blanco principal es el proteosoma 26S, una maquinaria multicatalítica esencial para la degradación de proteínas ubiquitinadas, especialmente aquellas involucradas en el control del ciclo celular, la apoptosis, la respuesta al estrés y la regulación inmunitaria.<sup>310</sup> El fármaco pionero de este grupo de fármacos es el **bortezomib**, el cual es un inhibidor reversible de la actividad quimotripsina de la subunidad catalítica  $\beta 5$  del proteosoma. El efecto en la célula humana es la acumulación de proteínas mal plegadas y reguladoras claves como son p53, I $\kappa$ B $\alpha$  (Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha) y citoquinas pro-apoptóticas, desencadenando estrés del retículo endoplásmico y muerte celular programada.<sup>311</sup> Este efecto es particularmente letal en células tumorales, ya que dependen de una elevada actividad proteosomal para mantener su viabilidad frente a la alta carga proteica y al estrés metabólico. En los últimos años, se han desarrollado inhibidores de segunda generación, como son el **carfilzomib**, un inhibidor irreversible que ofrece mayor especificidad y menos efectos adversos neurológicos, y el **ixazomib**, el primer inhibidor oral aprobado para uso clínico.<sup>312</sup> A pesar de su éxito en oncología, su toxicidad sistémica, especialmente neuropatía periférica y mielosupresión, limita su uso prolongado y se deben ajustar las dosis terapéuticas para evitar o reducir su toxicidad en células no cancerígenas.

Además de su utilidad en neoplasias, hay un creciente interés en la aplicación de inhibidores del proteosoma en otras patologías, incluyendo enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas, dada su capacidad para modular la vía NF- $\kappa$ B, la presentación antigénica y la respuesta a proteínas mal plegadas.

En el contexto de enfermedades infecciosas, aunque aún no han sido aprobados con esta indicación, estudios experimentales han demostrado que diversos patógenos, incluidos *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum* y *Leishmania* spp., dependen de proteosomas funcionales para evadir la respuesta inmunitaria y sobrevivir en condiciones de

estrés del huésped.<sup>313,314</sup> En el caso de hongos patógenos, como *C. albicans*, su potencial terapéutico aún está sin explorar.

En cualquier caso, el principal desafío sigue siendo la selectividad, dado que el proteosoma se encuentra muy conservado entre eucariotas. Por ello, la investigación actual se centra en el diseño de inhibidores que aprovechen diferencias estructurales entre los proteosomas del hospedador y el patógeno, o en enfoques de administración dirigida que minimicen la toxicidad en tejidos humanos. Además, hay un interés creciente en el estudio de la aparición de resistencias a inhibidores del proteosoma, en algunos pacientes, sin conocerse en profundidad los mecanismos responsables de estas.<sup>106,315</sup>

## 8. La ruta del N-degrón con aplicación terapéutica

Los eucariotas han desarrollado múltiples mecanismos para modular la vida media de sus proteínas mediante el reconocimiento selectivo de los N-degrones por N-recogninas, que conectan los sustratos con las maquinarias proteolíticas, ya sea a través del sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) o de la autofagia mediada por lisosomas (ALS). Esta vía del N-degrón regula la degradación de una gran variedad de sustratos, incluyendo reguladores de vida media corta, agregados de proteínas mal plegadas, orgánulos subcelulares e incluso patógenos invasores, como bacterias y virus, mediante rutas dependientes de UPS o de autofagia.<sup>316,317</sup>

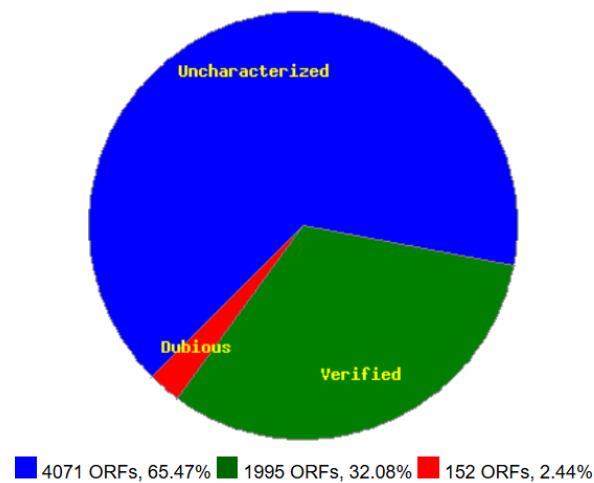
El sistema ubiquitin-proteosoma se encuentra sobreexpresado en ciertos tipos de cáncer, debido a que la elevada tasa de crecimiento en células cancerígenas debe acompañarse de un incremento en la actividad del proteosoma. Por ello, el tratamiento con inhibidores de esta estructura se está empleando en algunos casos conjuntamente con agentes quimioterapéuticos en diversos tipos de cáncer, buscando esa acción sinérgica, y para el desarrollo de nuevos fármacos contra la malaria que prevengan la replicación de *Plasmodium*.<sup>318</sup>

Desde el punto de vista terapéutico, estas rutas ofrecen múltiples puntos de intervención, que incluyen moduladores de la arginilación N-terminal (como la arginil-transferasa 1, ATE1), inhibidores de N-recogninas o moléculas que alteren el destino de las proteínas con N-degrón. Estas estrategias están siendo exploradas para tratar enfermedades neurodegenerativas, donde la acumulación de proteínas mal plegadas es tóxica, así como frente a ciertas neoplasias. Adicionalmente, se propone que la manipulación selectiva de la degradación mediada por N-degrón podría permitir eliminar proteínas patogénicas o restaurar la homeostasis proteica en enfermedades donde UPS o ALS están alteradas. Aunque aún en fases preclínicas, el desarrollo de compuestos bivalentes (por ejemplo, que enlazan un sustrato con ATE1 o UBR) muestra potencial para dirigir proteínas específicas hacia su degradación, abriendo un innovador campo terapéutico basado en la degradación programada mediante N-degrón.<sup>319</sup>

## 9. Herramienta para convertir los identificadores de proteínas de *C. albicans*

Los investigadores que trabajamos con el hongo *C. albicans* en el campo de la proteómica, utilizamos como referencia CGD, un recurso para datos de secuencias genómicas e información sobre los genes y las proteínas que estos codifican en esta y en especies relacionadas. Este recurso en línea está más revisado y completo que Uniprot, pero somos conscientes de la complejidad asociada al manejo de datos por los identificadores de las proteínas anotadas. En el archivo *.fasta* de las proteínas anotadas en CGDs, tal y como se muestra en la **Figura 60**, hay 1995 ORFs verificados, pero no todos tienen asignado un nombre del gen, y otros 4071 están aún por caracterizar y aparecen solo con el identificador del ORF.

Graphical View of Protein Coding Genes (as of Jun 28, 2025)



**Figura 60. Clasificación de genes que codifican proteínas en CGD.**

Actualizado el 28/06/2025. Clasificación de los ORFs que codifican proteínas anotados en CGD: verificados (32.06%), dudosos (2,44%) y no caracterizados (65,47%).

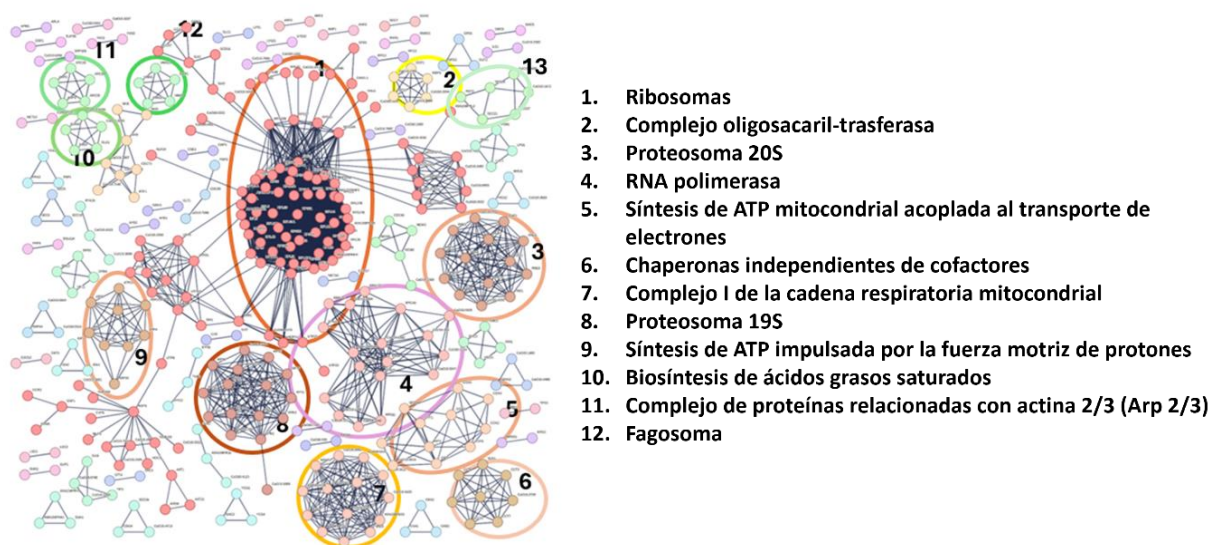
En este trabajo, se ha implementado una aplicación **H-Convertor (Figura 53)**, que resulta una herramienta muy útil para agilizar la interpretación de los datos obtenidos durante esta tesis, especialmente en los análisis proteómicos debido al gran volumen de proteínas y donde los identificadores de ORF de la base de datos de CGD dificultaban la lectura directa de resultados.

Gracias a esta interfaz, ha sido posible vincular de una manera rápida y eficiente las proteínas identificadas con sus nombres de genes, y convertir el identificador ORF al nombre sistemático, facilitando su anotación funcional y la integración con bases de datos, como GO o Kegg. Además, al ser gratuita y disponible en línea, esta herramienta puede ser utilizada por otros investigadores que trabajen con *C. albicans*, promoviendo la facilidad, accesibilidad e interpretación de los resultados de estudios de proteómica a gran escala.

## 10. Avances preliminares y futuras líneas de investigación

Los resultados obtenidos proporcionan una base sólida para explorar nuevas funciones celulares reguladas por la actividad del proteosoma en *C. albicans*. En particular, profundizar en el papel del proteosoma en procesos clave para el hongo, como son la respuesta al estrés oxidativo, la filamentación o la adaptación metabólica, todos ellos alterados como muestran los resultados presentados.

Una de las líneas prioritarias será la caracterización del **N-terminoma** en condiciones de disfunción proteosomal. Este análisis permitirá identificar patrones diferenciales de modificación N-terminal, como la acetilación y la arginilación, que podrían actuar como señales para rutas de degradación específicas (como la vía Ac/N-degrón o Arg/N-degrón). Estas modificaciones podrían ofrecer nuevos marcadores funcionales para comprender la selectividad del proteosoma y sus rutas accesorias en la levadura patógena. Comparar los perfiles N-terminales entre el estado reprimido e inducido de *PRE1* proporcionará información clave sobre los mecanismos compensatorios o adaptativos que surgen ante la disfunción del proteosoma.



**Figura 61. Análisis de las interacciones moleculares con la herramienta STRING.**

Complejos correspondientes al análisis preliminar de dos de las bandas obtenidas por electroforesis nativa *Blue-Native PAGE*.

En paralelo, se plantea continuar el análisis estructural y funcional de **complejos proteicos** analizando las 48 bandas obtenidas mediante electroforesis nativa *Blue Native* y cuantificadas por espectrometría de masas. El estudio comparativo de la composición y estabilidad de estos complejos permitirá identificar redes de interacción alteradas y posibles sustratos acumulados o redistribuidos en ausencia de una degradación proteosomal eficiente. Esta aproximación contribuirá a definir con mayor precisión el impacto global del proteosoma en la organización del proteoma funcional de *C. albicans*. En este sentido, un análisis muy preliminar de los complejos

aislados en las bandas 14 y 18 analizadas, mediante la herramienta *String*, ha permitido la identificación de varios complejos, los cuales hemos comenzado a analizar y cuantificar en detalle (**Figura 61**).

Por último, otra línea de investigación con proyección aplicada consiste en el rastreo de **compuestos bioactivos** específicos del sistema proteosomal de *C. albicans*.

## CONCLUSIONES

---



1. El gen *CaPRE1* es el homólogo funcional en *C. albicans* del gen *PRE1* de *S. cerevisiae*. Codifica la subunidad  $\beta 4$  del complejo catalítico 20S del proteosoma, y es esencial para el crecimiento y la viabilidad celular en *C. albicans*.
2. Mutantes condicionales *pre1* de *C. albicans* dependientes de fuente de carbono muestran una morfología celular aberrante, hiperfilamentosa y con defectos en separación celular.
3. En condiciones de represión de la expresión de *PRE1* (bajo un promotor regulable de tetraciclina), el proteosoma 20S no está ensamblado completamente y la subunidad  $\beta 4$  del proteosoma no se detecta.
4. El alto número de proteínas identificadas, casi un 80% del proteoma de *C. albicans*, valida la aproximación proteómica DIA como una herramienta poderosa para el estudio y la caracterización a gran escala del proteoma.
5. El estudio de proteómica cuantitativa diferencial entre la represión y la inducción de la expresión de *CaPRE1* muestra un 42% de proteínas con cambios significativos en su abundancia, con predominio de proteínas que aumentaron su abundancia cuando se reprime la expresión de *PRE1*.
6. La represión de *PRE1* induce un aumento en la abundancia de proteínas relacionadas con el proceso catabólico del proteosoma, transporte de proteínas, la endocitosis, el transporte vacuolar, la autofagia, la morfogénesis y el ciclo celular, entre otros procesos biológicos.
7. La represión de *PRE1* provoca la disminución de la fosforilación oxidativa, una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo, lo que evidencia una deficiencia en la función mitocondrial y un fenotipo apoptótico.
8. El aumento en la abundancia de proteínas de las subunidades de la parte reguladora del proteosoma 19S, algunas del complejo catalítico 20S y del factor de transcripción Rpn4, las posicionan como sustratos directos del proteosoma. La disminución en la abundancia de proteínas implicadas en la biogénesis y ensamblaje de los ribosomas, y el metabolismo de aminoácidos cuando se reprime el gen *PRE1*, los sitúan como procesos compensatorios de la deficiencia de la actividad del proteosoma.

9. El ensayo competitivo basado en la humanización y *candidización* de un mutante de *S. cerevisiae* deficiente en *PRE1*, constituye un sistema idóneo para el cribado de compuestos con actividad antifúngica y con especificidad farmacológica para la proteína Pre1 de *C. albicans*.
10. Los sustratos de proteólisis generados son específicos de la ruta del N-terminal, lo que ha posibilitado el desarrollo de un ensayo positivo para la identificación de agentes antifúngicos dirigidos a componentes específicos de la maquinaria de degradación.
11. La aplicación web H-Convertor es una herramienta proteómica de acceso público para la comunidad científica de gran utilidad para el análisis global de proteínas de *C. albicans*.

## LISTADO DE FIGURAS





Figura 1. Factores causantes del paso de <i>C. albicans</i> de comensal a patógeno.....	30
Figura 2. Mecanismos de acción de los antifúngicos utilizados en la actualidad.....	33
Figura 3. Degradación de proteínas en levaduras por proteólisis vacuolar.....	38
Figura 4. Subunidades que componen el proteosoma 26 S: la parte reguladora 19S y la parte catalítica 20S.....	41
Figura 5. Mecanismo de acción del proteosoma 26S.....	44
Figura 6. Ruta de ubiquitinación.....	46
Figura 7. Rutas del sistema del amino-terminal.....	48
Figura 8. Estrategia de cuantificación proteómica sin marcaje ( <i>label-free</i> ).....	50
Figura 9. Métodos de adquisición de datos en espectrometría de masas.....	51
Figura 10. Estrategia de interrupción o delección de genes en <i>C. albicans</i> .....	65
Figura 11. Construcción de delección del gen <i>PRE1</i> en <i>C. albicans</i> .....	66
Figura 12. Esquema de la construcción de delección del gen <i>HIS1</i> y <i>PRE1</i> en <i>C. albicans</i> .....	67
Figura 13. Esquema de la construcción de delección del gen <i>HIS1</i> en <i>C. albicans</i> .....	68
Figura 14. Estrategia de obtención del mutante condicional en <i>CaPRE1</i> de <i>C. albicans</i> .....	69
Figura 15. Detalle de la construcción de las fusiones <i>UBI1-X-CaURA3</i> .....	71
Figura 16. Plásmido YEpHISX.....	83
Figura 17. <i>PRE1</i> es esencial para la viabilidad celular ante un incremento de temperatura.....	85
Figura 18. Complementación del fenotipo termosensible del mutante <i>pre1</i> de <i>S. cerevisiae</i> por el inserto HISX de <i>C. albicans</i> que porta el gen <i>CaPRE1</i> .....	86
Figura 19. Complementación del fenotipo de sensibilidad a sulfato de L-canavanina del mutante <i>pre1</i> de <i>S. cerevisiae</i> por el gen <i>CaPRE1</i> .....	87
Figura 20. Esquema del genotipo de mutantes condicionales <i>pre1</i> de <i>C. albicans</i> .....	89
Figura 21. Crecimiento en medio sólido de un mutante condicional en <i>CaPRE1</i> dependiente de la fuente de carbono.....	90
Figura 22. Capacidad de crecimiento del mutante condicional HS10.....	91
Figura 23. Morfología celular del mutante condicional <i>PRE1</i> en condiciones de represión.....	92
Figura 24. La morfología celular del mutante condicional es irreversible.....	92
Figura 25. Ensayo de crecimiento en gota de mutantes condicionales <i>PRE1</i> .....	94
Figura 26. Crecimiento en medio líquido en condiciones de expresión/represión de <i>PRE1</i> .....	94
Figura 27. Puesta a punto de las condiciones idóneas para el estudio del mutante condicional <i>pre1</i> .....	95
Figura 28. Caracterización morfológica del mutante condicional en condiciones de inducción y represión de <i>CaPRE1</i> .....	96
Figura 29. Estudio de viabilidad celular de <i>PRE1<sup>OFF</sup></i> .....	97
Figura 30. Separación de complejos proteicos mediante electroforesis nativa (BN-PAGE).....	98
Figura 31. Localización de los complejos del proteosoma 20S y 19S en el gel nativo.....	98

Figura 32. Análisis de componentes principales (PCA).....	102
Figura 33. Matriz de correlación de Pearson. ....	103
Figura 34. Ratios de la abundancia de proteínas $PRE1^{OFF}/PRE1^{ON}$ .....	103
Figura 35. Análisis de enriquecimiento en componente celular de las proteínas aumentadas significativamente en $PRE1^{OFF}$ . ....	108
Figura 36. Clasificación del componente celular enriquecido de las proteínas menos abundantes cuando se reprime el gen $CaPRE1$ . ....	110
Figura 37. Análisis de rutas implicadas y enriquecidas en las proteínas aumentadas o disminuidas cuando se reprime $CaPRE1$ . ....	111
Figura 38. Inducción de la filamentación con el inductor N-acetilglucosamina. ....	112
Figura 39. Microscopía de fluorescencia de las células teñidas con blanco de calcoflúor. ....	113
Figura 40. Microscopía de fluorescencia de las células teñidas con DHR123. ....	114
Figura 41. Microscopía de fluorescencia de las células teñidas con el fluorocromo FM4-64. ....	115
Figura 42. Morfología celular de la cepa <i>candidizada</i> . ....	118
Figura 43. Curva de crecimiento de la cepa <i>candidizada</i> en condiciones de inducción/represión. Crecimiento del mutante <i>pre1</i> de <i>S. cerevisiae</i> expresando o no $CaPRE1$ (-/+ doxiciclina, dox). Como control se utilizó la cepa YFN639 portadora del mismo plásmido pero con $ScPRE1$ . ....	118
Figura 44. Bioensayo basado en el marcaje diferencial de las cepas humanizada y <i>candidizada</i> . .....	119
Figura 45 Generación de sustratos de la proteólisis según la regla del extremo amino-terminal. .....	122
Figura 46. Estudio del fenotipo de la cepa <i>ubr1Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> en medio sólido. ....	123
Figura 47. Estudio del crecimiento en medio líquido en condiciones de expresión. ....	124
Figura 48. Estudio del crecimiento en medio líquido en condiciones de represión. ....	125
Figura 49. Ensayo en gota del crecimiento en medio sólido de variantes de $CaUra3p$ . ....	126
Figura 50. Crecimiento en medio sólido de variantes de $CaUra3p$ en mutantes en proteosoma. .....	127
Figura 51. Representación gráfica de la frecuencia de aa en 2ª posición del N-terminoma en <i>C. albicans</i> . ....	128
Figura 52. Frecuencia relativas de los aminoácidos N-terminales en segunda posición del proteoma de <i>C. albicans</i> y de las proteínas con cambios significativos cuando se reprime la expresión del gen $PRE1$ . ....	129
Figura 53. H-Convensor, desarrollado por M <sup>a</sup> Luisa Hernández. ....	130
Figura 54. Cambios observados en el ensamblaje de las subunidades del proteosoma 19 S y 20S. .....	135
Figura 55. Diagrama de Venn comparativo de proteínas identificadas .....	137

Figura 56. Ensamblaje de la partícula catalítica 20S del proteosoma.....	140
Figura 57. Esquema de la actividad proteolítica del proteosoma. ....	141
Figura 58. Esquema de diferentes vías de regulación de la filamentación. ....	143
Figura 59. Frecuencia relativa del aminoácido en segunda posición de las proteínas que aumentan su abundancia o disminuyen en <i>PRE1<sup>OFF</sup></i> . ....	147
Figura 60. Clasificación de genes que codifican proteínas en CGD.....	150
Figura 61. Análisis de las interacciones moleculares con la herramienta STRING. ....	151



## LISTADO DE TABLAS





Tabla 1. Microorganismos utilizados en este trabajo.....	59
Tabla 2. Medios de cultivo usados en este estudio.....	60
Tabla 3. Lista de plásmidos usados en este estudio.....	62
Tabla 4. Lista de oligonucleótidos usados en este trabajo.....	63
Tabla 5. Mutantes condicionales en el gen <i>CaPRE1</i> y sus correspondientes cepas parentales...	90
Tabla 6. Nomenclatura de cepas y condiciones de inducción/represión.....	93
Tabla 7. Datos del análisis de proteómica de espectrometría de masas de los complejos de proteosoma.....	99
Tabla 8. Datos de los resultados del análisis de proteómica cuantitativa mediante DIA de la cepa ML1113 .....	101
Tabla 9. Resumen numérico de las proteínas cuantificadas y los cambios de abundancia observados.....	104
Tabla 10. Clasificación de los procesos biológicos de las proteínas enriquecidas en <i>PRE1<sup>OFF</sup></i> mediante la herramienta bioinformática <i>FunfiFunv3</i> .....	106
Tabla 11. Clasificación ontológica de los procesos biológicos enriquecidos de las proteínas que disminuyen su abundancia cuando se reprime el gen <i>CaPRE1</i> .....	109
Tabla 12. Tiempos de generación (Tg) de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> humanizada y <i>candidizada</i> .....	117
Tabla 13. Clasificación de los N-degrones según la ruta del N-terminal.....	127



## BIBLIOGRAFÍA

---



1. Nash AK, Auchtung TA, Wong MC, et al. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome*. 2017;5(1):153. doi:10.1186/s40168-017-0373-4
2. Peroumal D, Sahu SR, Kumari P, Utkalaja BG, Acharya N. Commensal Fungus *Candida albicans* Maintains a Long-Term Mutualistic Relationship with the Host To Modulate Gut Microbiota and Metabolism. Alanio A, ed. *Microbiol Spectr*. 2022;10(5):e02462-22. doi:10.1128/spectrum.02462-22
3. Kumamoto CA, Gresnigt MS, Hube B. The gut, the bad and the harmless: *Candida albicans* as a commensal and opportunistic pathogen in the intestine. *Current Opinion in Microbiology*. 2020;56:7-15. doi:10.1016/j.mib.2020.05.006
4. Lee PP, Lau YL. Cellular and Molecular Defects Underlying Invasive Fungal Infections—Revelations from Endemic Mycoses. *Front Immunol*. 2017;8:735. doi:10.3389/fimmu.2017.00735
5. Bongomin F, Gago S, Oladele R, Denning D. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *JoF*. 2017;3(4):57. doi:10.3390/jof3040057
6. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010;14(11):e954-e966. doi:10.1016/j.ijid.2010.04.006
7. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;62(4):e1-e50. doi:10.1093/cid/civ933
8. Perleth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol*. 2007;45(4):321-346. doi:10.1080/13693780701218689
9. Bradford LL, Ravel J. The vaginal mycobiome: A contemporary perspective on fungi in women's health and diseases. *Virulence*. 2017;8(3):342-351. doi:10.1080/21505594.2016.1237332
10. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):18026. doi:10.1038/nrdp.2018.26
11. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. 2001;9(7):327-335. doi:10.1016/S0966-842X(01)02094-7
12. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4(2):119-128. doi:10.4161/viru.22913
13. Carlisle PL, Kadosh D. *Candida albicans* Ume6, a Filament-Specific Transcriptional Regulator, Directs Hyphal Growth via a Pathway Involving Hgc1 Cyclin-Related Protein. *Eukaryot Cell*. 2010;9(9):1320-1328. doi:10.1128/EC.00046-10
14. Wächtler B, Wilson D, Haedicke K, Dalle F, Hube B. From Attachment to Damage: Defined Genes of *Candida albicans* Mediate Adhesion, Invasion and Damage during Interaction with

- Oral Epithelial Cells. Munro C, ed. *PLoS ONE*. 2011;6(2):e17046. doi:10.1371/journal.pone.0017046
15. Brand A, Shanks S, Duncan VMS, Yang M, Mackenzie K, Gow NAR. Hyphal Orientation of *Candida albicans* Is Regulated by a Calcium-Dependent Mechanism. *Current Biology*. 2007;17(4):347-352. doi:10.1016/j.cub.2006.12.043
  16. Brand A, Gow NA. Mechanisms of hypha orientation of fungi. *Current Opinion in Microbiology*. 2009;12(4):350-357. doi:10.1016/j.mib.2009.05.007
  17. Robbins N, Uppuluri P, Nett J, et al. Hsp90 Governs Dispersion and Drug Resistance of Fungal Biofilms. May RC, ed. *PLoS Pathog*. 2011;7(9):e1002257. doi:10.1371/journal.ppat.1002257
  18. Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, et al. A Recently Evolved Transcriptional Network Controls Biofilm Development in *Candida albicans*. *Cell*. 2012;148(1-2):126-138. doi:10.1016/j.cell.2011.10.048
  19. Zarnowski R, Sanchez H, Covelli AS, et al. *Candida albicans* biofilm-induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. Soll D, ed. *PLoS Biol*. 2018;16(10):e2006872. doi:10.1371/journal.pbio.2006872
  20. Scaduto CM, Bennett RJ. *Candida albicans* the chameleon: transitions and interactions between multiple phenotypic states confer phenotypic plasticity. *Current Opinion in Microbiology*. 2015;26:102-108. doi:10.1016/j.mib.2015.06.016
  21. Soll DR. Why does *Candida albicans* switch? *FEMS Yeast Research*. 2009;9(7):973-989. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00562.x
  22. Alkafeef SS, Yu C, Huang L, Liu H. Wor1 establishes opaque cell fate through inhibition of the general co-repressor Tup1 in *Candida albicans*. Dudley AM, ed. *PLoS Genet*. 2018;14(1):e1007176. doi:10.1371/journal.pgen.1007176
  23. Solis NV, Park YN, Swidergall M, Daniels KJ, Filler SG, Soll DR. *Candida albicans* White-Opaque Switching Influences Virulence but Not Mating during Oropharyngeal Candidiasis. Deepe GS, ed. *Infect Immun*. 2018;86(6):e00774-17. doi:10.1128/IAI.00774-17
  24. Naglik JR, Gaffen SL, Hube B. Candidalysin: discovery and function in *Candida albicans* infections. *Current Opinion in Microbiology*. 2019;52:100-109. doi:10.1016/j.mib.2019.06.002
  25. Pendrak ML, Roberts DD. Hemoglobin is an effective inducer of hyphal differentiation in *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2007;45(1):61-71. doi:10.1080/13693780601028691
  26. Gong Y, Li T, Yu C, Sun S. *Candida albicans* Heat Shock Proteins and Hsps-Associated Signaling Pathways as Potential Antifungal Targets. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:520. doi:10.3389/fcimb.2017.00520
  27. Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis*. 2018;117:128-138. doi:10.1016/j.micpath.2018.02.028

28. Gow NAR, Van De Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(2):112-122. doi:10.1038/nrmicro2711
29. Höfs S, Mogavero S, Hube B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *J Microbiol*. 2016;54(3):149-169. doi:10.1007/s12275-016-5514-0
30. Spampinato C, Leonardi D. *Candida* Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. *BioMed Research International*. 2013;2013:1-13. doi:10.1155/2013/204237
31. Basmaciyan L, Bon F, Paradis T, Lapaquette P, Dalle F. " *Candida Albicans* Interactions With The Host: Crossing The Intestinal Epithelial Barrier." *Tissue Barriers*. 2019;7(2):1612661. doi:10.1080/21688370.2019.1612661
32. Pemán J, Salavert M. Epidemiología y prevención de las infecciones nosocomiales causadas por especies de hongos filamentosos y levaduras. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2013;31(5):328-341. doi:10.1016/j.eimc.2013.02.002
33. Oever JT, Netea MG. The bacteriome–mycobiome interaction and antifungal host defense. *Eur J Immunol*. 2014;44(11):3182-3191. doi:10.1002/eji.201344405
34. Canela HMS, Cardoso B, Vitali LH, Coelho HC, Martinez R, Ferreira MEDS. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. *Mycoses*. 2018;61(1):11-21. doi:10.1111/myc.12695
35. Mba IE, Nweze EI. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39(10):1797-1819. doi:10.1007/s10096-020-03912-w
36. Tang S, Moyes D, Richardson J, Blagojevic M, Naglik J. Epithelial discrimination of commensal and pathogenic *Candida albicans*. *Oral Diseases*. 2016;22(S1):114-119. doi:10.1111/odi.12395
37. Nikou SA, Kichik N, Brown R, et al. *Candida albicans* Interactions with Mucosal Surfaces during Health and Disease. *Pathogens*. 2019;8(2):53. doi:10.3390/pathogens8020053
38. Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(2):96-108. doi:10.1038/nrmicro.2016.157
39. Grohskopf LA, Andriole VT. Systemic *Candida* infections. *Yale J Biol Med*. 1996 Nov-Dec;69(6):505-15. PMID: 9436294; PMCID: PMC2589037..
40. Papon N, Bougnoux ME, d'Enfert C. Tracing the Origin of Invasive Fungal Infections. *Trends in Microbiology*. 2020;28(4):240-242. doi:10.1016/j.tim.2020.01.007
41. Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. Champion EW, ed. *N Engl J Med*. 2015;373(15):1445-1456. doi:10.1056/NEJMra1315399

42. Mantilla-Florez YF, Tuta-Quintero E, Brito-Rodriguez AJ, Clavijo-Moreno LC. Candidiasis y *Candida Albicans*. *BMSA*. 2021;61(3):391-400. doi:10.52808/bmsa.7e5.613.003
43. Pemán J, Salavert M. Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2012;30(2):90-98. doi:10.1016/j.eimc.2011.09.004
44. Caceres DH, Forsberg K, Welsh RM, et al. *Candida auris*: A Review of Recommendations for Detection and Control in Healthcare Settings. *JoF*. 2019;5(4):111. doi:10.3390/jof5040111
45. Lamoth F, Kontoyiannis DP. The *Candida auris* Alert: Facts and Perspectives. *The Journal of Infectious Diseases*. 2018;217(4):516-520. doi:10.1093/infdis/jix597
46. Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2014;31(1):42-48. doi:10.1016/j.riam.2013.10.001
47. Bays D, Jenkins E, Lyman M, et al. Epidemiology of Invasive Candidiasis. *CLEP*. 2024;Volume 16:549-566. doi:10.2147/CLEP.S459600
48. Bassetti M, Giacobbe DR, Vena A, et al. Incidence and outcome of invasive candidiasis in intensive care units (ICUs) in Europe: results of the EUCANDICU project. *Crit Care*. 2019;23(1):219. doi:10.1186/s13054-019-2497-3
49. Koehler P, Stecher M, Cornely OA, et al. Morbidity and mortality of candidaemia in Europe: an epidemiologic meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019;25(10):1200-1212. doi:10.1016/j.cmi.2019.04.024
50. Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019;25(7):792-798. doi:10.1016/j.cmi.2019.03.028
51. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci Transl Med*. 2012;4(165). doi:10.1126/scitranslmed.3004404
52. Gow NAR, Amin T, McArdle K, et al. Strategic Research Funding: A Success Story for Medical Mycology. *Trends in Microbiology*. 2018;26(10):811-813. doi:10.1016/j.tim.2018.05.014
53. Pfaller MA, Castanheira M. Nosocomial Candidiasis: Antifungal Stewardship and the Importance of Rapid Diagnosis. *Med Myco*. Published online September 18, 2015:myv076. doi:10.1093/mmy/myv076
54. Pinalto K, Alspaugh J. New Horizons in Antifungal Therapy. *JoF*. 2016;2(4):26. doi:10.3390/jof2040026
55. Gintjee T, Donnelley M, Thompson G. Aspiring Antifungals: Review of Current Antifungal Pipeline Developments. *JoF*. 2020;6(1):28. doi:10.3390/jof6010028
56. Barantsevich N, Barantsevich E. Diagnosis and Treatment of Invasive Candidiasis. *Antibiotics*. 2022;11(6):718. doi:10.3390/antibiotics11060718

57. Ben-Ami R. Treatment of Invasive Candidiasis: A Narrative Review. *JoF*. 2018;4(3):97. doi:10.3390/jof4030097
58. Von Lilienfeld-Toal M, Wagener J, Einsele H, Cornely OA, Kurzai O. Invasive Fungal Infection. *Deutsches Ärzteblatt international*. Published online April 19, 2019. doi:10.3238/arztebl.2019.0271
59. Di Mambro T, Guerriero I, Aurisicchio L, Magnani M, Marra E. The Yin and Yang of Current Antifungal Therapeutic Strategies: How Can We Harness Our Natural Defenses? *Front Pharmacol*. 2019;10:80. doi:10.3389/fphar.2019.00080
60. Brown, A. L., & Greig, J. R. (2003). Caspofungin versus amphotericin B for invasive candidiasis. *The New England journal of medicine*, 348(13), 1287–1288. <https://doi.org/10.1056/NEJM200303273481315>
61. Espinel-Ingroff A, Cantón E. In vitro activity of echinocandins against non-Candida albicans: Is echinocandin antifungal activity the same? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011;29:3-9. doi:10.1016/S0213-005X(11)70002-7
62. Loh BS, Ang WH. “Illuminating” Echinocandins’ Mechanism of Action. *ACS Cent Sci*. 2020;6(10):1651-1653. doi:10.1021/acscentsci.0c01222
63. Lee Y, Robbins N, Cowen LE. Molecular mechanisms governing antifungal drug resistance. *npj Antimicrob Resist*. 2023;1(1):5. doi:10.1038/s44259-023-00007-2
64. Lass-Flörl C. Triazole Antifungal Agents in Invasive Fungal Infections: A Comparative Review. *Drugs*. 2011;71(18):2405-2419. doi:10.2165/11596540-000000000-00000
65. Carolus H, Pierson S, Lagrou K, Van Dijck P. Amphotericin B and Other Polyenes—Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. *JoF*. 2020;6(4):321. doi:10.3390/jof6040321
66. Saravolatz LD, Ostrosky-Zeichner L, Marr KA, Rex JH, Cohen SH. Amphotericin B: Time for a New “Gold Standard.” *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(3):415-425. doi:10.1086/376634
67. Prusty JS, Kumar A. Coumarins: antifungal effectiveness and future therapeutic scope. *Mol Divers*. 2020;24(4):1367-1383. doi:10.1007/s11030-019-09992-x
68. Indunil Karunarathna, U Ekanayake, K Gunawardana, et al. Advances in Amphotericin B Formulations: Enhancing Efficacy and Reducing Toxicity. Published online 2024. doi:10.13140/RG.2.2.27149.35041
69. Prasad R, Shah AH, Rawal MK. Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance. In: Ramos J, Sychrová H, Kschischo M, eds. *Yeast Membrane Transport*. Vol 892. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing; 2016:327-349. doi:10.1007/978-3-319-25304-6\_14
70. Wu S, Song R, Liu T, Li C. Antifungal therapy: Novel drug delivery strategies driven by new targets. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2023;199:114967. doi:10.1016/j.addr.2023.114967

71. Ivanov M, Ćirić A, Stojković D. Emerging Antifungal Targets and Strategies. *IJMS*. 2022;23(5):2756. doi:10.3390/ijms23052756
72. August, B. A. and Kale-Pradhan, P. B. (2024). Management of invasive candidiasis: A focus on rezafungin, ibrexafungerp, and fosmanogepix. *Pharmacotherapy* 44(6): 467-479.
73. Espinel-Ingroff, A. and Wiederhold, N. P. (2024). A Mini-Review of In Vitro Data for Candida Species, Including *C. auris*, Isolated during Clinical Trials of Three New Antifungals: Fosmanogepix, Ibrexafungerp, and Rezafungin. *J Fungi (Basel)* 10(5): 362.
74. Hoenigl, M., Sprute, R., Egger, M., Arastehfar, A., Cornely, O. A., Krause, R., Lass-Flörl, C., Prattes, J., Spec, A., Thompson, G. R., 3rd, Wiederhold, N. and Jenks, J. D. (2021). The Antifungal Pipeline: Fosmanogepix, Ibrexafungerp, Olorofim, Opelconazole, and Rezafungin. *Drugs* 81(15): 1703-1729.
75. Lima, S. L., Colombo, A. L. and de Almeida Junior, J. N. (2019). Fungal Cell Wall: Emerging Antifungals and Drug Resistance. *Front Microbiol* 10: 2573.
76. Velazhahan, V., McCann, B. L., Bignell, E. and Tate, C. G. (2023). Developing novel antifungals: lessons from G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 44(3): 162-174.
77. Jimenez-Ortigosa, C., Perez, W. B., Angulo, D., Borroto-Esoda, K. and Perlin, D. S. (2017). De Novo Acquisition of Resistance to SCY-078 in *Candida glabrata* Involves FKS Mutations That both Overlap and Are Distinct from Those Conferring Echinocandin Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 61(9): e00833-00817.
78. Thompson, G. R., 3rd, Soriano, A., Honore, P. M., Bassetti, M., Cornely, O. A., Kollef, M., Kullberg, B. J., Pullman, J., Hites, M., Fortun, J., Horcajada, J. P., Kotanidou, A., Das, A. F., Sandison, T., Aram, J. A., Vazquez, J. A. and Pappas, P. G. (2024). Efficacy and safety of rezafungin and caspofungin in candidaemia and invasive candidiasis: pooled data from two prospective randomised controlled trials. *Lancet Infect Dis* 24(3): 319-328.
79. Pappas, P. G., Vazquez, J. A., Oren, I., Rahav, G., Aoun, M., Bulpa, P., Ben-Ami, R., Ferrer, R., McCarty, T., Thompson, G. R., Schlamm, H., Bien, P. A., Barbat, S. H., Wedel, P., Oborska, I., Tawadrous, M. and Hodges, M. R. (2023). Clinical safety and efficacy of novel antifungal, fosmanogepix, for the treatment of candidaemia: results from a Phase 2 trial. *J Antimicrob Chemother* 78(10): 2471-2480.
80. Pharmaceutical, B. (2022). An Interventional Efficacy and Safety Phase 3 Double-blind 2-arm Study to Investigate IV Followed by Oral Fosmanogepix Compared With IV Caspofungin Followed by Oral Fluconazole in Adult Participants With Candidemia and/or Invasive Candidiasis.
81. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. 2007;111(5):509-547. doi:10.1016/j.mycres.2007.03.004
82. Priest SJ, Lorenz MC. Characterization of Virulence-Related Phenotypes in *Candida* Species of the CUG Clade. *Eukaryot Cell*. 2015;14(9):931-940. doi:10.1128/EC.00062-15

83. Pla J, Gil C, Monteoliva L, Navarro-García F, Sánchez M, Nombela C. Understanding *Candida albicans* at the Molecular Level. *Yeast*. 1996;12(16):1677-1702. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199612)12:16<1677::AID-YEA79>3.0.CO;2-U
84. Van Het Hoog M, Rast TJ, Martchenko M, et al. Assembly of the *Candida albicans* genome into sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. *Genome Biol*. 2007;8(4):R52. doi:10.1186/gb-2007-8-4-r52
85. Hirakawa MP, Chyou DE, Huang D, Slan AR, Bennett RJ. Parasex Generates Phenotypic Diversity *de Novo* and Impacts Drug Resistance and Virulence in *Candida albicans*. *Genetics*. 2017;207(3):1195-1211. doi:10.1534/genetics.117.300295
86. Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol*. 2011;49(2):171-177. doi:10.1007/s12275-011-1064-7
87. Mba IE, Nweze EI, Eze EA, Anyaegbunam ZKG. Genome plasticity in *Candida albicans*: A cutting-edge strategy for evolution, adaptation, and survival. *Infection, Genetics and Evolution*. 2022;99:105256. doi:10.1016/j.meegid.2022.105256
88. Liang SH, Bennett RJ. The Impact of Gene Dosage and Heterozygosity on the Diploid Pathobiont *Candida albicans*. *JoF*. 2019;6(1):10. doi:10.3390/jof6010010
89. Selmecki A, Forche A, Berman J. Genomic Plasticity of the Human Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2010;9(7):991-1008. doi:10.1128/EC.00060-10
90. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. 2004;12(7):317-324. doi:10.1016/j.tim.2004.05.008
91. Odds, F. C. (1988). *Candida and Candidosis: A Review and Bibliography* 2nd ed. Toronto, Canada: Bailliere Tindall.
92. Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*. 2011;9(10):737-748. doi:10.1038/nrmicro2636
93. Staib P, Morschhäuser J. Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* – an enigmatic developmental programme. *Mycoses*. 2007;50(1):1-12. doi:10.1111/j.1439-0507.2006.01308.x
94. Chen H, Zhou X, Ren B, Cheng L. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*. 2020;11(1):337-348. doi:10.1080/21505594.2020.1748930
95. Boyce KJ, Andrianopoulos A. Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host. Braus G, ed. *FEMS Microbiology Reviews*. 2015;39(6):797-811. doi:10.1093/femsre/fuv035
96. Whiteway M, Bachewich C. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*. 2007;61(1):529-553. doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093341
97. Witchley JN, Penumetcha P, Abon NV, Woolford CA, Mitchell AP, Noble SM. *Candida albicans* Morphogenesis Programs Control the Balance between Gut Commensalism and

- Invasive Infection. *Cell Host & Microbe*. 2019;25(3):432-443.e6. doi:10.1016/j.chom.2019.02.008
98. Capilla BH. Caracterización del papel del dimorfismo y la respuesta humoral frente a *Candida albicans* en un modelo de colonización gastrointestinal. Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral 2016. <https://hdl.handle.net/20.500.14352/22412>.
99. Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2012;10(1):85-93. doi:10.1586/eri.11.152
100. Ciurea CN, Kosovski IB, Mare AD, Toma F, Pintea-Simon IA, Man A. *Candida* and Candidiasis—Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. *Microorganisms*. 2020;8(6):857. doi:10.3390/microorganisms8060857
101. Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. Engineered Control of Cell Morphology In Vivo Reveals Distinct Roles for Yeast and Filamentous Forms of *Candida albicans* during Infection. *Eukaryot Cell*. 2003;2(5):1053-1060. doi:10.1128/EC.2.5.1053-1060.2003
102. Decanis N. Farnesol, a Fungal Quorum-Sensing Molecule Triggers *Candida Albicans* Morphological Changes by Downregulating the Expression of Different Secreted Aspartyl Proteinase Genes. *TOMICROJ*. 2011;5(1):119-126. doi:10.2174/1874285801105010119
103. Hinkson IV, Elias JE. The dynamic state of protein turnover: It's about time. *Trends in Cell Biology*. 2011;21(5):293-303. doi:10.1016/j.tcb.2011.02.002
104. Doherty MK, Beynon RJ. Protein turnover on the scale of the proteome. *Expert Review of Proteomics*. 2006;3(1):97-110. doi:10.1586/14789450.3.1.97
105. Varshavsky A. Proteolysis. In: *Encyclopedia of Genetics*. Elsevier; 2001:1573-1575. doi:10.1006/rwgn.2001.1041
106. Thibaudeau TA, Smith DM. A Practical Review of Proteasome Pharmacology. Ma Q, ed. *Pharmacol Rev*. 2019;71(2):170-197. doi:10.1124/pr.117.015370
107. Braten O, Livneh I, Ziv T, et al. Numerous proteins with unique characteristics are degraded by the 26S proteasome following monoubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(32). doi:10.1073/pnas.1608644113
108. Johansson KE, Mashahreh B, Hartmann-Petersen R, Ravid T, Lindorff-Larsen K. Prediction of Quality-control Degradation Signals in Yeast Proteins. *Journal of Molecular Biology*. 2023;435(2):167915. doi:10.1016/j.jmb.2022.167915
109. Raynes R, Pomatto LCD, Davies KJA. Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways. *Molecular Aspects of Medicine*. 2016;50:41-55. doi:10.1016/j.mam.2016.05.001
110. Biswas S, Van Dijck P, Datta A. Environmental Sensing and Signal Transduction Pathways Regulating Morphopathogenic Determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007;71(2):348-376. doi:10.1128/MMBR.00009-06

111. Hossain S, Lash E, Veri AO, Cowen LE. Functional connections between cell cycle and proteostasis in the regulation of *Candida albicans* morphogenesis. *Cell Reports*. 2021;34(8):108781. doi:10.1016/j.celrep.2021.108781
112. Guo X, Dixon JE. The 26S proteasome: A cell cycle regulator regulated by cell cycle. *Cell Cycle*. 2016;15(7):875-876. doi:10.1080/15384101.2016.1151728
113. Martin-Perez M, Villén J. Determinants and Regulation of Protein Turnover in Yeast. *Cell Systems*. 2017;5(3):283-294.e5. doi:10.1016/j.cels.2017.08.008
114. Doherty MK, Brownridge P, Owen MAG, Davies SJ, Young IS, Whitfield PD. A proteomics strategy for determining the synthesis and degradation rates of individual proteins in fish. *Journal of Proteomics*. 2012;75(14):4471-4477. doi:10.1016/j.jprot.2012.03.025
115. Lilienbaum A. Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int J Biochem Mol Biol*. 2013 Mar 31;4(1):1-26. PMID: 23638318; PMCID: PMC3627065.
116. Berner N, Reutter KR, Wolf DH. Protein Quality Control of the Endoplasmic Reticulum and Ubiquitin-Proteasome-Triggered Degradation of Aberrant Proteins: Yeast Pioneers the Path. *Annu Rev Biochem*. 2018;87(1):751-782. doi:10.1146/annurev-biochem-062917-012749
117. Zhao L, Zhao J, Zhong K, Tong A, Jia D. Targeted protein degradation: mechanisms, strategies and application. *Sig Transduct Target Ther*. 2022;7(1):113. doi:10.1038/s41392-022-00966-4
118. Dikic I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem*. 2017;86(1):193-224. doi:10.1146/annurev-biochem-061516-044908
119. Huber LA, Teis D. Lysosomal signaling in control of degradation pathways. *Current Opinion in Cell Biology*. 2016;39:8-14. doi:10.1016/j.ceb.2016.01.006
120. MacDonald C, Buchkovich NJ, Stringer DK, Emr SD, Piper RC. Cargo ubiquitination is essential for multivesicular body intraluminal vesicle formation. *EMBO Reports*. 2012;13(4):331-338. doi:10.1038/embor.2012.18
121. Raudenska M, Balvan J, Masarik M. Crosstalk between autophagy inhibitors and endosome-related secretory pathways: a challenge for autophagy-based treatment of solid cancers. *Mol Cancer*. 2021;20(1):140. doi:10.1186/s12943-021-01423-6
122. Budenholzer L, Cheng CL, Li Y, Hochstrasser M. Proteasome Structure and Assembly. *Journal of Molecular Biology*. 2017;429(22):3500-3524. doi:10.1016/j.jmb.2017.05.027
123. Dong S, Aguirre-Hernandez C, Scrivo A, et al. Monitoring spatiotemporal changes in chaperone-mediated autophagy in vivo. *Nat Commun*. 2020;11(1):645. doi:10.1038/s41467-019-14164-4
124. Kumar Deshmukh F, Yaffe D, Olshina M, Ben-Nissan G, Sharon M. The Contribution of the 20S Proteasome to Proteostasis. *Biomolecules*. 2019;9(5):190. doi:10.3390/biom9050190

125. Wendler P, Enenkel C. Nuclear Transport of Yeast Proteasomes. *Front Mol Biosci*. 2019;6:34. doi:10.3389/fmolb.2019.00034
126. Peth A, Nathan JA, Goldberg AL. The ATP Costs and Time Required to Degrade Ubiquitinated Proteins by the 26 S Proteasome. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(40):29215-29222. doi:10.1074/jbc.M113.482570
127. Tanaka K. The proteasome: Overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad, Ser B*. 2009;85(1):12-36. doi:10.2183/pjab.85.12
128. Cao C, Xue C. More Than Just Cleaning: Ubiquitin-Mediated Proteolysis in Fungal Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:774613. doi:10.3389/fcimb.2021.774613
129. Zhao J, Zhai B, Gygi SP, Goldberg AL. mTOR inhibition activates overall protein degradation by the ubiquitin proteasome system as well as by autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(52):15790-15797. doi:10.1073/pnas.1521919112
130. Goldberg AL. Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. *Journal of Cell Biology*. 2012;199(4):583-588. doi:10.1083/jcb.201210077
131. Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chemistry & Biology*. 2001;8(8):739-758. doi:10.1016/S1074-5521(01)00056-4
132. Sahu I, Glickman MH. Structural Insights into Substrate Recognition and Processing by the 20S Proteasome. *Biomolecules*. 2021;11(2):148. doi:10.3390/biom11020148
133. Deshmukh FK, Ben-Nissan G, Olshina MA, et al. Allosteric regulation of the 20S proteasome by the Catalytic Core Regulators (CCRs) family. *Nat Commun*. 2023;14(1):3126. doi:10.1038/s41467-023-38404-w
134. Sahu I, Glickman MH. Proteasome in action: substrate degradation by the 26S proteasome. *Biochemical Society Transactions*. 2021;49(2):629-644. doi:10.1042/BST20200382
135. Bard JAM, Goodall EA, Greene ER, Jonsson E, Dong KC, Martin A. Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annu Rev Biochem*. 2018;87(1):697-724. doi:10.1146/annurev-biochem-062917-011931
136. Claydon AJ, Beynon R. Proteome Dynamics: Revisiting Turnover with a Global Perspective. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012;11(12):1551-1565. doi:10.1074/mcp.O112.022186
137. Fabre B, Lambour T, Garrigues L, et al. Label-Free Quantitative Proteomics Reveals the Dynamics of Proteasome Complexes Composition and Stoichiometry in a Wide Range of Human Cell Lines. *J Proteome Res*. 2014;13(6):3027-3037. doi:10.1021/pr500193k
138. Aiken CT, Kaake RM, Wang X, Huang L. Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. *Molecular & Cellular Proteomics*. Published online January 31, 2011;R110.006924. doi:10.1074/mcp.R110.006924

139. Shringarpure R, Grune T, Mehlhase J, Davies KJA. Ubiquitin Conjugation Is Not Required for the Degradation of Oxidized Proteins by Proteasome. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(1):311-318. doi:10.1074/jbc.M206279200
140. Lander GC, Estrin E, Matyskiela ME, Bashore C, Nogales E, Martin A. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature*. 2012;482(7384):186-191. doi:10.1038/nature10774
141. Worden EJ, Dong KC, Martin A. An AAA Motor-Driven Mechanical Switch in Rpn11 Controls Deubiquitination at the 26S Proteasome. *Molecular Cell*. 2017;67(5):799-811.e8. doi:10.1016/j.molcel.2017.07.023
142. Aguilera MA, Korac J, Durcan TM, et al. The E3 Ubiquitin Ligase Parkin Is Recruited to the 26S Proteasome via the Proteasomal Ubiquitin Receptor Rpn13. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(12):7492-7505. doi:10.1074/jbc.M114.614925
143. Riedinger C, Boehringer J, Trempe JF, et al. Structure of Rpn10 and Its Interactions with Polyubiquitin Chains and the Proteasome Subunit Rpn12\*. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(44):33992-34003. doi:10.1074/jbc.M110.134510
144. Inobe T, Genmei R. N-Terminal Coiled-Coil Structure of ATPase Subunits of 26S Proteasome Is Crucial for Proteasome Function. Castañó JG, ed. *PLoS ONE*. 2015;10(7):e0134056. doi:10.1371/journal.pone.0134056
145. Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(7):1807-1819. doi:10.1681/ASN.2006010083
146. Clague MJ, Urbé S. Ubiquitin: Same Molecule, Different Degradation Pathways. *Cell*. 2010;143(5):682-685. doi:10.1016/j.cell.2010.11.012
147. Takeuchi J, Chen H, Coffino P. Proteasome substrate degradation requires association plus extended peptide. *EMBO J*. 2007;26(1):123-131. doi:10.1038/sj.emboj.7601476
148. Yu H, Kago G, Yellman CM, Matouschek A. Ubiquitin-like domains can target to the proteasome but proteolysis requires a disordered region. *The EMBO Journal*. 2016;35(14):1522-1536. doi:10.15252/embj.201593147
149. Eralles J, Coffino P. Ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2014;1843(1):216-221. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.05.008
150. Tsvetkov P, Myers N, Moscovitz O, Sharon M, Prilusky J, Shaul Y. Thermo-resistant intrinsically disordered proteins are efficient 20S proteasome substrates. *Mol BioSyst*. 2012;8(1):368-373. doi:10.1039/C1MB05283G
151. Demasi M, Da Cunha FM. The physiological role of the free 20S proteasome in protein degradation: A critical review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2018;1862(12):2948-2954. doi:10.1016/j.bbagen.2018.09.009

152. Myers N, Olender T, Savidor A, Levin Y, Reuven N, Shaul Y. The Disordered Landscape of the 20S Proteasome Substrates Reveals Tight Association with Phase Separated Granules. *Proteomics*. 2018;18(21-22):1800076. doi:10.1002/pmic.201800076
153. Elsasser S, Chandler-Militello D, Müller B, Hanna J, Finley D. Rad23 and Rpn10 Serve as Alternative Ubiquitin Receptors for the Proteasome. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(26):26817-26822. doi:10.1074/jbc.M404020200
154. Barthelme D, Chen JZ, Grabenstatter J, Baker TA, Sauer RT. Architecture and assembly of the archaeal Cdc48-20S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(17). doi:10.1073/pnas.1404823111
155. Bodnar NO, Rapoport TA. Molecular Mechanism of Substrate Processing by the Cdc48 ATPase Complex. *Cell*. 2017;169(4):722-735.e9. doi:10.1016/j.cell.2017.04.020
156. Peth A, Kukushkin N, Bossé M, Goldberg AL. Ubiquitinated Proteins Activate the Proteasomal ATPases by Binding to Usp14 or Uch37 Homologs. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(11):7781-7790. doi:10.1074/jbc.M112.441907
157. Aufderheide A, Beck F, Stengel F, et al. Structural characterization of the interaction of Ubp6 with the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(28):8626-8631. doi:10.1073/pnas.1510449112
158. Bashore C, Dambacher CM, Goodall EA, Matyskiela ME, Lander GC, Martin A. Ubp6 deubiquitinase controls conformational dynamics and substrate degradation of the 26S proteasome. *Nat Struct Mol Biol*. 2015;22(9):712-719. doi:10.1038/nsmb.3075
159. VanderLinden RT, Hemmis CW, Schmitt B, et al. Structural Basis for the Activation and Inhibition of the UCH37 Deubiquitylase. *Molecular Cell*. 2016;61(3):487. doi:10.1016/j.molcel.2016.01.014
160. Hamazaki J, Iemura S, Ichiro, Natsume T, Yashiroda H, Tanaka K, Murata S. A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes. *EMBO J*. 2006;25(19):4524-4536. doi:10.1038/sj.emboj.7601338
161. Husnjak K, Elsasser S, Zhang N, et al. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature*. 2008;453(7194):481-488. doi:10.1038/nature06926
162. Hung KYS, Klumpe S, Eisele MR, et al. Allosteric control of Ubp6 and the proteasome via a bidirectional switch. *Nat Commun*. 2022;13(1):838. doi:10.1038/s41467-022-28186-y
163. Iosefson O, Olivares AO, Baker TA, Sauer RT. Dissection of Axial-Pore Loop Function during Unfolding and Translocation by a AAA+ Proteolytic Machine. *Cell Reports*. 2015;12(6):1032-1041. doi:10.1016/j.celrep.2015.07.007
164. Finley D, Chen X, Walters KJ. Gates, Channels, and Switches: Elements of the Proteasome Machine. *Trends in Biochemical Sciences*. 2016;41(1):77-93. doi:10.1016/j.tibs.2015.10.009
165. Sahu I, Mali SM, Sulkshane P, et al. The 20S as a stand-alone proteasome in cells can degrade the ubiquitin tag. *Nat Commun*. 2021;12(1):6173. doi:10.1038/s41467-021-26427-0

166. Emmerich NPN, Nussbaum AK, Stevanovic S, et al. The Human 26 S and 20 S Proteasomes Generate Overlapping but Different Sets of Peptide Fragments from a Model Protein Substrate. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(28):21140-21148. doi:10.1074/jbc.M000740200
167. Saric T, Graef CI, Goldberg AL. Pathway for Degradation of Peptides Generated by Proteasomes. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(45):46723-46732. doi:10.1074/jbc.M406537200
168. Inobe T, Matouschek A. Paradigms of protein degradation by the proteasome. *Current Opinion in Structural Biology*. 2014;24:156-164. doi:10.1016/j.sbi.2014.02.002
169. Swaney DL, Beltrao P, Starita L, et al. Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nat Methods*. 2013;10(7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2519
170. Kors S, Geijtenbeek K, Reits E, Schipper-Krom S. Regulation of Proteasome Activity by (Post-)transcriptional Mechanisms. *Front Mol Biosci*. 2019;6:48. doi:10.3389/fmolb.2019.00048
171. Mehrtash AB, Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein degradation at the endoplasmic reticulum and nuclear envelope. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2019;93:111-124. doi:10.1016/j.semcdb.2018.09.013
172. Glickman MH, Ciechanover A. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiological Reviews*. 2002;82(2):373-428. doi:10.1152/physrev.00027.2001
173. Beaudette P, Popp O, Dittmar G. Proteomic techniques to probe the ubiquitin landscape. *Proteomics*. 2016;16(2):273-287. doi:10.1002/pmic.201500290
174. Breckel CA, Johnson ZM, Hickey CM, Hochstrasser M. Yeast 26S proteasome nuclear import is coupled to nucleus-specific degradation of the karyopherin adaptor protein Sts1. *Sci Rep*. 2024;14(1):2048. doi:10.1038/s41598-024-52352-5
175. Gong, Xiaofeng & Du, Danyu & Deng, Yanran & Zhou, Yuqi & Sun, Li & Yuan, Shengtao. (2020). The structure and regulation of the E3 ubiquitin ligase HUWE1 and its biological functions in cancer. *Investigational New Drugs*. 38. 10.1007/s10637-020-00894-6.
176. Varshavsky A. The Ubiquitin System, Autophagy, and Regulated Protein Degradation. *Annu Rev Biochem*. 2017;86(1):123-128. doi:10.1146/annurev-biochem-061516-044859
177. Qian S, Zhan X, Lu M, et al. Quantitative Analysis of Ubiquitinated Proteins in Human Pituitary and Pituitary Adenoma Tissues. *Front Endocrinol*. 2019;10:328. doi:10.3389/fendo.2019.00328
178. Shabek N, Herman-Bachinsky Y, Buchsbaum S, et al. The Size of the Proteasomal Substrate Determines Whether Its Degradation Will Be Mediated by Mono- or Polyubiquitylation. *Molecular Cell*. 2012;48(1):87-97. doi:10.1016/j.molcel.2012.07.011

179. Ordureau A, Münch C, Harper JW. Quantifying Ubiquitin Signaling. *Molecular Cell*. 2015;58(4):660-676. doi:10.1016/j.molcel.2015.02.020
180. Schapira M, Calabrese MF, Bullock AN, Crews CM. Targeted protein degradation: expanding the toolbox. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(12):949-963. doi:10.1038/s41573-019-0047-y
181. Varshavsky A. The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Science*. 2011;20(8):1298-1345. doi:10.1002/pro.666
182. Sriram, S. M., & Kwon, Y. T. (2010). The molecular principles of N-end rule recognition. *Nature structural & molecular biology*, 17(10), 1164–1165. <https://doi.org/10.1038/nsmb1010-1164>
183. Tasaki T, Sriram SM, Park KS, Kwon YT. The N-End Rule Pathway. *Annu Rev Biochem*. 2012;81(1):261-289. doi:10.1146/annurev-biochem-051710-093308
184. Winter N, Novatchkova M, Bachmair A. Cellular Control of Protein Turnover via the Modification of the Amino Terminus. *IJMS*. 2021;22(7):3545. doi:10.3390/ijms22073545
185. Geffen Y, Appleboim A, Gardner RG, Friedman N, Sadeh R, Ravid T. Mapping the Landscape of a Eukaryotic Degronome. *Molecular Cell*. 2016;63(6):1055-1065. doi:10.1016/j.molcel.2016.08.005
186. Bachmair, A., Finley, D., & Varshavsky, A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science (New York, N.Y.)*, 234(4773), 179–186. <https://doi.org/10.1126/science.3018930>.
187. Hwang CS, Shemorry A, Varshavsky A. N-Terminal Acetylation of Cellular Proteins Creates Specific Degradation Signals. *Science*. 2010;327(5968):973-977. doi:10.1126/science.1183147
188. Bartel B, Wüning I, Varshavsky A. The recognition component of the N-end rule pathway. *The EMBO Journal*. 1990;9(10):3179-3189. doi:10.1002/j.1460-2075.1990.tb07516.x
189. Varshavsky A. The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(22):12142-12149. doi:10.1073/pnas.93.22.12142
190. Tasaki T, Kwon YT. The mammalian N-end rule pathway: new insights into its components and physiological roles. *Trends in Biochemical Sciences*. 2007;32(11):520-528. doi:10.1016/j.tibs.2007.08.010
191. Melnykov A, Chen SJ, Varshavsky A. Gid10 as an alternative N-recognin of the Pro/N-degron pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(32):15914-15923. doi:10.1073/pnas.1908304116
192. Chen SJ, Melnykov A, Varshavsky A. Evolution of Substrates and Components of the Pro/N-Degron Pathway. *Biochemistry*. 2020 Feb 4;59(4):582-593. doi: 10.1021/acs.biochem.9b00953. Epub 2020 Jan 2. PMID: 31895557; PMCID: PMC7286083.

193. Kim HK, Kim RR, Oh JH, Cho H, Varshavsky A, Hwang CS. The N-Terminal Methionine of Cellular Proteins as a Degradation Signal. *Cell*. 2014;156(1-2):158-169. doi:10.1016/j.cell.2013.11.031
194. Kats I, Khmelinskii A, Kschonsak M, et al. Mapping Degradation Signals and Pathways in a Eukaryotic N-terminome. *Molecular Cell*. 2018;70(3):488-501.e5. doi:10.1016/j.molcel.2018.03.033
195. Gibbs DJ, Bacardit J, Bachmair A, Holdsworth MJ. The eukaryotic N-end rule pathway: conserved mechanisms and diverse functions. *Trends in Cell Biology*. 2014;24(10):603-611. doi:10.1016/j.tcb.2014.05.001
196. Varshavsky A. N-degron and C-degron pathways of protein degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(2):358-366. doi:10.1073/pnas.1816596116
197. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*. 1995;16(1):1090-1094. doi:10.1002/elps.11501601185
198. Wang Z, Liu PK, Li L. A Tutorial Review of Labeling Methods in Mass Spectrometry-Based Quantitative Proteomics. *ACS Meas Sci Au*. 2024;4(4):315-337. doi:10.1021/acsmeasuresciau.4c00007
199. Neilson, K. A., Ali, N. A., Muralidharan, S., Mirzaei, M., Mariani, M., Assadourian, G., Lee, A., van Sluyter, S. C., & Haynes, P. A. (2011). Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics*, 11(4), 535–553. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000553>
200. Huang T, Bruderer R, Muntel J, Xuan Y, Vitek O, Reiter L. Combining Precursor and Fragment Information for Improved Detection of Differential Abundance in Data Independent Acquisition. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2020;19(2):421-430. doi:10.1074/mcp.RA119.001705
201. Navarro P, Kuharev J, Gillet LC, et al. A multicenter study benchmarks software tools for label-free proteome quantification. *Nat Biotechnol*. 2016;34(11):1130-1136. doi:10.1038/nbt.3685
202. Guo J, Huan T. Comparison of Full-Scan, Data-Dependent, and Data-Independent Acquisition Modes in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Based Untargeted Metabolomics. *Anal Chem*. 2020;92(12):8072-8080. doi:10.1021/acs.analchem.9b05135
203. Michalski A, Damoc E, Lange O, et al. Ultra High Resolution Linear Ion Trap Orbitrap Mass Spectrometer (Orbitrap Elite) Facilitates Top Down LC MS/MS and Versatile Peptide Fragmentation Modes. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012;11(3):O111.013698. doi:10.1074/mcp.O111.013698
204. Gillet LC, Navarro P, Tate S, et al. Targeted Data Extraction of the MS/MS Spectra Generated by Data-independent Acquisition: A New Concept for Consistent and Accurate Proteome Analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012;11(6):O111.016717. doi:10.1074/mcp.O111.016717

205. Krasny L, Huang PH. Data-independent acquisition mass spectrometry (DIA-MS) for proteomic applications in oncology. *Mol Omics*. 2021;17(1):29-42. doi:10.1039/D0MO00072H
206. Meier F, Brunner AD, Koch S, et al. Online Parallel Accumulation–Serial Fragmentation (PASEF) with a Novel Trapped Ion Mobility Mass Spectrometer. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2018;17(12):2534-2545. doi:10.1074/mcp.TIR118.000900
207. Vitko D, Chou WF, Nouri Golmaei S, et al. timsTOF HT Improves Protein Identification and Quantitative Reproducibility for Deep Unbiased Plasma Protein Biomarker Discovery. *J Proteome Res*. 2024;23(3):929-938. doi:10.1021/acs.jproteome.3c00646
208. Ridgeway ME, Lubeck M, Jordens J, Mann M, Park MA. Trapped ion mobility spectrometry: A short review. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2018;425:22-35. doi:10.1016/j.ijms.2018.01.006
209. Ludwig C, Gillet L, Rosenberger G, Amon S, Collins BC, Aebersold R. Data-independent acquisition-based SWATH - MS for quantitative proteomics: a tutorial. *Molecular Systems Biology*. 2018;14(8):e8126. doi:10.15252/msb.20178126
210. Payton, M. A., & de Tiani, M. (1990). The isolation of osmotic-remedial conditional lethal mutants of *Candida albicans*. *Current genetics*, 17(4), 293–296. <https://doi.org/10.1007/BF00314875>.
211. Hanahan D (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In: Glover D M, editor. *DNA cloning: a practical approach*. Oxford, United Kingdom: IRL Press 1: 109-135.
212. Gillum AM, Tsay EY & Kirsch DR (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* 198: 179- 182.
213. Fonzi WA & Irwin MY (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134: 717-728.
214. Heinemeyer W, Kleinschmidt JA, Saidowsky J, Escher C, Wolf DH. Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *The EMBO Journal*. 1991;10(3):555-562. doi:10.1002/j.1460-2075.1991.tb07982.x
215. Ghislain M, Dohmen RJ, Levy F, Varshavsky A. Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*. 1996;15(18):4884-4899. doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb00869.x
216. Roman E, Prieto D, Martin R, Correia I, Mesa Arango AC, Alonso-Monge R, Zaragoza O & Pla J (2016) Role of catalase overproduction in drug resistance and virulence in *Candida albicans*. *Future Microbiol* 11: 1279- 1297.
217. Sherman F, G. R., Hicks, J. B (1986) *Methods in Yeast Genetics* Cold Spring Harbor Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.

218. Ausubel FM, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Pub. Associates ; J. Wiley, order fulfillment; 1987.
219. *DNA Cloning 2: A Practical Approach Expression Systems Second Edition Edited by D. M. Glover and B. D. Hames*.
220. Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
221. Becker, D. M., Fikes, J. D., & Guarente, L. (1991). A cDNA encoding a human CCAAT-binding protein cloned by functional complementation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(5), 1968–1972. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1968>.
222. Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J., & Tzagoloff, A. (1986). Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast (Chichester, England)*, 2(3), 163–167. <https://doi.org/10.1002/yea.320020304>.
223. Pla, J., Pérez-Díaz, R. M., Navarro-García, F., Sánchez, M., & Nombela, C. (1995). Cloning of the *Candida albicans* HIS1 gene by direct complementation of a *C. albicans* histidine auxotroph using an improved double-ARS shuttle vector. *Gene*, 165(1), 115–120. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00492-o](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00492-o).
224. Roman E, Alonso-Monge R, Gong Q, Li D, Calderone R & Pla J (2009) The Cek1 MAPK is a short-lived protein regulated by quorum sensing in the fungal pathogen *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 9: 942-955.
225. Stoldt VR. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *The EMBO Journal*. 1997;16(8):1982-1991. doi:10.1093/emboj/16.8.1982
226. Martín, H., Castellanos, M.C., Cenamor, R. et al. Molecular and functional characterization of a mutant allele of the mitogen-activated protein-kinase gene SLT2(MPK1) rescued from yeast autolytic mutants. *Curr Genet* 29, 516–522 (1996). <https://doi.org/10.1007/BF02426955>.
227. Gemma Bellí, Eloi Garí, Lidia Piedrafita, Martí Aldea, Enrique Herrero, An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast, *Nucleic Acids Research*, Volume 26, Issue 4, 1 February 1998, Pages 942–947, <https://doi.org/10.1093/nar/26.4.942>.
228. Cormack, B. P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N. A. R., Falkow, S., & Brown, A. J. P. (1997). Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, England)*, 143 ( Pt 2), 303–311. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-2-303>.
229. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (1990) Optimization of PCRs. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White T.J., Eds., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, London, 3-12.

230. Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23-28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-P](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-P).
231. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., & Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of bacteriology*, 153(1), 163–168. <https://doi.org/10.1128/jb.153.1.163-168.1983>.
232. Herreros, E., García-Sáez, M. I., Nombela, C., & Sánchez, M. (1992). A reorganized *Candida albicans* DNA sequence promoting homologous non-integrative genetic transformation. *Molecular microbiology*, 6(23), 3567–3574. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01792.x>.
233. Hinnen, A., Hicks, J. B., & Fink, G. R. (1978). Transformation of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(4), 1929–1933. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.4.1929>.
234. Kong, A., Lervstam, F., Avtonomov, D. et al. MSFragger: ultrafast and comprehensive peptide identification in mass spectrometry–based proteomics. *Nat Methods* 14, 513–520 (2017). <https://doi.org/10.1038/nmeth.4256>.
235. Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic acids research*, 51(D1), D638–D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>.
236. TraianProt: a user-friendly R shiny application for wide format proteomics data downstream analysis December 2024 DOI: 10.48550/arXiv.2412.15806 LicenseCC BY 4.0 Samuel de la Camara-FuentesDolores Gutierrez-BlazquezMaria Luisa HernándezMaria Luisa HernándezConcha GilConcha Gil.
237. Cabezón V, Vialás V, Gil-Bona A, et al. Apoptosis of *Candida albicans* during the Interaction with Murine Macrophages: Proteomics and Cell-Death Marker Monitoring. *J Proteome Res*. 2016;15(5):1418-1434. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00913
238. Fernández-Acero T, Rodríguez-Escudero I, Molina M, Cid VJ. The yeast cell wall integrity pathway signals from recycling endosomes upon elimination of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate by mammalian phosphatidylinositol 3-kinase. *Cellular Signalling*. 2015;27(11):2272-2284. doi:10.1016/j.cellsig.2015.08.004
239. Juchimiuk M, Orłowski J, Gawarecka K, Świeżewska E, Ernst JF, Palamarczyk G. *Candida albicans* cis-prenyltransferase Rer2 is required for protein glycosylation, cell wall integrity and hypha formation. *Fungal Genetics and Biology*. 2014;69:1-12. doi:10.1016/j.fgb.2014.05.004
240. M.C. Teixeira, R. Viana, M. Palma, J. Oliveira, M. Galocha, M.N. Mota, D. Couceiro, M.G. Pereira, M. Antunes, I.V. Costa, P. Pais, C. Parada, C. Chaouiya, I. SáCorreia, P.T. Monteiro (2023) YEASTRACT+: a portal for the exploitation of global transcription regulation and

- metabolic model data in yeast biotechnology and pathogenesis *Nucleic Acids Research*, advance access doi:10.1093/nar/gkac1041.
241. Kapranov, A.B.; Kuryatova, M.V.; Preobrazhenskaya, O.V.; Tutyaeva, V.V.; Stucka, R.; Feldmann, H.; Karpov, V.L. Isolation and identification of PACE-binding protein Rpn4, a new transcriptional activator regulating 26S-proteasomal and other genes. *Mol. Biol.* 2001, 35, 356–364. [.]
  242. Spasskaya DS, Nadolinskaia NI, Tutyaeva VV, Lysov YP, Karpov VL, Karpov DS. Yeast Rpn4 Links the Proteasome and DNA Repair via RAD52 Regulation. *IJMS*. 2020;21(21):8097. doi:10.3390/ijms21218097
  243. Gasch AP, Moses AM, Chiang DY, Fraser HB, Berardini M, Eisen MB. Conservation and Evolution of Cis-Regulatory Systems in Ascomycete Fungi. Andy Clark, ed. *PLoS Biol.* 2004;2(12):e398. doi:10.1371/journal.pbio.0020398
  244. Zaret, K. S., & Sherman, F. (1982). DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. *Cell*, 28(3), 563–573. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90211-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90211-2).
  245. Varadi M, Bertoni D, Magana P, et al. AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic Acids Research*. 2024;52(D1):D368-D375. doi:10.1093/nar/gkad1011
  246. Jumper, J et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* (2021). Varadi, M et al. AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic Acids Research* (2024).
  247. Leuker, C.E., Ernst, J.F. Toxicity of a heterologous leucyl-tRNA (anticodon CAG) in the pathogen *Candida albicans*: in vivo evidence for non-standard decoding of CUG codons. *Molec. Gen. Genet.* **245**, 212–217 (1994). <https://doi.org/10.1007/BF00283269>
  248. Srikantha T, Klapach A, Lorenz WW, et al. The sea pansy *Renilla reniformis* luciferase serves as a sensitive bioluminescent reporter for differential gene expression in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 1996;178(1):121-129. doi:10.1128/jb.178.1.121-129.1996
  249. Srikantha T, Klapach A, Lorenz WW, et al. The sea pansy *Renilla reniformis* luciferase serves as a sensitive bioluminescent reporter for differential gene expression in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 1996;178(1):121-129. doi:10.1128/jb.178.1.121-129.1996
  250. Mio T, Yamada-Okabe T, Yabe T, Nakajima T, Arisawa M, Yamada-Okabe H. Isolation of the *Candida albicans* homologs of *Saccharomyces cerevisiae* KRE6 and SKN1: expression and physiological function. *Journal of Bacteriology.* 1997;179(7):2363-2372. doi:10.1128/jb.179.7.2363-2372.1997
  251. Lea, P. J., Chen, Z. H., Leegood, R. C., & Walker, R. P. (2001). Does phosphoenolpyruvate carboxykinase have a role in both amino acid and carbohydrate metabolism?. *Amino acids*, 20(3), 225–241. <https://doi.org/10.1007/s007260170041>.

252. Park, Y. N., & Morschhäuser, J. (2005). Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell*, 4(8), 1328–1342. <https://doi.org/10.1128/EC.4.8.1328-1342.2005>.
253. Prieto, D., Román, E., Correia, I., & Pla, J. (2014). The HOG pathway is critical for the colonization of the mouse gastrointestinal tract by *Candida albicans*. *PloS one*, 9(1), e87128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087128>.
254. Hillier C, Pardo M, Yu L, et al. Landscape of the Plasmodium Interactome Reveals Both Conserved and Species-Specific Functionality. *Cell Reports*. 2019;28(6):1635-1647.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.07.019
255. da Fonseca PCA, He J, Morris EP. Molecular Model of the Human 26S Proteasome. *Molecular Cell*. 2012;46(1):54-66. doi:10.1016/j.molcel.2012.03.026
256. Finley D. Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. *Annu Rev Biochem*. 2009;78(1):477-513. doi:10.1146/annurev.biochem.78.081507.101607
257. Collins GA, Goldberg AL. The Logic of the 26S Proteasome. *Cell*. 2017;169(5):792-806. doi:10.1016/j.cell.2017.04.023
258. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M. KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data. *Protein Science*. 2022;31(1):47-53. doi:10.1002/pro.4172
259. Kanehisa M, Sato Y. KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Science*. 2020;29(1):28-35. doi:10.1002/pro.3711
260. Vida TA, Emr SD. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *The Journal of cell biology*. 1995;128(5):779-792. doi:10.1083/jcb.128.5.779
261. Nishimura, C., Tamura, T., Akioka, H., Tokunaga, F., Tanaka, K., & Ichihara, A. (1993). cDNA cloning of rat proteasome subunit RC10-II, assumed to be responsible for trypsin-like catalytic activity. *FEBS letters*, 336(3), 462–466. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80856-p](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80856-p).
262. Nothwang, H. G., Tamura, T., Tanaka, K., & Ichihara, A. (1994). Sequence analyses and inter-species comparisons of three novel human proteasomal subunits, HsN3, HsC7-I and HsC10-II, confine potential proteolytic active-site residues. *Biochimica et biophysica acta*, 1219(2), 361–368. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(94\)90060-4](https://doi.org/10.1016/0167-4781(94)90060-4).
263. Deshaies RJ. Make it or break it: the role of ubiquitin-dependent proteolysis in cellular regulation. *Trends in Cell Biology*. 1995;5(11):428-434. doi:10.1016/S0962-8924(00)89102-3
264. Huang Y, Baker RT, Fischer-Vize JA. Control of Cell Fate by a Deubiquitinating Enzyme Encoded by the *fat facets* Gene. *Science*. 1995;270(5243):1828-1831. doi:10.1126/science.270.5243.1828

265. McGrath JP, Jentsch S, Varshavsky A. UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *The EMBO Journal*. 1991;10(1):227-236. doi:10.1002/j.1460-2075.1991.tb07940.x
266. Dohmen RJ, Stappen R, McGrath JP, et al. An Essential Yeast Gene Encoding a Homolog of Ubiquitin-activating Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(30):18099-18109. doi:10.1074/jbc.270.30.18099
267. Ozkaynak E, Finley D, Solomon MJ, Varshavsky A. The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *The EMBO Journal*. 1987;6(5):1429-1439. doi:10.1002/j.1460-2075.1987.tb02384.x
268. Garí E, Piedrafita L, Aldea M, Herrero E. A Set of Vectors with a Tetracycline-Regulatable Promoter System for Modulated Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1997;13(9):837-848. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199707)13:9<837::AID-YEA145>3.0.CO;2-T
269. Varshavsky, A., Bachmair, A., Finley, D., Gonda, D. K., & Wüning, I. (1989). Targeting of proteins for degradation. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 13, 109–143.
270. Noble, S. M., French, S., Kohn, L. A., Chen, V., & Johnson, A. D. (2010). Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nature genetics*, 42(7), 590–598. <https://doi.org/10.1038/ng.605>.
271. Homann, O. R., Dea, J., Noble, S. M., & Johnson, A. D. (2009). A phenotypic profile of the *Candida albicans* regulatory network. *PLoS genetics*, 5(12), e1000783. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000783>.
272. Chen Y, Mallick J, Maqnas ASun YChoudhury BICôte PYan L, Ni T, Li Y, Zhang D, Rodríguez-Ortiz R, Lv Q, Jiang Y, Whiteway M. 2018. Chemogenomic Profiling of the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 62:10.1128/aac.02365-17. <https://doi.org/10.1128/aac.02365-17>.
273. Article Source: In Vivo Systematic Analysis of *Candida albicans* Zn2-Cys6 Transcription Factors Mutants for Mice Organ Colonization Vandeputte P, Ischer F, Sanglard D, Coste AT (2011) In Vivo Systematic Analysis of *Candida albicans* Zn2-Cys6 Transcription Factors Mutants for Mice Organ Colonization. *PLOS ONE* 6(10): e26962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026962>.
274. Hossain S, Veri AO, Cowen LE. The Proteasome Governs Fungal Morphogenesis via Functional Connections with Hsp90 and cAMP-Protein Kinase A Signaling. *Lorenz M, ed. mBio*. 2020;11(2). doi:10.1128/mbio.00290-20
275. Kim SH, Iyer KR, Pardeshi L, Muñoz JF, Robbins N, Cuomo CA, Wong KH, Cowen LE. 2019. Genetic analysis of *Candida auris* implicates Hsp90 in morphogenesis and azole tolerance and Cdr1 in azole resistance. *mBio* 10:e02529-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02529-18>.
276. Leach MD, Stead DA, Argo E, MacCallum DM, Brown AJP. Molecular and proteomic analyses highlight the importance of ubiquitination for the stress resistance, metabolic adaptation,

- morphogenetic regulation and virulence of *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*. 2011;79(6):1574-1593. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07542.x
277. Roig, P., and Gozalbo, D. (2003) Depletion of polyubiquitin encoded by the UBI4 gene confers pleiotropic phenotype to *Candida albicans* cells. *Fungal Gen Biol* 39: 70–81.
278. Arribas V, Monteoliva L, Hernández ML, Gil C, Molero G. Unravelling the Role of *Candida albicans* Prn1 in the Oxidative Stress Response through a Proteomics Approach. *Antioxidants*. 2024;13(5):527. doi:10.3390/antiox13050527
279. Martínez-López R, Hernández ML, Redondo E, et al. *Candida albicans* Hyphal Extracellular Vesicles Are Different from Yeast Ones, Carrying an Active Proteasome Complex and Showing a Different Role in Host Immune Response. Vylkova S, ed. *Microbiol Spectr*. 2022;10(3):e00698-22. doi:10.1128/spectrum.00698-22
280. Marshall RS, Vierstra RD. Dynamic Regulation of the 26S Proteasome: From Synthesis to Degradation. *Front Mol Biosci*. 2019;6:40. doi:10.3389/fmolb.2019.00040
281. Fabre B, Lambour T, Garrigues L, et al. Deciphering preferential interactions within supramolecular protein complexes: the proteasome case. *Molecular Systems Biology*. 2015;11(1):771. doi:10.15252/msb.20145497
282. Vialas V, Sun Z, Reales-Calderón JA, et al. A comprehensive *Candida albicans* PeptideAtlas build enables deep proteome coverage. *Journal of Proteomics*. 2016;131:122-130. doi:10.1016/j.jprot.2015.10.019
283. Gomez-Artiguez L, De La Cámara-Fuentes S, Sun Z, et al. *Candida albicans* : A Comprehensive View of the Proteome. *J Proteome Res*. 2025;24(4):1636-1648. doi:10.1021/acs.jproteome.4c01020
284. Mannhaupt, G., Schnall, R., Karpov, V., Vetter, I., & Feldmann, H. (1999). Rpn4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS letters*, 450(1-2), 27–34. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00467-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00467-6).
285. Nicholls S, Leach MD, Priest CL, Brown AJP. Role of the heat shock transcription factor, Hsf1, in a major fungal pathogen that is obligately associated with warm-blooded animals. *Molecular Microbiology*. 2009;74(4):844-861. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06883.x
286. Hahn, J. S., Neef, D. W., & Thiele, D. J. (2006). A stress regulatory network for co-ordinated activation of proteasome expression mediated by yeast heat shock transcription factor. *Molecular microbiology*, 60(1), 240–251. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05097.x>.
287. Morris, E.P., da Fonseca, P.C.A. How to build a proteasome. *Nat Struct Mol Biol* 28, 409–410 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00592-8>.
288. Livneh I, Cohen-Kaplan V, Cohen-Rosenzweig C, Avni N, Ciechanover A. The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Res*. 2016;26(8):869-885. doi:10.1038/cr.2016.86

289. Mark E, Ramos PC, Kayser F, Höckendorff J, Dohmen RJ, Wendler P. Structural roles of Ump1 and  $\beta$ -subunit propeptides in proteasome biogenesis. *Life Sci Alliance*. 2024;7(11):e202402865. doi:10.26508/lsa.202402865
290. Weberruss MH, Savulescu AF, Jando J, et al. Blm10 facilitates nuclear import of proteasome core particles. *EMBO J*. 2013;32(20):2697-2707. doi:10.1038/emboj.2013.192
291. Bhatia S, Singh M, Singh T, Singh V. Scrutinizing the Therapeutic Potential of PROTACs in the Management of Alzheimer's Disease. *Neurochem Res*. 2023;48(1):13-25. doi:10.1007/s11064-022-03722-w
292. Hoeller D, Dikic I. How the proteasome is degraded. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(47):13266-13268. doi:10.1073/pnas.1616535113
293. Nemeč AA, Howell LA, Peterson AK, Murray MA, Tomko RJ. Autophagic clearance of proteasomes in yeast requires the conserved sorting nexin Snx4. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;292(52):21466-21480. doi:10.1074/jbc.M117.817999
294. Waite KA, Mota-Peynado ADL, Vontz G, Roelofs J. Starvation Induces Proteasome Autophagy with Different Pathways for Core and Regulatory Particles. *Journal of Biological Chemistry*. 2016;291(7):3239-3253. doi:10.1074/jbc.M115.699124
295. Rollenhagen C, Agyeman H, Eszterhas S, Lee SA. *Candida albicans* *END3* Mediates Endocytosis and Has Subsequent Roles in Cell Wall Integrity, Morphological Switching, and Tissue Invasion. Cuomo CA, ed. *Microbiol Spectr*. 2022;10(2):e01880-21. doi:10.1128/spectrum.01880-21
296. Höfken, T. (2013) *Candida* and candidiasis. In *Microbial Pathogenesis*. U. Kishore, and A. Nayak (eds). New York: Springer, pp. 82–114.
297. Pérez-Gallardo RV, Briones LS, Díaz-Pérez AL, Gutiérrez S, Rodríguez-Zavala JS, Campos-García J. Reactive oxygen species production induced by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* increases because of a dysfunctional mitochondrial iron-sulfur cluster assembly system. *FEMS Yeast Res*. 2013;13(8):804-819. doi:10.1111/1567-1364.12090
298. Amador-García A, Zapico I, Borrajo A, Malmström J, Monteoliva L, Gil C. Extending the Proteomic Characterization of *Candida albicans* Exposed to Stress and Apoptotic Inducers through Data-Independent Acquisition Mass Spectrometry. *mSystems*. 2021 Oct 26;6(5):e0094621. doi: 10.1128/mSystems.00946-21. Epub 2021 Oct 5. PMID: 34609160; PMCID: PMC8547427.
299. Doss EM, Moore JM, Harman BH, Doud EH, Rubenstein EM, Bernstein DA. Characterization of endoplasmic reticulum-associated degradation in the human fungal pathogen *Candida albicans*. *PeerJ*. 2023;11:e15897. doi:10.7717/peerj.15897
300. Sibirny AA. Yeast peroxisomes: structure, functions and biotechnological opportunities. Nielsen J, ed. *FEMS Yeast Research*. 2016;16(4):fow038. doi:10.1093/femsyr/fow038
301. Arnold PK, Finley LWS. Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle. *Journal of Biological Chemistry*. 2023;299(2):102838. doi:10.1016/j.jbc.2022.102838

302. Chew SY, Chee WJY, Than LTL. The glyoxylate cycle and alternative carbon metabolism as metabolic adaptation strategies of *Candida glabrata*: perspectives from *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biomed Sci*. 2019;26(1):52. doi:10.1186/s12929-019-0546-5
303. Almeida Castro LH, Rachel Arguello L, Andrade Ferreira NT, et al. Energy metabolism: gluconeogenesis and oxidative phosphorylation. *Int J Innov Educ Res*. 2020;8(9):359-368. doi:10.31686/ijier.vol8.iss9.2643
304. Meul T, Berschneider K, Schmitt S, et al. Mitochondrial Regulation of the 26S Proteasome. *Cell Reports*. 2020;32(8):108059. doi:10.1016/j.celrep.2020.108059
305. Barbero-Úriz Ó, Valenti M, Molina M, Fernández-Acero T, Cid VJ. Modeling Necroptotic and Pyroptotic Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. Preprint posted online March 12, 2025. doi:10.20944/preprints202503.0857.v1
306. Erik L.L. Sonnhammer, Gabriel Östlund, InParanoid 8: orthology analysis between 273 proteomes, mostly eukaryotic, *Nucleic Acids Research*, Volume 43, Issue D1, 28 January 2015, Pages D234–D239, <https://doi.org/10.1093/nar/gku1203>.
307. Fernández-Acero T, Bertalmio E, Luna S, et al. Expression of Human PTEN-L in a Yeast Heterologous Model Unveils Specific N-Terminal Motifs Controlling PTEN-L Subcellular Localization and Function. *Cells*. 2019;8(12):1512. doi:10.3390/cells8121512
308. Kachroo AH, Vandeloos M, Greco BM, Abdullah M. Humanized yeast to model human biology, disease and evolution. *Disease Models & Mechanisms*. 2022;15(6):dmm049309. doi:10.1242/dmm.049309
309. Helbig AO, Gauci S, Raijmakers R, et al. Profiling of N-Acetylated Protein Termini Provides In-depth Insights into the N-terminal Nature of the Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2010;9(5):928-939. doi:10.1074/mcp.M900463-MCP200
310. Adams, J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer* 4, 349–360 (2004). <https://doi.org/10.1038/nrc1361>.
311. Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the proteasome, in preclinical models of multiple myeloma. *Blood*. 2007;110(9):3281–3290.
312. Richardson, P. G., et al. (2018). Proteasome inhibition in multiple myeloma: past lessons and future applications. *Hematology/Oncology Clinics*, 32(5), 865–88.
313. Lin, G., et al. (2009). Inhibitors selective for mycobacterial versus human proteasomes. *Nature*, 461(7264), 621–626. <https://doi.org/10.1038/nature08357>.
314. Li, H., et al. (2016). Structure- and function-based design of Plasmodium-selective proteasome inhibitors. *Nature*, 530(7589), 233–236. <https://doi.org/10.1038/nature16936>.

315. Patiño-Escobar B, Talbot A, Wiita AP. Overcoming proteasome inhibitor resistance in the immunotherapy era. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2023;44(8):507-518. doi:10.1016/j.tips.2023.05.006
316. Y.J. Lee, J.K. Kim, C.H. Jung, Y.J. Kim, E.J. Jung, S.H. Lee, H.R. Choi, Y.S. Son, S. M. Shim, S.M. Jeon, J.H. Choe, S.H. Lee, J. Whang, K.C. Sohn, G.M. Hur, H. T. Kim, J. Yeom, E.K. Jo, Y.T. Kwon, Chemical modulation of SQSTM1/p62mediated xenophagy that targets a broad range of pathogenic bacteria, *Autophagy* (2022) 1–20, <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2054240>.
317. C.H. Ji, H.Y. Kim, A.J. Heo, S.H. Lee, M.J. Lee, S.B. Kim, G. Srinivasrao, S.R. Mun, H. Chamolstad, A. Ciechanover, C.Y. Choi, H.G. Lee, B.Y. Kim, Y.T. Kwon, The Ndegron pathway mediates ER-phagy, *Mol. Cell* 75 (5) (2019) 1058–1072 e9, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.028>.
318. Sanaullah B, Truong NV, Nguyen TK, Han ET. Combating Malaria: Targeting the Ubiquitin-Proteasome System to Conquer Drug Resistance. *TropicalMed*. 2025;10(4):94. doi:10.3390/tropicalmed10040094
319. Heo AJ, Kim SB, Kwon YT, Ji CH. The N-degron pathway: From basic science to therapeutic applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2023;1866(2):194934. doi:10.1016/j.bbagr.2023.194934



# ANEXO





**Anexo 1.** Proteínas cuantificadas de *C. albicans* con cambios significativos (q-valor<0,05).

La *ratio* de abundancia  $PRE1^{OFF}/PRE1^{ON}$  se expresa en  $\text{Log}_2$

$\text{Log}_2 \text{ ratio} > 1$	$\text{Log}_2 \text{ ratio} > 1 > 0,56$
$\text{Log}_2 \text{ ratio} < -1$	$\text{Log}_2 \text{ ratio} < -1 > -0,58$

aa en la 2ª posición	Nombre sistemático	Nombre estándar	Identificador	$\text{Log}_2 \text{ ratio } PRE1^{OFF}/PRE1^{ON}$	Mayor abundancia
E	C2_06970W_A	AAH1	orf19.2251	-1,73	$PRE1^{ON}$
T	C4_01200C_A	AAT22	orf19.4669	-0,82	$PRE1^{ON}$
S	C1_01450W_A	ABC1	orf19.3331	-1,62	$PRE1^{ON}$
V	C2_09390W_A	ABG1	orf19.1597	-0,60	$PRE1^{ON}$
E	C4_02940W_A	ABP1	orf19.2699	1,10	$PRE1^{OFF}$
S	C1_02190W_A	ABP140	orf19.3676	-0,79	$PRE1^{ON}$
R	CR_00640W_A	ACC1	orf19.7466	-2,11	$PRE1^{ON}$
H	CR_07440W_A	ACE2	orf19.6124	1,61	$PRE1^{OFF}$
G	C6_01690W_A	ACF2	orf19.3417	1,70	$PRE1^{OFF}$
L	CR_08210C_A	ACO1	orf19.6385	-0,62	$PRE1^{ON}$
L	CR_05790C_A	ACO2	orf19.6632	-0,98	$PRE1^{ON}$
F	C1_06060C_A	ACP1	orf19.2439	-0,76	$PRE1^{ON}$
T	C1_04290C_A	ACS2	orf19.1064	-1,58	$PRE1^{ON}$
T	C2_03090C_A	ADE8	orf19.5789	-0,79	$PRE1^{ON}$
S	C5_05050W_A	ADH1	orf19.3997	-1,64	$PRE1^{ON}$
S	C1_08330C_A	ADH2	orf19.5113	1,92	$PRE1^{OFF}$
S	C3_02800W_A	ADH4	orf19.271	7,34	Ausente en $PRE1^{ON}$
S	CR_02070C_A	ADH5	orf19.2608	1,00	$PRE1^{OFF}$
S	C6_01910W_A	ADK1	orf19.3391	-1,29	$PRE1^{ON}$
S	C6_03080C_A	ADO1	orf19.5591	-0,72	$PRE1^{ON}$
I	C4_02500C_A	ADR1	orf19.2752	0,60	$PRE1^{OFF}$
L	C6_01000C_A	AEP1	orf19.102	-0,94	$PRE1^{ON}$
S	C1_13400C_A	AGC1	orf19.4966	-1,19	$PRE1^{ON}$
S	C4_06340W_A	AGO1	orf19.2903	0,66	$PRE1^{OFF}$
D	C6_00910C_A	AIP5	orf19.92	0,95	$PRE1^{OFF}$
F	C2_02970C_A	ALD5	orf19.5806	-1,54	$PRE1^{ON}$
T	C4_05130C_A	ALD6	orf19.742	2,52	$PRE1^{OFF}$
I	C3_01410C_A	ALI1	orf19.1710	-1,18	$PRE1^{ON}$
S	CR_00210W_A	ALK2	orf19.7513	1,13	$PRE1^{OFF}$
L	CR_07070C_A	ALS3	orf19.1816	2,87	$PRE1^{OFF}$
E	C2_03120W_A	AMO1	orf19.5784	1,18	$PRE1^{OFF}$
G	C4_02360W_A	AMS1	orf19.2768	2,26	$PRE1^{OFF}$
A	C6_03410C_A	APA2	orf19.5630	1,23	$PRE1^{OFF}$
A	C1_04400C_A	APE2	orf19.5197	0,63	$PRE1^{OFF}$
T	CR_06730W_A	APG7	orf19.707	2,14	$PRE1^{OFF}$

S	C3_02430W_A	APL2	orf19.231	0,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_02590W_A	APL5	orf19.248	0,74	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C3_06430W_A	APN1	orf19.7428	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
Q	C2_07400C_A	APR1	orf19.1891	2,39	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C1_08480C_A	APS3	orf19.393	1,01	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C2_08130W_A	ARA1	orf19.2172	1,21	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C6_01140C_A	ARC18	orf19.121	0,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_00620C_A	ARG1	orf19.7469	1,11	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_03570W_A	ARG4	orf19.6689	0,99	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_00890W_A	ARO1	orf19.4704	-0,97	PRE1 <sup>ON</sup>
T	CR_06860C_A	ARO10	orf19.1847	0,77	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_07710W_A	ARO2	orf19.1986	-0,98	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C2_02030W_A	ARO3	orf19.1517	-0,94	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C2_00340C_A	ARO8	orf19.2098	-0,62	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_05560C_A	ARO9	orf19.1237	2,53	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C5_03380W_A	ARP1	orf19.2641	0,65	PRE1 <sup>OFF</sup>
Q	C1_03230C_A	ARX1	orf19.3015	-1,17	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C7_01250W_A	ASC1	orf19.6906	-0,99	PRE1 <sup>ON</sup>
C	C2_09060C_A	ASN1	orf19.198	-1,22	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C1_10740C_A	ASR1	orf19.2344	3,02	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_03790C_A	ASR3	orf19.842	1,94	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_06940C_A	ATC1	orf19.6214	1,40	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C3_04340W_A	ATF1	orf19.5877	-1,56	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C4_04450C_A	ATG1	orf19.3841	1,43	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C6_01740C_A	ATG15	orf19.3412	1,55	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C2_06290C_A	ATP14	orf19.5491.1	-2,45	PRE1 <sup>ON</sup>
R	C1_05700W_A	AUT7	orf19.2480.1	1,47	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C4_04170C_A	AXL2	orf19.5292	-1,19	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C2_04230W_A	BAT21	orf19.797	-0,81	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C1_07540C_A	BBC1	orf19.2791	0,88	PRE1 <sup>OFF</sup>
M	C4_02310W_A	BEM3	orf19.2771	1,12	PRE1 <sup>OFF</sup>
Q	C1_04070C_A	BET4	orf19.1039	0,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C1_00230C_A	BFA1	orf19.6080	1,19	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_01930C_A	BIO2	orf19.2593	-3,00	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C2_05360C_A	BIO32	orf19.3567	1,32	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_08010W_A	BLM3	orf19.2182	1,42	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C3_07180C_A	BMT1	orf19.6782	-1,08	PRE1 <sup>ON</sup>
F	CR_00740C_A	BMT3	orf19.3282	0,62	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C6_03250W_A	BMT4	orf19.5612	-1,21	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_00260C_A	BNA4	orf19.5443	-0,71	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_03860C_A	BNI4	orf19.4457	0,92	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	CR_00070W_A	BNR1	orf19.7537	0,74	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_06520C_A	BPH1	orf19.6261	0,93	PRE1 <sup>OFF</sup>
M	C4_05660C_A	BRN1	orf19.1251	0,84	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C3_01750C_A	BRO1	orf19.1670	0,69	PRE1 <sup>OFF</sup>

Q	C5_03620W_A	BTS1	orf19.6674	2,37	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C4_03120C_A	BUB1	orf19.2678	1,39	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C2_02780C_A	BUB2	orf19.5827	0,82	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C5_03240W_A	BUB3	orf19.2655	1,32	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C2_05260W_A	BUD14	orf19.3555	1,41	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C1_09880C_A	BUD31	orf19.4855	-0,65	PRE1 <sup>ON</sup>
F	CR_06910W_A	BUD5	orf19.1842	0,77	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C1_08170C_A	BUL1	orf19.5094	0,61	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C5_03580C_A	CAC2	orf19.6670	0,62	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_08430W_A	CAF16	orf19.388	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_03280W_A	CAM11	orf19.2651	-1,20	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C3_02220W_A	CAP1	orf19.1623	1,18	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_04490C_A	CAR1	orf19.3934	-0,62	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_11810W_A	CAS1	orf19.1135	0,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C3_01530C_A	CAS4	orf19.1693	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C4_01190W_A	CAS5	orf19.4670	0,61	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C4_06580W_A	CBF1	orf19.2876	-0,68	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_09270C_A	CBP1	orf19.7323	0,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_03710W_A	CCC1	orf19.6948	-1,46	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C1_07180W_A	CCS1	orf19.4449	1,25	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C5_00070W_A	CDC11	orf19.5691	0,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C1_03210C_A	CDC12	orf19.3013	0,65	PRE1 <sup>OFF</sup>
C	C1_00360W_A	CDC13	orf19.6072	0,73	PRE1 <sup>OFF</sup>
H	C6_00670W_A	CDC14	orf19.4192	0,93	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_05460W_A	CDC19	orf19.3575	-1,71	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C6_01150W_A	CDC20	orf19.122	2,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C5_01970C_A	CDC24	orf19.3174	0,96	PRE1 <sup>OFF</sup>
H	CR_01230C_A	CDC27	orf19.3231	0,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_01920W_A	CDC34	orf19.6529	1,24	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C6_02610C_A	CDC37	orf19.5531	1,48	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	CR_01680C_A	CDC4	orf19.2559	2,11	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_10790W_A	CDC48	orf19.2340	1,58	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_00950C_A	CDC5	orf19.6010	1,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_01690C_A	CDC60	orf19.2560	-1,03	PRE1 <sup>ON</sup>
Q	C2_05320W_A	CDC7	orf19.3561	1,12	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	CR_09180W_A	CDG1	orf19.7314	0,98	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C2_00450C_A	CDH1	orf19.2084	1,06	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_05060W_A	CDL1	orf19.3773	1,11	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_01580C_A	CEF3	orf19.4152	-0,89	PRE1 <sup>ON</sup>
N	C4_06480C_A	CEK1	orf19.2886	0,76	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C3_05070W_A	CEM1	orf19.5977	-0,61	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C4_05780C_A	CFL2	orf19.1264	-3,59	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_02760C_A	CGR1	orf19.2722	1,23	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_01270W_A	CHA1	orf19.1996	-7,19	Ausente en PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_03320W_A	CHK1	orf19.896	1,37	PRE1 <sup>OFF</sup>

L	C5_04130C_A	CHT2	orf19.3895	-0,82	PRE1 <sup>ON</sup>
L	CR_10110W_A	CHT3	orf19.7586	-1,73	PRE1 <sup>ON</sup>
C	C2_02010C_A	CHT4	orf19.1515	1,73	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C6_01170W_A	CIC1	orf19.124	-1,06	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C6_01070C_A	CIP1	orf19.113	2,74	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_03500W_A	CIT1	orf19.4393	-1,05	PRE1 <sup>ON</sup>
D	CR_07240C_A	CLG1	orf19.6146	1,81	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_10260C_A	CMK2	orf19.1754	0,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C5_05160C_A	CNB1	orf19.4009	0,90	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C2_06020W_A	CNT	orf19.4118	-1,59	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C1_07900W_A	COI1	orf19.5063	-1,57	PRE1 <sup>ON</sup>
M	C6_01840C_A	COQ3	orf19.3400	-0,67	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C1_03160C_A	COQ4	orf19.3008	-0,91	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C2_05470W_A	COQ5	orf19.3577	-0,80	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C2_01590W_A	COX13	orf19.1467	-1,08	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C2_03470C_A	COX6	orf19.873.1	-0,81	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_07370C_A	CPH1	orf19.4433	0,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C6_00280W_A	CPH2	orf19.1187	0,92	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_10000C_A	CPP1	orf19.4866	1,12	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_10670W_A	CPR6	orf19.7654	0,62	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C7_03360W_A	CPY1	orf19.1339	1,05	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C4_02900C_A	CRH11	orf19.2706	-0,88	PRE1 <sup>ON</sup>
Q	C1_09250W_A	CRP1	orf19.4784	0,85	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_12310C_A	CSI2	orf19.5232	-0,82	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_06130W_A	CSM3	orf19.4105	0,88	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_04580C_A	CSU57	orf19.3942	0,86	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C6_01830W_A	CTA1	orf19.3401	1,54	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_01270W_A	CTA9	orf19.3315	1,18	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_01740W_A	CTN1	orf19.4551	1,74	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_04270C_A	CTP1	orf19.5870	-1,34	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_05170C_A	CUE5	orf19.448	0,99	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C1_13640W_A	CUP2	orf19.5001	0,81	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C7_02040C_A	CUP9	orf19.6514	-0,84	PRE1 <sup>ON</sup>
M	C1_02250W_A	CWH8	orf19.3682	-1,95	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C1_13630W_A	CYB2	orf19.5000	0,64	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C5_01130W_A	CYC3	orf19.1957	-1,88	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C1_06690W_A	CYK3	orf19.6242	1,13	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C3_06360C_A	CYP5	orf19.7421	1,23	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_01870C_A	CYS4	orf19.4536	-0,59	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_05210W_A	DAD2	orf19.3551	0,63	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_09190C_A	DAK2	orf19.4777	1,04	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	CR_04060C_A	DAP1	orf19.489	1,39	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_02950C_A	DBF4	orf19.5166	1,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C7_01200C_A	DBP7	orf19.6902	-0,82	PRE1 <sup>ON</sup>
Q	C1_14420W_A	DDI1	orf19.7258	2,36	PRE1 <sup>OFF</sup>

S	C7_03670W_A	DED81	orf19.6702	-1,02	PRE1 <sup>ON</sup>
E	CR_09880W_A	DEF1	orf19.7561	1,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C2_00520W_A	DFG5	orf19.2075	0,73	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_13730C_A	DIM1	orf19.5010	-1,35	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C1_08290C_A	DIP2	orf19.5106	-0,60	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C1_10480W_A	DJP1	orf19.991	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C2_02980C_A	DLD1	orf19.5805	-0,59	PRE1 <sup>ON</sup>
W	C3_07360W_A	DLD2	orf19.6755	-0,70	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C6_00320C_A	DNA2	orf19.1192	0,63	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_09660W_A	DOA1	orf19.4829	1,25	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_02860C_A	DOA10	orf19.5175	1,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C1_14000C_A	DOA4	orf19.7207	1,50	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C6_01900C_A	DOG1	orf19.3392	-0,77	PRE1 <sup>ON</sup>
D	C1_13920W_A	DOS2	orf19.5030	0,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C3_00480C_A	DOT5	orf19.5417	1,40	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_01580C_A	DOT6	orf19.2545	-0,74	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C2_07260C_A	DQD1	orf19.2283	-1,00	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C1_08100W_A	DRG1	orf19.5083	-0,74	PRE1 <sup>ON</sup>
P	CR_10550W_A	DRS1	orf19.7635	-0,95	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C2_08490W_A	DSE1	orf19.3629	2,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	CR_06940W_A	DSL1	orf19.2370	1,12	PRE1 <sup>OFF</sup>
R	C3_03010C_A	DTD2	orf19.297	0,96	PRE1 <sup>OFF</sup>
C	C7_03020C_A	DUG3	orf19.5159	1,75	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_04660W_A	DUR1,2	orf19.780	-1,71	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C2_08280W_A	EAF3	orf19.2660	0,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C6_01180C_A	EBP1	orf19.125	1,30	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C2_02880C_A	EBP7	orf19.5816	2,20	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	CR_08690C_A	ECI1	orf19.6445	0,91	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C1_10180C_A	ECM21	orf19.4887	1,17	PRE1 <sup>OFF</sup>
Q	C3_07260C_A	ECM29	orf19.6773	1,31	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_07890W_A	EFG1	orf19.610	-1,66	PRE1 <sup>ON</sup>
N	C2_06340W_A	EFH1	orf19.5498	7,34	Ausente en PRE1 <sup>ON</sup>
V	C2_03100W_A	EFT2	orf19.5788	-0,75	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C1_03320C_A	EHD3	orf19.3029	1,13	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C1_03390W_A	EHT1	orf19.3040	-2,52	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_10490W_A	EIF4E	orf19.7626	-0,69	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C5_00340W_A	EIP1	orf19.955	1,98	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_09370W_A	ELF1	orf19.7332	-1,08	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C7_02910W_A	ENA21	orf19.5170	-1,44	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C3_01400W_A	END3	orf19.1711	0,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_08500C_A	ENO1	orf19.395	-0,76	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C7_03700C_A	ENP1	orf19.5507	-0,61	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_05100C_A	ERF1	orf19.3541	-0,81	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_08590C_A	ERG1	orf19.406	-1,05	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C5_00660C_A	ERG11	orf19.922	-1,09	PRE1 <sup>ON</sup>

S	C1_09460W_A	ERG12	orf19.4809	-0,70	PRE1 <sup>ON</sup>
V	CR_09160C_A	ERG13	orf19.7312	-1,01	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C1_00800C_A	ERG2	orf19.6026	-0,72	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_02150C_A	ERG6	orf19.1631	-1,65	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C2_08610W_A	ERG9	orf19.3616	-0,59	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C1_10040W_A	ERO1	orf19.4871	0,89	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_03010C_A	ERV1	orf19.2863.1	0,88	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C3_00490W_A	ESA1	orf19.5416	1,13	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C1_01670C_A	ESP1	orf19.3356	1,56	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_04410C_A	ESS1	orf19.5196	0,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
C	C3_07470W_A	EVP1	orf19.6741	-7,19	Ausente en PRE1 <sup>ON</sup>
M	C1_02630C_A	EXG2	orf19.2952	1,30	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_06070W_A	FAA21	orf19.4114	1,83	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C3_02810C_A	FAA21	orf19.272	-1,32	PRE1 <sup>ON</sup>
A	CR_10160W_A	FAA4	orf19.7592	-0,78	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C2_01990C_A	FAB1	orf19.1513	0,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C6_01110W_A	FAD2	orf19.118	-1,59	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C5_00190C_A	FAS1	orf19.979	-1,88	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C3_04830C_A	FAS2	orf19.5949	-1,72	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C4_01750C_A	FBA1	orf19.4618	-0,62	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_07830W_A	FBP1	orf19.6178	1,81	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C5_01810W_A	FCR3	orf19.3193	0,75	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_10250C_A	FDH3	orf19.7600	0,64	PRE1 <sup>OFF</sup>
Y	C3_07060W_A	FESUR1	orf19.6794	-0,88	PRE1 <sup>ON</sup>
R	C6_00440C_A	FET34	orf19.4215	-2,13	PRE1 <sup>ON</sup>
R	C6_00470C_A	FET99	orf19.4212	-2,75	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C4_04880W_A	FGR10	orf19.3791	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C2_00720C_A	FGR15	orf19.2054	1,03	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_11130W_A	FGR16	orf19.2303	0,73	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C4_04420W_A	FGR3	orf19.3845	1,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	CR_10030W_A	FGR34	orf19.7579	1,02	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C1_01760W_A	FGR38	orf19.4549	1,40	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C6_01570C_A	FGR47	orf19.3429	0,85	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C2_04720C_A	FGR51	orf19.156	1,31	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_02750W_A	FGR61	orf19.5191	1,41	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C3_00980W_A	FLC1	orf19.2501	-1,23	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_04450C_A	FMA1	orf19.6837	-1,01	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_00810C_A	FOX2	orf19.1288	0,76	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_01460C_A	FOX3	orf19.1704	1,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C4_04320W_A	FRE10	orf19.1415	-1,42	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_06680W_A	FRP3	orf19.1224	-1,13	PRE1 <sup>ON</sup>
P	CR_01760C_A	FRS1	orf19.2573	-0,80	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_02710W_A	FRS2	orf19.2960	-0,68	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_09400C_A	FTH1	orf19.4802	2,01	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C1_14130W_A	FTR1	orf19.7219	-1,79	PRE1 <sup>ON</sup>

S	CR_04530W_A	FUM11	orf19.543	-1,31	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C3_05850W_A	FYV10	orf19.7365	1,00	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C4_04260C_A	FZO1	orf19.1422	0,89	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C1_11660W_A	GAD1	orf19.1153	1,15	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C5_02790C_A	GAP1	orf19.4304	-2,01	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_07120W_A	GAP4	orf19.4456	-1,66	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C5_03500W_A	GAP6	orf19.6659	-0,96	PRE1 <sup>ON</sup>
N	C1_11550W_A	GAR1	orf19.1164	-1,18	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C1_10550C_A	GCA2	orf19.999	1,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C3_07250W_A	GCD2	orf19.6776	-0,64	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C2_09940W_A	GCN4	orf19.1358	1,13	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	CR_06710C_A	GCN5	orf19.705	0,95	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C1_08400C_A	GCV2	orf19.385	-1,49	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C3_06120C_A	GDA1	orf19.7394	-0,76	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C2_07900W_A	GDH2	orf19.2192	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C4_06120W_A	GDH3	orf19.4716	-2,66	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_03130C_A	GGA2	orf19.3006	0,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C4_04750W_A	GID8	orf19.3806	1,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C1_11440C_A	GIN1	orf19.658	1,85	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C1_11400C_A	GIN4	orf19.663	0,77	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_00880C_A	GIT3	orf19.1979	-1,72	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_06450W_A	GLG2	orf19.7434	2,18	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_05050W_A	GLN1	orf19.646	-1,30	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C5_04280C_A	GLN3	orf19.3912	0,73	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C1_00500C_A	GLO1	orf19.6058	1,06	PRE1 <sup>OFF</sup>
Y	C2_09260C_A	GLO2	orf19.4088	1,00	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C5_01520C_A	GLR1	orf19.4147	0,95	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C3_02610C_A	GLX3	orf19.251	0,73	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_10450W_A	GLY1	orf19.986	-2,30	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C6_00330C_A	GNP1	orf19.1193	-2,36	PRE1 <sup>ON</sup>
Y	C2_10240W_A	GPD1	orf19.1756	-1,19	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C6_02010C_A	GPD2	orf19.691	-2,10	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C2_03270W_A	GPM1	orf19.903	-1,38	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C1_07350C_A	GPX3	orf19.4436	0,81	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_06720W_A	GRE2	orf19.3150	3,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_02860C_A	GRP2	orf19.4309	1,10	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_04600C_A	GRR1	orf19.3944	1,94	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_02420C_A	GSC1	orf19.2929	-1,00	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C4_02990C_A	GST2	orf19.2693	1,50	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_03720W_A	GTT11	orf19.6947	1,11	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_09490C_A	GUA1	orf19.4813	-1,06	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C5_03790W_A	GUK1	orf19.1115	-1,23	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_06760W_A	GUT2	orf19.3133	-0,88	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C4_04710W_A	GYP1	orf19.3811	1,35	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C7_03490W_A	GYP7	orf19.6706	1,42	PRE1 <sup>OFF</sup>

S	C5_02910C_A	GYP8	orf19.4315	1,20	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C1_06130C_A	HAC1	orf19.2432	3,75	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C1_11210C_A	HAP43	orf19.681	2,26	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C6_04220C_A	HBR2	orf19.1078	1,96	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_03650W_A	HBR3	orf19.6955	-0,62	PRE1 <sup>ON</sup>
E	CR_02000C_A	HEM1	orf19.2601	-1,33	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C3_04060C_A	HEM13	orf19.2803	-0,71	PRE1 <sup>ON</sup>
M	C2_07490W_A	HEM15	orf19.1880	0,84	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C6_00100C_A	HET1	orf19.6327	-0,61	PRE1 <sup>ON</sup>
N	C2_02240C_A	HEX3	orf19.1542	0,92	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_01980W_A	HGT1	orf19.4527	2,73	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C6_03790C_A	HGT10	orf19.5753	-1,57	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_01000W_A	HGT7	orf19.2023	-2,64	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_01010W_A	HGT8	orf19.2021	-2,36	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_04240C_A	HHF1	orf19.1059	-1,37	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C7_03180C_A	HHO1	orf19.5137.1	-0,83	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_04260W_A	HHT21	orf19.1061	-1,63	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C4_00140C_A	HIS4	orf19.5639	-0,63	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C7_03720C_A	HIS7	orf19.5505	-1,07	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C4_02750W_A	HIT1	orf19.2723	-0,98	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_00170C_A	HMA1	orf19.2115	-1,01	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_05670C_A	HMO1	orf19.6645	-1,10	PRE1 <sup>ON</sup>
Q	C1_00350C_A	HMX1	orf19.6073	1,19	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C6_01390W_A	HOC1	orf19.3445	-0,97	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_05540W_A	HOM3	orf19.1235	-1,18	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_02620C_A	HOM6	orf19.2951	-0,61	PRE1 <sup>ON</sup>
N	C4_06010C_A	HOS1	orf19.4411	1,37	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_13970C_A	HPC2	orf19.5035	0,81	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C6_02890C_A	HPD1	orf19.5565	1,18	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_02740C_A	HPT1	orf19.5832	-0,69	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_01690C_A	HRT2	orf19.4624	-1,01	PRE1 <sup>ON</sup>
T	CR_01210C_A	HSE1	orf19.3233	1,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C1_09170W_A	HSF1	orf19.4775	1,18	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_02840C_A	HSL1	orf19.4308	0,88	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C7_03450C_A	HSM3	orf19.1331	1,83	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	CR_08250C_A	HSP104	orf19.6387	1,09	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_04010C_A	HSP21	orf19.822	3,92	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C2_03390C_A	HSP78	orf19.882	2,05	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	CR_01800C_A	HST2	orf19.2580	0,61	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_03900W_A	HST7	orf19.469	0,81	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_03910W_A	HTA1	orf19.6924	-0,73	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_04170C_A	HTA2	orf19.1051	-0,92	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C5_05490C_A	HTS1	orf19.4051	-0,70	PRE1 <sup>ON</sup>
V	CR_04510W_A	HXK2	orf19.542	-0,92	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_02990C_A	HYU1	orf19.5804	0,59	PRE1 <sup>OFF</sup>

P	C1_04500W_A	ICL1	orf19.6844	2,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_02280W_A	IDI1	orf19.2775	-0,61	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C7_03170W_A	IFA21	orf19.5138	0,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C2_04420W_A	IFA4	orf19.4510	1,58	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_01240W_A	IFD3	orf19.3311	1,09	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C1_04750W_A	IFE1	orf19.769	-1,41	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C5_00450C_A	IFG3	orf19.944	-1,07	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C2_08080C_A	IFM3	orf19.2176	0,90	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	CR_03280W_A	IFR2	orf19.2396	0,77	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_01730W_A	IFU5	orf19.2568	1,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C6_04520W_A	ILS1	orf19.2138	-0,62	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_06190W_A	ILV1	orf19.5480	-0,98	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C3_02320W_A	ILV2	orf19.1613	-1,62	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C5_05410C_A	ILV3	orf19.4040	-1,33	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C6_00870C_A	ILV5	orf19.88	-0,68	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C4_01370W_A	ILV6	orf19.4650	-1,71	PRE1 <sup>ON</sup>
R	C4_05020W_A	IMG2	orf19.3777	-1,20	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C2_06390C_A	IMH3	orf19.18	-1,00	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C1_03610C_A	IMP1	orf19.3061	-0,67	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_10100C_A	INO1	orf19.7585	3,94	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_03840C_A	INO4	orf19.837.1	1,17	PRE1 <sup>OFF</sup>
M	C6_02320C_A	IPL1	orf19.3474	0,70	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C7_01840W_A	IQG1	orf19.6536	1,54	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_14230C_A	IRR1	orf19.7232	0,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
M	C6_02520W_A	ISA1	orf19.5521	-1,78	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C3_00540C_A	IST1	orf19.5409	0,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C7_01760C_A	ISU1	orf19.6548	-2,01	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C4_03450C_A	JAB1	orf19.3371	1,16	PRE1 <sup>OFF</sup>
R	C2_08790W_A	JEM1	orf19.3592	0,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_09370C_A	KAR3	orf19.564	0,85	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_13740W_A	KAR9	orf19.5011	0,99	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	CR_07420W_A	KGD2	orf19.6126	1,09	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_06710W_A	KIN28	orf19.6239	1,17	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_10530C_A	KIN3	orf19.5325	1,54	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_10310C_A	KIP2	orf19.1747	0,88	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_12010C_A	KIP4	orf19.5265	1,45	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C3_05830W_A	KRE6	orf19.7363	-0,67	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C5_00470C_A	KRE62	orf19.942	7,34	Ausente en PRE1 <sup>ON</sup>
P	C1_11420W_A	KRR1	orf19.661	-0,60	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_07410C_A	KRS1	orf19.6749	-0,87	PRE1 <sup>ON</sup>
E	C1_07380C_A	KSP1	orf19.4432	1,48	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	CR_03370C_A	KTI12	orf19.2385	-0,84	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C1_04000C_A	KTR4	orf19.4475	-0,63	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C4_02290W_A	LAB5	orf19.2774	-2,55	PRE1 <sup>ON</sup>
G	CR_04480C_A	LAP3	orf19.539	0,94	PRE1 <sup>OFF</sup>

N	C5_03590W_A	LAP4	orf19.6671	1,05	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_02170C_A	LAP41	orf19.1628	0,96	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_01640W_A	LAT1	orf19.6561	-0,65	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_12080W_A	LCB4	orf19.5257	0,74	PRE1 <sup>OFF</sup>
Q	C1_00170W_A	LEU4	orf19.6086	0,86	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C7_02060W_A	LIG1	orf19.6511	-0,60	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_04740W_A	LPG20	orf19.771	1,79	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_00870W_A	LRO1	orf19.6018	0,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	CR_06760C_A	LSC2	orf19.1860	-0,81	PRE1 <sup>ON</sup>
L	CR_01400W_A	LYS12	orf19.2525	-1,08	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_04460W_A	LYS22	orf19.4506	-0,80	PRE1 <sup>ON</sup>
M	C4_04410C_A	LYS4	orf19.3846	-1,51	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C3_06590W_A	LYS9	orf19.7448	-0,63	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C7_00510W_A	MAC1	orf19.7068	-0,60	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C1_04080W_A	MAD2	orf19.1040	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C6_01670W_A	MAE1	orf19.3419	-1,03	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_06360C_A	MAK16	orf19.5500	-0,78	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_04560W_A	MAK21	orf19.5912	-1,11	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C1_01770W_A	MAK32	orf19.4548	0,94	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_10790W_A	MAL2	orf19.7668	3,00	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_03930C_A	MAM33	orf19.7187	0,81	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_01060W_A	MBF1	orf19.3294	0,64	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_04110C_A	MBP1	orf19.5855	1,41	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	CR_10540C_A	MCD1	orf19.7634	1,11	PRE1 <sup>OFF</sup>
R	CR_01740W_A	MCI4	orf19.2570	-1,65	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C7_01750W_A	MCP1	orf19.6550	-0,83	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C6_02040W_A	MCR1	orf19.3507	0,85	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	CR_00540C_A	MDH1	orf19.7481	0,95	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_06230C_A	MDM34	orf19.1826	1,17	PRE1 <sup>OFF</sup>
H	C6_03170C_A	MDR1	orf19.5604	1,25	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_01290W_A	MED11	orf19.6909	0,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	CR_09760W_A	MED21	orf19.7548	0,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C2_07500C_A	MED4	orf19.1878	0,83	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_04950W_A	MED5	orf19.1808	0,85	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_04530W_A	MED8	orf19.4497	0,73	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C1_07000W_A	MEF2	orf19.6208	-1,02	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C2_09140C_A	MET10	orf19.4076	1,20	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C3_02950C_A	MET13	orf19.288	-0,90	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C5_00430W_A	MET14	orf19.946	-1,14	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C4_00200C_A	MET15	orf19.5645	0,70	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C3_01450C_A	MET18	orf19.1706	-0,67	PRE1 <sup>ON</sup>
N	C7_00730W_A	MET28	orf19.7046	7,34	Ausente en PRE1 <sup>ON</sup>
I	C4_03020W_A	MGM1	orf19.2690	0,85	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_05920C_A	MHP1	orf19.6621	0,89	PRE1 <sup>OFF</sup>
Y	C1_02880C_A	MIA40	orf19.2977	0,59	PRE1 <sup>OFF</sup>

S	C2_10540W_A	MIG2	orf19.5326	-0,75	PRE1 <sup>ON</sup>
V	CR_07010W_A	MIS11	orf19.2364	-0,99	PRE1 <sup>ON</sup>
T	CR_00080W_A	MIS12	orf19.7534	-1,55	PRE1 <sup>ON</sup>
R	C2_09150W_A	MIT1	orf19.4077	-1,59	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_00790C_A	MLH1	orf19.4162	1,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_09690W_A	MLS1	orf19.4833	2,12	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C1_08210C_A	MLT1	orf19.5100	-0,59	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C5_02630C_A	MNN1	orf19.4279	-1,38	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C1_02400C_A	MNN11	orf19.2927	-0,67	PRE1 <sup>ON</sup>
R	C1_04900W_A	MNN15	orf19.753	-1,58	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C1_10720C_A	MNN2	orf19.2347	-1,39	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_10070C_A	MNN23	orf19.4874	-0,97	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C2_01300C_A	MNN24	orf19.1995	-1,82	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C7_03600W_A	MNN26	orf19.6692	-1,60	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_06540W_A	MNN4	orf19.2881	-1,01	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C1_09130W_A	MNN47	orf19.4771	-0,74	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C3_06020W_A	MNN9	orf19.7383	-0,65	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_03730C_A	MNS1	orf19.1036	0,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C3_01810C_A	MNT1	orf19.1665	-0,96	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C3_01830C_A	MNT2	orf19.1663	-0,77	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_00620W_A	MOB2	orf19.6044	0,63	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_13910C_A	MODF	orf19.5029	0,89	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C4_03430W_A	MOH1	orf19.3369	3,48	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C4_06190C_A	MPH1	orf19.2919	2,31	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C5_01700W_A	MPRL36	orf19.3205	-1,28	PRE1 <sup>ON</sup>
P	CR_08960C_A	MPS1	orf19.7293	2,15	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_13570W_A	MPT5	orf19.4991	1,76	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C7_01340W_A	MRE11	orf19.6915	0,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_11700C_A	MRF1	orf19.1149	1,11	PRE1 <sup>OFF</sup>
Y	C5_00420C_A	MRP17	orf19.947	-1,26	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C5_05290C_A	MRP2	orf19.4023	-1,48	PRE1 <sup>ON</sup>
D	C1_01600W_A	MRP20	orf19.3350	-1,25	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C7_03790W_A	MRP7	orf19.7203	-1,22	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C2_05000C_A	MRPL10	orf19.3532	-1,14	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_06790C_A	MRPL19	orf19.6231	-2,07	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C1_03650C_A	MRPL27	orf19.3064	-1,48	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C1_07910C_A	MRPL3	orf19.5064	-1,35	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C1_04880C_A	MRPL37	orf19.755	-0,68	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_04010C_A	MRPL40	orf19.484	-1,19	PRE1 <sup>ON</sup>
F	CR_00480W_A	MRPL6	orf19.7486	-0,87	PRE1 <sup>ON</sup>
P	CR_07390C_A	MRPL8	orf19.6129	-1,54	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_12340C_A	MRPS9	orf19.5230	-1,38	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_05920W_A	MRR1	orf19.7372	1,07	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C6_02770W_A	MRT4	orf19.5550	-0,96	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_07120C_A	MSH2	orf19.3093	0,93	PRE1 <sup>OFF</sup>

G	C1_13170C_A	MSH6	orf19.4945	0,70	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C7_01870W_A	MSK1	orf19.6533	-0,63	PRE1 <sup>ON</sup>
R	C5_04650C_A	MSM1	orf19.3950	-0,86	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_08940C_A	MSN4	orf19.4752	1,14	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C1_08810C_A	MSS116	orf19.4739	-0,87	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C5_05090W_A	MSS2	orf19.4001	-0,61	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C3_01160W_A	MSS4	orf19.3153	0,94	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C2_08550C_A	MSU1	orf19.3624	-0,89	PRE1 <sup>ON</sup>
T	CR_03380W_A	MTG1	orf19.2384	-0,94	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C1_07800W_A	MTO1	orf19.5050	-0,88	PRE1 <sup>ON</sup>
R	C3_06210C_A	MUB1	orf19.7412	2,00	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_00600C_A	MUC1	orf19.4183	0,76	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_05450C_A	MUM2	orf19.4044	3,65	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C1_11870W_A	MUP1	orf19.5280	-0,79	PRE1 <sup>ON</sup>
Y	C2_00260C_A	MUQ1	orf19.2107	1,49	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C2_00960C_A	MXR1	orf19.2028	1,39	PRE1 <sup>OFF</sup>
R	C6_04590C_A	NAG1	orf19.2156	-0,64	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C6_03450C_A	NAM2	orf19.5705	-0,64	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_09010W_A	NAR1	orf19.4757	0,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_11150W_A	NAS2	orf19.2301	1,50	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_04920C_A	NAS6	orf19.5961	2,01	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C2_03430W_A	NBN1	orf19.878	0,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C3_04910C_A	NCE102	orf19.5960	-1,14	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C3_01300C_A	NCE103	orf19.1721	-1,96	PRE1 <sup>ON</sup>
E	C1_14300C_A	NCR1	orf19.7242	1,02	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C3_03420C_A	NDE1	orf19.339	-1,26	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C2_04550C_A	NDH51	orf19.4495	-1,16	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_11380W_A	NEP1	orf19.665	-1,06	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C1_03290W_A	NGG1	orf19.3023	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C4_01700C_A	NHP6A	orf19.4623.3	-1,01	PRE1 <sup>ON</sup>
N	C7_02800W_A	NIK1	orf19.5181	0,92	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_01490W_A	NIP1	orf19.4635	-0,87	PRE1 <sup>ON</sup>
A	CR_05520W_A	NOC2	orf19.5850	-0,86	PRE1 <sup>ON</sup>
Q	C3_06030W_A	NOG1	orf19.7384	-1,01	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C6_03640W_A	NOG2	orf19.5732	-0,76	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C4_06720W_A	NOP1	orf19.3138	-0,61	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C7_00690W_A	NOP15	orf19.7050	-1,17	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_04390C_A	NOP4	orf19.5198	-0,60	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C6_04330W_A	NOP8	orf19.1091	-1,21	PRE1 <sup>ON</sup>
I	CR_03420C_A	NOT4	orf19.2379	1,20	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C1_14280C_A	NPL3	orf19.7238	-0,73	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_06110C_A	NPL4	orf19.2434	1,75	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C7_04040C_A	NPT1	orf19.7176	0,99	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C3_02820C_A	NSG2	orf19.273	1,13	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C2_03280W_A	NSP1	orf19.900	0,65	PRE1 <sup>OFF</sup>

L	C7_01900W_A	NUC2	orf19.6531	-1,25	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C5_01280C_A	NUF2	orf19.1941	0,95	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_09550C_A	NUO1	orf19.6607	-0,67	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_02940C_A	NUO2	orf19.287	-1,23	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C5_01770C_A	OBPA	orf19.3198	-0,61	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_13990W_A	OCA6	orf19.7206	0,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C7_03910W_A	OGG1	orf19.7190	0,97	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_08360C_A	OLE1	orf19.5117	-1,25	PRE1 <sup>ON</sup>
D	CR_02220C_A	OPT3	orf19.3749	-0,77	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C1_04120C_A	orf19.1045	orf19.1045	0,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_04180W_A	orf19.1052	orf19.1052	-1,13	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C6_04250W_A	orf19.1082.1	orf19.1082.1	-0,63	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C5_03830C_A	orf19.1111	orf19.1111	0,97	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C5_03780C_A	orf19.1116	orf19.1116	1,45	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C5_03710C_A	orf19.1124	orf19.1124	1,15	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C5_03700C_A	orf19.1124.2	orf19.1124.2	-0,62	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_11790W_A	orf19.1137	orf19.1137	0,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
M	C6_01080C_A	orf19.114	orf19.114	0,74	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C1_11560C_A	orf19.1163	orf19.1163	-1,15	PRE1 <sup>ON</sup>
D	C6_00190W_A	orf19.1177	orf19.1177	0,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C6_00270W_A	orf19.1186	orf19.1186	1,83	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C6_00290W_A	orf19.1189	orf19.1189	-0,80	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C6_00310W_A	orf19.1191	orf19.1191	1,02	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C6_00340C_A	orf19.1195	orf19.1195	-0,72	PRE1 <sup>ON</sup>
N	C6_00400C_A	orf19.1202	orf19.1202	0,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C6_00430C_A	orf19.1204	orf19.1204	0,62	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_05650W_A	orf19.1250	orf19.1250	-1,02	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C4_05820W_A	orf19.1267.1	orf19.1267.1	-1,02	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_05900C_A	orf19.1277	orf19.1277	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C5_04080C_A	orf19.1281	orf19.1281	0,63	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C5_04050W_A	orf19.1285	orf19.1285	0,96	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_03810W_A	orf19.1297	orf19.1297	0,94	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C4_03780C_A	orf19.1300	orf19.1300	-0,80	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_03770W_A	orf19.1301	orf19.1301	1,08	PRE1 <sup>OFF</sup>
H	C4_03750C_A	orf19.1303	orf19.1303	-1,02	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_03730C_A	orf19.1305	orf19.1305	-0,67	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_03600C_A	orf19.1314	orf19.1314	1,02	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C4_03530W_A	orf19.1326	orf19.1326	7,34	Ausente en PRE1 <sup>ON</sup>
L	C7_03310W_A	orf19.1344	orf19.1344	-2,62	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_09960W_A	orf19.1356	orf19.1356	0,61	PRE1 <sup>OFF</sup>
C	C2_09930W_A	orf19.1359	orf19.1359	1,90	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C2_09910C_A	orf19.1360.1	orf19.1360.1	1,02	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_09880C_A	orf19.1363	orf19.1363	2,37	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C2_09810C_A	orf19.1369	orf19.1369	7,34	Ausente en PRE1 <sup>ON</sup>
N	C6_01300W_A	orf19.137	orf19.137	1,45	PRE1 <sup>OFF</sup>

P	C2_09710C_A	orf19.1381	orf19.1381	0,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C2_09690C_A	orf19.1383	orf19.1383	0,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_09670C_A	orf19.1387	orf19.1387	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C2_09660W_A	orf19.1388	orf19.1388	-0,94	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_09650W_A	orf19.1389	orf19.1389	-0,80	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C2_09620W_A	orf19.1392	orf19.1392	1,02	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_09610W_A	orf19.1393	orf19.1393	-1,18	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C2_09590C_A	orf19.1395	orf19.1395	-1,15	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C4_04390W_A	orf19.1409.1	orf19.1409.1	-0,79	PRE1 <sup>ON</sup>
N	C4_04330C_A	orf19.1414	orf19.1414	0,64	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C4_04240C_A	orf19.1426	orf19.1426	-1,06	PRE1 <sup>ON</sup>
H	C2_08390W_A	orf19.1433	orf19.1433	0,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C4_03340C_A	orf19.1438	orf19.1438	-7,19	Ausente en PRE1 <sup>ON</sup>
E	C2_01420C_A	orf19.1447	orf19.1447	0,95	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_01440C_A	orf19.1448.1	orf19.1448.1	0,59	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_01450C_A	orf19.1449	orf19.1449	3,50	PRE1 <sup>OFF</sup>
H	C2_01540W_A	orf19.1461	orf19.1461	1,20	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C2_01570W_A	orf19.1465	orf19.1465	1,30	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_01680C_A	orf19.1479	orf19.1479	0,62	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C2_01730W_A	orf19.1484	orf19.1484	0,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C2_01740C_A	orf19.1485	orf19.1485	-1,05	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C2_01820C_A	orf19.1491	orf19.1491	0,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C2_01920C_A	orf19.1504	orf19.1504	0,94	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_02050C_A	orf19.1522	orf19.1522	1,05	PRE1 <sup>OFF</sup>
R	C2_02120W_A	orf19.1528	orf19.1528	-1,22	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C2_02150C_A	orf19.1531	orf19.1531	1,01	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C2_04700C_A	orf19.154	orf19.154	-1,52	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_02270C_A	orf19.1545	orf19.1545	-2,23	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C2_02310W_A	orf19.1549	orf19.1549	-0,80	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C2_02420C_A	orf19.1565	orf19.1565	0,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C2_02500W_A	orf19.1574	orf19.1574	1,21	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C2_02520W_A	orf19.1576	orf19.1576	1,34	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_02540W_A	orf19.1578	orf19.1578	-0,65	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C2_04320W_A	orf19.1590	orf19.1590	1,36	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_09420W_A	orf19.1600	orf19.1600	2,07	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C3_02390W_A	orf19.1606	orf19.1606	2,62	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C3_02350W_A	orf19.1609	orf19.1609	-0,63	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_02190C_A	orf19.1625	orf19.1625	-0,83	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_02180C_A	orf19.1626	orf19.1626	-1,24	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C3_02160C_A	orf19.1630	orf19.1630	0,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C3_02060W_A	orf19.1641	orf19.1641	2,64	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C3_02040C_A	orf19.1642	orf19.1642	-1,58	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C3_01850W_A	orf19.1662	orf19.1662	-1,13	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C3_01820W_A	orf19.1664	orf19.1664	-2,32	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C3_01610W_A	orf19.1682	orf19.1682	-1,03	PRE1 <sup>ON</sup>

T	C3_01510W_A	orf19.1698	orf19.1698	0,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C3_01440C_A	orf19.1707	orf19.1707	-0,78	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C3_01210C_A	orf19.1730	orf19.1730	1,28	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	CR_04720C_A	orf19.1734	orf19.1734	0,98	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_02500W_A	orf19.175	orf19.175	1,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
Q	C2_10230W_A	orf19.1757	orf19.1757	2,01	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C2_10130W_A	orf19.1768	orf19.1768	1,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C2_10090C_A	orf19.1772	orf19.1772	-1,53	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C2_10050W_A	orf19.1777	orf19.1777	1,06	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	CR_06930W_A	orf19.178	orf19.178	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C4_05310W_A	orf19.1789	orf19.1789	-1,09	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C4_05350W_A	orf19.1793	orf19.1793	0,86	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_05360C_A	orf19.1794	orf19.1794	-0,91	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_05400C_A	orf19.1797	orf19.1797	2,49	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C4_05440C_A	orf19.1800	orf19.1800	1,65	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C2_04820W_A	orf19.182	orf19.182	-1,28	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C1_06270W_A	orf19.1823	orf19.1823	0,81	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_10620W_A	orf19.1833	orf19.1833	-0,78	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_10630C_A	orf19.1834	orf19.1834	1,59	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_04790C_A	orf19.185	orf19.185	-1,56	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C2_07640W_A	orf19.1861	orf19.1861	0,70	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_07610C_A	orf19.1864	orf19.1864	0,79	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C2_07550W_A	orf19.1872	orf19.1872	-1,20	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C2_04780W_A	orf19.188	orf19.188	0,95	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C2_07420W_A	orf19.1889	orf19.1889	-0,99	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_07410W_A	orf19.1890	orf19.1890	-0,98	PRE1 <sup>ON</sup>
D	C2_07370W_A	orf19.1897	orf19.1897	-1,02	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C2_04770W_A	orf19.190	orf19.190	0,90	PRE1 <sup>OFF</sup>
Y	C2_07360W_A	orf19.1900	orf19.1900	-0,88	PRE1 <sup>ON</sup>
H	C2_00060C_A	orf19.1917	orf19.1917	-0,79	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C5_01300C_A	orf19.1939	orf19.1939	7,34	Ausente en PRE1 <sup>ON</sup>
I	C5_01140C_A	orf19.1956	orf19.1956	-0,67	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C5_01070C_A	orf19.1964	orf19.1964	-2,56	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C5_01050C_A	orf19.1967	orf19.1967	-1,86	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C5_00920W_A	orf19.1975	orf19.1975	-0,59	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_07700W_A	orf19.1985	orf19.1985	0,70	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_01310W_A	orf19.1994	orf19.1994	0,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C2_01250W_A	orf19.1999	orf19.1999	2,10	PRE1 <sup>OFF</sup>
H	C2_01230W_A	orf19.2001	orf19.2001	2,37	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_01070W_A	orf19.2017	orf19.2017	-0,73	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C2_01030W_A	orf19.2019	orf19.2019	-0,86	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_00770W_A	orf19.2047	orf19.2047	1,34	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C2_00740C_A	orf19.2050	orf19.2050	0,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_00730C_A	orf19.2051	orf19.2051	0,89	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C2_00600C_A	orf19.2067	orf19.2067	-1,10	PRE1 <sup>ON</sup>

L	C2_00510W_A	orf19.2076	orf19.2076	0,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_00420W_A	orf19.2089	orf19.2089	1,50	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C2_00400C_A	orf19.2091	orf19.2091	-1,28	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C2_00230W_A	orf19.2110	orf19.2110	1,13	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_00220C_A	orf19.2111	orf19.2111	1,13	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_00190C_A	orf19.2113	orf19.2113	0,75	PRE1 <sup>OFF</sup>
Q	C2_00180C_A	orf19.2114	orf19.2114	1,04	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C6_04410C_A	orf19.2124	orf19.2124	0,73	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C6_04420W_A	orf19.2125	orf19.2125	-1,75	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C6_04450W_A	orf19.2128	orf19.2128	-1,26	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C6_04530C_A	orf19.2143	orf19.2143	-1,13	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C6_04550C_A	orf19.2149	orf19.2149	-0,81	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C2_08920W_A	orf19.215	orf19.215	0,70	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C6_04560W_A	orf19.2150	orf19.2150	-0,77	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C2_08910C_A	orf19.216	orf19.216	0,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C2_07920W_A	orf19.2191	orf19.2191	-0,62	PRE1 <sup>ON</sup>
N	C2_07860W_A	orf19.2196	orf19.2196	0,86	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_07800W_A	orf19.2201	orf19.2201	-0,71	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_07790C_A	orf19.2202	orf19.2202	7,34	Ausente en PRE1 <sup>ON</sup>
G	C2_07770C_A	orf19.2203.1	orf19.2203.1	7,34	Ausente en PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_07740W_A	orf19.2208	orf19.2208	0,64	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C2_07720C_A	orf19.2210	orf19.2210	1,47	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C2_07680W_A	orf19.2214	orf19.2214	-1,63	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_06770W_A	orf19.2228	orf19.2228	0,75	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C2_06780C_A	orf19.2229	orf19.2229	2,09	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C2_06850W_A	orf19.2237.1	orf19.2237.1	-0,80	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_06890C_A	orf19.2244	orf19.2244	2,02	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_06950C_A	orf19.2249	orf19.2249	-1,10	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C2_07030C_A	orf19.2259	orf19.2259	-1,06	PRE1 <sup>ON</sup>
Q	C2_07070W_A	orf19.2262	orf19.2262	1,38	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_07190C_A	orf19.2275	orf19.2275	-0,60	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_07290W_A	orf19.2286	orf19.2286	-0,83	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_11200W_A	orf19.2296	orf19.2296	1,09	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_11160C_A	orf19.2299	orf19.2299	-0,62	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_11120C_A	orf19.2304	orf19.2304	0,89	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C1_11100W_A	orf19.2306	orf19.2306	1,16	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_11080W_A	orf19.2308	orf19.2308	2,46	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C1_11010C_A	orf19.2313	orf19.2313	0,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_10880W_A	orf19.2330	orf19.2330	-0,76	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C1_10840C_A	orf19.2333	orf19.2333	1,26	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_10820C_A	orf19.2335	orf19.2335	0,59	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C1_10730W_A	orf19.2346	orf19.2346	2,21	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	CR_06970C_A	orf19.2368	orf19.2368	0,59	PRE1 <sup>OFF</sup>
M	C7_02610C_A	orf19.2371	orf19.2371	-1,54	PRE1 <sup>ON</sup>
L	CR_03400W_A	orf19.2382	orf19.2382	-0,86	PRE1 <sup>ON</sup>

I	CR_03350C_A	orf19.2387	orf19.2387	-0,65	PRE1 <sup>ON</sup>
D	CR_03340C_A	orf19.2389	orf19.2389	1,18	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_03330W_A	orf19.2391	orf19.2391	0,88	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_03310C_A	orf19.2393	orf19.2393	0,64	PRE1 <sup>OFF</sup>
C	CR_03260W_A	orf19.2397.3	orf19.2397.3	2,24	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	CR_03250C_A	orf19.2398	orf19.2398	0,86	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	CR_03220C_A	orf19.2401	orf19.2401	1,32	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_03120W_A	orf19.2414	orf19.2414	1,35	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C1_06090C_A	orf19.2436	orf19.2436	-0,65	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C1_06070W_A	orf19.2438	orf19.2438	-1,61	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_06030C_A	orf19.2442	orf19.2442	0,64	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_05990C_A	orf19.2446	orf19.2446	0,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C1_05980W_A	orf19.2447	orf19.2447	1,41	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C1_05950C_A	orf19.2452	orf19.2452	-2,06	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_05900W_A	orf19.2459	orf19.2459	-0,61	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C3_02570W_A	orf19.246	orf19.246	0,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_05790W_A	orf19.2472.1	orf19.2472.1	-1,04	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_05750C_A	orf19.2476	orf19.2476	1,29	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_05720W_A	orf19.2478.1	orf19.2478.1	-1,16	PRE1 <sup>ON</sup>
R	C1_05670W_A	orf19.2484	orf19.2484	0,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_05650W_A	orf19.2487	orf19.2487	0,77	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C1_05630C_A	orf19.2489	orf19.2489	-0,69	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C3_00940W_A	orf19.2498	orf19.2498	1,01	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C3_01100W_A	orf19.2512	orf19.2512	2,52	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C3_01120W_A	orf19.2514	orf19.2514	-1,04	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C3_01130C_A	orf19.2515	orf19.2515	1,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_01360W_A	orf19.2519	orf19.2519	0,65	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_02620C_A	orf19.252	orf19.252	-1,09	PRE1 <sup>ON</sup>
F	CR_01370C_A	orf19.2520	orf19.2520	-1,33	PRE1 <sup>ON</sup>
L	CR_01410C_A	orf19.2527	orf19.2527	-1,27	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_01490C_A	orf19.2533.1	orf19.2533.1	-1,28	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_01560W_A	orf19.2542	orf19.2542	1,11	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_01570W_A	orf19.2544	orf19.2544	-0,66	PRE1 <sup>ON</sup>
V	CR_01710W_A	orf19.2564	orf19.2564	-1,64	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_01780W_A	orf19.2575	orf19.2575	-1,26	PRE1 <sup>ON</sup>
K	CR_01820W_A	orf19.2582	orf19.2582	-0,64	PRE1 <sup>ON</sup>
R	CR_01910C_A	orf19.2590	orf19.2590	-2,03	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_01950W_A	orf19.2594	orf19.2594	-0,93	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C5_03440W_A	orf19.2638.1	orf19.2638.1	-1,61	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C5_03410C_A	orf19.2639	orf19.2639	-1,54	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C5_03400C_A	orf19.2639.1	orf19.2639.1	0,99	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C3_02720W_A	orf19.264	orf19.264	1,03	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_03370C_A	orf19.2642	orf19.2642	0,74	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C1_06200W_A	orf19.2663	orf19.2663	0,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C4_03200C_A	orf19.2670	orf19.2670	0,96	PRE1 <sup>OFF</sup>

S	C4_03090W_A	orf19.2682	orf19.2682	0,73	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C4_03050C_A	orf19.2686	orf19.2686	-0,81	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C4_02920W_A	orf19.2703	orf19.2703	0,93	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C4_02880C_A	orf19.2708	orf19.2708	-0,78	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_02860W_A	orf19.2710	orf19.2710	0,95	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C4_02770C_A	orf19.2721	orf19.2721	1,52	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C4_02700W_A	orf19.2728	orf19.2728	1,15	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_02670W_A	orf19.2733	orf19.2733	1,14	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C4_02620C_A	orf19.2737	orf19.2737	1,52	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C4_02600C_A	orf19.2739	orf19.2739	1,38	PRE1 <sup>OFF</sup>
Q	C4_02450W_A	orf19.2757	orf19.2757	0,61	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C4_02420C_A	orf19.2761	orf19.2761	0,81	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C4_02340W_A	orf19.2769	orf19.2769	1,81	PRE1 <sup>OFF</sup>
Y	C4_02330C_A	orf19.2770	orf19.2770	2,08	PRE1 <sup>OFF</sup>
R	CR_02590C_A	orf19.2818	orf19.2818	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	CR_02620C_A	orf19.2821	orf19.2821	-0,89	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_02630C_A	orf19.2822	orf19.2822	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_02690W_A	orf19.2828	orf19.2828	0,95	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	CR_02700W_A	orf19.2829	orf19.2829	1,12	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	CR_02910W_A	orf19.2848	orf19.2848	1,62	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_02940C_A	orf19.2851	orf19.2851	-1,46	PRE1 <sup>ON</sup>
M	CR_02950C_A	orf19.2852	orf19.2852	-1,63	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_02970C_A	orf19.2857	orf19.2857	0,70	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	CR_03000C_A	orf19.2863	orf19.2863	0,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C4_06650W_A	orf19.2867	orf19.2867	1,19	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C4_06470W_A	orf19.2887	orf19.2887	-1,73	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_06460C_A	orf19.2888	orf19.2888	0,75	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_06450W_A	orf19.2889	orf19.2889	0,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
R	C4_06430C_A	orf19.2891	orf19.2891	-0,68	PRE1 <sup>ON</sup>
D	C4_06420W_A	orf19.2892	orf19.2892	0,99	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_06360C_A	orf19.2899	orf19.2899	7,34	Ausente en PRE1 <sup>ON</sup>
R	C4_06210C_A	orf19.2917	orf19.2917	-0,88	PRE1 <sup>ON</sup>
R	C1_02440C_A	orf19.2933	orf19.2933	1,83	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C1_02450C_A	orf19.2934	orf19.2934	-1,12	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C1_02490C_A	orf19.2938	orf19.2938	-0,72	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_02650W_A	orf19.2954	orf19.2954	-1,18	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_02720W_A	orf19.2961	orf19.2961	0,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C1_02730W_A	orf19.2962	orf19.2962	2,23	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_02910C_A	orf19.2982	orf19.2982	1,48	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_02970W_A	orf19.2988	orf19.2988	-1,08	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_03140W_A	orf19.3007	orf19.3007	2,29	PRE1 <sup>OFF</sup>
C	C1_03270W_A	orf19.3021	orf19.3021	3,18	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_03280W_A	orf19.3022	orf19.3022	-1,40	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C1_03330C_A	orf19.3030	orf19.3030	1,18	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_03370W_A	orf19.3037	orf19.3037	-0,78	PRE1 <sup>ON</sup>

T	C1_03620C_A	orf19.3061.1	orf19.3061.1	-1,24	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_07220C_A	orf19.3080	orf19.3080	1,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C4_07210W_A	orf19.3084	orf19.3084	0,79	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C4_07150W_A	orf19.3088	orf19.3088	1,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C4_07140W_A	orf19.3089	orf19.3089	-1,78	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C4_07080C_A	orf19.3100	orf19.3100	1,07	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_07010C_A	orf19.3108	orf19.3108	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_06940C_A	orf19.3115	orf19.3115	0,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_06860C_A	orf19.3123.2	orf19.3123.2	1,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_06840W_A	orf19.3125	orf19.3125	1,31	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_03150W_A	orf19.314	orf19.314	1,44	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_06670W_A	orf19.3142	orf19.3142	0,65	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C2_06750C_A	orf19.3147	orf19.3147	-1,09	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_06740W_A	orf19.3148	orf19.3148	0,89	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C2_06710W_A	orf19.3151	orf19.3151	2,83	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C3_01190C_A	orf19.3158	orf19.3158	0,77	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C5_01960C_A	orf19.3175	orf19.3175	-1,18	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C5_01920C_A	orf19.3180	orf19.3180	0,97	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_01890W_A	orf19.3183	orf19.3183	1,06	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_01880C_A	orf19.3184	orf19.3184	-1,52	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_03210W_A	orf19.320	orf19.320	1,18	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_01180W_A	orf19.3235	orf19.3235	0,85	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_01170W_A	orf19.3237	orf19.3237	1,26	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_01130W_A	orf19.3241	orf19.3241	0,75	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	CR_01090W_A	orf19.3245	orf19.3245	2,14	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	CR_01080W_A	orf19.3247	orf19.3247	0,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_01050C_A	orf19.3250	orf19.3250	0,83	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_01020C_A	orf19.3254	orf19.3254	0,83	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_00980C_A	orf19.3260	orf19.3260	0,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_00880W_A	orf19.3266	orf19.3266	1,46	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	CR_00690C_A	orf19.3286	orf19.3286	1,05	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_01000C_A	orf19.3289	orf19.3289	1,15	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C1_01010W_A	orf19.3290	orf19.3290	-1,05	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C1_01040W_A	orf19.3292	orf19.3292	1,55	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_01050C_A	orf19.3293	orf19.3293	0,70	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_01090C_A	orf19.3297	orf19.3297	-1,44	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_01210W_A	orf19.3309	orf19.3309	1,36	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_01220C_A	orf19.3310	orf19.3310	2,48	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_01300W_A	orf19.3319	orf19.3319	1,08	PRE1 <sup>OFF</sup>
Q	C3_03340C_A	orf19.332.1	orf19.332.1	-1,23	PRE1 <sup>ON</sup>
Q	C1_01400C_A	orf19.3329	orf19.3329	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
Q	C1_01470W_A	orf19.3333	orf19.3333	0,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_01530C_A	orf19.3341	orf19.3341	-0,91	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_01540W_A	orf19.3342	orf19.3342	1,03	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_01580W_A	orf19.3348	orf19.3348	-1,43	PRE1 <sup>ON</sup>

G	C1_01610C_A	orf19.3351	orf19.3351	2,33	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C1_01620C_A	orf19.3352	orf19.3352	0,97	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C1_01680C_A	orf19.3357	orf19.3357	-1,13	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_01710W_A	orf19.3360	orf19.3360	1,25	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C4_03410W_A	orf19.3367	orf19.3367	-1,82	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C4_03500C_A	orf19.3378	orf19.3378	3,50	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C6_01850W_A	orf19.3399	orf19.3399	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C3_03430C_A	orf19.340	orf19.340	0,96	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C6_01560W_A	orf19.3430	orf19.3430	-0,89	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C6_01450C_A	orf19.3439	orf19.3439	1,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C6_01420C_A	orf19.3442	orf19.3442	-1,85	PRE1 <sup>ON</sup>
R	C6_01370W_A	orf19.3447	orf19.3447	0,81	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C6_02160W_A	orf19.3456	orf19.3456	0,74	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C6_02250W_A	orf19.3466	orf19.3466	-1,65	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C6_02300C_A	orf19.3471	orf19.3471	0,86	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C6_02370C_A	orf19.3480	orf19.3480	-1,34	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C6_02380W_A	orf19.3481	orf19.3481	-1,12	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C6_02410W_A	orf19.3482	orf19.3482	0,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C6_02420W_A	orf19.3483	orf19.3483	0,77	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C6_02110W_A	orf19.3498	orf19.3498	1,06	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C6_02100W_A	orf19.3499	orf19.3499	1,89	PRE1 <sup>OFF</sup>
M	C6_02090C_A	orf19.3501	orf19.3501	1,37	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C6_02030C_A	orf19.3508	orf19.3508	0,65	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	CR_05440W_A	orf19.3515	orf19.3515	-1,01	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_05020W_A	orf19.3533	orf19.3533	-1,25	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C2_05160C_A	orf19.3547	orf19.3547	-1,02	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C2_05170W_A	orf19.3548	orf19.3548	0,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C2_05300C_A	orf19.3559	orf19.3559	-1,51	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C2_05400W_A	orf19.3572	orf19.3572	0,76	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C2_05410W_A	orf19.3572.3	orf19.3572.3	-1,15	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C2_08840W_A	orf19.3585	orf19.3585	-0,60	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_06620W_A	orf19.36	orf19.36	0,90	PRE1 <sup>OFF</sup>
Y	C2_08690C_A	orf19.3607	orf19.3607	1,11	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C2_08650W_A	orf19.3611	orf19.3611	-1,29	PRE1 <sup>ON</sup>
E	C2_08540C_A	orf19.3625	orf19.3625	1,52	PRE1 <sup>OFF</sup>
C	C2_08530C_A	orf19.3626	orf19.3626	-0,69	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C2_08510W_A	orf19.3627	orf19.3627	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C6_00800C_A	orf19.3644	orf19.3644	1,13	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C6_00760W_A	orf19.3649	orf19.3649	0,79	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C6_00700C_A	orf19.3659	orf19.3659	0,81	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_02040C_A	orf19.3661	orf19.3661	0,59	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_02100W_A	orf19.3667	orf19.3667	1,38	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C1_02160W_A	orf19.3673	orf19.3673	0,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C1_02270C_A	orf19.3684	orf19.3684	0,65	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C1_02290C_A	orf19.3686	orf19.3686	-1,34	PRE1 <sup>ON</sup>

A	C1_02330C_A	orf19.3690.2	orf19.3690.2	-1,82	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C7_02630W_A	orf19.3701	orf19.3701	0,63	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	CR_07760W_A	orf19.3704.1	orf19.3704.1	-1,77	PRE1 <sup>ON</sup>
A	CR_07850W_A	orf19.3714	orf19.3714	1,46	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C1_12610W_A	orf19.3755	orf19.3755	-1,39	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C4_05010W_A	orf19.3778	orf19.3778	-0,85	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_04980W_A	orf19.3782	orf19.3782	0,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C4_04820C_A	orf19.3797	orf19.3797	-1,19	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_04720W_A	orf19.3810	orf19.3810	-0,72	PRE1 <sup>ON</sup>
F	CR_06070W_A	orf19.3859	orf19.3859	1,21	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_06230W_A	orf19.3874	orf19.3874	0,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	CR_06290C_A	orf19.3881	orf19.3881	1,04	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	CR_06320C_A	orf19.3886	orf19.3886	1,63	PRE1 <sup>OFF</sup>
M	CR_06330C_A	orf19.3887	orf19.3887	-0,95	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C1_08440C_A	orf19.389	orf19.389	1,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C5_04260W_A	orf19.3910	orf19.3910	1,04	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_04290C_A	orf19.3914	orf19.3914	-0,60	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C5_04300C_A	orf19.3915	orf19.3915	0,79	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C5_04320C_A	orf19.3919	orf19.3919	0,88	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_08470W_A	orf19.392	orf19.392	-1,25	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C5_04350C_A	orf19.3921	orf19.3921	0,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C5_04420W_A	orf19.3929	orf19.3929	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_04470C_A	orf19.3932	orf19.3932	1,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_04480C_A	orf19.3932.1	orf19.3932.1	4,35	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C5_04530W_A	orf19.3938	orf19.3938	-1,57	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C5_04640C_A	orf19.3949	orf19.3949	1,24	PRE1 <sup>OFF</sup>
R	C5_04710W_A	orf19.3956	orf19.3956	-0,81	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C5_04720C_A	orf19.3957	orf19.3957	-1,33	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C1_08520C_A	orf19.397	orf19.397	-1,49	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C5_04920C_A	orf19.3980	orf19.3980	0,85	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C5_04940W_A	orf19.3982	orf19.3982	2,23	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C1_08540C_A	orf19.399	orf19.399	1,00	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_05140W_A	orf19.4006	orf19.4006	-0,72	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C5_05250C_A	orf19.4018	orf19.4018	-1,21	PRE1 <sup>ON</sup>
Q	C5_05360C_A	orf19.4031	orf19.4031	0,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_05440C_A	orf19.4043	orf19.4043	0,97	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C5_05460C_A	orf19.4046	orf19.4046	0,91	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_09070C_A	orf19.4066	orf19.4066	-1,34	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C1_08610C_A	orf19.409	orf19.409	-0,93	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C2_09310C_A	orf19.4092	orf19.4092	-0,78	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C2_09360W_A	orf19.4097	orf19.4097	-1,08	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_05540C_A	orf19.411	orf19.411	2,00	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_06030W_A	orf19.4117	orf19.4117	0,79	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C2_05980C_A	orf19.4122	orf19.4122	-1,05	PRE1 <sup>ON</sup>
N	C5_01530C_A	orf19.4148	orf19.4148	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>

A	C5_01540W_A	orf19.4149.1	orf19.4149.1	-1,28	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C5_01560C_A	orf19.4150	orf19.4150	-0,99	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C5_01590W_A	orf19.4153	orf19.4153	0,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C4_00800W_A	orf19.4161	orf19.4161	0,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_00610W_A	orf19.4182	orf19.4182	1,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C1_05440C_A	orf19.419	orf19.419	2,24	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C4_00500W_A	orf19.4191.1	orf19.4191.1	0,77	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C6_00550W_A	orf19.4204	orf19.4204	-1,32	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C6_00500C_A	orf19.4209	orf19.4209	1,20	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C6_00490W_A	orf19.4210	orf19.4210	-0,73	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C5_02110W_A	orf19.4216	orf19.4216	0,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C5_02220C_A	orf19.4229	orf19.4229	1,86	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C5_02370C_A	orf19.4245	orf19.4245	0,96	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C5_02390C_A	orf19.4247	orf19.4247	1,36	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C1_05400C_A	orf19.425	orf19.425	-1,96	PRE1 <sup>ON</sup>
Q	C1_05380C_A	orf19.427	orf19.427	0,93	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C5_02590C_A	orf19.4273	orf19.4273	-1,55	PRE1 <sup>ON</sup>
E	C5_02620C_A	orf19.4278	orf19.4278	1,05	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_05370C_A	orf19.428	orf19.428	0,99	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C5_02690W_A	orf19.4287	orf19.4287	1,07	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C5_02780W_A	orf19.4301	orf19.4301	1,10	PRE1 <sup>OFF</sup>
H	C5_02830W_A	orf19.4307	orf19.4307	0,99	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_02920W_A	orf19.4316	orf19.4316	1,55	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_05330C_A	orf19.432	orf19.432	7,34	Ausente en PRE1 <sup>ON</sup>
D	C5_02990W_A	orf19.4324	orf19.4324	-0,72	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C5_03170C_A	orf19.4349	orf19.4349	1,21	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	CR_03640C_A	orf19.4362	orf19.4362	0,75	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_03690W_A	orf19.4368	orf19.4368	1,76	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	CR_03700C_A	orf19.4369	orf19.4369	0,93	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_03710C_A	orf19.4370	orf19.4370	-0,70	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_05270C_A	orf19.439	orf19.439	-1,46	PRE1 <sup>ON</sup>
I	CR_03470W_A	orf19.4390	orf19.4390	-0,60	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_05980C_A	orf19.4409	orf19.4409	0,92	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C1_07400C_A	orf19.4428	orf19.4428	0,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C1_07390W_A	orf19.4430	orf19.4430	1,86	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_07360W_A	orf19.4435	orf19.4435	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C1_05220C_A	orf19.444	orf19.444	0,70	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C1_07260C_A	orf19.4441	orf19.4441	0,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C1_07220W_A	orf19.4445	orf19.4445	2,49	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C1_05210C_A	orf19.445	orf19.445	-1,48	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C1_07130C_A	orf19.4455	orf19.4455	-1,29	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_03870C_A	orf19.4459	orf19.4459	2,25	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_05200C_A	orf19.446	orf19.446	2,91	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C1_03940W_A	orf19.4468	orf19.4468	-0,59	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_03950C_A	orf19.4470	orf19.4470	0,75	PRE1 <sup>OFF</sup>

S	C1_03990W_A	orf19.4474	orf19.4474	2,24	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_04010C_A	orf19.4476	orf19.4476	2,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C2_04400W_A	orf19.4513	orf19.4513	1,94	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_02020W_A	orf19.4523	orf19.4523	-0,79	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C1_01930W_A	orf19.4530.1	orf19.4530.1	1,06	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C1_01900C_A	orf19.4533	orf19.4533	1,17	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_01890C_A	orf19.4534	orf19.4534	0,98	PRE1 <sup>OFF</sup>
Y	C1_01850C_A	orf19.4538	orf19.4538	1,34	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C6_04120C_A	orf19.4557	orf19.4557	1,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C4_02260C_A	orf19.4563	orf19.4563	-0,64	PRE1 <sup>ON</sup>
M	CR_05980W_A	orf19.457	orf19.457	1,42	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C4_02200C_A	orf19.4570	orf19.4570	0,65	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	CR_05970C_A	orf19.458	orf19.458	-0,81	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C4_01970W_A	orf19.4595	orf19.4595	-1,69	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C4_01930C_A	orf19.4600	orf19.4600	-1,16	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_01790W_A	orf19.4614	orf19.4614	1,48	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C4_01780C_A	orf19.4615	orf19.4615	0,64	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C4_01670C_A	orf19.4626	orf19.4626	1,41	PRE1 <sup>OFF</sup>
H	C4_01560C_A	orf19.4629	orf19.4629	0,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_01510W_A	orf19.4633	orf19.4633	0,99	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C4_01420W_A	orf19.4643	orf19.4643	1,00	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C4_01310W_A	orf19.4656	orf19.4656	0,76	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C4_01290W_A	orf19.4658	orf19.4658	1,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C4_00950C_A	orf19.4699	orf19.4699	1,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	CR_03910C_A	orf19.470	orf19.470	0,59	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C4_00880W_A	orf19.4705	orf19.4705	-0,65	PRE1 <sup>ON</sup>
E	C4_00840W_A	orf19.4711	orf19.4711	0,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_06130W_A	orf19.4715	orf19.4715	0,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
R	C1_08630W_A	orf19.4721	orf19.4721	-1,28	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_08700W_A	orf19.4728	orf19.4728	0,65	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C1_08780W_A	orf19.4736	orf19.4736	1,33	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_08900W_A	orf19.4749	orf19.4749	-2,41	PRE1 <sup>ON</sup>
A	CR_03940W_A	orf19.475	orf19.475	-1,02	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C1_08920W_A	orf19.4751	orf19.4751	-1,48	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C1_09020W_A	orf19.4758	orf19.4758	-1,31	PRE1 <sup>ON</sup>
R	C1_09040C_A	orf19.4760	orf19.4760	-0,80	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_09210C_A	orf19.4779	orf19.4779	-1,73	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_09310C_A	orf19.4791	orf19.4791	7,34	Ausente en PRE1 <sup>ON</sup>
T	C1_09320C_A	orf19.4792	orf19.4792	1,26	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C1_09340C_A	orf19.4795	orf19.4795	0,63	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C1_09520C_A	orf19.4816	orf19.4816	1,96	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_09620C_A	orf19.4825	orf19.4825	-0,87	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_09790C_A	orf19.4844	orf19.4844	-0,75	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C1_09810W_A	orf19.4846	orf19.4846	-0,96	PRE1 <sup>ON</sup>
M	C1_09840C_A	orf19.4849	orf19.4849	3,28	PRE1 <sup>OFF</sup>

T	C1_09850C_A	orf19.4850	orf19.4850	0,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_10120C_A	orf19.4882	orf19.4882	0,74	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C1_10140C_A	orf19.4883	orf19.4883	1,84	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C1_10170W_A	orf19.4886	orf19.4886	5,34	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_10190W_A	orf19.4888	orf19.4888	1,00	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C1_10230C_A	orf19.4893	orf19.4893	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_10240C_A	orf19.4894	orf19.4894	1,73	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_10310W_A	orf19.4901	orf19.4901	2,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_10420C_A	orf19.4912	orf19.4912	0,90	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C1_12840W_A	orf19.4914	orf19.4914	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_12890W_A	orf19.4919	orf19.4919	1,50	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C1_13010W_A	orf19.4929	orf19.4929	-0,63	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_13060C_A	orf19.4932	orf19.4932	-0,94	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_04110W_A	orf19.494	orf19.494	-1,22	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C1_13190W_A	orf19.4947	orf19.4947	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C1_13240W_A	orf19.4951	orf19.4951	1,03	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_13250W_A	orf19.4952	orf19.4952	3,97	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_13270W_A	orf19.4953	orf19.4953	1,12	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_13320C_A	orf19.4959	orf19.4959	-1,05	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_13330C_A	orf19.4960	orf19.4960	-0,84	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C1_13430C_A	orf19.4970	orf19.4970	2,38	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	CR_04140W_A	orf19.498	orf19.498	-1,08	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C1_04960C_A	orf19.50	orf19.50	1,06	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_04160C_A	orf19.500	orf19.500	-0,71	PRE1 <sup>ON</sup>
D	C1_13650C_A	orf19.5003	orf19.5003	0,63	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_13720W_A	orf19.5009	orf19.5009	-0,71	PRE1 <sup>ON</sup>
G	CR_04170W_A	orf19.501	orf19.501	-0,73	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C1_13770C_A	orf19.5014	orf19.5014	-0,71	PRE1 <sup>ON</sup>
H	C1_13820C_A	orf19.5020	orf19.5020	-0,93	PRE1 <sup>ON</sup>
N	C1_13880C_A	orf19.5026	orf19.5026	0,62	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_03830W_A	orf19.5038	orf19.5038	-0,82	PRE1 <sup>ON</sup>
A	CR_04180C_A	orf19.504	orf19.504	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_03880W_A	orf19.5043	orf19.5043	1,35	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_07790C_A	orf19.5049	orf19.5049	-1,07	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_07840W_A	orf19.5054	orf19.5054	1,08	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C1_07850C_A	orf19.5056	orf19.5056	1,22	PRE1 <sup>OFF</sup>
Q	C1_08080C_A	orf19.5079.1	orf19.5079.1	-0,93	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C1_08110W_A	orf19.5085	orf19.5085	-0,60	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_08180C_A	orf19.5095	orf19.5095	0,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_08240C_A	orf19.5103	orf19.5103	-1,41	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_08340C_A	orf19.5114	orf19.5114	0,62	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C7_03280C_A	orf19.5125	orf19.5125	2,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C7_03210W_A	orf19.5134	orf19.5134	-1,46	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C7_03160W_A	orf19.5139	orf19.5139	0,81	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C7_03150W_A	orf19.5140	orf19.5140	4,48	PRE1 <sup>OFF</sup>

S	C7_03030W_A	orf19.5158	orf19.5158	1,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C7_03000C_A	orf19.5161	orf19.5161	-1,46	PRE1 <sup>ON</sup>
D	C7_02960C_A	orf19.5165	orf19.5165	1,15	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_02920W_A	orf19.5169	orf19.5169	0,59	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_04430C_A	orf19.5194.1	orf19.5194.1	1,06	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C1_04370C_A	orf19.5201	orf19.5201	-1,10	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_05810W_A	orf19.5204	orf19.5204	1,25	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C2_05910W_A	orf19.5213	orf19.5213	0,70	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_12430W_A	orf19.5221	orf19.5221	0,75	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C1_12280C_A	orf19.5235	orf19.5235	-1,29	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_12250C_A	orf19.5238	orf19.5238	0,75	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_12240C_A	orf19.5239	orf19.5239	0,94	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_04350C_A	orf19.524	orf19.524	0,62	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_12140W_A	orf19.5250	orf19.5250	1,27	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C1_12090C_A	orf19.5256	orf19.5256	4,15	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_11950W_A	orf19.5270	orf19.5270	3,02	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_11920W_A	orf19.5275	orf19.5275	0,76	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_11890W_A	orf19.5278	orf19.5278	1,41	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C1_11880W_A	orf19.5279	orf19.5279	-1,37	PRE1 <sup>ON</sup>
K	CR_05360C_A	orf19.5287	orf19.5287	0,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C4_04180C_A	orf19.5291	orf19.5291	1,15	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C4_04160W_A	orf19.5293	orf19.5293	-0,62	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C4_04140W_A	orf19.5295	orf19.5295	0,94	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C4_04090C_A	orf19.5300	orf19.5300	1,24	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C4_04010W_A	orf19.5311	orf19.5311	0,79	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C2_10470C_A	orf19.5322	orf19.5322	0,63	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C2_10630W_A	orf19.5342	orf19.5342	0,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_10650W_A	orf19.5342.2	orf19.5342.2	-1,23	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_10670W_A	orf19.5345	orf19.5345	1,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C2_10700C_A	orf19.5350	orf19.5350	0,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_10820C_A	orf19.5365	orf19.5365	-1,09	PRE1 <sup>ON</sup>
E	C2_10850C_A	orf19.5368	orf19.5368	0,61	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	CR_04460C_A	orf19.537	orf19.537	0,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C3_00620C_A	orf19.5394.1	orf19.5394.1	-1,30	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C3_00610W_A	orf19.5397	orf19.5397	0,86	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_04500C_A	orf19.541	orf19.541	-0,67	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C3_00450C_A	orf19.5420	orf19.5420	-1,17	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C3_00360W_A	orf19.5431	orf19.5431	1,86	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_00340W_A	orf19.5433	orf19.5433	-1,27	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C2_06200C_A	orf19.5483	orf19.5483	-0,69	PRE1 <sup>ON</sup>
C	C2_06230W_A	orf19.5486	orf19.5486	0,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_06260W_A	orf19.5488	orf19.5488	-1,64	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C7_03760W_A	orf19.5502	orf19.5502	2,52	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_03730C_A	orf19.5504	orf19.5504	0,91	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C6_02460C_A	orf19.5515	orf19.5515	-1,23	PRE1 <sup>ON</sup>

T	C6_02480W_A	orf19.5517	orf19.5517	1,10	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C6_02490C_A	orf19.5518	orf19.5518	1,70	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C6_02530C_A	orf19.5522	orf19.5522	0,77	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C6_02640C_A	orf19.5534	orf19.5534	0,96	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C6_02690C_A	orf19.5541	orf19.5541	-1,19	PRE1 <sup>ON</sup>
E	C6_02790C_A	orf19.5552	orf19.5552	1,27	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C6_02880W_A	orf19.5564	orf19.5564	-0,90	PRE1 <sup>ON</sup>
D	C6_02930W_A	orf19.5569	orf19.5569	1,09	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C6_02940C_A	orf19.5572	orf19.5572	-1,75	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C6_02980C_A	orf19.5576	orf19.5576	-0,60	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C6_03050C_A	orf19.5587	orf19.5587	1,46	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C6_03180C_A	orf19.5605	orf19.5605	0,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
R	C6_03200W_A	orf19.5607	orf19.5607	-1,61	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C6_03240W_A	orf19.5611	orf19.5611	2,47	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C6_03260W_A	orf19.5614	orf19.5614	1,34	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C6_03300C_A	orf19.5618	orf19.5618	0,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C6_03310W_A	orf19.5619	orf19.5619	1,07	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C6_03320W_A	orf19.5620	orf19.5620	-1,14	PRE1 <sup>ON</sup>
E	C6_03330C_A	orf19.5621	orf19.5621	0,79	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C6_03380W_A	orf19.5627	orf19.5627	-0,59	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C6_03390W_A	orf19.5628	orf19.5628	-1,24	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_00100C_A	orf19.5633	orf19.5633	0,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
M	C4_00170W_A	orf19.5642	orf19.5642	1,32	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C4_00230W_A	orf19.5648	orf19.5648	-1,00	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_00260W_A	orf19.5651	orf19.5651	1,90	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C4_00320C_A	orf19.5660	orf19.5660	1,49	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_00410W_A	orf19.5669	orf19.5669	1,28	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_00100C_A	orf19.5686	orf19.5686	1,07	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C5_00090C_A	orf19.5688	orf19.5688	-1,26	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C5_00030W_A	orf19.5698	orf19.5698	-1,01	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C6_03440W_A	orf19.5704	orf19.5704	-1,84	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C6_03550C_A	orf19.5722	orf19.5722	-0,77	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C6_03590C_A	orf19.5727	orf19.5727	0,81	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C6_03730C_A	orf19.5747	orf19.5747	-1,41	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C6_03780C_A	orf19.5752	orf19.5752	2,29	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C6_03800C_A	orf19.5754	orf19.5754	1,91	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C6_03880W_A	orf19.5763	orf19.5763	0,65	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C5_00750C_A	orf19.577	orf19.577	1,00	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C6_03950C_A	orf19.5772	orf19.5772	1,33	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C6_03960W_A	orf19.5773	orf19.5773	0,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C2_02920W_A	orf19.5813	orf19.5813	3,34	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C2_02840C_A	orf19.5821	orf19.5821	1,16	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C2_02820C_A	orf19.5824	orf19.5824	-2,04	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C5_00800C_A	orf19.583	orf19.583	1,83	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C2_02730W_A	orf19.5833	orf19.5833	1,89	PRE1 <sup>OFF</sup>

R	C5_00820W_A	orf19.585	orf19.585	-1,40	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C3_04330C_A	orf19.5876	orf19.5876	1,12	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_04380C_A	orf19.5885	orf19.5885	-0,90	PRE1 <sup>ON</sup>
P	CR_08050C_A	orf19.590	orf19.590	0,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C3_04540C_A	orf19.5910	orf19.5910	0,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_08040W_A	orf19.592	orf19.592	-0,65	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C3_04650W_A	orf19.5925	orf19.5925	1,41	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C3_04720C_A	orf19.5932	orf19.5932	1,51	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C3_04750W_A	orf19.5935	orf19.5935	0,62	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C3_04790W_A	orf19.5942	orf19.5942	1,08	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C3_04800C_A	orf19.5943	orf19.5943	1,76	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_04810C_A	orf19.5943.1	orf19.5943.1	-0,72	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_04970C_A	orf19.5965	orf19.5965	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C3_05140C_A	orf19.5987	orf19.5987	-0,81	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_05160C_A	orf19.5991	orf19.5991	-0,61	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C3_05290C_A	orf19.6008	orf19.6008	1,55	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_00890W_A	orf19.6016	orf19.6016	0,88	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_00860W_A	orf19.6020	orf19.6020	1,15	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_00820W_A	orf19.6024	orf19.6024	0,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C1_00810W_A	orf19.6025	orf19.6025	-1,03	PRE1 <sup>ON</sup>
N	C1_00760W_A	orf19.6030	orf19.6030	3,34	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_00700W_A	orf19.6035	orf19.6035	-1,05	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C1_00630W_A	orf19.6043	orf19.6043	0,90	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_00570C_A	orf19.6049	orf19.6049	1,07	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C1_00530C_A	orf19.6055	orf19.6055	0,90	PRE1 <sup>OFF</sup>
Y	C1_00510W_A	orf19.6057	orf19.6057	-0,85	PRE1 <sup>ON</sup>
D	CR_07920W_A	orf19.606	orf19.606	0,90	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_00410C_A	orf19.6066	orf19.6066	2,00	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_07910C_A	orf19.607	orf19.607	0,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C1_00320W_A	orf19.6076	orf19.6076	1,04	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C1_00200C_A	orf19.6083	orf19.6083	-0,97	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_00160C_A	orf19.6090	orf19.6090	-0,85	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C1_00100C_A	orf19.6100	orf19.6100	-0,90	PRE1 <sup>ON</sup>
P	CR_07470W_A	orf19.6118	orf19.6118	-1,34	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_07320C_A	orf19.6136	orf19.6136	-1,24	PRE1 <sup>ON</sup>
I	CR_07310W_A	orf19.6137	orf19.6137	-0,87	PRE1 <sup>ON</sup>
D	CR_07250C_A	orf19.6143	orf19.6143	3,50	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	CR_07220C_A	orf19.6148	orf19.6148	1,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	CR_07200W_A	orf19.6152	orf19.6152	-0,74	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C3_00830C_A	orf19.6155	orf19.6155	0,81	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_00850C_A	orf19.6160	orf19.6160	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_07100C_A	orf19.6194	orf19.6194	-0,68	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C1_07050C_A	orf19.6199	orf19.6199	0,73	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_06910C_A	orf19.6220	orf19.6220	1,12	PRE1 <sup>OFF</sup>
Y	C1_06760C_A	orf19.6234	orf19.6234	-0,90	PRE1 <sup>ON</sup>

E	C1_06700W_A	orf19.6240	orf19.6240	0,59	PRE1 <sup>OFF</sup>
Y	C1_06640C_A	orf19.6247.1	orf19.6247.1	-1,98	PRE1 <sup>ON</sup>
R	C1_06500W_A	orf19.6264	orf19.6264	0,59	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_06440C_A	orf19.6266	orf19.6266	-0,69	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C1_06390W_A	orf19.6272	orf19.6272	1,32	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C1_06360W_A	orf19.6275	orf19.6275	0,89	PRE1 <sup>OFF</sup>
M	C1_06350W_A	orf19.6276	orf19.6276	1,79	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	CR_07680C_A	orf19.6282	orf19.6282	1,06	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	CR_07670W_A	orf19.6283	orf19.6283	-0,94	PRE1 <sup>ON</sup>
D	CR_04880W_A	orf19.6305	orf19.6305	0,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_04870C_A	orf19.6306	orf19.6306	1,50	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C6_00120W_A	orf19.6325.1	orf19.6325.1	1,20	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C6_00110C_A	orf19.6326	orf19.6326	0,84	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_12810W_A	orf19.6341	orf19.6341	2,24	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C1_12760W_A	orf19.6346	orf19.6346	-0,68	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_12710C_A	orf19.6351	orf19.6351	0,63	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C1_12700W_A	orf19.6353	orf19.6353	7,34	Ausente en PRE1 <sup>ON</sup>
V	C1_12690C_A	orf19.6354	orf19.6354	1,43	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_12680W_A	orf19.6355	orf19.6355	-1,01	PRE1 <sup>ON</sup>
D	CR_08200C_A	orf19.6382	orf19.6382	0,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	CR_05150W_A	orf19.639.1	orf19.639.1	-1,45	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_08330W_A	orf19.6400	orf19.6400	1,08	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	CR_08350W_A	orf19.6403	orf19.6403	1,26	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	CR_08420W_A	orf19.6408	orf19.6408	1,63	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	CR_05130C_A	orf19.641	orf19.641	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_08440W_A	orf19.6413	orf19.6413	-0,78	PRE1 <sup>ON</sup>
T	CR_08450C_A	orf19.6414	orf19.6414	1,88	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	CR_08480C_A	orf19.6415.1	orf19.6415.1	-1,91	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_08520C_A	orf19.6419.1	orf19.6419.1	-0,69	PRE1 <sup>ON</sup>
Q	CR_08550W_A	orf19.6423	orf19.6423	0,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	CR_08610W_A	orf19.6435	orf19.6435	-1,41	PRE1 <sup>ON</sup>
A	CR_08650C_A	orf19.6440	orf19.6440	0,81	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_08670C_A	orf19.6443	orf19.6443	1,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
Y	C7_02540W_A	orf19.6456	orf19.6456	0,70	PRE1 <sup>OFF</sup>
R	C7_02460C_A	orf19.6463	orf19.6463	0,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C7_02450W_A	orf19.6464	orf19.6464	0,96	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C7_02170C_A	orf19.6498	orf19.6498	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_02120C_A	orf19.6503	orf19.6503	-0,80	PRE1 <sup>ON</sup>
D	C7_02080W_A	orf19.6509	orf19.6509	-1,18	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C7_02010C_A	orf19.6518	orf19.6518	3,97	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C7_01830W_A	orf19.6537	orf19.6537	1,11	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_01700W_A	orf19.6554	orf19.6554	1,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C7_01680C_A	orf19.6556	orf19.6556	1,88	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C7_01660C_A	orf19.6558	orf19.6558	-1,11	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C7_01610W_A	orf19.6563.1	orf19.6563.1	-0,72	PRE1 <sup>ON</sup>

L	C7_01600W_A	orf19.6565	orf19.6565	-1,47	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C7_01510W_A	orf19.6578	orf19.6578	-1,53	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C7_01460C_A	orf19.6583	orf19.6583	0,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C7_01440W_A	orf19.6585	orf19.6585	-0,70	PRE1 <sup>ON</sup>
T	CR_09700W_A	orf19.6592	orf19.6592	2,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	CR_09560C_A	orf19.6606	orf19.6606	1,10	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_09530C_A	orf19.6608	orf19.6608	2,26	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_09510C_A	orf19.6612	orf19.6612	-0,98	PRE1 <sup>ON</sup>
N	CR_05880W_A	orf19.6626	orf19.6626	0,85	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_05860W_A	orf19.6627	orf19.6627	0,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
R	CR_05750W_A	orf19.6637	orf19.6637	2,14	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C5_03490C_A	orf19.6658	orf19.6658	1,09	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C5_03550W_A	orf19.6665	orf19.6665	-0,88	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C7_03620C_A	orf19.6694	orf19.6694	0,83	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C7_03660C_A	orf19.6701	orf19.6701	-0,90	PRE1 <sup>ON</sup>
R	C7_03500W_A	orf19.6707	orf19.6707	-1,44	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C3_07760C_A	orf19.6709	orf19.6709	0,94	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_07700W_A	orf19.6717	orf19.6717	-1,60	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_07680W_A	orf19.6719	orf19.6719	0,86	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C3_07550C_A	orf19.6736	orf19.6736	-1,81	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C3_07540C_A	orf19.6737	orf19.6737	0,98	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C3_07450C_A	orf19.6744	orf19.6744	0,94	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C3_07430W_A	orf19.6747	orf19.6747	1,44	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C3_07390C_A	orf19.6752	orf19.6752	-1,80	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_07380W_A	orf19.6753	orf19.6753	2,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_07350W_A	orf19.6756	orf19.6756	0,82	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_07330W_A	orf19.6758	orf19.6758	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C3_07120W_A	orf19.6788	orf19.6788	1,56	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C3_07110W_A	orf19.6789	orf19.6789	0,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_07030C_A	orf19.6797	orf19.6797	0,88	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_06920W_A	orf19.6809	orf19.6809	-0,63	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_06860C_A	orf19.6816	orf19.6816	2,07	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C3_06830C_A	orf19.6818	orf19.6818	-1,03	PRE1 <sup>ON</sup>
D	C3_06810W_A	orf19.6821	orf19.6821	1,24	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_06760W_A	orf19.6828	orf19.6828	-1,03	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_06740W_A	orf19.6829	orf19.6829	-1,22	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_06730W_A	orf19.6830	orf19.6830	2,20	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_04560W_A	orf19.6850	orf19.6850	1,09	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C1_04600C_A	orf19.6853	orf19.6853	-1,54	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_05560W_A	orf19.6868	orf19.6868	0,59	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C2_05570C_A	orf19.6869	orf19.6869	1,19	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C6_01960W_A	orf19.687	orf19.687	0,83	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_05750W_A	orf19.6886	orf19.6886	-0,79	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C2_05760C_A	orf19.6887	orf19.6887	-0,67	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C2_05770W_A	orf19.6888	orf19.6888	0,97	PRE1 <sup>OFF</sup>

Y	C7_01150W_A	orf19.6898	orf19.6898	1,16	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_01160C_A	orf19.6898.1	orf19.6898.1	-1,09	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C7_01350C_A	orf19.6916	orf19.6916	-0,60	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C3_03920W_A	orf19.6923.1	orf19.6923.1	-1,09	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C3_03860W_A	orf19.6929	orf19.6929	-0,91	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C3_05360C_A	orf19.6973	orf19.6973	0,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_05410W_A	orf19.6979	orf19.6979	1,07	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_05510W_A	orf19.6986	orf19.6986	1,29	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_05540C_A	orf19.6989	orf19.6989	-0,90	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_05550C_A	orf19.6990	orf19.6990	0,62	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C7_01070C_A	orf19.7006	orf19.7006	0,63	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_01040C_A	orf19.7010	orf19.7010	1,00	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C7_01030C_A	orf19.7011	orf19.7011	-0,99	PRE1 <sup>ON</sup>
D	C7_01020C_A	orf19.7012	orf19.7012	-1,50	PRE1 <sup>ON</sup>
M	C7_00880C_A	orf19.7027	orf19.7027	2,05	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C7_00870W_A	orf19.7029	orf19.7029	1,28	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C7_00790W_A	orf19.7038	orf19.7038	0,99	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_00780W_A	orf19.7041	orf19.7041	0,70	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_00680W_A	orf19.7051	orf19.7051	1,10	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C7_00580C_A	orf19.7061	orf19.7061	0,79	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C7_00450C_A	orf19.7074	orf19.7074	0,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C7_00420C_A	orf19.7078	orf19.7078	0,79	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C7_00350C_A	orf19.7085	orf19.7085	3,13	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C7_00270W_A	orf19.7095	orf19.7095	-1,34	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C7_00250C_A	orf19.7097	orf19.7097	0,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C1_03690W_A	orf19.71	orf19.71	0,91	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_00130W_A	orf19.7110	orf19.7110	0,61	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C7_00120W_A	orf19.7111	orf19.7111	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	CR_06530W_A	orf19.713	orf19.713	1,12	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C7_04310C_A	orf19.7131	orf19.7131	-1,10	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C7_04280C_A	orf19.7140	orf19.7140	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C7_04260W_A	orf19.7144	orf19.7144	0,92	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_04140C_A	orf19.7160	orf19.7160	-0,73	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C7_04120W_A	orf19.7163	orf19.7163	-1,15	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C7_04090C_A	orf19.7166	orf19.7166	-0,80	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C7_04000W_A	orf19.7181	orf19.7181	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	CR_06470W_A	orf19.719	orf19.719	1,88	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_03880C_A	orf19.7194	orf19.7194	-1,00	PRE1 <sup>ON</sup>
R	C7_03860W_A	orf19.7196	orf19.7196	1,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C7_03850W_A	orf19.7197	orf19.7197	-0,99	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C7_03780C_A	orf19.7204	orf19.7204	0,95	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_14030W_A	orf19.7210	orf19.7210	1,75	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C1_14170W_A	orf19.7224	orf19.7224	1,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
M	C1_14330W_A	orf19.7245	orf19.7245	-1,99	PRE1 <sup>ON</sup>
P	CR_06430W_A	orf19.725	orf19.725	0,78	PRE1 <sup>OFF</sup>

S	C1_14410W_A	orf19.7256	orf19.7256	-1,16	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C1_14430C_A	orf19.7260	orf19.7260	-1,13	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_08920W_A	orf19.7288	orf19.7288	1,12	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_08940W_A	orf19.7291	orf19.7291	-0,88	PRE1 <sup>ON</sup>
Q	CR_08990C_A	orf19.7296	orf19.7296	1,09	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	CR_09070C_A	orf19.7304	orf19.7304	1,25	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_09100C_A	orf19.7306	orf19.7306	0,74	PRE1 <sup>OFF</sup>
Y	CR_09140C_A	orf19.7310	orf19.7310	0,82	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	CR_09230C_A	orf19.7321	orf19.7321	0,76	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_09240C_A	orf19.7322	orf19.7322	0,89	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_09310W_A	orf19.7326	orf19.7326	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_09330C_A	orf19.7328	orf19.7328	-0,70	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C3_05680W_A	orf19.7347	orf19.7347	0,64	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_05990C_A	orf19.7380	orf19.7380	1,25	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C3_06050C_A	orf19.7386	orf19.7386	-1,06	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C3_06160C_A	orf19.7397.1	orf19.7397.1	-0,88	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C3_06280W_A	orf19.7404	orf19.7404	-0,73	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C3_06270C_A	orf19.7405	orf19.7405	0,93	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C3_06240C_A	orf19.7409.1	orf19.7409.1	-1,41	PRE1 <sup>ON</sup>
E	C3_06350W_A	orf19.7420	orf19.7420	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
C	C3_06490W_A	orf19.7437	orf19.7437	1,13	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C3_06610W_A	orf19.7450	orf19.7450	0,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C3_06680C_A	orf19.7457	orf19.7457	2,03	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C3_06700C_A	orf19.7459	orf19.7459	-1,43	PRE1 <sup>ON</sup>
L	CR_00570W_A	orf19.7478	orf19.7478	-1,31	PRE1 <sup>ON</sup>
F	CR_00490W_A	orf19.7485	orf19.7485	-1,21	PRE1 <sup>ON</sup>
V	CR_00290W_A	orf19.7504	orf19.7504	1,07	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_00270C_A	orf19.7507	orf19.7507	7,34	Ausente en PRE1 <sup>ON</sup>
K	CR_00110W_A	orf19.7527	orf19.7527	0,92	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_00090C_A	orf19.7531	orf19.7531	1,19	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_09750C_A	orf19.7547	orf19.7547	1,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	CR_09930W_A	orf19.7567	orf19.7567	1,42	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	CR_10020C_A	orf19.7578	orf19.7578	0,77	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	CR_10060W_A	orf19.7581	orf19.7581	0,63	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	CR_10140W_A	orf19.7590	orf19.7590	-1,26	PRE1 <sup>ON</sup>
T	CR_10170C_A	orf19.7593	orf19.7593	-1,02	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_10230W_A	orf19.7598	orf19.7598	2,15	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	CR_10420W_A	orf19.7619	orf19.7619	-1,75	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_10510W_A	orf19.7629	orf19.7629	0,90	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	CR_10810C_A	orf19.7672	orf19.7672	2,10	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_10830C_A	orf19.7675	orf19.7675	-1,63	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C1_04700C_A	orf19.775	orf19.775	1,10	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_04630C_A	orf19.783	orf19.783	0,79	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C2_04160W_A	orf19.805	orf19.805	-1,50	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_04130W_A	orf19.808	orf19.808	0,93	PRE1 <sup>OFF</sup>

V	C2_04100W_A	orf19.811	orf19.811	0,95	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C2_04080W_A	orf19.813	orf19.813	2,06	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C2_03950W_A	orf19.828	orf19.828	-1,39	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C2_03910C_A	orf19.834	orf19.834	1,49	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_03900C_A	orf19.835	orf19.835	0,97	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_03800C_A	orf19.841	orf19.841	0,61	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C2_03560C_A	orf19.863	orf19.863	-1,25	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C2_03500W_A	orf19.871	orf19.871	0,96	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_03420C_A	orf19.879	orf19.879	0,77	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C2_03210W_A	orf19.909.1	orf19.909.1	-0,86	PRE1 <sup>ON</sup>
Y	CR_06570C_A	orf19.915	orf19.915	0,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_00580W_A	orf19.931	orf19.931	1,79	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C5_00560W_A	orf19.933	orf19.933	0,94	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C5_00510W_A	orf19.938	orf19.938	-2,72	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C6_00930C_A	orf19.94	orf19.94	0,98	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C5_00400C_A	orf19.949	orf19.949	0,98	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_00280C_A	orf19.967	orf19.967	-0,68	PRE1 <sup>ON</sup>
R	C5_00260W_A	orf19.969	orf19.969	-0,68	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_10460W_A	orf19.988	orf19.988	1,15	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C1_10470W_A	orf19.989	orf19.989	-1,59	PRE1 <sup>ON</sup>
E	C1_10500W_A	orf19.993	orf19.993	2,11	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_10520W_A	orf19.996	orf19.996	1,28	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_10540C_A	orf19.998	orf19.998	1,23	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_05700W_A	OSM1	orf19.6882	0,63	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C6_01410C_A	OYE2	orf19.3443	1,76	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_01200W_A	OYE22	orf19.3234	2,06	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C6_01510W_A	OYE23	orf19.3433	0,94	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C4_06780C_A	OYE32	orf19.3131	1,27	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_14150C_A	PAM16	orf19.7222	-1,17	PRE1 <sup>ON</sup>
Y	C2_03380W_A	PAN1	orf19.886	0,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_02580W_A	PAN6	orf19.163	-0,96	PRE1 <sup>ON</sup>
K	CR_09580C_A	PBA1	orf19.6604	1,21	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C2_07220W_A	PBA2	orf19.2278	0,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_12370W_A	PBA3	orf19.5227	0,93	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	CR_00200W_A	PCK1	orf19.7514	1,44	PRE1 <sup>OFF</sup>
Y	C4_07110C_A	PDA1	orf19.3097	-1,50	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_04150C_A	PDB1	orf19.5294	-1,24	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_06570C_A	PDC11	orf19.2877	-1,36	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C1_09970C_A	PDC2	orf19.4863	1,02	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C7_03250C_A	PDI1	orf19.5130	0,62	PRE1 <sup>OFF</sup>
M	C2_07660W_A	PDS5	orf19.2216	0,89	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C1_13830C_A	PDX1	orf19.5021	-0,68	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C6_03020W_A	PEP3	orf19.5584	1,04	PRE1 <sup>OFF</sup>
Q	C4_00350W_A	PEP7	orf19.5662	0,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C2_09320C_A	PES1	orf19.4093	-1,23	PRE1 <sup>ON</sup>

G	C1_09960W_A	PET100	orf19.4862.2	-1,10	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C1_11070W_A	PET127	orf19.2309	-1,35	PRE1 <sup>ON</sup>
E	C2_01150W_A	PEX12	orf19.2009	1,05	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_08710W_A	PEX17	orf19.3605	0,74	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_08600C_A	PEX19	orf19.6434	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C5_05430W_A	PEX4	orf19.4041	1,39	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_00150C_A	PEX5	orf19.5640	1,57	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C2_05440W_A	PEX6	orf19.3573	1,01	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C6_00880W_A	PEX7	orf19.89	1,12	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C5_04810W_A	PFK1	orf19.3967	-1,11	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C7_01800C_A	PFK2	orf19.6540	-1,59	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C4_04080C_A	PGA31	orf19.5302	3,49	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C5_05390C_A	PGA4	orf19.4035	-1,07	PRE1 <sup>ON</sup>
Q	C1_05960W_A	PGA45	orf19.2451	-1,44	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C6_00750C_A	PGK1	orf19.3651	-0,72	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C2_08140C_A	PHM7	orf19.2170	-1,23	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C2_09490W_A	PHO13	orf19.1405	0,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C1_05940W_A	PHO87	orf19.2454	-1,84	PRE1 <sup>ON</sup>
Y	C4_04530C_A	PHR1	orf19.3829	4,42	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_04880W_A	PIN3	orf19.5956	1,29	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	CR_01500W_A	PIN4	orf19.2534	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C2_01380W_A	PLB4.5	orf19.1442	-2,88	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C7_03710C_A	PLC1	orf19.5506	1,21	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_00720W_A	PMA1	orf19.5383	-1,45	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C3_01250W_A	PMC1	orf19.1727	-1,11	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_09470C_A	PMS1	orf19.1605	0,75	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C7_03520W_A	PNC1	orf19.6684	1,14	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_05660W_A	PNG2	orf19.6877	1,22	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C3_03180C_A	PNP1	orf19.317	0,59	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C2_02380W_A	POB3	orf19.1560	1,11	PRE1 <sup>OFF</sup>
Y	CR_10690W_A	POP3	orf19.7657	-0,90	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C3_07010W_A	POS5	orf19.6800	0,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	CR_00150C_A	POT1	orf19.7520	2,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_01520W_A	PPE1	orf19.1459	1,05	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_04970C_A	PPR1	orf19.3986	0,73	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C2_03060W_A	PR26	orf19.5793	1,54	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C2_06880C_A	PRB1	orf19.2242	0,84	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C5_01450W_A	PRC2	orf19.4135	1,55	PRE1 <sup>OFF</sup>
Q	C1_05770C_A	PRC3	orf19.2474	1,03	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C1_05300C_A	PRD1	orf19.434	0,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C5_05310W_A	PRE1	orf19.4025	-3,95	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C7_01470C_A	PRE10	orf19.6582	0,76	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C7_04020C_A	PRE5	orf19.7178	0,96	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_04550W_A	PRE6	orf19.544.1	1,00	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C3_01040C_A	PRM9	orf19.2508	7,34	Ausente en PRE1 <sup>ON</sup>

S	C1_05860W_A	PRN2	orf19.2463	0,79	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_05880W_A	PRN4	orf19.2461	1,48	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_02510W_A	PRS1	orf19.1575	-0,66	PRE1 <sup>ON</sup>
R	C2_07890W_A	PRS5	orf19.2193	-0,61	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C1_13160W_A	PSA2	orf19.4943	2,11	PRE1 <sup>OFF</sup>
R	C5_04680W_A	PSD2	orf19.3954	0,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C7_00530C_A	PSF3	orf19.7065	1,61	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C2_06870C_A	PST1	orf19.2241	1,96	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	CR_05390W_A	PST3	orf19.5285	-0,72	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C5_05260W_A	PSY4	orf19.4019	0,74	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	CR_05740C_A	PTC4	orf19.6638	1,35	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C4_00960W_A	PTC8	orf19.4698	-1,00	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C5_02260C_A	PTH1	orf19.4232	-0,77	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_03890W_A	PTP2	orf19.5045	1,76	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_10340W_A	PTP3	orf19.7610	1,90	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_03800W_A	PTR22	orf19.6937	-1,80	PRE1 <sup>ON</sup>
P	CR_10300W_A	PUP1	orf19.7605	0,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	CR_06750C_A	PUP2	orf19.709	0,98	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_03390C_A	PUP3	orf19.1336	0,70	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C5_01180W_A	PUS4	orf19.1954	-0,91	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C5_02600W_A	PUT1	orf19.4274	-1,11	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C4_03940C_A	PYC2	orf19.789	-1,62	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C6_03400C_A	QCR7	orf19.5629	-0,77	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C4_00810C_A	QRI7	orf19.4160	-1,09	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_05820C_A	RAD10	orf19.2469	1,20	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C7_02020W_A	RAD14	orf19.6517	1,33	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_02810W_A	RAD16	orf19.2969	1,28	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C4_03550W_A	RAD2	orf19.1324	0,91	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C7_00050C_A	RAD3	orf19.7119	1,14	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C3_02000W_A	RAD50	orf19.1648	1,18	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C6_00510C_A	RAD52	orf19.4208	1,55	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_13660W_A	RAD54	orf19.5004	0,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_03870W_A	RAD6	orf19.7195	0,88	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C2_01840C_A	RAD7	orf19.1493	0,85	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C5_02610C_A	RAD9	orf19.4275	0,85	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C6_02840C_A	RBF1	orf19.5558	-0,87	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_12780W_A	RBK1	orf19.6344	0,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
R	C4_03520C_A	RBT1	orf19.1327	2,05	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C5_04000W_A	RCF3	orf19.3211	0,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C6_01160W_A	RCN1	orf19.123	1,43	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	CR_00140W_A	REP1	orf19.7521	0,86	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_00380C_A	RFA1	orf19.2093	0,86	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C2_05790C_A	RFC1	orf19.6891	0,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_02030W_A	RFX2	orf19.4590	1,71	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C4_02000C_A	RGA2	orf19.4593	0,84	PRE1 <sup>OFF</sup>

S	CR_06590C_A	RGS2	orf19.695	1,46	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C1_05000W_A	RHD1	orf19.54	-1,08	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C4_04050C_A	RHD3	orf19.5305	2,00	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	CR_02860W_A	RHO1	orf19.2843	-0,73	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_07750W_A	RHO2	orf19.2204.2	0,86	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_02990C_A	RIB1	orf19.2862	1,19	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C5_05300W_A	RIB5	orf19.4024	0,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C1_14340C_A	RIM101	orf19.7247	2,92	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_00740W_A	RIM15	orf19.7044	0,65	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C2_04510W_A	RIM2	orf19.4499	-0,92	PRE1 <sup>ON</sup>
N	C1_09380W_A	RIM20	orf19.4800	1,04	PRE1 <sup>OFF</sup>
H	CR_08100C_A	RIO2	orf19.6369	-0,76	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_03350C_A	RLI1	orf19.3034	-0,65	PRE1 <sup>ON</sup>
D	C1_13360C_A	RMP1	orf19.4962	0,92	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_00680W_A	RMT2	orf19.920	-0,87	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_03010C_A	RNR21	orf19.5801	0,61	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_07570W_A	RNR22	orf19.1868	-0,91	PRE1 <sup>ON</sup>
T	CR_05570C_A	RNR3	orf19.5845	1,74	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_13620W_A	ROB1	orf19.4998	1,46	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C5_00220W_A	ROT2	orf19.974	0,61	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C7_00570W_A	RPA135	orf19.7062	-1,02	PRE1 <sup>ON</sup>
D	C1_10670C_A	RPA190	orf19.1839	-0,85	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_14390W_A	RPC10	orf19.7255	-0,73	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_05340C_A	RPC40	orf19.3564	-0,98	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_02800W_A	RPC53	orf19.2715	0,77	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C4_03270W_A	RPF1	orf19.2667	-0,90	PRE1 <sup>ON</sup>
I	C2_05230C_A	RPF2	orf19.3553	-0,63	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_02460W_A	RPL10	orf19.2935	-0,82	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C6_02240C_A	RPL10A	orf19.3465	-1,53	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_06810C_A	RPL11	orf19.2232	-1,14	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C3_02110W_A	RPL12	orf19.1635	-0,91	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_03020C_A	RPL13	orf19.2994	-1,33	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_13050W_A	RPL14	orf19.4931.1	-1,67	PRE1 <sup>ON</sup>
G	CR_04100C_A	RPL15A	orf19.493	-1,60	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_00180W_A	RPL16A	orf19.6085	-1,29	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C2_04600C_A	RPL17B	orf19.4490	-1,94	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C3_05100C_A	RPL18	orf19.5982	-1,18	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C3_04500C_A	RPL19A	orf19.5904	-1,60	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C1_11060C_A	RPL2	orf19.2309.2	-1,55	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_01520C_A	RPL20B	orf19.4632	-1,85	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C2_03810C_A	RPL21A	orf19.840	-1,85	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C6_02070C_A	RPL23A	orf19.3504	-2,06	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C4_04890C_A	RPL24A	orf19.3789	-0,72	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C6_01970C_A	RPL25	orf19.687.1	-0,96	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_12390C_A	RPL27A	orf19.5225.2	-1,71	PRE1 <sup>ON</sup>

S	C2_09430W_A	RPL3	orf19.1601	-1,69	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C4_04900W_A	RPL30	orf19.3788.1	-1,90	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C6_01700W_A	RPL32	orf19.3415.1	-1,75	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C3_04960W_A	RPL35	orf19.5964.2	-0,95	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C1_11360W_A	RPL37B	orf19.667.1	-1,94	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C2_03960W_A	RPL39	orf19.827.1	-1,54	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C1_10390C_A	RPL42	orf19.4909.1	1,26	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_14110C_A	RPL4B	orf19.7217	-1,46	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C7_01790C_A	RPL5	orf19.6541	-1,03	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_03110W_A	RPL6	orf19.3003.1	-1,65	PRE1 <sup>ON</sup>
A	CR_06120W_A	RPL7	orf19.3867	-1,26	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C3_05240C_A	RPL8B	orf19.6002	-1,41	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C3_02470C_A	RPL9B	orf19.236	-1,21	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_13300C_A	RPN1	orf19.4956	1,01	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C2_06150C_A	RPN10	orf19.4102	1,56	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C1_14460W_A	RPN11	orf19.7264	1,02	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_08930W_A	RPN12	orf19.213	1,26	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_04230W_A	RPN13	orf19.1058	1,49	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_12050W_A	RPN2	orf19.5260	1,14	PRE1 <sup>OFF</sup>
Q	C1_03520W_A	RPN3	orf19.3054	0,94	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_04330W_A	RPN4	orf19.1069	3,56	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_05380W_A	RPN5	orf19.4032	1,48	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_03790W_A	RPN6	orf19.1299	1,53	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	CR_08910C_A	RPN7	orf19.7286	1,44	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_02030W_A	RPN8	orf19.3168	1,39	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C2_01320W_A	RPN9	orf19.1993	1,41	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C1_00640C_A	RPO41	orf19.6041	-1,98	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C7_00990W_A	RPP0	orf19.7015	-0,82	PRE1 <sup>ON</sup>
K	CR_08360C_A	RPP2A	orf19.6403.1	-1,05	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_03090W_A	RPS1	orf19.3002	-0,66	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_07150C_A	RPS12	orf19.6785	-1,77	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C6_00650C_A	RPS13	orf19.4193.1	-0,84	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_06450C_A	RPS14B	orf19.6265.1	-1,36	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C3_04670C_A	RPS15	orf19.5927	-1,61	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_03030W_A	RPS16A	orf19.2994.1	-1,27	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C1_10870W_A	RPS17B	orf19.2329.1	-1,32	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C7_00960W_A	RPS18	orf19.7018	-1,60	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C3_05200W_A	RPS19A	orf19.5996.1	-0,84	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_08150W_A	RPS20	orf19.6375	-1,00	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_01480C_A	RPS21	orf19.3334	-1,06	PRE1 <sup>ON</sup>
E	C1_01370C_A	RPS21B	orf19.3325.3	-0,88	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C1_06580W_A	RPS23A	orf19.6253	-1,09	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_00090W_A	RPS24	orf19.5466	-1,20	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C5_03540C_A	RPS25B	orf19.6663	-1,07	PRE1 <sup>ON</sup>
V	CR_07630C_A	RPS27	orf19.6286.2	-1,16	PRE1 <sup>ON</sup>

V	C1_05510C_A	RPS27A	orf19.413.1	1,63	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	CR_04810W_A	RPS3	orf19.6312	-1,12	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_01640W_A	RPS42	orf19.3354	-1,24	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C5_03070W_A	RPS5	orf19.4336	-1,32	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C4_01270W_A	RPS6A	orf19.4660	-1,54	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_01490W_A	RPS7A	orf19.1700	-1,22	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C2_05610C_A	RPS8A	orf19.6873	-1,74	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C2_03820C_A	RPS9B	orf19.838.1	-1,20	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C1_05240C_A	RPT1	orf19.441	1,10	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C3_00290W_A	RPT2	orf19.5440	1,02	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_04000W_A	RPT4	orf19.482	1,23	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C4_06870W_A	RPT5	orf19.3123	1,04	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C2_08780W_A	RPT6	orf19.3593	1,32	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_00030W_A	RRN3	orf19.1923	1,20	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_05050C_A	RRP6	orf19.58	-0,72	PRE1 <sup>ON</sup>
A	CR_02710W_A	RRP9	orf19.2830	-0,96	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_00900W_A	RRS1	orf19.6014	-0,80	PRE1 <sup>ON</sup>
Y	C1_05500W_A	RSM22	orf19.414	-1,66	PRE1 <sup>ON</sup>
R	CR_02140W_A	RSR1	orf19.2614	-0,87	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C7_00720W_A	RTF1	orf19.7047	0,61	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C7_00080C_A	SAC7	orf19.7115	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_04270C_A	SAH1	orf19.3911	-0,65	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C6_03830W_A	SAL6	orf19.5758	1,33	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_11450C_A	SAM2	orf19.657	-0,94	PRE1 <sup>ON</sup>
N	C1_14490C_A	SAM35	orf19.7267	0,86	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C1_08410C_A	SAM4	orf19.386	-0,97	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_05770C_A	SAM50	orf19.7358	-0,85	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C4_02790C_A	SAS10	orf19.2717	-0,87	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C6_03750C_A	SBA1	orf19.5749	1,08	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_00770C_A	SCL1	orf19.5378	0,79	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	CR_05660W_A	SDA1	orf19.6648	-1,24	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C4_06610C_A	SDH12	orf19.2871	-0,70	PRE1 <sup>ON</sup>
F	CR_05180C_A	SDH2	orf19.637	-0,87	PRE1 <sup>ON</sup>
H	C6_00090W_A	SDH7	orf19.6328	-1,76	PRE1 <sup>ON</sup>
V	C1_08370W_A	SDS24	orf19.5118	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C6_01100W_A	SEC9	orf19.117	0,82	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_06880C_A	SEM1	orf19.3122.2	1,00	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_06210C_A	SER1	orf19.5484	-0,92	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_12030W_A	SER33	orf19.5263	-0,64	PRE1 <sup>ON</sup>
H	C3_02780W_A	SES1	orf19.269	-0,66	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C1_14140C_A	SET3	orf19.7221	1,03	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_04440C_A	SFC1	orf19.3931	0,97	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_10270C_A	SFH5	orf19.4897	0,89	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_05990C_A	SFL1	orf19.454	-0,78	PRE1 <sup>ON</sup>
R	C3_01320C_A	SGA1	orf19.1719	-1,11	PRE1 <sup>ON</sup>

A	C2_05200C_A	SGO1	orf19.3550	1,37	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_02830C_A	SGT2	orf19.5823	1,03	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_02120C_A	SHA3	orf19.3669	-1,66	PRE1 <sup>ON</sup>
N	C2_03050W_A	SHE9	orf19.5796	0,70	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C7_03330C_A	SHM1	orf19.1342	-0,73	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_01610C_A	SHP1	orf19.2549	1,29	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C1_09760C_A	SHY1	orf19.4841	-0,87	PRE1 <sup>ON</sup>
P	CR_09950C_A	SIK1	orf19.7569	-0,60	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C1_13940W_A	SIM1	orf19.5032	-0,80	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C1_05910W_A	SIP5	orf19.2458	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C2_01330C_A	SIR2	orf19.1992	0,91	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	CR_06080W_A	SIS1	orf19.3861	0,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_00240W_A	SKN7	orf19.971	1,05	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_07410C_A	SKP1	orf19.4427	0,88	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_02600C_A	SLC1	orf19.250	-0,77	PRE1 <sup>ON</sup>
R	CR_01000C_A	SLN1	orf19.3256	0,93	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C7_01580W_A	SMC6	orf19.6568	0,82	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C2_07160W_A	SMF12	orf19.2270	-7,19	Ausente en PRE1 <sup>ON</sup>
G	C1_07870C_A	SMI1	orf19.5058	0,70	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C2_09890W_A	SMM1	orf19.1362	-0,67	PRE1 <sup>ON</sup>
Q	C2_01550W_A	SMP2	orf19.1462	0,92	PRE1 <sup>OFF</sup>
W	C1_00650C_A	SNF7	orf19.6040	1,08	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_02600W_A	SNO1	orf19.2948	-1,14	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_12230W_A	SNT1	orf19.5241	0,59	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_01350C_A	SNX4	orf19.1990	1,47	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_04210C_A	SOH1	orf19.1429	0,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_06000W_A	SOK1	orf19.451	2,92	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_03850C_A	SOL1	orf19.6930	1,35	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C6_04160C_A	SPB1	orf19.76	-0,82	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C4_04910C_A	SPC34	orf19.3788	1,49	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C2_06960W_A	SPE3	orf19.2250	-1,14	PRE1 <sup>ON</sup>
Y	C7_00390W_A	SPL1	orf19.7081	-0,78	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_05740W_A	SPO7	orf19.6885	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C2_06010W_A	SPO72	orf19.4119	1,35	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C1_03250C_A	SPP1	orf19.3018	0,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_07040W_A	SPT10	orf19.2361	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C1_05430W_A	SPT20	orf19.422	0,97	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C2_10280C_A	SPT23	orf19.1751	1,30	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_05090C_A	SRB8	orf19.736	0,78	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_01980C_A	SRD1	orf19.1510	-0,67	PRE1 <sup>ON</sup>
G	CR_02980C_A	SRP40	orf19.2859	-1,14	PRE1 <sup>ON</sup>
I	CR_05610C_A	SRR1	orf19.5843	1,97	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_03210C_A	SSU72	orf19.2402	0,75	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_04700W_A	SSZ1	orf19.3812	-0,80	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C2_09010W_A	STB3	orf19.203	1,27	PRE1 <sup>OFF</sup>

I	C4_00280W_A	STE24	orf19.5654	0,77	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_13350W_A	STP2	orf19.4961	1,40	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C6_00300C_A	STV1	orf19.1190	0,88	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_03560C_A	SUA71	orf19.3059	0,94	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_05490W_A	SUA72	orf19.3519	0,70	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C2_04350C_A	SUV3	orf19.4519	-1,23	PRE1 <sup>ON</sup>
S	CR_00400C_A	SWC4	orf19.7492	0,81	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_03140C_A	SYN8	orf19.2411	1,21	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C3_06820C_A	TAF12	orf19.6820	0,74	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C2_07460W_A	TAF4	orf19.1885	0,82	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_03720W_A	TAL1	orf19.4371	0,63	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_09350W_A	TAZ1	orf19.4096	-1,68	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_04810W_A	TCO89	orf19.761	0,81	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C3_06870W_A	TDH3	orf19.6814	-1,08	PRE1 <sup>ON</sup>
M	C3_04530C_A	TEC1	orf19.5908	1,33	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	C2_08370C_A	TEF1	orf19.1435	-0,91	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C5_00690C_A	TFB3	orf19.567	1,27	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_02060C_A	TFG1	orf19.4585	0,89	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C5_00930C_A	TFS1	orf19.1974	1,73	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C3_05130C_A	THI4	orf19.5986	1,14	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_00650C_A	THR1	orf19.923	-0,96	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C2_10710W_A	TIF11	orf19.5351	-1,08	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C6_01630W_A	TIF3	orf19.3423	-0,70	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C5_02490C_A	TIF5	orf19.4261	-0,66	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C2_09900C_A	TIM23	orf19.1361	-0,94	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C3_00250C_A	TIM44	orf19.5444	-1,11	PRE1 <sup>ON</sup>
P	C7_03120W_A	TIM54	orf19.5143	-0,88	PRE1 <sup>ON</sup>
D	C7_03630C_A	TIM9	orf19.6696	-1,47	PRE1 <sup>ON</sup>
D	C5_05110C_A	TIP20	orf19.4003	0,65	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C2_02210C_A	TLG2	orf19.1538	0,69	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C2_00010W_A	TLO5	orf19.1925	0,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	CR_00860C_A	TMA19	orf19.3268	-0,66	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C4_01680W_A	TOA2	orf19.4625	1,03	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C2_03180C_A	TOM1	orf19.5776	1,41	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C7_02680W_A	TOM22	orf19.3696	-1,45	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C7_02640W_A	TOM70	orf19.3700	-0,74	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C6_00950C_A	TOP1	orf19.96	-0,76	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C3_01550C_A	TOS1	orf19.1690	-1,01	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_11350C_A	TOS4	orf19.668	1,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
G	CR_03920C_A	TPO4	orf19.473	-2,82	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C2_10690W_A	TPS3	orf19.5348	0,77	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C3_00350W_A	TPT1	orf19.5432	-1,02	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_00910W_A	TRI1	orf19.6013	0,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C1_01380C_A	TRM2	orf19.3327	-0,73	PRE1 <sup>ON</sup>
G	C3_07400W_A	TRM7	orf19.6751	-1,05	PRE1 <sup>ON</sup>

T	CR_01590C_A	TRP2	orf19.2546	-0,76	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C1_12210W_A	TRP3	orf19.5243	-0,82	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C4_07090C_A	TRP4	orf19.3099	-1,15	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C1_05410C_A	TRP99	orf19.424	1,11	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	CR_10350C_A	TRX1	orf19.7611	0,68	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C5_00980W_A	TRY3	orf19.1971	0,82	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C3_06330W_A	TSA1B	orf19.7398.1	0,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	CR_08490W_A	TSR1	orf19.6417	-1,22	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_03060C_A	TSR2	orf19.2998	-1,04	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C1_00490C_A	TTR1	orf19.6059	1,26	PRE1 <sup>OFF</sup>
R	CR_09120C_A	TUB1	orf19.7308	0,72	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C1_00590W_A	TUF1	orf19.6047	-1,05	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C1_09800C_A	TVP18	orf19.4845	-1,06	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_13140C_A	TYE7	orf19.4941	-1,64	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_06500W_A	UBA1	orf19.7438	0,85	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_10930C_A	UBA4	orf19.2324	-0,59	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C2_10580W_A	UBC15	orf19.5337	1,42	PRE1 <sup>OFF</sup>
R	C4_07180W_A	UBI3	orf19.3087	0,74	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C3_05870C_A	UBP1	orf19.7367	0,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C2_02020W_A	UBP14	orf19.1516	1,39	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_00440W_A	UBP6	orf19.6063	1,41	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C2_10140W_A	UBP8	orf19.1767	0,96	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C4_02960W_A	UBR2	orf19.2697	0,96	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_04190C_A	UGA1	orf19.802	0,80	PRE1 <sup>OFF</sup>
I	C1_01810C_A	UGA2	orf19.4543	1,88	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_02160W_A	UGT51C1	orf19.2616	1,41	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_06690C_A	UMP1	orf19.3140.1	1,98	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C1_09720W_A	URA1	orf19.4836	-0,76	PRE1 <sup>ON</sup>
A	CR_07050C_A	URA2	orf19.2360	-1,53	PRE1 <sup>ON</sup>
K	C5_04570C_A	URA7	orf19.3941	-0,87	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C3_03090W_A	USO5	orf19.306	1,62	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_05310W_A	USO6	orf19.6967	1,01	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C7_04190C_A	UTP18	orf19.7154	-1,08	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_01200W_A	UTP20	orf19.3159	-0,76	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C2_02430W_A	UTP21	orf19.1566	-0,59	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_07500W_A	VAN1	orf19.6738	-0,64	PRE1 <sup>ON</sup>
L	C2_06640C_A	VAS1	orf19.1295	-0,99	PRE1 <sup>ON</sup>
N	C6_00130C_A	VID27	orf19.6324	1,20	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_02450W_A	VID30	orf19.4253	0,87	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_06400C_A	VMA8	orf19.2895	0,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C5_01210W_A	VPS1	orf19.1949	0,83	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_05910C_A	VPS11	orf19.4403	0,82	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C4_06060W_A	VPS13	orf19.4416	0,66	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_01550W_A	VPS17	orf19.3344	0,58	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_08060C_A	VPS21	orf19.589	0,91	PRE1 <sup>OFF</sup>

N	C5_01620C_A	VPS22	orf19.6296	1,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
V	C1_10760W_A	VPS23	orf19.2343	0,86	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_00750C_A	VPS27	orf19.6031	1,37	PRE1 <sup>OFF</sup>
Q	C2_05650W_A	VPS35	orf19.6875	1,20	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_03090W_A	VPS4	orf19.4339	1,16	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C1_09920W_A	VPS41	orf19.4858	1,14	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	C6_02920C_A	VPS51	orf19.5568	0,84	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C1_00130C_A	VPS53	orf19.6094	0,74	PRE1 <sup>OFF</sup>
L	C7_00170W_A	VPS70	orf19.7106	2,49	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C2_07930C_A	VRP1	orf19.2190	1,31	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_05180W_A	WH11	orf19.3548.1	1,06	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_07730W_A	WOR4	orf19.6713	-1,59	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C1_12380C_A	WRS1	orf19.5226	-0,72	PRE1 <sup>ON</sup>
Q	C1_02990C_A	XOG1	orf19.2990	0,91	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_10840C_A	XYL2	orf19.7676	0,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C7_03770C_A	YAF9	orf19.5501	0,83	PRE1 <sup>OFF</sup>
F	C3_03390C_A	YAH1	orf19.336	-1,08	PRE1 <sup>ON</sup>
A	C2_04660C_A	YAK1	orf19.147	0,83	PRE1 <sup>OFF</sup>
A	C1_04890W_A	YBN5	orf19.754	-0,62	PRE1 <sup>ON</sup>
E	C1_13960W_A	YBP1	orf19.5034	0,67	PRE1 <sup>OFF</sup>
D	C2_07470W_A	YCS4	orf19.1883	0,90	PRE1 <sup>OFF</sup>
T	CR_07790C_A	YHB1	orf19.3707	-1,27	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C6_01930W_A	YHM1	orf19.685	-0,87	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C6_00600C_A	YHM2	orf19.4197	-1,19	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C2_03750W_A	YIM1	orf19.847	1,60	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_09600C_A	YKE2	orf19.6601.1	1,18	PRE1 <sup>OFF</sup>
K	C1_02860C_A	YKT6	orf19.2974	-0,63	PRE1 <sup>ON</sup>
T	C1_07200W_A	YMC1	orf19.4447	-1,10	PRE1 <sup>ON</sup>
F	C7_00950W_A	YML6	orf19.7019	-1,55	PRE1 <sup>ON</sup>
M	C7_00970C_A	YOX1	orf19.7017	-7,19	Ausente en PRE1 <sup>ON</sup>
S	C3_05370C_A	YST1	orf19.6975	-1,16	PRE1 <sup>ON</sup>
F	CR_09860W_A	YTA6	orf19.7558	0,63	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C1_09510W_A	YTM1	orf19.4815	-0,94	PRE1 <sup>ON</sup>
S	C5_04430C_A	YUH2	orf19.3930	0,82	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_02640C_A	ZCF1	orf19.255	1,56	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C5_03320C_A	ZCF14	orf19.2647	1,30	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_04020C_A	ZCF16	orf19.2808	1,14	PRE1 <sup>OFF</sup>
P	C1_02010C_A	ZCF24	orf19.4524	1,39	PRE1 <sup>OFF</sup>
E	C3_04770C_A	ZCF32	orf19.5940	1,40	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	CR_10070C_A	ZCF39	orf19.7583	1,40	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C2_01880C_A	ZCF6	orf19.1497	0,85	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C4_04580W_A	ZDS1	orf19.3823	0,63	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C3_07200C_A	ZFU2	orf19.6781	2,01	PRE1 <sup>OFF</sup>
S	C5_01850C_A	ZNC1	orf19.3187	1,64	PRE1 <sup>OFF</sup>
N	C2_02200W_A	ZRC1	orf19.1536	-0,59	PRE1 <sup>ON</sup>

N	C2_02590W_A	ZRT2	orf19.1585	-3,77	<i>PRE1<sup>ON</sup></i>
S	C4_02870C_A	ZUO1	orf19.2709	-0,73	<i>PRE1<sup>ON</sup></i>
S	C1_08980C_A	ZWF1	orf19.4754	0,59	<i>PRE1<sup>OFF</sup></i>