

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Caracterización funcional del factor de transcripción Wor1 y su
implicación en la adaptación al estado comensal en el patógeno
oportunisto Candida Albicans**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Susana Hidalgo Vico

Directores

Jesús Pla Alonso
Elvira Román González

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN WOR1
Y SU IMPLICACIÓN EN LA ADAPTACIÓN AL ESTADO COMENSAL
EN EL PATÓGENO OPORTUNISTA *Candida albicans*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

SUSANA HIDALGO VICO

DIRECTORES

DR. JESÚS PLA ALONSO
DRA. ELVIRA ROMÁN GONZÁLEZ

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

- **Infect-ERA: PCIN-2014-052:** “From colonization to infection: dissection of the commensal-to-pathogen shift of *Candida albicans* (FunComPath)”. Entidad financiadora: Ministerio de Economía y Competitividad. 01/01/2015 – 31/12/2017.
- **S2017/BMD-3691:** “InGEMICS - Ingeniería microbiana, salud y calidad de vida”. Entidad financiadora: Dirección General de Investigación e Innovación, Consejería de Educación e Investigación de la Comunidad de Madrid y Fondo Europeo. 01/01/2018 - 31-12-2021.
- **PGC2018-095047-B-I00:** “Papel de la adhesión durante la colonización del tracto gastrointestinal por *Candida albicans* y su relación con la señalización mediada por MAP quinasas. Estudio de probióticos”. Entidad financiadora: Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). 01/01/2019 - 31/12/2021.

así como a la concesión de las siguientes ayudas:

- **Beca Ayudante de Investigación de la Convocatoria de Empleo Joven de La Comunidad de Madrid.** Referencia: PEJ16/MED/AI-1465. Abril 2017 - febrero 2019.
- **Beca Predoctoral de la Convocatoria de Empleo Joven de La Comunidad de Madrid.** Referencia: PEJD/2018-PRE/BMD-9049. Marzo 2019 – febrero 2020.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dedicar este espacio a todas las personas que me han acompañado durante estos cuatro años y que de una manera u otra habéis formado parte de esta etapa.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores Jesús y Elvira por la dedicación y la confianza que han puesto en mí. A ti Jesús, gracias por darme la oportunidad de trabajar en este grupo de investigación y apostar por mí, incluso en los momentos en los que estaba más perdida. Tu motivación por este trabajo y la constante proposición de experimentos (a cada cual más raro, pero más curioso) han hecho que crezca como científica. A ti Elvira agradecerte el tiempo que has invertido en enseñarme, y, sobre todo, por darme ánimos y apoyo cuando más lo he necesitado. Tu energía ha hecho que desde el principio esto haya sido un poco más fácil.

A la unidad 2 por ser las piezas fundamentales de este camino. A Rebe, gracias por esos momentos en los cuales has dejado lo que estabas haciendo para darle vueltas a mis ideas más enrevesadas. A Dani, por hacerme reír un rato todos los días y escuchar las penas del doctorado desde tu sabiduría y con una palmerita de chocolate vegana de la máquina de abajo. Y a Ioana, por supuesto, porque desde el primer momento que entramos a trabajar juntas hemos estado pipeta con pipeta. Y a todos los estudiantes que han ido y venido y que, de alguna manera, habéis marcado una diferencia en mi día a día: Sarita, Noe, Elena, Antonio, Ana, Mariela, Santa, Beunza, Sara, María, Marta, Ane, Paula, Alejandro, y a la última incorporación, Isabel, que has dado un nuevo aire a este grupo.

A la unidad 4 por tomarme como hija adoptiva desde el primer momento. A Sonia, Raúl, Belén, Yulia y Mónica por ayudarme y escucharme en los días difíciles... y reírnos bastante también. Y en especial mención a Vero, mi Vero, el tesoro que conservo de mi paso por este departamento. Sin ti esta dura etapa llamada doctorado habría sido menos divertida y más dramática (aunque por favor, que no falte nunca el drama). Y a las que dejaron el departamento, pero son muy importantes para mí; Jenny, porque desde que te fuiste todo es un poquito menos bonito, y a Sandra, porque tu manera sarcástica de apreciar la vida me hace ver las cosas siempre desde otra perspectiva. A la unidad 1, a Raquel y a Victoria por el apoyo que siempre me aupas por las mañanas por los pasillos, y a Ahinara y Cata por ayudarme con ese terror llamado proteómica. Mucha suerte en vuestro camino, compañeras.

Al resto del departamento solo daros las gracias, porque en mayor o menor medida habéis hecho mi día a día un poquito mejor. En especial a José Alberto y Benito porque siempre me sacáis una sonrisa pase lo que pase ¡Se os quiere mucho! A Inma por las palabras de cariño y ánimo que siempre tienes a mano. Y a Gloria por ser la cabeza de familia, y ayudarme con todo lo que he necesitado.

Me gustaría dedicar unas palabras a otras personas que han puesto su granito de arena a lo largo de estos años. A Pilar y Carolina del Rocasolano, porque, aunque hemos pasado pocos días juntas, han sido muchas horas en las que me habéis acogido con mucho cariño (¡y un té!) y me habéis enseñado a luchar como mujer y científica a la vez. No voy a olvidar nunca vuestros consejos.

*Me gustaría además dedicar unas palabras a todas las personas que desde fuera habéis apoyado a este proyecto de doctora. A Ana y Atocha porque sois mi todo, y soy la persona más afortunada del mundo por teneros. A Nuri por comprenderme y ayudarme desde 1989 a desconectar en conexión Madrid-Valencia. A la Asociación Canina de Leganés por aceptarme como voluntaria y cuya maravillosa gente que se desvive por los animales ha hecho que esta la última etapa de tesis doctoral haya sido más llevadera. A Fran por hacer unos dibujos tan maravillosos de *C. albicans* en todas sus morfologías. And a very huge and special thank you goes to my second home, Jena. First of all, to the Department of Infection Biology that started this all. Thank you, Peter and Christine, for the opportunity to learn what research means in all kinds of ways. To my labmates Luke, Ramona and Nadine because you made my days better, and to my german and second mom, Ina, I can't wait to hug you again! Also, to all the lovely people that shared time with me, Andrea, Heike, Hans-Martin, Monika, Mahmoud, Fei, Sarah, Justus and Christian. I would also like to say thank you to Debbie, Johannes, and Lucas for all the support and nice time we had in Freisweg and until today. I miss you very often.*

Para finalizar quiero dar las gracias a mis padres y a mi hermana por apoyar siempre las decisiones que me han llevado a este momento. En especial a mi madre, que en los días malos levanta mi ánimo y me hace ver el lado positivo de las cosas.

Y como no, quiero dar eternas gracias a la persona que más ha sufrido este proceso. Has hecho que este camino sea un poco más fácil con tu apoyo incondicional, incluso en los días más duros... que no han sido pocos. Por último, agradecer a crazy legs por echar una patita todos los días. Esta tesis la hemos escrito entre los tres, os quiero Javi y Proud.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE	7
ABREVIATURAS	13
RESUMEN	17
SUMMARY	23
INTRODUCCIÓN	29
1. Infecciones de etiología fúngica	31
2. El patógeno oportunista <i>Candida albicans</i>	31
A. Pared y membrana celular	32
B. Polimorfismo	34
3. <i>C. albicans</i> : de organismo comensal a patógeno	42
A. Modelos <i>in vivo</i> para el estudio de <i>Candida</i> como patógeno y como comensal	42
B. Factores implicados en el establecimiento en el TGI	44
C. Adaptación al tracto gastrointestinal	47
D. Adaptación metabólica y nutricional en el hospedador	49
E. Papel de la mitocondria	52
F. Invasión del hospedador	53
G. Evasión del sistema inmunitario del hospedador	54
OBJETIVOS	57
RESULTADOS	61
1. Análisis de la sobreexpresión de <i>WOR1</i> en fondo silvestre	63
A. Caracterización de la cepa CAI4-WOR1 ^{OE}	63
B. Análisis del proteoma en células que sobreproducen Wor1	68
C. Estudio de la respuesta a distintas condiciones de crecimiento y estrés celular	73
D. Capacidad de filamentación y de formación de biopelículas	84
E. Papel de Als3 y otras proteínas que participan en la patogénesis	89

F. Actividad fosfolipasa y proteasa	93
G. Homeostasis de hierro	95
H. Estudio del metabolismo respiratorio	103
I. Análisis del contenido lipídico	108
J. Metabolismo de fuentes de carbono	115
2. Caracterización de cepas microevolucionadas en el tracto gastrointestinal de ratón	126
A. Estudios de colonización en cepas μ Ev	126
B. Análisis de fenotipos relacionados con las células GUT y células opacas	126
C. Análisis del proteoma de las cepas μ Ev	129
D. Análisis genómico de las cepas μ Ev	137
E. Caracterización fenotípica de las cepas μ Ev	137
F. Papel de <i>FLO8</i> en la adaptación al estado comensal	146
DISCUSIÓN	157
1. Efecto de la sobreexpresión de <i>WOR1</i>	159
A. Caracterización de las células <i>WOR1</i> ^{OE} y análisis proteómico	159
B. Análisis de la respuesta a estrés de pared y de membrana celular	160
C. Efecto de la sobreexpresión de <i>WOR1</i> en la respuesta a estrés osmótico y oxidativo	163
D. Mitocondria, homeostasis de hierro y lípidos	164
E. Efecto en adhesión, filamentación y formación de biopelículas	167
F. Efecto sobre el metabolismo de fuentes de carbono	168
2. Análisis de una trayectoria de microevolución en el tracto gastrointestinal de ratón	170
CONCLUSIONES	177
MATERIALES Y MÉTODOS	181
1. Microorganismos y procedimientos	183
A. Microorganismos	183
B. Medios de cultivo y compuestos	187

2.	Condiciones y métodos para ensayos fenotípicos y bioquímicos	191
A.	Ensayos de sensibilidad y crecimiento.....	191
B.	Evaluación de la cinética de crecimiento microbiano: curva de crecimiento	192
C.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	192
D.	Estudios de cinéticas de caída de viabilidad en medio líquido.....	193
E.	Detección de la actividad fosfolipasa y proteasa.....	193
F.	Ensayos de filamentación en medio líquido	193
G.	Formación de biopelículas.....	193
H.	Cuantificación de hierro intracelular	194
I.	Inducción de la transición célula blanca a célula opaca	195
3.	Construcción de cepas genéticamente modificadas	195
A.	Descripción del sistema de regulación por tetraciclina.....	195
B.	Obtención de cepas control	196
C.	Obtención de cepas que sobreexpresan <i>WOR1</i>	197
4.	Técnicas de biología molecular.....	199
A.	Plásmidos y oligonucleótidos	199
B.	Manipulación de DNA y RNA	201
C.	Delección génica mediante el sistema CRISPR-Cas9.....	202
D.	Construcción de la proteína de fusión GFP-Pxp2M	205
E.	Reintegración de un alelo silvestre <i>FLO8</i>	207
5.	Obtención y manipulación de proteínas	208
A.	Obtención de extractos proteicos.....	208
B.	Electroforesis y transferencia	209
C.	Inmunodetección	209
D.	Identificación de proteínas por LC-MS/MS	210
6.	Obtención y detección de lípidos	213

A. Contenido total de lípidos por LC-HRMS	213
7. Técnicas de microscopía y citometría de flujo	216
A. Tinción con floxina B	216
B. Tinción con rojo de Nilo	216
C. Tinción con blanco de calcoflúor	217
D. Exposición de β -glucanos	217
E. Determinación del potencial de membrana con JC-1	217
8. Ensayos con animales de experimentación	218
A. Modelo de colonización y procedimiento de inoculación de ratones	218
B. Procesamiento de heces y cuantificación de colonias	219
C. Obtención de muestras de contenido intestinal.....	220
D. Adhesión <i>ex vivo</i> a mucosa intestinal	220
E. Obtención de las cepas microevolucionadas	220
9. Análisis estadístico y bioinformática	221
LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS	223
BIBLIOGRAFÍA	231
ANEXOS	253

ABREVIATURAS

\pm	más/menos	GPI	Glicofosfatidilinositol
$\mu\text{g/mL}$	Microgramo/mililitro	GUT	<i>Gastrointestinally-IndUced Transition</i>
μL	Microlitro	HK	<i>Heat-killed</i>
μM	Micromolar	IAR	Índice de adhesión relativa
aa	Aminoácidos	IMF	Intensidad media de fluorescencia
AA	Antimicina A	KCN	Cianuro potásico
ABC	<i>ATP binding cassette</i>	kDa	Kilodalton
ACE	Acetato sódico	LC-HRMS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución
Als	<i>Agglutinin-like sequence</i>	LC-MS/MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem
AO/T80	Aceite de oliva/Tween 80	LIM	Low iron medium
As (III)	Arsenito	LOH	Pérdida de heterocigosidad
As (V)	Arseniato	LPC	Lisofosfatidilcolina
ATP	Adenosín trifosfato	LPE	Lisofosfatidiletanolamina
BHT	Butilhidroxitolueno	M	Molar
BPS	Disulfonato batofenantrolina	mAc	Anticuerpo monoclonal
BSA	Albúmina de suero bovino	MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>	MEA	Agar malta huevo
CAS	Casporfungina	MeOH	Metanol
CFW	Blanco de Calcoflúor	MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
CGD	<i>Candida Genome Database</i>	mg/mL	Miligramo/mililitro
CHL	Cloranfenicol	mL	Mililitro
CI	Candidiasis invasora	mm	Milímetro
CIT	Citrato sódico	mM	Milimolar
CMI	Concentración mínima inhibitoria	mRNA	ARN mensajero
CNA	<i>Candida no albicans</i>	MTL	<i>Mating type locus</i>
CNV	Variaciones en el número de copias	MZ	Miconazol
CWP	Proteínas de pared celular, <i>Cell wall proteins</i>	NaN₃	Azida sódica
D.O.	Densidad óptica	NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
DAG	Diacilglicerol	ng/mL	Nanogramo/mililitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico	nm	Nanómetro
Dox	Doxiciclina	NS	No significativo
DTT	Ditiotreitol	O/N	<i>Overnight</i>
EtOH	Etanol	pAc	Anticuerpo policlonal
FBS	Suero bovino fetal	PB	Floxina B
Fe	Hierro	pb	Pares de bases
FZ	Fluconazol	PBS	Tampón fosfato salino
GIT	<i>Gastrointestinal tract</i>	PC	Fosfatidilcolina
GlcNac	N-acetilglucosamina	PE	Fosfatidiletanolamina
GLI	Glicerol	PI	Fosfatidilinositol
GLU	Glucosa	Pir	<i>Proteins with Internal Repeats</i>

PKA	<i>Protein kinase A</i>
PL	Fosfolípidos
pmol	Picomol
PS	Fosfatidilserina
RC	Rojo Congo
rcf	Fuerza centrífuga relativa
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
SA	Sulfato de amonio
Saps	Proteasas aspárticas secretadas
SB	Sales biliares
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEA	Agar Sabouraud huevo
SEM	Error estándar de la media
SHAM	Ácido salicilhidroxámico
SigA	Inmunoglobulina A secretada
TAG	Triacilglicerol
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos
TGI	Tracto gastrointestinal
TOF	<i>Time of flight</i>
u.d.o	Unidades de densidad óptica
UFCs	Unidades formadoras de colonias
UHPLC	<i>Ultra High-performance Liquid Chromatography</i>
wo	<i>White-opaque</i>

RESUMEN

Caracterización funcional del factor de transcripción Wor1 y su implicación en la adaptación al estado comensal en el patógeno oportunista *Candida albicans*

Introducción

C. albicans es un microorganismo comensal, pero también un patógeno oportunista que produce infecciones superficiales y, en situaciones más graves, infecciones sistémicas que presentan una elevada tasa de mortalidad. Dado el origen endógeno de muchas de estas infecciones diseminadas, existe un interés creciente por determinar los factores que permiten que este hongo se establezca como comensal.

En el tracto gastrointestinal (TGI) el hongo se expone a señales y condiciones que generan una respuesta adaptativa esencial para su establecimiento. Uno de estos cambios es un aumento de la expresión de *WOR1* (*White-Opaque Regulator 1*), el principal factor de transcripción que regula la transición de célula blanca a célula opaca, pero que también participa en la transición epigenética que sufren estas células tras su paso por el TGI. Conocer qué factores podrían estar regulando el estado comensal resulta fundamental para diseñar nuevas estrategias para prevenir y combatir las infecciones causadas por este hongo.

Objetivos

1. Caracterizar la cepa que sobreproduce Wor1 (*WOR1^{OE}*) en fondo silvestre, prestando atención a los cambios en su morfología, en su proteoma y en su sensibilidad/resistencia a diferentes tipos de estrés.
2. Analizar el papel de la sobreexpresión de *WOR1* en la regulación de los principales factores implicados en el comensalismo y virulencia.
3. Desarrollar y caracterizar cepas microevolucionadas en el TGI de ratón y relacionar los fenotipos encontrados con los observados en células sobreproductoras de Wor1 (*WOR1^{OE}*), células opacas y células GUT.

Resultados

1. Caracterización de la sobreproducción de Wor1

Para estudiar cómo afecta la sobreproducción de Wor1 al estado comensal, desarrollamos una cepa que sobreexpresa *WOR1* bajo el sistema TET-OFF en el fondo silvestre CAI4. Dicha cepa (CAI4-*WOR1^{OE}*) expresa cuatro veces más mRNA de *WOR1* desencadenando un fenotipo opaco y que reprime la expresión de *EFG1*. Estas células son más grandes y se tiñen con floxina B.

El análisis de su proteoma indica que existen grandes cambios, encontrando en menor abundancia proteínas relacionadas con el uso de fuentes de carbono, con la síntesis de lípidos, con la función mitocondrial y relacionadas con el estrés oxidativo. Las células *WOR1^{OE}* son más sensibles a estrés oxidativo y a compuestos que afectan a la pared celular, pero más resistentes a aquellos que intervienen en la síntesis de ergosterol.

2. Implicación de *Wor1* en factores que regulan el comensalismo y la virulencia

Dado el papel represor ejercido por *EFG1* y su relación con *WOR1*, nos planteamos cómo podría afectar la sobreexpresión de *WOR1* a la transición de levadura a filamento. La cepa CAI4-*WOR1^{OE}* presenta defectos de filamentación y disminuye su capacidad de formar biopelículas. También posee menores niveles de mRNA de las adhesinas *ALS3* y *HWP1*; la expresión de *ECE1*, cuyo producto da lugar al péptido candidalísina, también se reprime. La producción de fosfolipasas y proteasas, en cambio, aumenta con la sobreexpresión de *WOR1*. Dado que *C. albicans* posee la capacidad de proliferar en ambientes con distintas concentraciones de hierro, hemos analizado el papel de *Wor1* en la homeostasis de este metal; nuestros sugieren que no participa en su adquisición, pero sí en su almacenamiento en la célula. Las células que sobreproducen *Wor1* son más dependientes de la vía clásica de respiración para producir energía y presentan alteraciones en la función mitocondrial. Igualmente poseen un menor contenido de fosfatidilserina y un aumento de gotas lipídicas en el citoplasma. *Wor1* interviene en el aprovechamiento de fuentes de carbono alternativas como citrato o etanol, proceso mediado en parte por una disminución de la enzima isocitrato liasa *Icl1*. El ciclo del glioxilato parece estar involucrado además en el *switching*, sugiriendo una relación entre *Wor1* e *Icl1*.

3. Caracterización de cepas microevolucionadas en el TGI del ratón

En esta parte del trabajo se generaron cepas microevolucionadas en el TGI del ratón mediante pases sucesivos hasta los 366 días. La cepa *μEv93* mejora su adecuación biológica (*fitness*) de colonización respecto a la cepa silvestre inicial; sin embargo, la alta expresión de *WOR1* solo es mantenida en altos niveles cuando se encuentra en el TGI. Estas células también tienen mayor tamaño celular y se tiñen con floxina B, pierden la capacidad de filamentar y producen menos fosfolipasas y proteasas.

La capacidad de crecer en presencia de altas concentraciones de sales biliares, la mejor adecuación biológica y la pérdida de la capacidad de filamentación parecen dependientes de la ausencia de *Flo8*, pero no de *Wor1*.

Conclusiones

1. La expresión ectópica de *WOR1* reduce significativamente la expresión de *EFG1* y desencadena un fenotipo opaco estable.
2. La sobreexpresión de *WOR1* genera cambios en el proteoma, disminuyendo la abundancia de proteínas que participan en la respuesta a estrés oxidativo y de proteínas mitocondriales, y cambios en las relacionadas con el uso de fuentes de carbono.
3. Las células *WOR1^{OE}* son más sensibles a compuestos que generan estrés de pared celular, pero más resistentes a compuestos que interfieren en la síntesis de ergosterol.
4. Las células *WOR1^{OE}* son más dependientes de la ruta clásica de respiración mitocondrial y poseen alteraciones en la función mitocondrial.
5. Las células *WOR1^{OE}* poseen un aumento de gotas lipídicas y una disminución de fosfatidilserina.
6. Las células que sobreproducen *Wor1* no poseen diferencias en la captación de hierro, pero sí en su almacenamiento y utilización.
7. Las células *WOR1^{OE}* tienen una menor capacidad de filamentación y de formar biopelículas; en estas, se reprime la expresión de las proteínas *ALS3*, *HWP1* o la candidalinasina codificada por *ECE1*, aunque presentan mayor actividad fosfolipasa y proteasa.
8. La sobreexpresión de *WOR1* disminuye la abundancia de la *Icl1* impidiendo la utilización de fuentes de carbono alternativas, e implica al ciclo del glioxilato en la transición de célula blanca a célula opaca.
9. El análisis de una trayectoria evolutiva de *C. albicans* en el TGI murino ha permitido obtener cepas con una mejor adecuación biológica y que expresan mayores niveles de *WOR1*. Las células también tienen mayor tamaño y se tiñen con floxina B.
10. El proteoma de estas células microevolucionadas en el TGI muestra una disminución de proteínas implicadas en la filamentación y cambios en aquellas relacionadas con la síntesis y aprovechamiento de lípidos y de fuentes de carbono.
11. La pérdida de la capacidad de filamentar y la resistencia a sales biliares en las células microevolucionadas es dependiente de *Flo8*, pero no de *Wor1*.

SUMMARY

Functional characterization of the transcription factor *Wor1* and its involvement in the adaptation to the commensal state in the opportunistic pathogen *Candida albicans*.

Introduction

C. albicans is a commensal microorganism, but also an opportunistic pathogen that produces superficial infections, and in more severe situations, systemic infections with a high mortality rate. Given the endogenous origin of many of these disseminated infections, there is a growing interest in determining the factors that allow this fungus to establish as a commensal.

In the gastrointestinal tract (GIT) the fungus is exposed to signals and conditions that generate an adaptive response essential for its establishment. One of these changes is an increase in the expression of *WOR1* (*White-Opaque Regulator 1*), the main transcription factor that regulates the transition from white cell to opaque cell, but also participates in the epigenetic transition that these cells undergo after passage through the GIT. Understanding the factors that could be regulating the commensal state is essential to design new strategies to prevent and combat infections caused by this fungus.

Aims

1. Characterization of the strain that overproduces *Wor1* (*WOR1*^{OE}) in a wild type background, paying attention to the changes in its morphology, proteome, and sensitivity/resistance to different types of stress.
2. Analyze the role of the *WOR1* overexpression in the regulation of the main factors involved in commensalism and virulence.
3. Development and characterization of microevolved strains in the mouse gastrointestinal tract and relate the found phenotypes to those observed in *Wor1* overproducing cells (*WOR1*^{OE}), opaque cells, and GUT cells.

Results

1. Characterization of *Wor1* overproduction

To study how *Wor1* overproduction affects the commensal state, we developed a strain that overexpresses *WOR1* under the TET-OFF system in the CAI4 wild type background. This strain (CAI4-*WOR1*^{OE}) shows a fourfold expression of *WOR1* triggering an opaque phenotype and repressing *EFG1* expression. These cells are larger and stain with phloxine B.

Analysis of their proteome indicates that there are major changes, finding in lower abundance proteins related to the use of carbon sources, lipid synthesis, mitochondrial function and some related to oxidative stress. *WOR1^{OE}* cells are more sensitive to oxidative stress and to compounds that affect the cell wall, but more resistant to those involved in ergosterol synthesis.

2. Involvement of Wor1 in factors regulating commensalism and virulence.

Given the repressor role exerted by *EFG1* and its relationship with *WOR1*, we wondered how *WOR1* overexpression could affect the yeast-to-filament transition. The CAI4-*WOR1^{OE}* strain exhibits filamentation defects and decreased ability to form biofilms. It also has lower mRNA levels of the adhesins *ALS3* and *HWP1*; the expression of *ECE1*, whose product gives rise to the peptide candidalysin, is also repressed. The production of phospholipases and proteases, on the other hand, increases with *WOR1* overexpression. Since *C. albicans* can proliferate in environments with different iron concentrations, we have analyzed the role of Wor1 in iron homeostasis; our results suggest that it is not involved in its acquisition, but is involved in its storage within the cell. Wor1 overproducing cells are more dependent on the classical respiration pathway to produce energy and show alterations in the mitochondrial function. They also have a lower phosphatidylserine content and an increase in lipid droplets within the cytoplasm. Wor1 is involved in the utilization of alternative carbon sources such as citrate or ethanol, a process partially mediated by a decrease in the enzyme isocitrate lyase *Icl1*. The glyoxylate cycle also appears to be involved in switching, suggesting a relationship between Wor1 and *Icl1*.

3. Characterization of microevolved strains in the mouse GIT

In this part of the work, microevolved strains were generated in the mouse GIT by successive passages up to 366 days. The μ Ev93 strain improves its colonization fitness compared to the initial wild type strain, however, the high expression of *WOR1* is only induced and maintained at high levels while it remains in the GIT. These cells are also larger and stain with phloxine B, lose the ability to filament and produce less phospholipases and proteases. The ability to grow in the presence of high concentrations of bile salts, the improved fitness and the loss of filamentation seem to be dependent on the absence of *Flo8*, but not of *Wor1*.

Conclusions

1. Ectopic expression of *WOR1* significantly reduces *EFG1* expression and triggers a stable opaque phenotype.

2. Overexpression of *WOR1* generates changes in the proteome, decreasing the abundance of proteins involved in the response to oxidative stress and mitochondrial proteins, and changes in those related to the use of carbon sources.
3. *WOR1^{OE}* cells are more sensitive to compounds that generate cell wall stress but become more resistant to compounds that interfere with ergosterol synthesis.
4. *WOR1^{OE}* cells are more dependent on the classical mitochondrial respiration pathway and have irregularities in the mitochondria function.
5. *WOR1^{OE}* cells have more lipid droplets and a decreased phosphatidylserine content.
6. *Wor1* overproducing cells do not have differences in iron uptake but do have differences in iron storage and utilization.
7. *WOR1^{OE}* cells have a lower capacity for filamentation and biofilm formation. In these cells, the expression of *ALS3*, *HWP1*, or *ECE1* encoded candidalysin protein is repressed, although they have greater phospholipase and protease activity.
8. Overexpression of *WOR1* decreases the abundance of *Icl1* preventing the utilization of alternative carbon sources and involves the glyoxylate cycle in the white-opaque transition.
9. Analysis of an evolutionary trajectory of *C. albicans* in the murine GIT has result in strains with better biological fitness and with higher levels of *WOR1*. The cells are also larger and stain with phloxine B.
10. The proteome of these microevolved cells in the GIT shows a decrease in proteins involved in filamentation, and changes in those related to the synthesis and utilization of lipids and carbon sources.
11. The loss of filamentation ability and resistance to bile salts in the microevolved cells is *Flo8*, but not *Wor1*, dependent.

INTRODUCCIÓN

1. Infecciones de etiología fúngica

Las infecciones fúngicas han adquirido especial relevancia en los últimos años. Aunque los datos de incidencia mundial de algunas enfermedades fúngicas son limitados, principalmente debido a la falta de sistemas de vigilancia regulares o del bajo rendimiento en pruebas diagnósticas, se estima que casi mil millones de personas sufren infecciones fúngicas superficiales en piel, uñas y cabello (Bongomin *et al.*, 2017). Las infecciones invasivas son menos comunes, pero suponen un grave problema médico debido a su alta mortalidad, en algunos casos superando el 50 % (Perlroth *et al.*, 2007, Brown *et al.*, 2012, Pappas *et al.*, 2018). Los géneros más comúnmente encontrados en pacientes con infecciones invasivas son *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* y *Pneumocystis*. Entre estos, varias especies de *Candida* se encuentran como comensales de la microbiota del hospedador (Ciurea *et al.*, 2020) y se adquieren generalmente durante el nacimiento por contacto con la madre (Parm *et al.*, 2011, Kondori *et al.*, 2019).

La candidiasis es un amplio término que hace referencia a infecciones en piel, mucosas y órganos profundos causadas por especies del género *Candida*, siendo la candidiasis invasora (CI), que comprende las infecciones en el torrente sanguíneo, la cavidad abdominal, huesos y órganos, la enfermedad fúngica más común en pacientes hospitalizados y que se asocia a altas tasas de mortalidad (Pappas *et al.*, 2018). La incidencia de especies de *Candida* no *albicans* (CNA), como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y en menor medida *C. krusei*, ha aumentado en las últimas décadas debido al uso prolongado y a las opciones limitadas de fármacos antimicóticos (Kullberg & Arendrup, 2013, Pristov & Ghannoum, 2019). En los últimos años y desde su descubrimiento en 2009, *C. auris* se ha convertido en una amenaza para la salud pública mundial por su resistencia a múltiples fármacos y sus altas tasas de mortalidad (Lamoth & Kontoyiannis, 2018). A pesar de ello, *C. albicans* sigue siendo el hongo más comúnmente encontrado en el microbioma de individuos sanos y es uno de los patógenos que con mayor frecuencia se aísla en muestras clínicas (Hallen-Adams & Suhr, 2017, Bajpai *et al.*, 2019, Kumamoto *et al.*, 2020); por ello, el análisis de los factores que dirigen el paso de comensal a patógeno y su interacción con el hospedador han sido y son objeto de numerosos estudios.

2. El patógeno oportunista *Candida albicans*

C. albicans es un hongo polimórfico que se encuentra formando parte de la microbiota del tracto gastrointestinal, genitourinario y de la cavidad oral de individuos sanos sin producir ningún daño

(Ghannoum *et al.*, 2010, Bradford & Ravel, 2017, Nash *et al.*, 2017). Como patógeno oportunista, en respuesta a ciertas perturbaciones en la microbiota o alteraciones en las defensas del hospedador puede producir infecciones superficiales en piel y mucosas e incluso pasar al sistema circulatorio provocando una candidiasis diseminada. Existen una serie de factores de riesgo que predisponen el desarrollo de estas infecciones: la terapia antibiótica, la neutropenia, el cáncer, determinados procedimientos quirúrgicos, el trasplante de órganos, el uso de catéteres con la posterior formación de biopelículas, la infección por VIH, la diabetes mellitus o enfermedades que afectan al riñón o hígado entre otros (Canela *et al.*, 2017). Muchas de las infecciones producidas por este hongo tienen un origen endógeno, ya que surgen a partir de las células comensales del tracto gastrointestinal (Miranda *et al.*, 2009) que en determinadas ocasiones son capaces de translocarse desde el intestino a la sangre y diseminarse hasta los distintos órganos del hospedador, pudiendo llegar a causar la muerte del paciente si no es tratado adecuadamente (Zaborin *et al.*, 2014, Basmacıyan *et al.*, 2019, Papon *et al.*, 2020).

Existe una combinación de factores que promueven tanto el estado comensal como la forma patógena de este hongo, haciendo posible que se adapte a los diferentes nichos del hospedador. *C. albicans* es un microorganismo diploide con un genoma organizado en ocho cromosomas; sin embargo, este hongo presenta una gran plasticidad genética y fenotípica que tiene un importante impacto en su interacción con el hospedador (Ene *et al.*, 2018). Por un lado, es un hongo que carece de ciclo sexual, pero que puede llevar a cabo un ciclo parasexual (ver transición célula blanca a célula opaca más adelante) por el cual se generan células tetraploides que se convierten en diploides por pérdida gradual de cromosomas. Asimismo, las cepas que provienen de aislamientos clínicos y que han sido sometidas a tratamientos antifúngicos también presentan variaciones cariotípicas como aneuploidías (Selmecki *et al.*, 2006), mutaciones en las secuencias génicas o pérdidas de heterocigosidad (LOH) (Ford *et al.*, 2015) que aportan ventajas a las células a la hora de establecerse y de persistir dentro del hospedador. Estos y otros cambios similares también se han observado en células que se encuentran en la cavidad oral y gastrointestinal (Forche *et al.*, 2018, Tso *et al.*, 2018) generando adaptaciones en las células que son propias de estas localizaciones.

A. Pared y membrana celular

La pared celular mantiene la integridad celular actuando como barrera de permeabilidad, aportando forma y rigidez a la célula, y es la estructura que interacciona en primera instancia con el hospedador. Es una estructura extremadamente dinámica y su composición varía en función de las condiciones externas como las fuentes de carbono, los cambios de pH, la temperatura o la concentración de

oxígeno. Dichos cambios también están asociados a la patogénesis fúngica, siendo capaz el sistema inmunitario del hospedador de discriminar en determinadas circunstancias entre las formas comensales y patogénicas (Netea *et al.*, 2008, Childers *et al.*, 2019). La pared celular está formada fundamentalmente por carbohidratos y por una pequeña parte por proteínas, y posee una capa externa y una más interna (Gow *et al.*, 2012) (Figura 1).

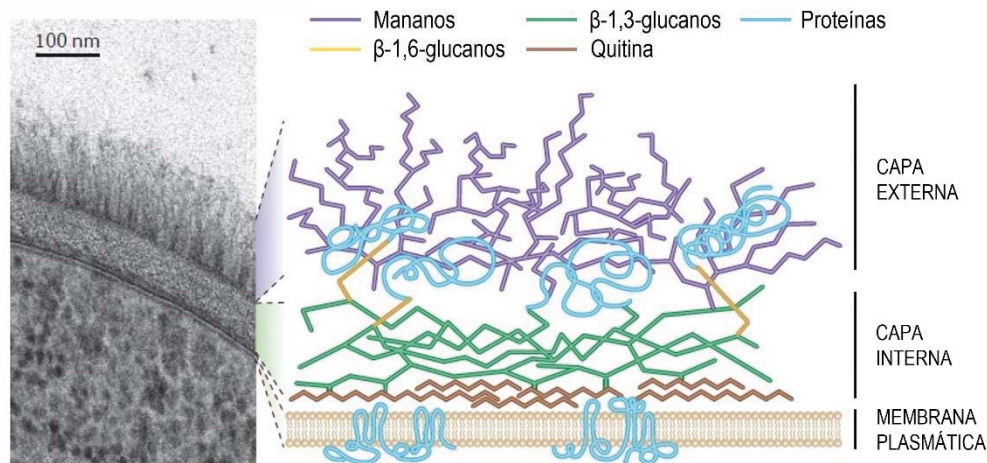


Figura 1. Esquema de la estructura de la pared celular de *C. albicans*.

La pared celular tiene una capa externa, formada por mananos y proteínas de pared, y una capa interna sobre la membrana plasmática, compuesta por β -glucanos y quitina. La membrana plasmática está formada por una bicapa lipídica compuesta de fosfolípidos, esfingolípidos y ergosterol. Imagen modificada de Gow *et al.*, 2012.

La capa más interna está formada por fibras de quitina (1-2 % del peso seco de la pared) entrecruzadas con β -glucanos en uniones β -1,3 y β -1,6 (50-60 %), mientras que la capa externa está compuesta por fibras de mananos que se encuentran unidos a la capa interna mediante manoproteínas (Marcilla *et al.*, 1998, Klis *et al.*, 2001, Chaffin, 2008, Childers *et al.*, 2019). La quitina es esencial para mantener la integridad celular, mientras que los β -1,3-glucanos, más abundantes que los β -1,6-glucanos, sirven de soporte para las uniones de todos los componentes. La capa más externa está formada por polímeros de manosa que se encuentran asociados a proteínas de pared celular (CWP, *Cell Wall Proteins*) mediante enlaces O-glicosídico y N-glicosídico y, que junto a los fosfolipomananos (oligomanósidos asociados a moléculas de lípidos), suponen un 30-40 % del peso seco. Existen dos clases de manoproteínas en base a su unión a los polímeros de β -glucanos: las proteínas de anclaje a GPI (glicofosfatidilinositol) se encuentran unidas a los β -1,6-glucanos a través de este tipo de anclaje y son las más abundantes, o las denominadas proteínas Pir (*Proteins with Internal Repeats*) que se unen a β -1,3-glucanos mediante enlaces covalentes. Las proteínas de la

pared celular son responsables de la estructura de esta, pero también tienen un papel esencial en la resistencia a compuestos, en la adhesión e invasión del hospedador y en la adquisición de nutrientes. Aunque los componentes básicos de la pared celular siempre son los mismos, su abundancia y las proteínas que presentan cambian, por ejemplo, durante la transición levadura a hifa o con las condiciones de crecimiento (Hall, 2017). De este modo, cualquier alteración en su estructura puede desencadenar una respuesta inmunitaria diferente.

La membrana plasmática es una bicapa lipídica en la que se encuentran algunas proteínas responsables de la síntesis de los compuestos de pared, proteínas encargadas del transporte de solutos y receptores. La bicapa está formada por fosfolípidos y esfingolípidos, los cuales poseen unas cadenas de ácidos grasos que forman la parte hidrofóbica y unas cabezas polares que se encuentran expuestas al exterior, constituyendo la estructura básica de la membrana (Pan *et al.*, 2018). La membrana contiene además esteroides, mayoritariamente ergosterol, que mantienen la integridad celular y modulan la rigidez, permeabilidad y fluidez de esta (Lv *et al.*, 2016). Los esteroides y los esfingolípidos forman las balsas lipídicas, unos agregados que regulan rutas de señalización y que tienen un papel importante en la patogenicidad de este hongo (Mollinedo, 2012).

Algunos componentes de pared y de la membrana celular son un blanco para antifúngicos, ya que no se encuentran en células humanas y son esenciales para la viabilidad celular de las diferentes especies de *Candida* (Odds *et al.*, 2003, Bhattacharya *et al.*, 2020). Entre ellos, los azoles tienen un efecto fungistático a través de inhibición de la síntesis de ergosterol (Whaley *et al.*, 2016), mientras que las equinocandinas tienen un efecto fungicida a través de la inhibición de la síntesis de β -1,3-glucanos (Pristov & Ghannoum, 2019).

B. Polimorfismo

C. albicans es un hongo polimórfico, presentando diversas morfologías (Figura 2) que se relacionan con la virulencia, cambios del estado comensal, la capacidad de adaptación a condiciones del ambiente, el apareamiento y la evasión del sistema inmunitario del hospedador. Las morfologías tradicionales descritas son las levaduras (células blancas), las hifas, las pseudohifas y las clamidosporas (Sudbery *et al.*, 2004, Staib & Morschhauser, 2007, Sudbery, 2011). La transición entre la forma de levadura y las hifas (ver transición dimórfica) es considerada uno de los factores de virulencia más importantes, y ambas morfologías son consideradas necesarias para la patogénesis de este hongo (Lo *et al.*, 1997, Saville *et al.*, 2003, Jacobsen *et al.*, 2012). Las pseudohifas, que poseen una estructura elipsoide y se encuentran formadas por varias células que pueden llegar a

formar un micelio con una invaginación en el septo, también se han encontrado en tejidos infectados. Las clamidosporas, para las cuales no se ha determinado su función en la actualidad, poseen una forma esférica con una pared gruesa y se forman en células suspensoras en la parte más distal de filamentos.

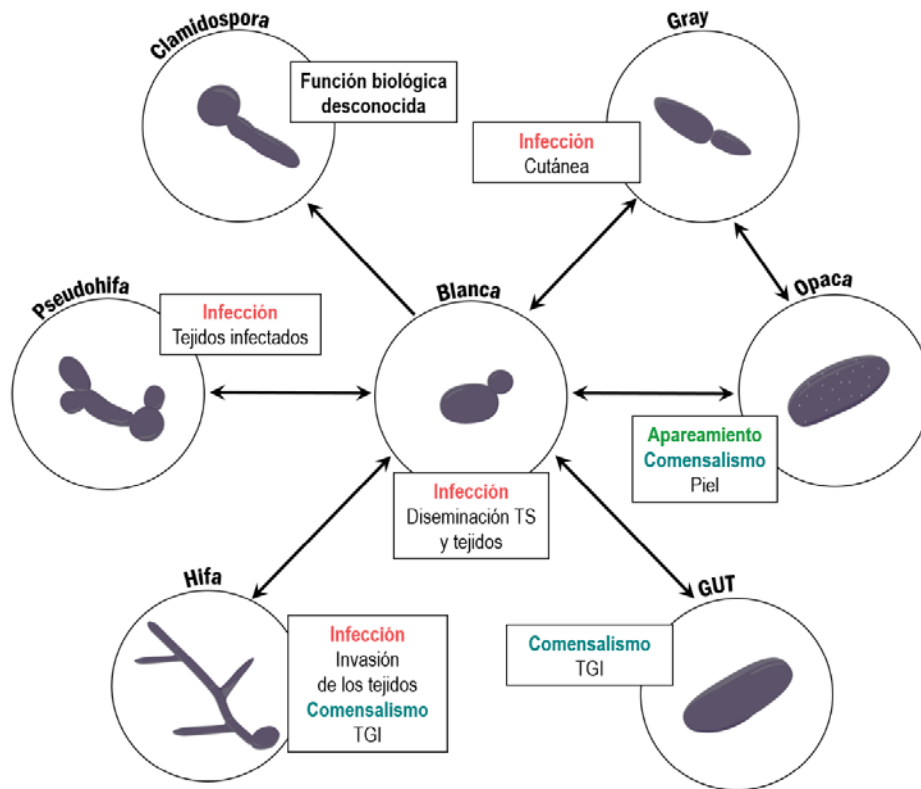


Figura 2. Cambios morfológicos y localización en el hospedador.

Las levaduras o células blancas son la forma unicelular ovalada con un tamaño de entre 4 y 6 μm ; son necesarias para la diseminación por el torrente sanguíneo (TS) y tejidos. Las células opacas, de mayor tamaño, presentan una forma más alargada y con protuberancias en su superficie; son las células competentes para el apareamiento, pero también presentan una mejor adecuación biológica como comensales en la piel. Las células gray tienen forma elipsoide y poseen un tamaño menor que las blancas, pero crecen mejor que estas y que las opacas en un modelo de infección *ex vivo* de lengua. Las células GUT poseen un tamaño similar a las opacas, pero carecen de las protuberancias; las señales del tracto gastrointestinal (TGI) desencadenan su formación, y reversion al fenotipo blanco si abandonan el hospedador. Las hifas y las pseudohifas son las formas multicelulares que se encuentran separadas por septos y forman filamentos largos, aunque las pseudohifas poseen invaginaciones en los septos que las diferencian de las primeras. Las hifas son las formas invasoras de los tejidos y se encuentran en como comensales en el TGI, y las pseudohifas se han encontrado en tejidos infectados. Las clamidosporas tienen una forma esférica y se forman en el extremo de los filamentos sobre células suspensoras, pero se desconoce su función biológica.

Además, este hongo puede cambiar reversiblemente entre las células blancas, opacas y gray; cada fenotipo expresa un perfil de transcripción distinto y la transición entre cada uno de los estados está dirigida principalmente por los factores de transcripción *Wor1* y *Efg1* (Tao *et al.*, 2014, Liang *et al.*, 2019). Las células opacas son la forma competente para el apareamiento en este hongo (ver transición célula blanca a célula opaca). Las células gray poseen características intermedias entre las blancas y las opacas, pero no son consideradas transitorias entre los dos estados. Poseen una mayor capacidad para aparearse comparadas con las células blancas, pero con una frecuencia menor que las opacas, y pueden causar infecciones cutáneas así como se han encontrado en órganos en modelos de infección diseminada. Por último, las células blancas pueden hacer la transición al fenotipo GUT (*Gastrointestinally-IndUced Transition*), que surge como consecuencia de la exposición de células silvestres blancas al tracto gastrointestinal (TGI) del ratón, generando un cambio dirigido a una mejor adaptación a las condiciones de esta localización (Pande *et al.*, 2013) (ver células GUT).

B.1. Transición dimórfica

Las levaduras y las hifas poseen diferentes mecanismos de adaptación al hospedador: la forma unicelular es más eficiente durante la diseminación por el torrente sanguíneo, mientras que la forma filamentosa es la forma invasiva con la que el hongo atraviesa los tejidos (Gow *et al.*, 2002, Saville *et al.*, 2003, Noble *et al.*, 2017). Las levaduras tienen forma ovalada y son unicelulares, ya que durante la gemación el núcleo se divide y la célula hija se separa de la madre por completo. Las hifas, en cambio, están compuestas por varias células separadas entre sí por septos paralelos construyendo filamentos largos y delgados denominados micelios. La habilidad de este hongo de cambiar su morfología entre levadura e hifa es crítica a la hora de invadir los tejidos, y las células que no son capaces de realizar este cambio son, en su mayoría, menos virulentas en modelos murinos de infección sistémica (Lo *et al.*, 1997). Dicha transición lleva asociada a cambios en la expresión génica, incluyendo genes que participan en la virulencia y en la biogénesis de la pared celular, modificando en consecuencia su interacción con el hospedador (Jacobsen *et al.*, 2012, Mukaremera *et al.*, 2017).

La filamentación es un proceso reversible e inducible en respuesta a distintas condiciones ambientales (Figura 3) como son el crecimiento a 37°C, cambios en el pH, condiciones de hipoxia, alta concentración de CO₂, la presencia de N-acetilglucosamina (GlcNac), el suero o bajos niveles de nitrógeno (revisado en Chen *et al.*, 2020). Existen varias rutas que activan genes específicos de la filamentación (Sudbery, 2011, Chen *et al.*, 2020); entre ellas destaca la ruta cAMP-PKA (*cyclic Adenosine Monophosphate – Protein kinase A*), donde en respuesta a ciertos estímulos el cAMP

activa a la PKA y al factor de transcripción Efg1, que activa a su vez a Flo8, e induce la expresión de genes específicos de filamentación.

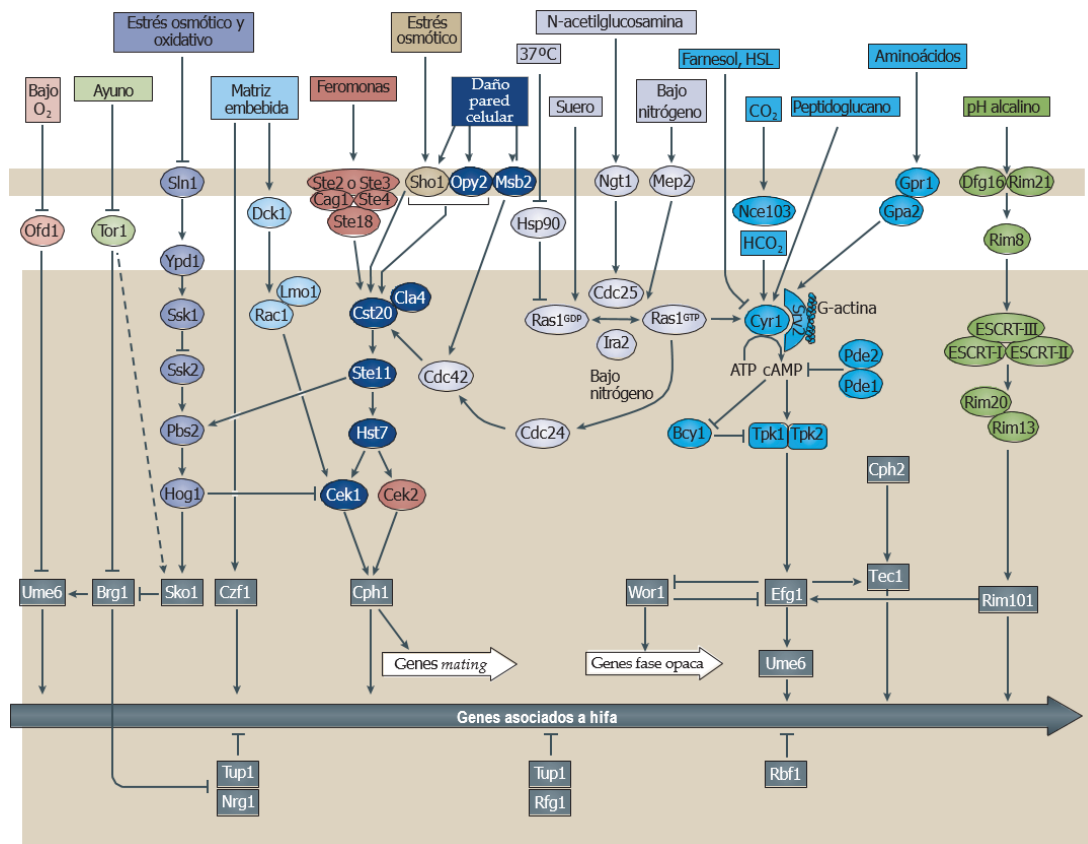


Figura 3. Señalización y regulación de la morfogénesis en *C. albicans*.

La ruta cAMP-PKA se activa mediante señales a través de la GTPasa Ras1 (crecimiento a 37°C, la presencia de suero o N-acetilglucosamina, bajo nitrógeno) y señales independientes de Ras1 (CO₂, presencia de peptidoglicano bacteriano, aminoácidos) desencadenando la formación de cAMP a partir de ATP mediante Cyr1 y activando a las subunidades Tpk1 y Tpk2 del complejo PKA. Una vez activado el complejo PKA, fosforila a Efg1 que activa la expresión de genes asociados a la filamentación y reprime la expresión de *WOR1* y de genes asociados a la fase opaca. Esta ruta es inhibida por farnesol y la homoserina lactona (HSL). La ruta Cek1 desencadena la cascada de fosforilación en respuesta al crecimiento en una matriz embebida, feromonas, estrés osmótico y baja concentración de nitrógeno. Cek1 fosforila a Cph1 induciendo la expresión de genes asociados a la filamentación, o en células opacas (a o α) Cek2 fosforila a Cph1 y activa la expresión de genes para el apareamiento o *mating*. La ruta HOG se activa en presencia de estrés osmótico y oxidativo a través de las proteínas adaptadoras Sln1 o Sho1 y que determina la fosforilación de la MAPK Hog1. Hog1 inhibe la filamentación a través de la inhibición de Cek1 o de Brg1 a través de Sko1. La ruta Rim101 se activa en respuesta a pH alcalino e inicia una cascada proteolítica que desencadena la escisión de Rim101 y la activación de Efg1. Las rutas Ofd1 y Tor1 se activan en respuesta a bajo oxígeno y ayuno respectivamente, y regulan la filamentación a través de los factores de transcripción Brg1 y Ume6. Figura modificada de Noble *et al.* 2017.

La ruta mediada por la MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) Cek1, donde esta se fosforila en respuesta a la baja concentración de nitrógeno o cuando existe en daño en pared entre otros

estímulos, activa a Cph1 que a su vez induce la expresión de estos genes. La filamentación también se induce en respuesta a un cambio del pH a neutro o alcalino y está mediado por Rim101 (Davis, 2003) y también en respuesta al crecimiento a través de una matriz sólida mediante la activación de Czf1 (Brown *et al.*, 1999). La regulación negativa de la filamentación ocurre a través de varios mecanismos, entre ellos los mediados por los heterodímeros Tup1-Nrg1 o Tup1-Rfg1 que se unen a los promotores de genes específicos de la filamentación inhibiendo su expresión (Braun, 1997, Braun & Johnson, 2000, Braun *et al.*, 2001, Murad *et al.*, 2001), pero también puede ocurrir a través de la fosforilación de Sko1 mediada por la MAPK Hog1 (Alonso-Monge *et al.*, 1999, Eisman *et al.*, 2006, Alonso-Monge *et al.*, 2010). *C. albicans* puede además regular la filamentación mediante mecanismos de *quorum sensing* cuando existe una alta densidad celular: el farnesol se acumula en el medio durante el crecimiento de las células inhibiendo la formación de hifas (Hornby *et al.*, 2001), mientras que otras moléculas como el tirosol acumulado la promueve (Chen *et al.*, 2004). Como se puede ver, el proceso de transición dimórfica es de gran relevancia en la biología del hongo y está sometido a una regulación compleja.

B.2. Transición célula blanca a célula opaca

C. albicans posee un ciclo parasexual mediante el cual determinadas células aparean dando lugar a tetraploides que más tarde recuperan la diploidía o aneuploidía (Hirakawa *et al.*, 2017). Para que las células puedan aparear, es necesario que se lleve a cabo la transición de célula blanca a célula opaca o *switching*, un programa epigenético que produce células opacas competentes para este proceso.

Los primeros cambios morfológicos en este hongo se observaron en cepas de laboratorio capaces de llevar a cabo hasta siete cambios fenotípicos distinguibles por su morfología colonial, y cuyo proceso ocurría de manera espontánea y a frecuencias elevadas (10^{-3}) (Slutsky *et al.*, 1985). Más tarde, el mismo equipo estudiando transiciones fenotípicas en aislamientos clínicos de pacientes con candidiasis sistémica describía los fenotipos blanco y opaco en la cepa WO-1 (Slutsky *et al.*, 1987). Este proceso fue denominado *white-opaque transition* o transición wo. Las colonias de ambos fenotipos se diferenciaban por tamaño, forma y color cuando crecían a 25°C; las colonias blancas tenían forma de semiesfera y se parecían a las formadas por cepas normales de laboratorio, mientras que las opacas tenían forma aplanada y una coloración más oscura. Cuando las colonias opacas se aislaban de nuevo en agar y se incubaban a 4°C o por encima de los 30°C, una parte de ellas revertía al fenotipo blanco mientras que otras mostraban sectores blancos y opacos. El estudio de la morfología celular (Anderson & Soll, 1987) desveló que las células opacas eran más grandes y alargadas, poseían una vacuola grande y presentaban protuberancias (*pimples*) en su superficie a

diferencia de las células blancas que eran más redondeadas y pequeñas (Figura 4A y B). Además, las colonias formadas por células opacas se teñían con floxina B, un colorante rojo fluorescente, mientras que las colonias blancas permanecían con su coloración normal (Figura 4C). El papel que desempeñaban estas células era desconocido hasta la descripción del *mating type locus* (*MTL*) (Hull & Johnson, 1999), de la capacidad de apareamiento de *C. albicans* (Hull *et al.*, 2000, Magee & Magee, 2000) y de los mecanismos moleculares que regulan esta transición (Miller & Johnson, 2002). Para que tenga lugar la transición de célula blanca a célula opaca es imprescindible que una célula heterocigota para el locus *MTL* (a/α) se convierta en homocigota (a/a o α/α). El locus *MTL* se encuentra en el cromosoma 5 y tiene dos alelos, *MTLa* y *MTL α* , los cuales codifican las proteínas reguladoras *Mtla1* y *Mtla2* o *Mtla α 1* y *Mtla α 2* respectivamente. El proceso puede ocurrir de manera natural por conversión génica, por recombinación o por pérdida de una copia del cromosoma 5 seguido de la duplicación de la copia que queda (Wu *et al.*, 2005). La transición también se induce en diferentes condiciones ambientales (Morschhauser, 2010), como son la incubación en condiciones de anaerobiosis (Ramirez-Zavala *et al.*, 2008), la presencia de CO₂ a niveles fisiológicos (Huang *et al.*, 2009), la presencia de GlcNAc producido principalmente por las bacterias del tracto gastrointestinal (Huang *et al.*, 2010) o mediante la delección de los genes *MTLa* o *MTL α* en sorbosa (Janbon *et al.*, 1999). A continuación, las células sufren un cambio epigenético que da lugar a la célula opaca. Cuando dos células opacas de sexo opuesto se encuentran pueden aparearse dando lugar a células tetraploides y, a diferencia de lo que ocurre en *Saccharomyces cerevisiae*, recuperan la diploidía no por meiosis sino por pérdida de cromosomas (Bennett & Johnson, 2005).

El principal regulador de esta transición es el factor de transcripción *Wor1* (Huang *et al.*, 2006, Zordan *et al.*, 2006), aunque *Efg1* y otras proteínas tienen también un papel determinante (Figura 4D). Las células blancas, heterocigotas para el locus *MTL* (a/α), reprimen la expresión de *WOR1* a través del heterodímero $a1/\alpha2$ (Lockhart *et al.*, 2002, Miller & Johnson, 2002) y mediante la expresión de *EFG1* uniéndose a las regiones 5' por delante del ORF de *WOR1* (Sriram *et al.*, 2009, Lassak *et al.*, 2011). Esta represión no es total y *Wor1* permanece en niveles bajos en las células blancas, de forma que cuando una población comienza a acumular *Wor1* de manera aleatoria, se produce la transición. Este proceso se encuentra autorregulado: las células opacas, homocigotas para el locus *MTL* (a/a o α/α), expresan *WOR1* que se une a su propio promotor activando su propia síntesis, y a las regiones 5' por delante del ORF de *EFG1* inhibiendo su expresión (Zordan *et al.*, 2007). La expresión ectópica de *WOR1* en células a/α también desencadena la transición a célula opaca proporcionando un fenotipo estable en el tiempo, mientras que la delección de *WOR1* impide dicha transición bloqueando a las células en el fenotipo blanco (Huang *et al.*, 2006).

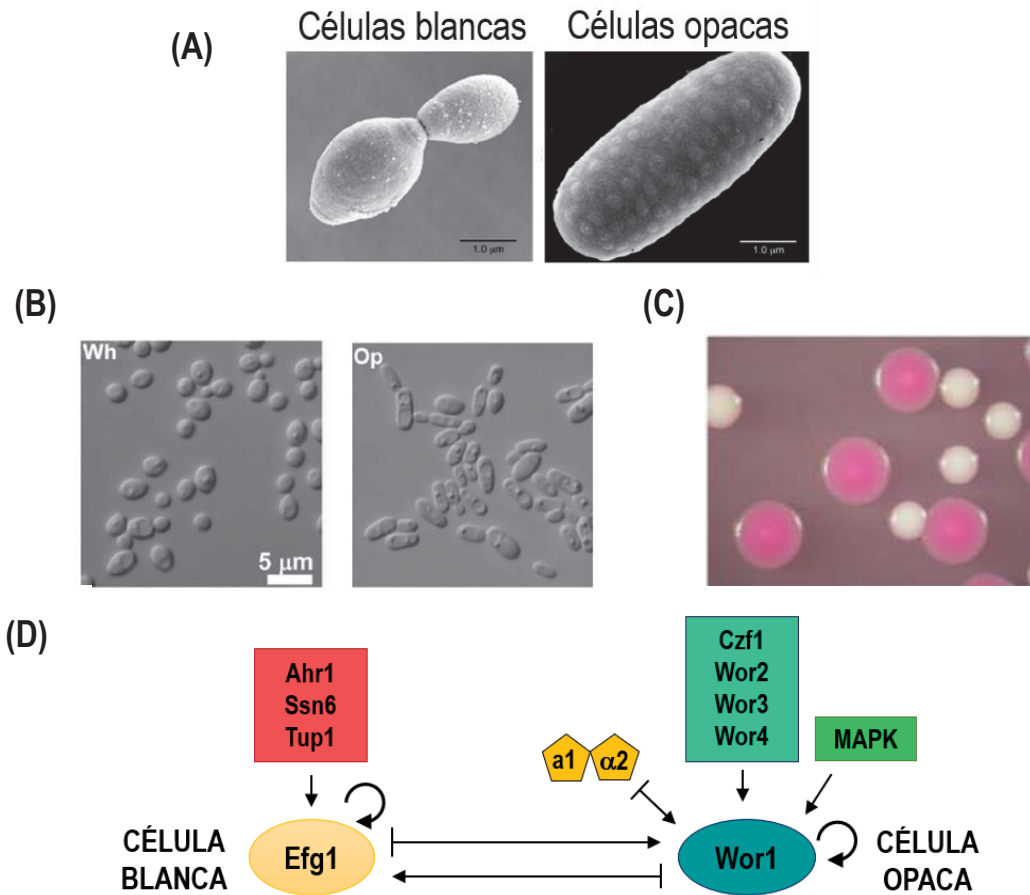


Figura 4. Transición wo: regulación del cambio morfológico de célula blanca a opaca.

(A) Micrografías en microscopio electrónico de barrido donde se aprecian las morfologías de las células blancas y opacas, estas últimas más grandes y con protuberancias en su superficie (Soll, 2014). (B) Fotografías al microscopio de células blancas (Wh) y opacas (Op) (Xie *et al.*, 2013). (C) Colonias blancas y opacas sobre agar floxina B (Morschhauser, 2010). Las colonias opacas son aplanadas y se tiñen de rosa intenso en presencia de este colorante. (D) Transición célula blanca a célula opaca y sus reguladores. Efg1 y el heterodímero $\alpha 1$ - $\alpha 2$ reprimen la expresión de *WOR1* manteniendo el fenotipo blanco con la ayuda de otras proteínas reguladoras. Bajo ciertas circunstancias, células homocigotas para el locus *MTL* comienzan a expresar *WOR1* e inhiben la expresión de *EFG1*, y a su vez, varias proteínas reguladoras controlan la estabilidad del fenotipo opaco.

Existen otros factores de transcripción reguladores de esta transición y que estabilizan ambos fenotipos. Por un lado, Wor2, Wor3, Czf1 y Wor4 contribuyen a mantener el fenotipo opaco (Vinces & Kumamoto, 2007, Zordan *et al.*, 2007, Lohse *et al.*, 2013, Lohse & Johnson, 2016). Por otro lado, el fenotipo blanco es estabilizado por ¹⁾ Ahr1 de manera dependiente de Efg1 (Wang *et al.*, 2011), por ²⁾ Ssn6 (una proteína adaptadora que no se une al DNA a diferencia del resto) que actúa reprimiendo genes inductores de la fase opaca manteniendo una baja expresión de *WOR1* (Hernday *et al.*, 2016)

y por ³) Tup1 que se une a la misma región del promotor de *WOR1* que ocupa *Wor1* para su propia autorregulación (Alkafeef *et al.*, 2018). El fenotipo blanco y opaco está controlado por estas proteínas reguladoras, donde cada una controla su propia expresión y la de las otras (Frazer *et al.*, 2020), aunque existen otras proteínas auxiliares y modificadoras de histonas que también regulan la transición (Qasim *et al.*, 2021).

Las rutas de transducción de señales mediadas por MAPK también parecen estar implicadas en la transición célula blanca a célula opaca. Nuestro grupo de investigación observó que los mutantes en la MAPK Hog1 que han permanecido 8 días en agar YPD a temperatura ambiente forman colonias blancas con sectores opacos, sugiriendo que de manera espontánea habían llevado a cabo la transición (I. Correia, Tesis Doctoral). Esta observación está en concordancia con trabajos posteriores donde se describieron que la delección de *SSK2*, *PBS2* u *HOG1* de la ruta HOG en células *a/a* o α/α desencadena el paso de célula blanca a célula opaca, aunque estas células presentan deficiencias en las proyecciones que se forman durante el apareamiento. La transición *wo* en mutantes *hog1* depende de la presencia de *Wor1*, ya que la delección de *WOR1* en fondo *hog1* impide esta conversión de morfologías. Otros trabajos han ampliado y mostrado la complejidad de proceso (Chang *et al.*, 2016, Scaduto *et al.*, 2017, Correia *et al.*, 2020).

Las células blancas y las opacas poseen distintos programas transcripcionales que generan cambios en el apareamiento y en su morfología, pero también en su metabolismo y en su respuesta a señales del ambiente que influyen directamente en su interacción con el hospedador. Las células blancas son más virulentas en un modelo de infección sistémica (Kvaal *et al.*, 1997), mientras que las células opacas infectan mejor la piel llegando a formar cavidades en el epitelio (Kvaal *et al.*, 1999). Además, las células opacas no inducen la liberación de quimiocinas, son más resistentes a la acción de fagocitos y poseen menor capacidad de invadir tejidos en un modelo de infección en comparación con las blancas (Kolotila & Diamond, 1990, Lohse & Johnson, 2008, Sasse *et al.*, 2013, Solis *et al.*, 2018). Los ensayos de colonización gastrointestinal en ratones indican que tanto *Wor1* como *Efg1* poseen un papel en la adaptación al estado comensal: mientras que los mutantes *efg1* son capaces de desplazar a una cepa silvestre cuando compiten por establecerse, los mutantes *wor1* se pierden (Pierce & Kumamoto, 2012, Pande *et al.*, 2013).

3. *C. albicans*: de organismo comensal a patógeno

A. Modelos *in vivo* para el estudio de *Candida* como patógeno y como comensal

El empleo de modelos animales ha permitido simular con ciertas limitaciones el proceso de interacción entre *C. albicans* y el hospedador. El estudio de estas interacciones en animales ha avanzado gracias a la disponibilidad de cepas mutantes de *C. albicans* en genes de interés, como son factores de transcripción o factores de virulencia, así como la aplicación de técnicas genéticas como *microarrays* que permiten conocer la expresión de múltiples genes a la vez. Los análisis sobre invertebrados han permitido que se genere una gran cantidad de datos al ser un modelo relativamente económico y no está restringido por las consideraciones éticas a las que sí están sujetos los estudios en mamíferos (Arvanitis *et al.*, 2013). Sin embargo, el modelo de invertebrado tiene limitaciones, pues aunque poseen un sistema inmunitario innato, carecen de sistema adaptativo (Muller *et al.*, 2008). De cualquier modo, algunos modelos invertebrados han resultado esenciales para el estudio de la patogénesis de este hongo, como los llevados a cabo en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* para estudiar los factores de virulencia de *C. albicans* y compuestos con actividad antifúngica (Breger *et al.*, 2007, Pukkila-Worley *et al.*, 2009), pero también los realizados en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* o en larvas del gusano de la cera *Galleria mellonella*, que tiene la ventaja de permitir trabajar a 37°C, la temperatura natural en mamíferos (Fuchs *et al.*, 2010).

El uso de mamíferos como ratas, ratones, hámster o primates (Samaranayake & Samaranayake, 2001, Cassone & Sobel, 2016) requiere una justificación que demuestre los beneficios de dicho estudio, con el menor impacto sobre los animales en base a unos fundamentos éticos. De entre los modelos mamíferos, el murino ha sido usado desde hace muchos años (de Repentigny, 2004). El modelo murino presenta ventajas como la disponibilidad de gran variedad de ratones modificados genéticamente (transgénicos y *knockout*), que son animales fácilmente manejables en el laboratorio y que la toma de muestras es relativamente sencilla. Además, los ratones no están colonizados de forma natural por *C. albicans* (a diferencia de primates o ratas) y por lo tanto no existe una respuesta inmunitaria previa frente al hongo (Samaranayake & Samaranayake, 2001).

Dada la similitud anatómica e inmunológica del ser humano con el ratón se han desarrollado modelos para el estudio de candidiasis sistémica, orofaríngea y vulvovaginal (Csank *et al.*, 1998, Alonso-Monge *et al.*, 1999, Fidel *et al.*, 2000, MacCallum & Odds, 2005, Rahman *et al.*, 2007, Conti *et al.*, 2014); sin embargo, los sistemas inmunitarios del ratón y del ser humano presentan algunas diferencias tanto

en la inmunidad innata como en la adaptativa que hay que tener en cuenta a la hora de extrapolar los resultados (Mestas & Hughes, 2004). Los modelos murinos en los que se inducen infecciones en la mucosa oral y vaginal e infecciones sistémicas han permitido estudiar los mecanismos de patogenicidad de este hongo (revisado en Segal & Frenkel, 2018). Los modelos de candidiasis orofaríngea requieren la inmunosupresión de los ratones (Kamai *et al.*, 2001), la extirpación de las glándulas salivares para producir xerostomía que prolonga la colonización (Totti *et al.*, 2002) o la administración de estrógenos (Rahman *et al.*, 2007). Los modelos de infección vaginal implican la inoculación intravaginal durante el ciclo estral para hacer un seguimiento de las UFC (unidades formadoras de colonias) en los fluidos vaginales o la escisión de la vagina seguida de la inoculación de las levaduras (Fidel Jr. *et al.*, 1995, Harriott *et al.*, 2010). En este último, y al contrario que ocurre en ratas, no es necesaria la ovariectomía para inducir la infección, siendo solo necesaria la administración de estrógenos para inducir el ciclo estral (Cassone & Sobel, 2016). La infección sistémica puede ser inducida mediante la inoculación del hongo en la vena lateral de la cola del ratón (MacCallum *et al.*, 2009, Lionakis *et al.*, 2011) o mediante una inyección intraperitoneal (Levy *et al.*, 1981), y aunque la entrada de este hongo por esta última vía es poco común, ha permitido identificar numerosos factores de virulencia mediante el seguimiento del establecimiento de este hongo en los diferentes órganos y la cuantificación de sus tasas de mortalidad.

La colonización gastrointestinal en modelos murinos permite el establecimiento en el TGI y, en caso de que se requiera, la translocación al torrente sanguíneo para generar una diseminación sistémica (Sandovsky-Losica *et al.*, 1992). *C. albicans* puede colonizar el estómago, intestino delgado, ciego y colon de ratones (Witchley *et al.*, 2019). Sin embargo, el modelo murino de colonización del TGI requiere reducir la microbiota bacteriana generalmente mediante el tratamiento antibiótico (Tansho *et al.*, 2004, Koh, 2013), que se usen ratones gnotobióticos (Balish *et al.*, 1990), que se modifique la dieta del ratón (Yamaguchi *et al.*, 2005) o modificar el sistema inmunitario del ratón para conseguir que *C. albicans* se establezca de forma estable en el TGI (revisado en Prieto *et al.*, 2016). Este modelo permite determinar qué elementos son esenciales para que este hongo se establezca como comensal sin producir daño o qué factores de la inmunidad del hospedador son necesarios para prevenir la candidiasis invasiva de origen endógeno. La alternativa a los modelos *in vivo* supone el uso de modelos *ex vivo* mediante el empleo de los tejidos u órganos de los animales tras su sacrificio, y supone una herramienta interesante para conocer los niveles de colonización, para llevar a cabo ensayos de adhesión o conocer el daño en tejido.

B. Factores implicados en el establecimiento en el TGI

B.1. Adhesión al hospedador

La adhesión a las células del hospedador sucede a través de interacciones de proteínas de adhesión del propio hongo y a receptores del epitelio (Moyes *et al.*, 2015). Las células de *C. albicans* se adhieren entre sí y al hospedador mediante unas proteínas denominadas genéricamente adhesinas, cuya expresión es diferente en levaduras e hifas (Chaffin, 2008). El contacto de las levaduras con una superficie desencadena la filamentación (tigmotropismo), y con ello la expresión de proteínas de adhesión específicas de hifas (Kumamoto, 2008, de Groot *et al.*, 2013).

Unas de las familias de adhesinas más conocidas son las glicoproteínas Als (*Agglutinin-Like Sequence*) que se encuentran asociadas a los β -1,6-glucanos de la pared celular (Hoyer *et al.*, 2008, Hoyer & Cota, 2016). Existen ocho proteínas Als (Als1 a 7 y Als9), de las cuales Als1 y Als3 son especialmente importantes durante el desarrollo de una infección y están reguladas por Efg1 (Leng *et al.*, 2001, Fu *et al.*, 2002). Als3 resulta particularmente interesante ya que interviene en varios procesos esenciales en la interacción con el hospedador. Además de su papel como adhesina, es considerada una invasina, promoviendo la endocitosis del hongo mediante su unión a través del dominio N-terminal a la E- y N-cadherina de las células del epitelio y endotelio respectivamente (Phan *et al.*, 2007), e induciendo la penetración activa del hongo (Wachtler 2012). Participa en la adquisición de hierro a través de la unión a ferritina del hospedador (Almeida *et al.*, 2008) y en la formación de biopelículas (Zhao *et al.*, 2006), esenciales en la adhesión a materiales abióticos como catéteres que son fuente primaria de infección sistémica por *C. albicans*. Tanto Als1 como Als3 han sido usadas en el desarrollo de vacunas como estrategia profiláctica frente a una candidiasis diseminada; así se ha demostrado que el extremo N-terminal recombinante de Als1 (rAls1p-N) protege a ratones en modelos de candidiasis diseminada y en menor medida en modelos de candidiasis orofaríngea (Ibrahim *et al.*, 2003, Spellberg *et al.*, 2005). Por su parte, la vacuna basada en el extremo N-terminal recombinante de Als3 (rAls3p-N) también es efectiva frente a una candidiasis diseminada, pero es más efectiva en una candidiasis orofaríngea y vaginal (Spellberg *et al.*, 2006).

Otra de las proteínas implicadas en adhesión es Hwp1 (*Hyphal Wall Protein 1*), que pertenece a la familia de las proteínas Hwp y cuya expresión se encuentra también regulada por Efg1 (Sharkey *et al.*, 1999, Braun *et al.*, 2000, Sohn *et al.*, 2003). Tiene un papel en la virulencia de este hongo, ya que media en la unión a las células al hospedador, pero también es necesaria durante el proceso de apareamiento y de formación de biopelículas (Ene & Bennett, 2009). Por último cabe destacar la

familia Hyr, a la que pertenece la adhesina Hyr1 que se regula también a través de Efg1 (Sohn *et al.*, 2003). Esta adhesina participa en la adhesión entre células de *C. albicans* y de estas al hospedador, y es necesaria para la supervivencia del hongo frente al ataque de los neutrófilos (Luo, 2010).

B.2. Papel de las mucosas del hospedador

El mucus constituye un importante mecanismo de inmunidad innata a nivel del tracto gastrointestinal. Este es secretado por las células del epitelio intestinal formando la superficie mucosa, y además de proveer de lubricación e hidratación a las células del epitelio, supone una primera línea de defensa del hospedador frente a microorganismos patógenos como *C. albicans* (Yan *et al.*, 2013, Bakshani *et al.*, 2018). Su presencia en el intestino supone una barrera mecánica y química que favorece el establecimiento y/o expulsión de microorganismos, impidiendo su adhesión al epitelio y limitando la penetración de patógenos a tejidos internos, así como regulando el sobrecrecimiento de microorganismos comensales por su acción antimicrobiana sobre muchos de ellos. Defectos en la producción o composición del mucus están asociados con el desarrollo de enfermedades en humanos y con disbiosis, con el posterior desarrollo de infecciones (Wagner *et al.*, 2018, Schroeder, 2019).

Las mucinas son los componentes mayoritarios del mucus. Se trata de macromoléculas altamente glicosiladas que aportan las propiedades viscosas del mucus formando una barrera física y proveen una matriz para una gran variedad de péptidos antimicrobianos e inmunoglobulinas secretadas como la IgA (sIgA), esencial en la respuesta adaptativa en mucosas. Asimismo, las mucinas participan en la adhesión de los microorganismos, son importantes reguladores de factores de virulencia microbianos y suponen una fuente de nutrientes para estos (Arevalo & Nobile, 2020). La familia de genes *MUC* codifica más de 20 mucinas, cuya expresión es específica de tejidos y que se clasifican en mucinas secretadas y asociadas a membranas (revisado en Cornfield, 2015). El conocimiento del papel de las mucinas en el control de la colonización e infecciones fúngicas no es tan amplio como en el caso de las bacterias, pero existen varios trabajos que demuestran su papel en aspectos relevantes tanto en el comensalismo como en la virulencia de *C. albicans*. Así, se sabe que las mucinas regulan la morfología y la fisiología de *C. albicans* a través de la inhibición de la expresión de genes relacionados con la adhesión, filamentación, formación de biopelículas y producción de proteasas limitando la habilidad de este hongo de adherirse e invadir los tejidos, pero permitiéndole establecerse como comensal (Naglik *et al.*, 2004, Kavanaugh *et al.*, 2014, Basmaciyan *et al.*, 2019). *C. albicans*, por su parte, posee mecanismos para evadir el efecto de las mucinas; por ejemplo, libera la proteína mucinolítica Sap2 degradando el mucus y permitiendo así que penetre a través de este y pueda adherirse a las células epiteliales e invadir el tejido (Colina *et al.*, 1996). También se ha descrito

que la proteína de superficie Msb2, que participa en la señalización durante el crecimiento y en la integridad de pared, es también liberada protegiendo de la acción de los péptidos antimicrobianos LL-37 e histatina-5 que se encuentran en el mucus (Swidergall *et al.*, 2013).

B.3. Formación de biopelículas

C. albicans puede formar unas estructuras denominadas biopelículas formadas por levaduras, pseudohifas e hifas embebidas en una matriz extracelular compuesta por proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos (Nett & Andes, 2006, Zarnowski *et al.*, 2014). Las biopelículas protegen a las células de la acción de antimicrobianos y de la acción de las células del sistema inmunitario del hospedador (revisado en Nobile & Johnson, 2015). Estas estructuras pueden formarse en superficies bióticas, como la boca o el tracto genitourinario, y abióticas como catéteres o válvulas cardíacas, dando lugar a una continua diseminación de células por el torrente sanguíneo y generando infecciones sistémicas en tejidos y órganos (Ramage *et al.*, 2006, Tsui *et al.*, 2016). Su formación está regulada por los reguladores transcripcionales Efg1, Tec1, Bcr1, Ndt80, Brg1 y Rob1, donde cada uno de ellos controla a su vez la expresión de los otros y la de un gran número de genes (aproximadamente 1000) formando un circuito de transcripción muy complejo (revisado en Gulati & Nobile, 2016). Para su formación es necesario que primero las células levaduriformes se hayan adherido entre sí y al epitelio formando una capa basal, y que consecuentemente proliferen pseudohifas e hifas; seguidamente las células secretan la matriz extracelular, generando una biopelícula madura y estructurada a través de la cual se dispersan levaduras para llegar a otras localizaciones (Lohse *et al.*, 2018).

Existen datos que indican que las biopelículas protegen a *C. albicans* del ataque del hospedador. La presencia de glucanos libres en la matriz extracelular inhibe la activación de los neutrófilos (Xie *et al.*, 2013) (ver evasión del sistema inmunitario del hospedador). Las biopelículas son, además, resistentes a la mayoría de los antifúngicos usados comúnmente para tratar las infecciones; por ejemplo, las células que se encuentran embebidas en biopelículas maduras inducen la expresión de transportadores de tipo ABC (*ATP binding cassette*) o de tipo MFS (*Major facilitator superfamily*) (Ramage *et al.*, 2002) contribuyendo a su resistencia a azoles, y aumentan la expresión de genes que participan en la biosíntesis de ergosterol, incrementando su resistencia a azoles (García-Sánchez *et al.*, 2004, Nett *et al.*, 2009). Las células que se diseminan a partir de estas biopelículas son denominadas células persistentes, y poseen mayor virulencia ya que son más resistentes a antifúngicos, mejoran su capacidad de adhesión, de filamentación y de formación de biofilms (Uppuluri *et al.*, 2010).

C. Adaptación al tracto gastrointestinal

A su paso por el TGI, las células de *C. albicans* se exponen a señales y condiciones ambientales que generan una respuesta adaptativa crucial para su establecimiento, y muchas de estas señales inducen el paso de levadura a hifa. Como se ha mencionado, la filamentación mejora la adhesión y la invasión de las células a través de los tejidos del hospedador, sin embargo, como comensal, debe causar el menor daño posible a este. Existen estudios que demuestran que *C. albicans* se encuentra tanto en forma de levadura como de hifa cuando habita como comensal en el TGI del ratón (Witchley *et al.*, 2019), aunque otros autores muestran que la forma predominante es la levadura, siendo esta presumiblemente la forma más adaptada al TGI (Vautier *et al.*, 2015). De hecho, mutantes defectuosos en filamentación, como son aquellos que afectan a factores de transcripción que regulan la dicho proceso como Efg1, Ume6, Brg1, Rob1 o Flo8 son menos virulentos en modelos murinos de diseminación, pero son mejores colonizadores del TGI en modelos de co-colonización (Lo *et al.*, 1997, Pierce & Kumamoto, 2012, Tso *et al.*, 2018, Witchley *et al.*, 2019). Por el contrario, mutantes en otros factores como Tup1, Nrg1 o en la MAPK Hog1, que resultan ser hiperfilamentosos o que tienen tendencia a filamentar, son también menos virulentos pero colonizan a niveles más bajos o son incapaces de establecerse en modelos murinos de co-colonización del TGI (Alonso-Monge *et al.*, 1999, Murad *et al.*, 2001, Prieto *et al.*, 2014, Vautier *et al.*, 2015, Roman *et al.*, 2018). Dado que muchos de los reguladores de la transición morfológica también controlan la expresión de otros genes que intervienen en la adhesión, la producción de factores de virulencia o el metabolismo, como es el caso de Hog1, es necesario determinar cuáles son los cambios verdaderamente importantes y que le aportan a este hongo versatilidad.

C.1. Interacción con la microbiota del hospedador

La microbiota del hospedador es esencial para el mantenimiento de un adecuado estado de salud. Los microorganismos del intestino degradan ciertos componentes de la dieta y llevan a cabo una serie de reacciones metabólicas que resultan en productos esenciales para el ser humano, como son la vitamina B12 y la vitamina K, la modificación de esteroides para su posterior absorción, la síntesis de ácidos grasos de cadena corta o la fermentación de determinados componentes de la dieta que de otra forma no podrían digerirse. Además ejercen una importante función protectora en el desarrollo y mantenimiento de un sistema inmunitario competente, con un papel muy importante en la protección frente a patógenos por un proceso que se denomina resistencia a la colonización, inhibiendo tanto el establecimiento de nuevos microorganismos como el sobrecrecimiento de los ya existentes en esta

localización por competición por los nutrientes, la ocupación de zonas de unión al epitelio y la liberación de sustancias antimicrobianas (Lawley & Walker, 2012).

C. albicans como comensal comparte espacio principalmente con bacterias y otros hongos, suponiendo estos últimos solo el 0,1 % del total (Qin *et al.*, 2010, Underhill & Iliiev, 2014). Las diferentes porciones del TGI presentan condiciones variables y, por lo tanto, hay distintas comunidades microbianas que lo cohabitan. A lo largo de este existe diferente concentración de oxígeno, se secretan sustancias antimicrobianas como defensinas o las propias sales biliares y existen cambios en el pH. De este modo, el estómago y la parte más proximal del intestino delgado cuentan con una menor diversidad y con un tiempo de tránsito de los microorganismos más corto, mientras que el intestino grueso, y en concreto el colon, presenta una mayor diversidad microbiana sobre todo de anaerobios facultativos (Zoetendal *et al.*, 2012, Donaldson *et al.*, 2016). Existen ciertas bacterias que crean interacciones que resultan beneficiosas para el hospedador e impiden la colonización por *C. albicans*; así, *Enterococcus faecalis* produce una bacteriocina que inhibe la filamentación de *C. albicans*, disminuyendo su virulencia y su capacidad de formación de biopelículas (Graham *et al.*, 2017). Las bacterias comensales de los grupos Firmicutes y Bacteroidetes protegen de una infección por *C. albicans* en un modelo murino (Fan *et al.*, 2015), y diferentes especies de *Lactobacillus* inhiben la filamentación y la formación de biopelículas (Matsubara *et al.*, 2016, Graf *et al.*, 2019). De hecho, algunas especies de *Lactobacillus* son utilizadas como probióticos, ya que su administración oral en neonatos previene la colonización gastrointestinal de especies del género *Candida* (Manzoni *et al.*, 2006). El uso de levaduras probióticas como *Saccharomyces boulardii*, *S. cerevisiae* e *Issatchenkia occidentalis* frente al establecimiento de distintas especies de *Candida* ha sido demostrado en modelos *in vitro* e *in vivo*, sin embargo, solo la primera es comercializada como probiótico en la actualidad (Kunyeit *et al.*, 2020, Pais *et al.*, 2020).

C.2. Células GUT: papel de Wor1 en la adaptación al estado comensal

La supervivencia de *C. albicans* como organismo comensal en el hospedador depende de la puesta en marcha de múltiples mecanismos regulados por un circuito complejo de genes, y le otorga a este hongo una gran capacidad de adaptarse a los diferentes nichos. La exposición a las condiciones del TGI, en concreto, genera una serie de señales que desencadenan una transición epigenética dirigida principalmente por Wor1. La relación de este factor de transcripción con el estado comensal se puso de manifiesto con la descripción de las células GUT (Pande *et al.*, 2013). En este trabajo se demostró que la administración intragástrica de células blancas de *C. albicans* en un modelo murino de

colonización gastrointestinal desencadena cambios fenotípicos y funcionales optimizados a dicho ambiente. Estas células, conocidas como células GUT, poseen una mayor expresión de *WOR1*, son similares a las células opacas en tamaño y forma, carecen de protuberancias en su superficie, no responden a feromonas y aparean con una frecuencia muy inferior a esta. El análisis de su transcriptoma indica que poseen adaptaciones relacionadas con las condiciones específicas de este nicho, como son una reorientación de su metabolismo celular a las fuentes de carbono disponibles en el intestino, con un aumento de genes relacionados con el catabolismo de ácidos grasos y de GlcNac, y una disminución de aquéllos involucrados en el catabolismo de la glucosa, de genes relacionados con la adquisición de hierro y de genes asociados a la adhesión. La exposición a señales específicas del TGI parecen mantener el fenotipo GUT, aunque una vez se recuperan las células del ratón, estas revierten al fenotipo blanco ya que es un proceso reversible y específico del nicho.

D. Adaptación metabólica y nutricional en el hospedador

La flexibilidad metabólica y la capacidad de adquirir nutrientes bajo una gran diversidad de situaciones son esenciales para que *C. albicans* se establezca como comensal o como patógeno en el hospedador. La regulación de las diferentes rutas que regulan la adquisición y la asimilación de diferentes fuentes de carbono o de macro y micronutrientes como el nitrógeno, fosfato o el hierro proveen a este hongo de múltiples posibilidades a la hora de establecerse y de hacer frente al estrés que pueden producir cambios en su biodisponibilidad (Miramon & Lorenz, 2017, Gerwien *et al.*, 2018, Rutherford *et al.*, 2019).

D.1. Metabolismo de fuentes de carbono

Al igual que otros hongos patógenos, este hongo es capaz de asimilar tanto fuentes de carbono fermentables (glucosa, fructosa o galactosa) como no fermentables o alternativas (aminoácidos, lípidos y ácidos orgánicos) proporcionándole una ventaja a la hora de colonizar diferentes localizaciones (Figura 5) (Sandai *et al.*, 2013, Miramon & Lorenz, 2017).

Mientras que la glucosa es un nutriente abundante en sangre, se encuentra en muy baja concentración en órganos como el intestino donde es absorbida por el hospedador. La glucosa es la fuente de carbono utilizada preferentemente para generar energía, pero las fuentes de carbono alternativas como el acetato, lactato o citrato pueden ser asimiladas mediante la β -oxidación de ácidos grasos, el ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis para dar lugar a azúcares necesarios para los

procesos vitales. La disponibilidad de fuentes de carbono y la capacidad de asimilar fuentes de

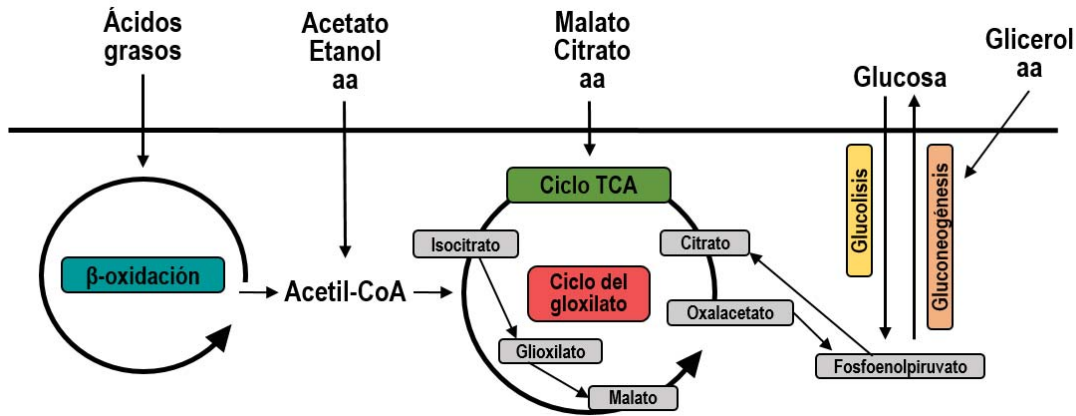


Figura 5. Rutas metabólicas para la asimilación de fuentes de carbono en *C. albicans*.

Los ácidos grasos son metabolizados por la β -oxidación en peroxisomas generando acetil-CoA. El acetato, el etanol o ciertos aminoácidos (aa) entran en la célula y se genera acetil-CoA en el citoplasma. El acetil-CoA entra en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) en la mitocondria, generando intermediarios que después por la gluconeogénesis dan lugar a la glucosa. El ciclo del glioxilato es una alternativa al TCA, y acorta este ciclo mediante el uso de isocitrato y genera malato. El malato, el citrato y otros aminoácidos también pueden entrar en la célula para abastecer al TCA de intermediarios, así como el glicerol y aminoácidos pueden usarse durante la gluconeogénesis. La glucosa se metaboliza en la glucólisis y es la vía preferente para generar energía.

carbono alternativas afectan a procesos tan importantes como el crecimiento, el apareamiento, a la composición de su pared, a su patogenicidad, a la morfología de las células e incluso a su resistencia o susceptibilidad a diferentes tipos de estrés y, en consecuencia, a la capacidad de *C. albicans* de comportarse como comensal y/o patógeno (Ene *et al.*, 2012, Lok *et al.*, 2020). Así, enzimas del ciclo del glioxilato (Icl1), de la glucólisis (Pyk1) y de la gluconeogénesis (Pck1) son necesarias para la virulencia en modelos murinos de candidiasis sistémica (Lorenz & Fink, 2001, Barelle *et al.*, 2006). Durante el curso de una infección y tras la fagocitosis, *C. albicans* se encuentra en un ambiente bajo en glucosa y reprograma su metabolismo hacia la β -oxidación, el ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis mediante un aumento de la expresión de genes que codifican las enzimas isocitrato liasa (Icl1) y malato sintasa (Mls1) del ciclo del glioxilato, y reprimiendo genes que codifican enzimas de la glucólisis (Lorenz *et al.*, 2004). Es por ello que mientras que el ciclo del glioxilato es necesario para la virulencia (Lorenz & Fink, 2001), la β -oxidación no lo es, ya que mutantes carentes en Fox1,

una enzima necesaria para el proceso, muestran defectos en el modelo murino de candidiasis sistémica (Piekarska *et al.*, 2006).

La transición célula blanca a célula opaca también conlleva cambios en el metabolismo. Los análisis mediante *microarrays* de células blancas y opacas de la cepa WO-1 crecidas en glucosa señalan que existe un perfil de expresión de genes diferente relacionado con el aprovechamiento de fuentes de carbono (Lan *et al.*, 2002). Las células opacas disminuyen la expresión de transportadores de glucosa y enzimas de la glucólisis y aumentan las que están relacionadas con el ciclo de Krebs, la β -oxidación, el metabolismo de aminoácidos, la degradación de ciertos carbohidratos y algunos transportadores de fosfato en comparación con las células blancas. Todo ello se correlaciona con la mayor adaptación que presentan las células opacas a ambientes ricos en carbohidratos, azúcares libres y lípidos como es el TGI, o estos últimos especialmente en la piel (Miramon & Lorenz, 2017). Tal y como hemos comentado, el paso por el TGI del ratón lleva asociado la generación de células más adaptadas y que poseen un patrón similar al de las células opacas. Dicha adaptación conlleva un aumento de la expresión de enzimas del ciclo del glioxilato y de la β -oxidación, y disminuyendo enzimas de la glucólisis (Pande *et al.*, 2013).

D.2. Homeostasis de hierro

La habilidad de *C. albicans* para adaptarse al hospedador depende tanto de su capacidad de regular la adquisición de metales como de la detoxificación de estos en ambientes donde aumenta su abundancia. El hierro, el cobre y el zinc entre otros son esenciales para el proceso de infección, ya que son cofactores de proteínas que están directamente relacionadas con la virulencia (Gerwien *et al.*, 2018). El hierro, en concreto, participa en procesos esenciales como el transporte de oxígeno y de electrones o la descomposición de peróxidos (Pierre *et al.*, 2002), y sirve como señal para regular la expresión de genes relacionados con la función mitocondrial, de hidrolasas, de adhesinas y de genes que participan en la remodelación de la pared celular (Lan *et al.*, 2004, Puri *et al.*, 2014). De este modo, se ha descrito que la alta concentración hierro modula la composición de la pared celular disminuyendo los niveles de mananos y de quitina e incrementando el contenido de β -1,3-glucanos, aumentando su exposición al reconocimiento de los fagocitos y mejorando su resistencia a compuestos que afectan a la pared celular (Tripathi *et al.*, 2020).

Este metal abunda en el tracto gastrointestinal debido a la dieta (hasta 500 mM (Ferraris *et al.*, 1990)), mientras que en el torrente sanguíneo su disponibilidad es muy limitada (hasta 5 mM (Barelle *et al.*, 2006)). Esto confiere de protección a los individuos por la denominada inmunidad nutricional, que limita su acceso a los microorganismos patógenos (Potrykus *et al.*, 2013, Fourie *et al.*, 2018).

C. albicans posee diferentes mecanismos para adquirir hierro del hospedador (Noble, 2013). Entre ellos, destacan los sistemas dirigidos a la hemoglobina del hospedador (vía Rbt5), sistemas de unión a transferrina mediante la utilización de la ferritina (vía Als3) y de sistemas de captación de hierro mediante sideróforos (como Sit1). Los altos niveles de hierro en el TGI pueden llegar a ser tóxicos para los microorganismos comensales debido a la reacción de Fenton (Winterbourn, 1995), ya que reacciona con H₂O₂ formando radicales hidroxilo que pueden provocar la inactivación de proteínas, daño en el ADN o en los lípidos de membrana, luego una correcta homeostasis de metales es esencial para su supervivencia. La homeostasis de hierro en *C. albicans* se mantiene mediante un circuito de regulación transcripcional mediado por los factores de transcripción Sef1, Sfu1 y Hap43. La expresión de *SEF1* se induce en condiciones de baja concentración de hierro, activando la expresión de *HAP43* y de genes necesarios para la adquisición de hierro; por su parte, Hap43 reprime vía Sfu1 la expresión de genes para la utilización de este. Por el contrario, una alta concentración de hierro induce la expresión de *SFU1* que reprime la expresión de *SEF1* y, en consecuencia, la expresión de genes para la adquisición de este metal (Chen *et al.*, 2011). De este modo, Sef1 se ha descrito esencial para la virulencia en el torrente sanguíneo, mientras que Sfu1 es necesario para el comensalismo, y ambos se expresan de manera diferente dependiendo de la localización en el hospedador.

E. Papel de la mitocondria

La mitocondria participa en los procesos de respiración, crecimiento, resistencia a compuestos, síntesis de lípidos, morfogénesis, virulencia y almacenamiento de hierro (Shingu-Vazquez & Traven, 2011, Calderone *et al.*, 2015, Fourie *et al.*, 2018, Duvenage *et al.*, 2019), convirtiendo a este orgánulo en un blanco terapéutico para el tratamiento de las infecciones de etiología fúngica.

C. albicans genera ATP a partir de oxígeno y nutrientes mediante la fosforilación oxidativa a través de la cadena transportadora de electrones. La respiración se lleva a cabo principalmente por la vía clásica, formada por los complejos I a IV, mientras que la ruta de la oxidasa alternativa y la ruta paralela permiten la respiración cuando la clásica es inhibida (Helmerhorst *et al.*, 2002). Ciertos mutantes en elementos de la cadena transportadora de electrones o la inhibición de alguno de sus componentes provocan la acumulación de especies reactivas del oxígeno y una disminución del crecimiento de las células, así como tiene un impacto en la virulencia de este hongo ya que desencadena defectos en la filamentación (McDonough *et al.*, 2002, Ruy *et al.*, 2006, Bambach *et al.*, 2009). La mitocondria también participa en la síntesis de lípidos junto a otros orgánulos (Klug & Daum, 2013). Los mutantes en las diferentes rutas de biosíntesis de fosfolípidos poseen defectos en su pared celular, son más sensibles a compuestos que afectan a la pared celular y son menos virulentos que

una cepa silvestre (Chen *et al.*, 2010). El uso de compuestos que inhiben la respiración ha demostrado incrementar el contenido de lípidos intracelulares, alterando el uso de las rutas metabólicas de fuentes de carbono y reorganizando los componentes de pared celular, que a su vez desencadena el aumento del reconocimiento de las células de *C. albicans* por parte de los macrófagos del hospedador (Duvenage *et al.*, 2019). La disponibilidad de hierro es también crucial para el metabolismo de la mitocondria y la síntesis de sus componentes, y funciona como almacén para este contribuyendo a la homeostasis de este metal (Lill, 2009, Xu *et al.*, 2014).

Asimismo, se ha demostrado el papel de la mitocondria en el comensalismo, ya que células con defectos en complejos de la ruta clásica (subunidad Nuo2 del complejo I) presentan defectos de colonización en el TGI del ratón, filamentación y formación de biopelículas (Huang *et al.*, 2017). También se ha descrito que el correcto ensamblaje del complejo I vía Ndu1 es necesario para el crecimiento en presencia de fuentes alternativas de carbono, para que puedan evadir el sistema inmunitario del hospedador, para que mejoren su resistencia a compuestos con efecto antifúngico y para la virulencia en un modelo de candidiasis diseminada (Mamouei *et al.*, 2021).

F. Invasión del hospedador

C. albicans puede invadir los tejidos del hospedador mediante dos mecanismos diferenciados: por endocitosis inducida o por penetración activa (Wachtler *et al.*, 2012). La primera ruta de invasión ocurre a través de las proteínas de pared celular e invasinas como Als3 y Ssa1, las cuales se unen a las moléculas de adhesión E- y N-cadherinas de las células epiteliales del hospedador, induciendo la remodelación del citoesqueleto de estas y la interiorización de las hifas (Phan *et al.*, 2007, Moreno-Ruiz *et al.*, 2009, Sun *et al.*, 2010). Las células también puede unirse a las células M (*microfold*) del hospedador asociadas a las placas de Peyer en el intestino y fomentar su endocitosis (Albac *et al.*, 2016) a través de un mecanismo en el que también parecen participar Als3 y Ssa1. La penetración activa, en cambio, implica la propia fuerza que ejercen las hifas durante su crecimiento a través de los enterocitos del hospedador y de la expresión de factores de virulencia (Schaller *et al.*, 2005, Dalle *et al.*, 2010). La secreción y acumulación de candidalisin, un péptido citolítico codificado por *ECE1*, se produce en la zona de invasión (*invasion pocket*) donde la hifa se encuentra rodeada por la membrana de las células epiteliales. Este péptido produce daño en las membranas mediante la creación de poros en las células del epitelio facilitando la entrada de las hifas (Moyes *et al.*, 2016, Allert *et al.*, 2018, Naglik *et al.*, 2019). Existen otros factores de virulencia que se expresan en la zona de invasión y que facilitan la entrada, como son las proteasas aspárticas secretadas (Saps), las fosfolipasas o las lipasas. Estas hidrolasas degradan las proteínas y membranas de las células del

hospedador, pero a su vez liberan nutrientes como lípidos, aminoácidos y metales esenciales que son utilizados por hongo para proliferar (Mukherjee *et al.*, 2001, Scholfield *et al.*, 2005).

G. Evasión del sistema inmunitario del hospedador

Las defensas del hospedador son evadidas por *C. albicans* mediante diferentes mecanismos entre los que se incluyen la formación de biopelículas, el enmascaramiento de componentes de pared que evitan su reconocimiento y estrategias para anticiparse y evadir el ataque directo de las células del sistema inmunitario. Las biopelículas protegen a las células fúngicas del ataque de neutrófilos mediante la inhibición de la liberación de NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*) (Urban *et al.*, 2006) y de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Xie *et al.*, 2013), del ataque de los monocitos inhibiendo la expresión de TNF- α e impiden la migración de macrófagos a esta localización (Kernien *et al.*, 2018). Tal y como hemos comentado, el contenido de los componentes de pared de *C. albicans* cambia con su morfología y, en consecuencia, el reconocimiento por las células inmunitarias. Las levaduras pueden enmascarar los β -glucanos en condiciones que pueden darse en el intestino, como la presencia de fuentes alternativas de carbono como el lactato (Ballou *et al.*, 2017) o a bajas concentraciones de oxígeno (Lopes *et al.*, 2018). Las hifas presentan una disminución de los β -1,3-glucanos disminuyendo así el reconocimiento por parte de los macrófagos mediante el receptor delectina-1 (Gantner *et al.*, 2005, Mukaremera *et al.*, 2017). Al mismo tiempo, las proteasas de tipo Saps degradan proteínas del sistema del complemento como C3b, y otras como Pra1 que mediante la unión de reguladores de este sistema como el factor H o FHL-1 impiden la activación del sistema del complemento que da lugar a la cascada de activación y que conlleva la muerte de las células de este hongo (Gropp *et al.*, 2009, Luo *et al.*, 2009, Zipfel & Skerka, 2009).

Ante el ataque producido por neutrófilos y macrófagos, las células expresan enzimas detoxificadoras para defenderse del daño oxidativo (da Silva Dantas & Day, 2015). La ruta HOG se activa en presencia de estrés oxidativo (Alonso-Monge *et al.*, 2003) activando la expresión de genes que incluyen la catalasa (*CAT1*), superóxido dismutasa (*SOD2*) y enzimas de los sistemas glutarredoxina (*GPX1*, *GSH1*) o tiorredoxina (*TSA1*, *TRR1*) necesarias para la detoxificación y reparación de proteínas dañadas (Enjalbert *et al.*, 2006). En respuesta a la fagocitosis, *C. albicans* filamta produciendo la lisis de este y escapando a su acción microbicida (Lewis *et al.*, 2012). Una vez fagocitadas por macrófagos, las células pueden provocar la piroptosis, la activación del inflammasoma y muerte celular, incluso mediante la competición por la glucosa disponible (Umawahoro *et al.*, 2014, O'Meara *et al.*, 2015, Kasper *et al.*, 2018, Tucey *et al.*, 2018). Por último, cabe destacar que *C. albicans* es capaz de

adaptarse a ambientes con pH extremos, y que resulta esencial para poder establecerse en ambientes ácidos como la vagina, neutros-alcálinos como el TGI, o neutros como la sangre. De hecho, una vez las células son fagocitadas, son capaces de manipular el pH ácido del fagolisosoma a neutro para inducir la filamentación y escapar del macrófago (Vylkova *et al.*, 2011, Vylkova & Lorenz, 2017, Westman *et al.*, 2018).

OBJETIVOS

La colonización de *C. albicans* del TGI adquiere especial relevancia ya que es el origen de muchas de las candidiasis diseminadas. Para poder establecerse como comensal en este nicho, ha de adaptarse al ambiente encontrado en las diferentes localizaciones, cohabitar con la microbiota presente y hacer frente a los mecanismos del sistema inmunitario del hospedador. En este contexto, resulta esencial conocer los factores que regulan su establecimiento y cuáles determinan el paso de comensal a patógeno.

La exposición de las células a señales y condiciones ambientales propias del TGI genera una respuesta adaptativa, como es el aumento de la expresión de *WOR1*. El papel de este factor de transcripción en la transición de célula blanca a célula opaca ha sido descrito en detalle, pero poco se sabe de los factores que podría estar regulando durante la adaptación de las células al estado comensal y que mejoran su *fitness* en este nicho. Por ello, para este trabajo se propusieron los siguientes objetivos:

1. Caracterizar a la cepa que sobreproduce *Wor1* en un fondo silvestre, prestando especial atención a los cambios en su morfología, en su proteoma y en su sensibilidad y/o resistencia a diferentes tipos de estrés.
2. Analizar el papel de la sobreexpresión de *WOR1* en la regulación de los principales factores implicados en el comensalismo y en la virulencia de *C. albicans*, como lo son la filamentación, la adhesión, la formación de biopelículas, la producción de hidrolasas, la homeostasis del hierro, el metabolismo respiratorio y la utilización de fuentes de carbono.
3. Desarrollar y caracterizar cepas microevolucionadas en el TGI de ratón con el objetivo de relacionar fenotipos encontrados en células que sobreproducen *Wor1*, células opacas y células GUT.

RESULTADOS

1. Análisis de la sobreexpresión de *WOR1* en fondo silvestre

A. Caracterización de la cepa CAI4-*WOR1*^{OE}

A.1. Obtención de cepas sobreproductoras de *Wor1*

Dado el papel esencial que posee *Wor1* en la adaptación al estado comensal, nos propusimos obtener cepas de *C. albicans* que presentaran niveles elevados de *WOR1*. Para ello, se generó una cepa que sobreexpresa *WOR1* en fondo silvestre CAI4 bajo un sistema de expresión que utiliza un promotor fuerte y regulable. Usamos el sistema TET-OFF, es decir, la versión reprimible del sistema descrito originalmente por el grupo de Joachim Morschhäuser para *C. albicans* (Park & Morschhauser, 2005) y utilizado con anterioridad por nuestro grupo (Prieto *et al.*, 2014). Este sistema nos permite expresar *WOR1* de manera constitutiva en ausencia de doxiciclina y reprimir su expresión en su presencia. La cepa generada CAI4-*WOR1*^{OE}, que se denominará en el trabajo *WOR1*^{OE} (*WOR1 OverExpression*), ha sido caracterizada exhaustivamente en este trabajo. También se generaron las cepas control en el mismo fondo genético, que se denominarán pNRUe (e de *empty*) si contienen el plásmido vacío, o RFP, si expresan la proteína fluorescente roja (ver materiales y métodos). La caracterización funcional de esta cepa supone el eje central de esta tesis doctoral.

A.2. Cuantificación de los niveles de expresión de *WOR1*

Para cuantificar la sobreexpresión de *WOR1* en la cepa CAI4-*WOR1*^{OE} y, a su vez, determinar el papel de *Wor1* como regulador de la expresión de *EFG1*, se comprobaron los niveles de expresión de mRNA de ambos genes mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) y se compararon con la expresión en la cepa silvestre. Es importante indicar que la cuantificación de la expresión de mRNA de *WOR1* comprende tanto su expresión natural (bajo el control de su promotor en su *locus* nativo) como la ectópica (expresión constitutiva en ausencia de doxiciclina y en el *locus ADH1* de integración en el genoma). Los resultados indican que la cepa CAI4-*WOR1*^{OE} produce aproximadamente cuatro veces más mRNA de *WOR1* en comparación con la cepa silvestre ($3,99 \pm 0,67$) (Figura 6A) y, como cabría esperar, reduce significativamente la expresión de *EFG1* ($0,47 \pm 0,18$) (Figura 6B).

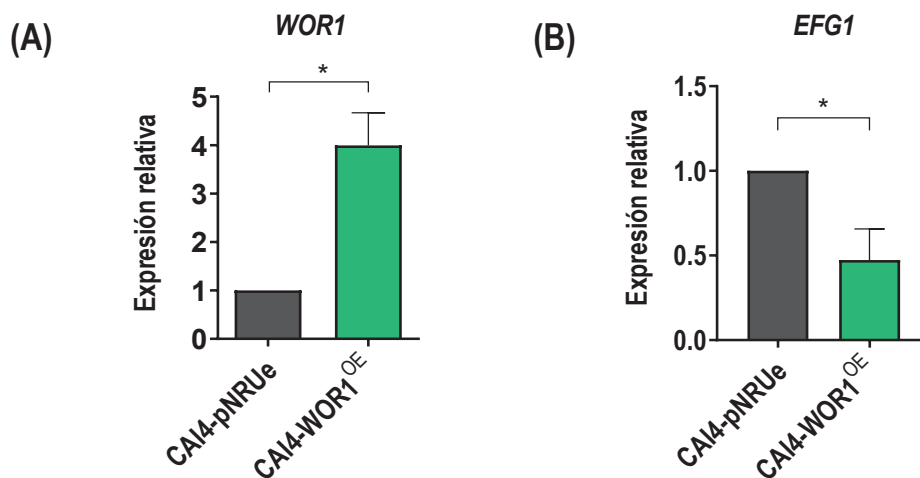


Figura 6. Expresión de mRNA de *WOR1* y *EFG1* en las cepas CAI4-WOR1^{OE} y CAI4-pNRUe.

Cuantificación mediante RT-qPCR de los niveles de expresión en células en fase exponencial. (A) Expresión de mRNA de *WOR1* o (B) de *EFG1* tomando como referencia la expresión en la cepa CAI4-pNRUe y normalizados a la expresión de *ACT1*. Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes \pm el error estándar de la media (SEM). * $p < 0,05$.

A.3. Las células que sobreexpresan *WOR1* forman colonias opacas

En primer lugar, realizamos una caracterización fenotípica de la cepa *WOR1*^{OE} y su respectiva cepa control (pNRUe) tras el crecimiento a 37°C en medio rico YPD. La inducción del fenotipo opaco en células que sobreproducen Wor1 es fácilmente detectado por la presencia de colonias de color más oscuro en medio sólido, y de células más grandes y alargadas tras la observación microscópica. Así, pudimos comprobar que las colonias de la cepa control presentan el fenotipo blanco con colonias blancas y grandes, mientras que la cepa que sobreexpresa *WOR1* presenta un fenotipo opaco con colonias de color más oscuro y más pequeñas (Figura 7A). Para comprobar si las células que sobreproducen Wor1 (*WOR1*^{OE}) en fondo silvestre compartían otras características con las células opacas, estas se incubaron en medio líquido YPD a 37°C y se observaron al microscopio (Figura 7B). Efectivamente, las células *WOR1*^{OE} poseen mayor tamaño, son más alargadas y poseen una vacuola más grande en comparación con la cepa silvestre.

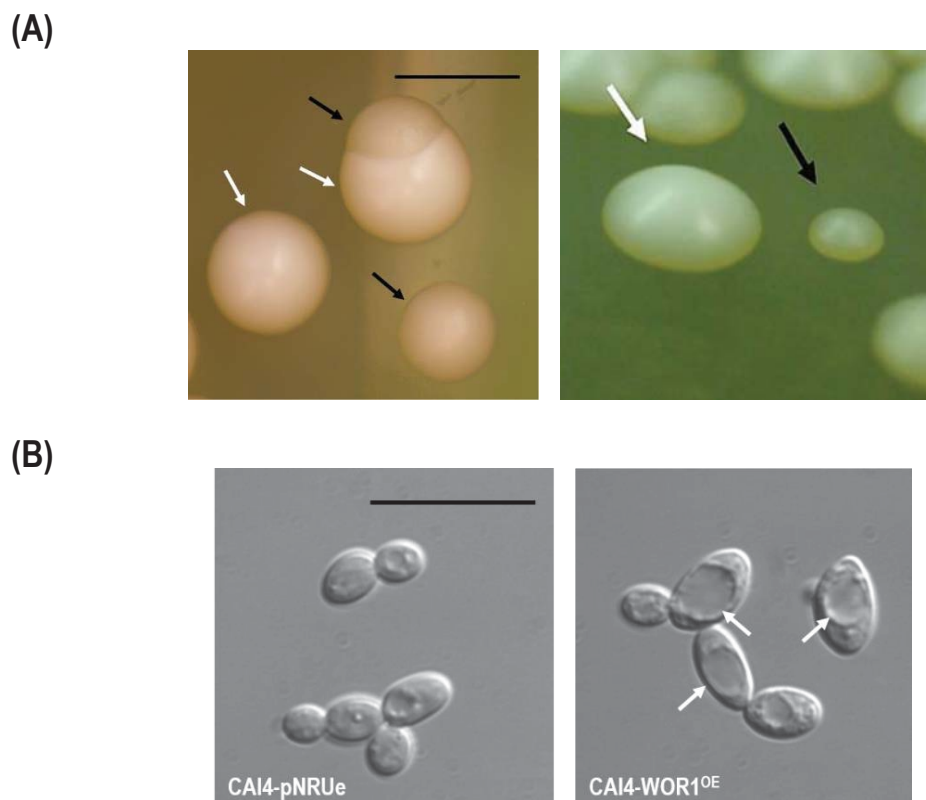


Figura 7. Caracterización morfológica de las cepas CAI4-WOR1^{OE} y CAI4-pNRUe.

(A) Fotografía representativa de colonias blancas y opacas usando una lupa con objetivo de 25x (izquierda, toma cenital) o una cámara (derecha, toma inclinada). Partiendo de cultivos de las cepas CAI4-pNRUe y CAI4-WOR1^{OE} crecidos a 37°C en YPD, se realizó una suspensión mixta 1:1 y se sembraron aproximadamente 150 células sobre agar YPD. Las placas se incubaron a 37°C durante 24-48 horas. Las flechas blancas indican las colonias blancas y las negras señalan a las opacas. La barra de escala (en negro) corresponde a un tamaño de 2 mm. (B) Células incubadas en medio YPD a 37°C en agitación durante 24 horas y observadas en fresco al microscopio óptico (100x). Las flechas blancas indican el detalle de vacuolas gigantes en la cepa CAI4-WOR1^{OE}. La barra de escala (en negro) corresponde a un tamaño de 10 μm.

Tradicionalmente se ha distinguido a las colonias opacas mediante su coloración rosa intenso cuando crecen en medio suplementado con el colorante rojo fluorescente floxina B (phloxine B, PB). Para determinar si las células que sobreexpresan *WOR1* presentaban esta característica, se observó el crecimiento de las colonias sobre agar YPD suplementado con floxina B (10 o 50 μg/mL) a 37°C en presencia y ausencia de doxiciclina (Dox). Las células, y por lo tanto las colonias, de la cepa CAI4-WOR1^{OE} se tiñeron de rosa intenso mientras que las de la cepa control permanecieron con su coloración blanca cuando crecieron en ausencia de doxiciclina (Figura 8A y B). Este fenotipo se revierte en presencia de 10 μg/mL de doxiciclina, donde la expresión del gen se encuentra reprimida.

Asimismo, se realizó una tinción con floxina B de células en suspensión y se observaron en el microscopio de fluorescencia, mostrando el mismo comportamiento (Figura 8C).

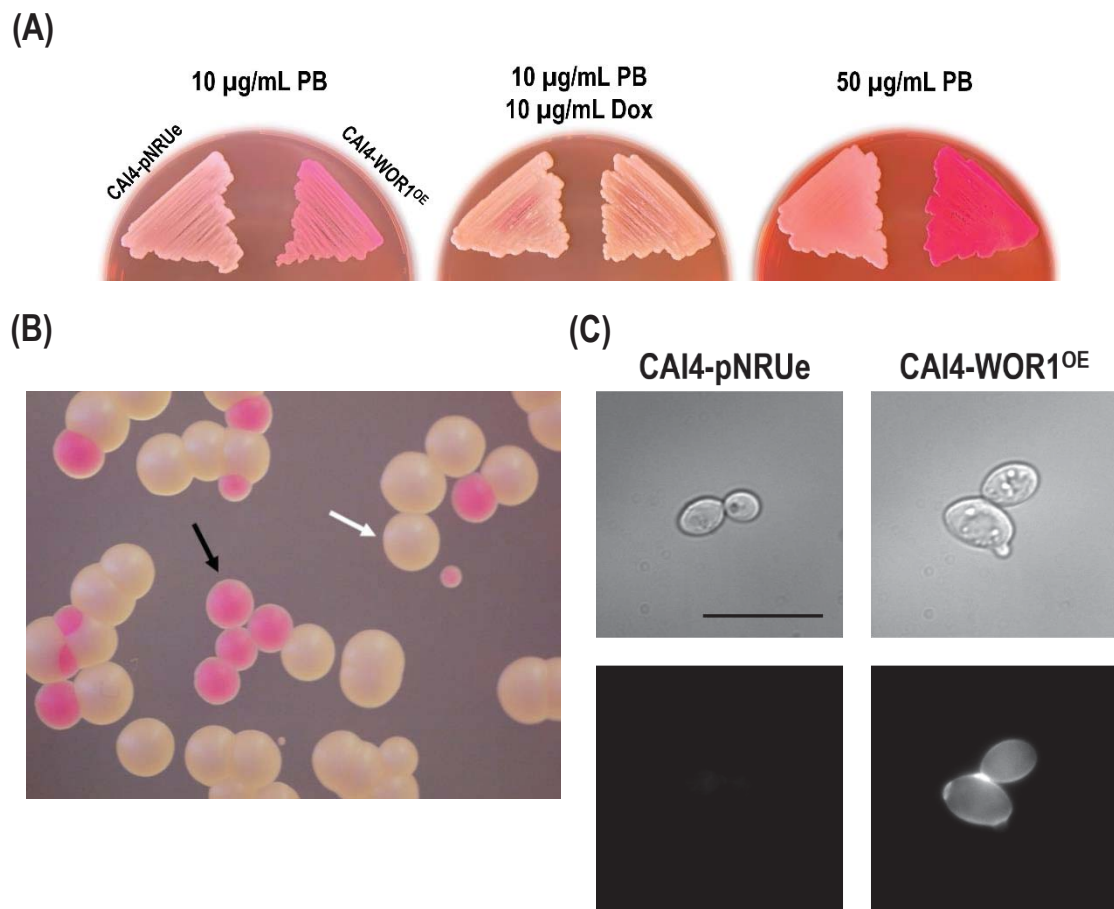


Figura 8. Tinción con floxina B de las cepas CAI4-WOR1^{OE} y CAI4-pNRUe.

(A) Fotografías del crecimiento sobre agar YPD suplementado con 10 µg/mL floxina B (PB) (izquierda), con 10 µg/mL de floxina B + 10 µg/mL de doxiciclina (Dox) (centro) o con 50 µg/mL de floxina B (derecha) a 37°C durante 48 horas. (B) Fotografía de una mezcla en proporción 1:1 de colonias de la cepa CAI4-pNRUe y CAI4-WOR1^{OE} en agar YPD suplementado con 10 µg/mL de floxina B tras ser incubadas a 37°C durante 48 horas. (C) Células crecidas en medio YPD líquido a 37°C se tiñeron con 10 µg/mL de floxina B y se tomaron fotografías en el microscopio de fluorescencia usando luz ultravioleta. La barra de escala (en negro) corresponde a un tamaño de 10 µm.

A.4. El fenotipo opaco inducido por la sobreproducción de Wor1 es estable a temperaturas superiores a 25°C

Las células opacas son inestables a temperaturas por encima de los 25°C, momento en el que revierten en masa al fenotipo blanco (Slutsky *et al.*, 1987, Rikkerink *et al.*, 1988, Srikantha & Soll,

1993). Con el objetivo de comprobar si el fenotipo opaco de la cepa CAI4-WOR1^{OE} era estable con el aumento de temperatura, las células de la cepa control y *WOR1*^{OE} se sembraron sobre agar YPD suplementado con floxina B y se incubaron a distintas temperaturas por encima de los 24°C. Dado que la expresión de *WOR1* es constitutiva en esta cepa, estas células mantienen el fenotipo opaco al aumentar la temperatura, no observándose colonias blancas o sectorizadas (Figura 9). Sin embargo, se observaron colonias más rosas y pequeñas a 42°C en la cepa control y, de manera más evidente, en la cepa *WOR1*^{OE}.

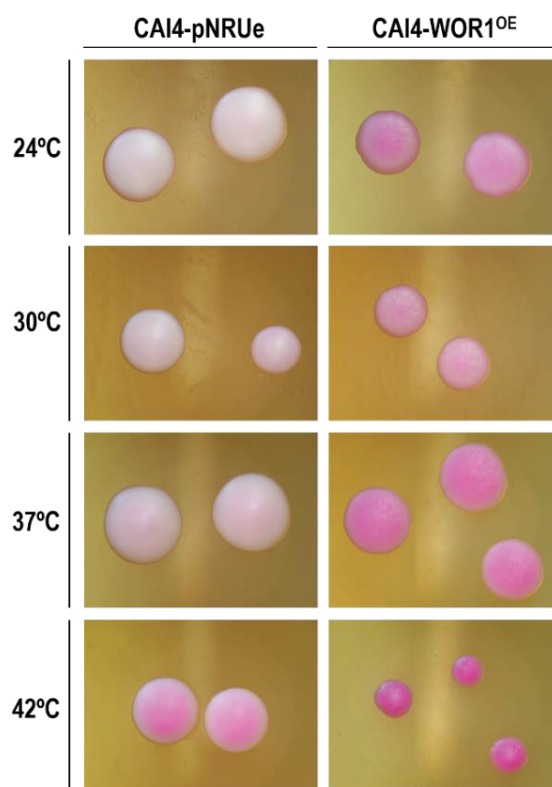


Figura 9. Efecto de la temperatura sobre la tinción con floxina B en las cepas CAI4-pNRUe y CAI4-WOR1^{OE}.

Fotografías con lupa (25x) de las colonias de las cepas CAI4-pNRUe y CAI4-WOR1^{OE} incubadas sobre agar YPD suplementado con floxina B a 10 µg/mL a 24, 30, 37 o 42°C durante 48 horas.

A.5. La sobreexpresión de *WOR1* afecta la cinética de crecimiento

Con el objetivo de analizar si la sobreexpresión de *WOR1* en fondo silvestre producía diferencias en el crecimiento de las células, determinamos el tiempo de generación en las cepas generadas. Para ello, se siguió el crecimiento de las células en medio YPD suplementado o no con 10 µg/mL de

doxiciclina a 37°C durante 24 horas mediante medidas de densidad óptica (D.O.) a los tiempos indicados (Figura 10). Como se puede observar, las células *WOR1^{OE}* poseen un tiempo de generación mayor en comparación con el de las células de la cepa control, el cual se estimó en 186 minutos para la cepa CAI4-*WOR1^{OE}* y de 88 minutos para la cepa control. Las células que crecieron en presencia de doxiciclina presentaron valores equiparables a la cepa silvestre control en su tiempo de generación: las células control presentaron un tiempo de generación de 90 minutos, mientras que el de las células de la cepa CAI4-*WOR1^{OE}*, en las cuales la expresión de *WOR1* se encuentra reprimida, se estimó en 93 minutos. Esto indica que la sobreproducción de *Wor1* afecta al crecimiento de estas células en las condiciones ensayadas.

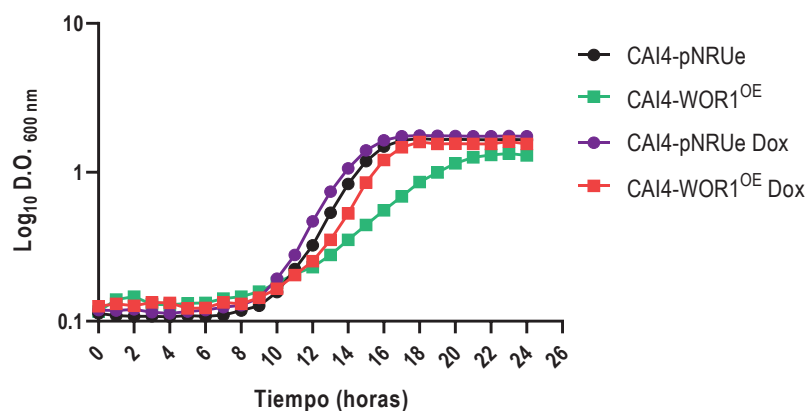


Figura 10. Crecimiento en YPD ± doxiciclina de las cepas CAI4-*WOR1^{OE}* y CAI4-pNRUe.

Las células fueron incubadas en medio YPD suplementado o no con 10 µg/mL de doxiciclina (Dox) a 37°C durante 24 horas en placa multipocillo. Se realizaron mediciones de la absorbancia cada 30 minutos y los datos se representaron en una gráfica en escala logarítmica.

B. Análisis del proteoma en células que sobreproducen *Wor1*

Uno de los primeros objetivos que nos planteamos fue conocer los cambios en el proteoma producidos por la sobreexpresión de *WOR1*. Para ello, se obtuvieron los extractos proteicos de las cepas CAI4-*WOR1^{OE}* y CAI4-pNRUe como control y se analizaron mediante LC-MS/MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem). Los resultados que se muestran a continuación corresponden a tres réplicas biológicas donde se identificaron un total de 3.190 proteínas entre la cepa CAI4-pNRUe y la cepa CAI4-*WOR1^{OE}*. Para realizar el análisis, solo se consideraron aquellas que tenían una *ratio* de abundancia *WOR1^{OE}*/control con valor $p < 0,05$ (expresado en $-\log_{10} p > 1,3$).

Se identificaron como proteínas que presentaban cambios en la cepa CAI4-WOR1^{OE} aquellas con una *ratio* de abundancia expresada en $\log_2 < -0,5$, si disminuyen, y $> 0,5$, si aumentan; igualmente, se identificaron como proteínas exclusivas de cada cepa aquellas en las que la *ratio* de abundancia expresada en \log_2 era de $-6,64$ para la cepa control o de $6,64$ para la cepa WOR1^{OE}.

Como se puede observar en el gráfico en volcán de la Figura 11A, la sobreexpresión de *WOR1* desencadena cambios muy acentuados en el proteoma de esta cepa, con una gran cantidad de proteínas que disminuyeron respecto a la cepa silvestre. Cuando se seleccionaron solamente las proteínas que presentaban una *ratio* de variabilidad inferior al 30 % entre réplicas (Figura 11B), se identificaron un total de 379 proteínas (Anexo 1). Se encontraron muy pocas que aumentaron su abundancia en la cepa CAI4-WOR1^{OE} (10 proteínas), mientras que sí se encontraron un gran número de proteínas que disminuyeron (163). Se identificaron de manera única 169 proteínas en la cepa CAI4-WOR1^{OE}, mientras que en la cepa CAI4-pNRUe se encontraron únicamente 37.

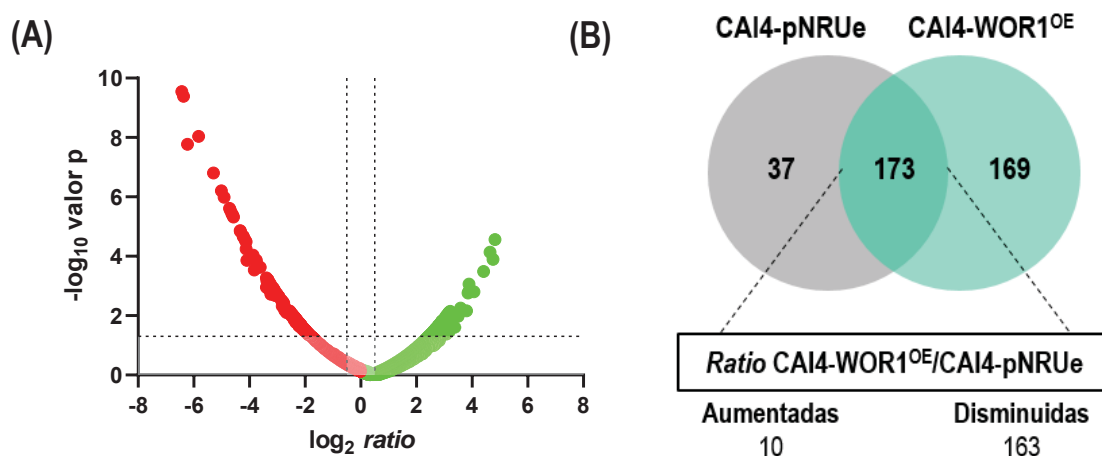


Figura 11. Cambios proteómicos en *C. albicans* tras la sobreexpresión de *WOR1* en fondo silvestre.

(A) Representación en gráfico tipo volcán de la abundancia de la *ratio* CAI4-WOR1^{OE}/CAI4-pNRUe de las proteínas identificadas que disminuyeron (en rojo) y/o aumentaron su abundancia (en verde). Las líneas discontinuas marcan las proteínas que se consideraron disminuidas ($-\log_{10}$ valor $p > 1,3$; \log_2 *ratio* $< -0,5$) o aumentadas ($-\log_{10}$ valor $p > 1,3$; \log_2 *ratio* $> 0,5$). (B) Diagrama de Venn con el número de proteínas que presentaban una *ratio* de variabilidad de la abundancia de $< 30\%$. Se muestran aquellas que se encontraron de manera única en cada cepa o que cambiaron de manera conjunta (intersección), y de entre estas últimas, las que se encontraron en mayor o menor abundancia en la cepa CAI4-WOR1^{OE}. Los resultados corresponden a 3 experimentos independientes.

B.1. Proteínas identificadas que aumentaron o disminuyeron en la cepa CAI4-WOR1^{OE}

El análisis de estos datos atendiendo al componente celular se llevó a cabo con la herramienta *GO Slim Mapper*, mientras que el análisis de enriquecimiento ontológico por proceso biológico se llevó a cabo por *PathoYeasttract Rank by GO* usando en ambos casos la base de datos *Candida Genome Database (CGD)*. El análisis por componente celular de las 163 proteínas que disminuyeron debido a la sobreproducción de *Wor1* muestra que las proteínas identificadas pertenecen a proteínas de citoplasma (74) así como a proteínas de orgánulos de gran relevancia como son el núcleo (32), la mitocondria (25) o el ribosoma (24). Se encontraron además proteínas que se localizan en la envoltura mitocondrial (15), membrana plasmática (14), pared celular (13), citoesqueleto (7), vacuola (3), peroxisoma (2), retículo endoplasmático (2) o aparato de Golgi (2). Dado que el método utilizado para la obtención de los extractos proteicos implica una rotura mecánica, es normal encontrar proteínas de orgánulos de este tipo.

Entre aquellas proteínas que se encontraron en menor abundancia (Tabla 1), destaca *Wh11*, proteína específica del fenotipo blanco, así como la proteína *Wal1*, necesaria para la filamentación pero que también regula la morfología celular y vacuolar. Ambas proteínas resultan interesantes dado el fenotipo que poseen las células que sobreexpresan *WOR1*. Se identificaron varias proteínas relacionadas con la utilización de fuentes de carbono, como son *Icl1* (isocitrato liasa) que participa en el ciclo del glioxilato y en el cual se profundizará más adelante en este trabajo, la proteína *Pck1* que participa en la ruta de la gluconeogénesis o *Glx3* involucrada en el metabolismo del piruvato. También se encontraron varias proteínas relacionadas con la síntesis de lípidos, donde destaca *Smp2* por su relación con la formación de diacilglicerol. Adicionalmente se identificaron las proteínas mitocondriales *Cyb5*, que participa en la fosforilación oxidativa, y *Tom22*, que participa en la importación de proteínas a este orgánulo. También se encontraron proteínas que se inducen en respuesta a estrés oxidativo, como *Pst2* o *Cat1*.

De las 10 proteínas identificadas con mayor abundancia en la cepa CAI4-WOR1^{OE}, 5 se localizan en el núcleo, 3 en el citoplasma y 2 en la mitocondria. Los resultados analizados por proceso biológico implicado no aportaron información relevante para este estudio y se han omitido.

Tabla 1. Proteínas que disminuyen en la cepa CAI4-WOR1^{OE} en comparación con la cepa CAI4-pNRUe.

Proteína	orf	Descripción	Ratio (log ₂)	Ratio Valor p
Metabolismo de fuentes de carbono				
Icl1	orf19.6844	Isocitrato liasa, ciclo del glioxilato	-3,76	0,00
Pck1	orf19.7514	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, gluconeogénesis	-4,33	0,00
Adh5	orf19.2608	Alcohol deshidrogenasa, degradación etanol	-2,16	0,02
Glx3	orf19.251	Metabolismo del piruvato, respuesta a estrés oxidativo	-2,33	0,01
Hgt1	orf19.4527	Transportador de alta afinidad de glucosa	-2,95	0,00
Hgt19	orf19.5447	Transportador de alta afinidad de glucosa y mioinositol	-2,74	0,00
Síntesis de lípidos				
Acp1	orf19.2439	Síntesis de ácidos grasos en mitocondria	-2,21	0,02
Smp2	orf19.1462	Síntesis de diacilglicerol	-2,22	0,02
Lag1	orf19.3249	Síntesis de fosfolípidos, organización de gotas lipídicas	-1,83	0,05
Función mitocondrial				
Cyb5	orf19.7049	Citocromo b 5 de la ruta paralela, fosforilación oxidativa. Síntesis de ergosterol en mitocondria	-4,91	0,00
Cox4	orf19.1471	Subunidad IV del citocromo c oxidasa, fosforilación oxidativa. Síntesis de ergosterol en mitocondria	-1,97	0,03
C1_06840cp_a	orf19.6225.1	Ensamblaje de la citocromo c oxidasa del complejo IV	-1,99	0,03
C2_01720cp_a	orf19.1483	Ensamblaje de la citocromo c oxidasa del complejo IV	-2,02	0,03
C7_01610wp_a	orf19.6563.1	Ensamblaje de la citocromo c oxidasa del complejo IV	-3,3	0,00
Tim13	orf19.2754	Importación de proteínas a mitocondria	-2,44	0,00
Tim22	orf19.1352	Importación de proteínas a mitocondria	-2,01	0,03
Tim9	orf19.6696	Importación de proteínas a mitocondria	-2,48	0,00
Tom22	orf19.3696	Subunidad de un receptor de importación de proteínas a mitocondria	-4,22	0,00
Atp20	orf19.3757	ATP sintasa mitocondrial	-1,88	0,04
Respuesta a estrés oxidativo				
Pst2	orf19.3612	Proteína similar a la flavodoxina, involucrada en estrés oxidativo y virulencia	-4,09	0,00
Cat1	orf19.6229	Catalasa	-2,03	0,03
Cip1	orf19.113	Posible oxidorreductasa, involucrada en estrés oxidativo y estrés por alta concentración de metales pesados	-2,8	0,00
Dot5	orf19.5417	Tiorredoxina peroxidasa	-3-34	0,00

B.2. Proteínas identificadas de manera única en cada cepa

Los resultados muestran que 169 proteínas se encontraron de manera única en la cepa CAI4-WOR1^{OE}, mientras que solo se encontraron 37 proteínas en la cepa control. El análisis por componente celular de la cepa CAI4-WOR1^{OE} determinó que la mayoría de las proteínas se localizaban principalmente en el núcleo (60) seguido del citoplasma (57), membrana (37), cromosoma (22), nucleolo (13), membrana plasmática (12), aparato de Golgi (9), mitocondria (8), retículo endoplasmático (8), citoesqueleto (8), vacuola (5) y peroxisoma (3) entre otras localizaciones. Las más destacadas se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Proteínas que se identificaron de manera única en la cepa CAI4-WOR1^{OE} en comparación con la cepa CAI4-pNRUe.

Proteína	orf	Descripción
Apareamiento		
C2_08860wp_a	orf19.223	Conjugación con fusión celular en respuesta a feromonas
C5_00570wp_a	orf19.932	Conjugación con fusión celular en respuesta a feromonas
Hst7	orf19.469	Fosforilación de Cek2 y Cek1
Síntesis y aprovechamiento de lípidos		
Lro1	orf19.6018	Aciltransferasa, formación de triacilglicerol
Ole2	orf19.2264	Síntesis de ácidos grasos no saturados (ácido linoleico)
Fad2	orf19.118	Síntesis de ácidos grasos no saturados (ácido linoleico)
C6_02420Wp_a	orf19.3483	Fosfolipasa C
Erg25	orf19.3732	Síntesis de ergosterol
Función del peroxisoma		
Pxa1	orf19.7500	Transportador de ácidos grasos a peroxisoma
Pxp2	orf19.1655	Acil-CoA oxidasa, β -oxidación de los ácidos grasos
Homeostasis de metales		
C3_05410wp_a	orf19.6979	Homeostasis de manganeso
C5_02320cp_a	orf19.4240	Homeostasis de manganeso
Smf12	orf19.2270	Transporte de manganeso y cobre
Amo1	orf19.5784	Homeostasis de cobre
Fet31	orf19.4211	Oxidasa multicobre, adquisición de hierro
Transportadores		
Pho89	orf19.4599	Transportador de alta afinidad de fosfato
Nag3	orf19.2158	Transportador de hexosa
Hgt2	orf19.3668	Transportador de glucosa

Se encontraron, además, varias proteínas que participan en el *switching* y en el apareamiento. Se identificó a la proteína Op4, específica del fenotipo opaco, y Swr1, una proteína que forma parte de un complejo que se necesita para la formación del nucleosoma y que se posiciona sobre el promotor de *WOR1* reduciendo posiblemente su accesibilidad (Guan & Haoping, 2015). Se encontraron además aumentadas las proteínas C2_08860wp_a y C5_00570wp_a que participan en el apareamiento, y la MAPKK Hst7, que activa las MAPK Cek1 y Cek2, durante el crecimiento exponencial y en respuesta a feromonas respectivamente.

Respecto a proteínas que tienen un papel en el aprovechamiento y síntesis de lípidos, se encontraron proteínas relacionadas con la síntesis de fosfolípidos y de ácidos grasos no saturados, como Lro1 y Ole2, así como una fosfolipasa C. También se identificó la proteína Pxp2, una acil-CoA oxidasa necesaria para la β -oxidación de los ácidos grasos en peroxisomas y en la cual también se profundizará más adelante en este trabajo. Se encontraron además proteínas que participan en la homeostasis de metales, como Smf12, que participa en la homeostasis de manganeso y cobre, o la oxidasa multicobre Fet31, que participa en la adquisición de hierro. Se identificaron los transportadores Pho89, Nag3 y Hgt2, y además Nad4, una subunidad de la NADH ubiquinona oxidoreductasa del complejo I de la cadena transportadora de electrones.

Con relación al análisis por componente celular de las proteínas que se encontraron de manera única en la cepa CA14-pNRUe, estas se localizan en citoplasma (17), membrana (10), núcleo (9), envuelta mitocondrial (7) o ribosoma (2). El análisis de enriquecimiento por proceso biológico no aportó tampoco información relevante y se omiten en este trabajo.

C. Estudio de la respuesta a distintas condiciones de crecimiento y estrés celular

Con el fin de establecerse en el hospedador, *C. albicans* es capaz de adaptarse a diferentes condiciones que encuentra en los distintos nichos que coloniza. En el tracto gastrointestinal los microorganismos encuentran un ambiente diferente del que presentan en el laboratorio, teniendo que adaptarse a la escasez de oxígeno (en la parte más distal del intestino), cambios en la disponibilidad de nutrientes, situaciones de estrés oxidativo y osmótico, estrés de pared y de membrana celular, a los mecanismos inmunitarios del hospedador y a los microorganismos de la microbiota comensal con la que ha de cohabitar. Dado que la sobreexpresión de *WOR1* mejora la capacidad de colonizar el TGI del ratón, nos pareció relevante estudiar cómo pueden afectar algunos de estos factores a su crecimiento.

C.1. Disponibilidad de oxígeno

Para determinar cómo la sobreproducción de Wor1 afecta al crecimiento en condiciones limitantes de O_2 , comparamos el crecimiento de células que sobreexpresan o no *WOR1* en YPD en condiciones de normoxia, microaerofilia y anaerobiosis a 37°C (Figura 12). Los resultados demuestran que una mayor producción de Wor1 no provoca cambios significativos de crecimiento en medio sólido en condiciones limitantes de oxígeno.

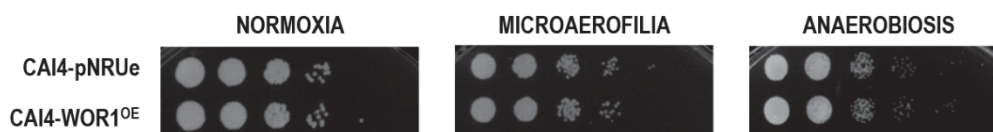


Figura 12. Crecimiento en condiciones de diferente disponibilidad de oxígeno de las células *WOR1^{OE}* y silvestres.

Diluciones seriadas de una suspensión a D.O. 0,8 de células en fase estacionaria de crecimiento fueron sembradas sobre placas de YPD. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas en condiciones de normoxia o 48 horas en condiciones de microaerofilia o anaerobiosis.

C.2. Respuesta a antifúngicos que generan estrés de pared y membrana celular

a) La sobreexpresión de *WOR1* aumenta la sensibilidad a caspofungina

Analizamos en primer lugar si los niveles de Wor1 afectaban a la sensibilidad a caspofungina mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a dicho antifúngico. Como se observa en la Figura 13, la CMI a caspofungina en medio YPD medida a las 24 horas fue de 50 ng/mL para la cepa control (CAI4-RFP) y de 25 ng/mL para la cepa que sobreexpresa *WOR1*, lo que sugiere que esta cepa presenta mayor sensibilidad a caspofungina. Los valores de CMI determinados a las 48 horas fueron mayores en ambos casos, mientras que a las 72 horas de incubación se observó un efecto paradójico en la cepa control.

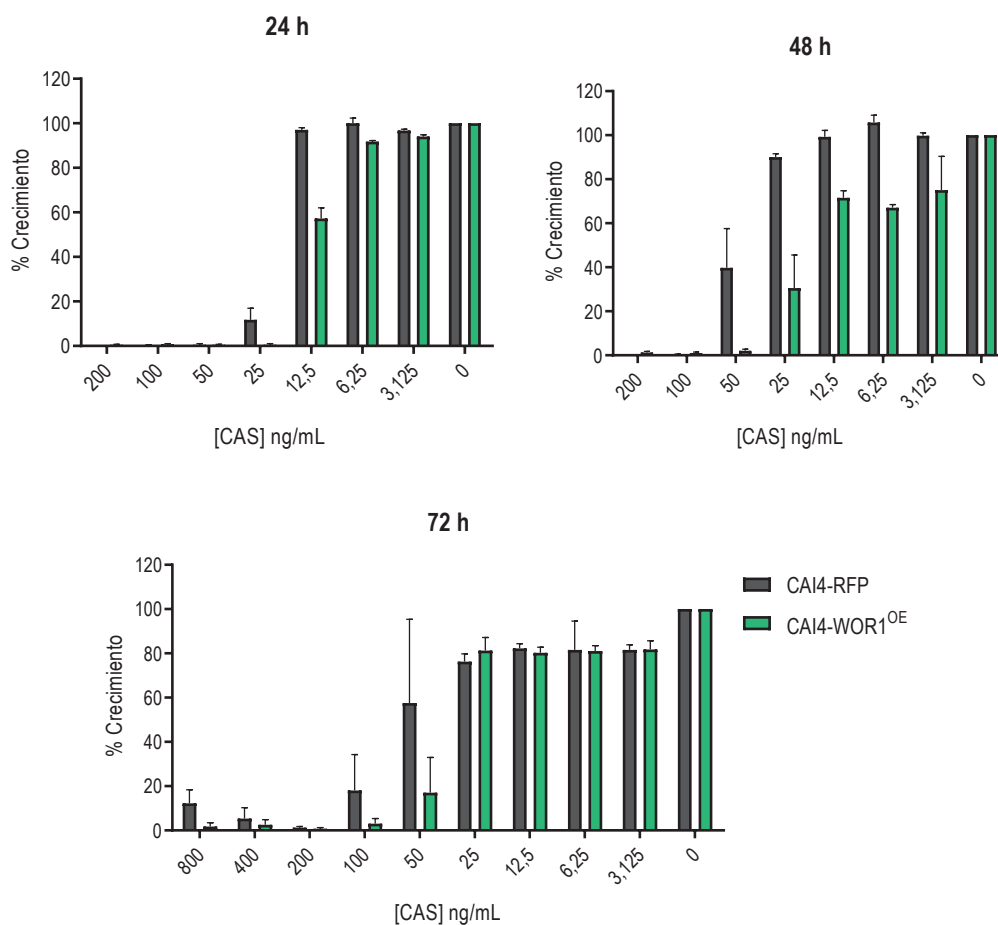


Figura 13. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de caspofungina en las cepas CAI4-WOR1^{OE} y CAI4-pNRUe.

Células en fase estacionaria se incubaron durante 72 horas en placa multipocillo con YPD suplementado con caspofungina (CAS) en intervalos de concentración de 800 a 3,125 ng/mL. Cada 24 horas se midió la absorbancia y se calculó el porcentaje (%) de crecimiento respecto al crecimiento en YPD sin antifúngico. Los resultados mostrados corresponden al porcentaje de las medias \pm la desviación estándar (SD) de tres resultados.

Para confirmar la mayor sensibilidad a caspofungina de las células *WOR1^{OE}*, se llevó a cabo un estudio de caída de viabilidad en medio líquido (Figura 14). Para ello, las células se incubaron en medio YPD líquido suplementado con 50 o 100 ng/mL de caspofungina a 37°C y en agitación, se tomaron muestras a distintos tiempos y se depositaron en forma de gota sobre agar YPD. Tras 24 horas de incubación confirmamos que la sobreproducción de *Wor1* confiere una mayor sensibilidad a caspofungina, cuyo fenotipo es dependiente de la dosis y del tiempo de incubación, ya que tras la primera hora se inhibe parcialmente el crecimiento a concentraciones de caspofungina de 50 ng/mL, y por completo a 100 ng/mL, en comparación con la cepa silvestre control.

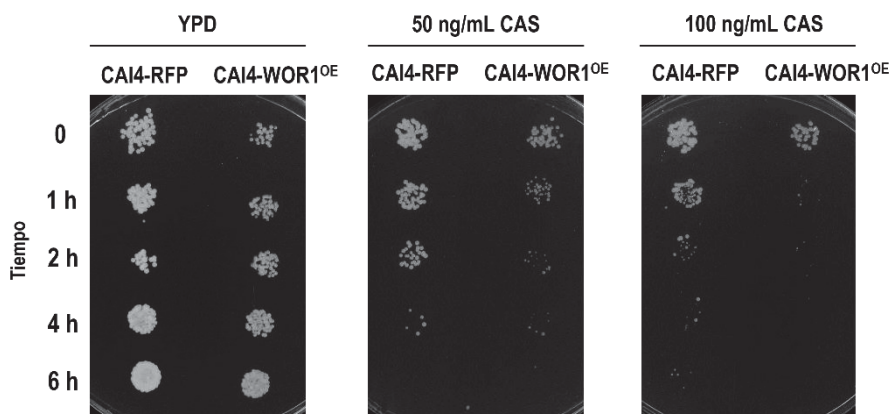


Figura 14. Caída de viabilidad en medio líquido en presencia de caspofungina de las cepas CAI4-WOR1^{OE} y CAI4-RFP.

10⁴ células en fase exponencial se incubaron durante 6 horas a 37°C en agitación en medio YPD suplementado o no con diferentes concentraciones de caspofungina (CAS). A los tiempos indicados, se tomaron 10 µl de cultivo y se transfirieron a una placa de agar YPD en forma de gota. Las placas se incubaron 24 horas a 37°C antes de ser escaneadas.

De forma complementaria, se evaluó la sensibilidad a caspofungina mediante un ensayo por dilución en gota en medio sólido YPD suplementado o no con 20 ng/mL del antifúngico. Como se observa en la Figura 15A, la cepa CAI4-WOR1^{OE} es más sensible a la acción de este antifúngico que su correspondiente cepa control (CAI4-RFP). Para determinar si el efecto era dependiente de doxiciclina al inhibir la expresión de *WOR1*, las células se incubaron en agar YPD con 30 o 50 ng/mL de caspofungina y suplementado o no adicionalmente con 20 µg/mL de doxiciclina. Como se muestra en la Figura 15B, la cepa CAI4-WOR1^{OE} no crece a concentraciones de 30 o 50 ng/mL, pero se observa una mejora de crecimiento con la adición de doxiciclina. Estos experimentos, en conjunto, indican que la sensibilidad a caspofungina es dependiente de la sobreproducción de Wor1.

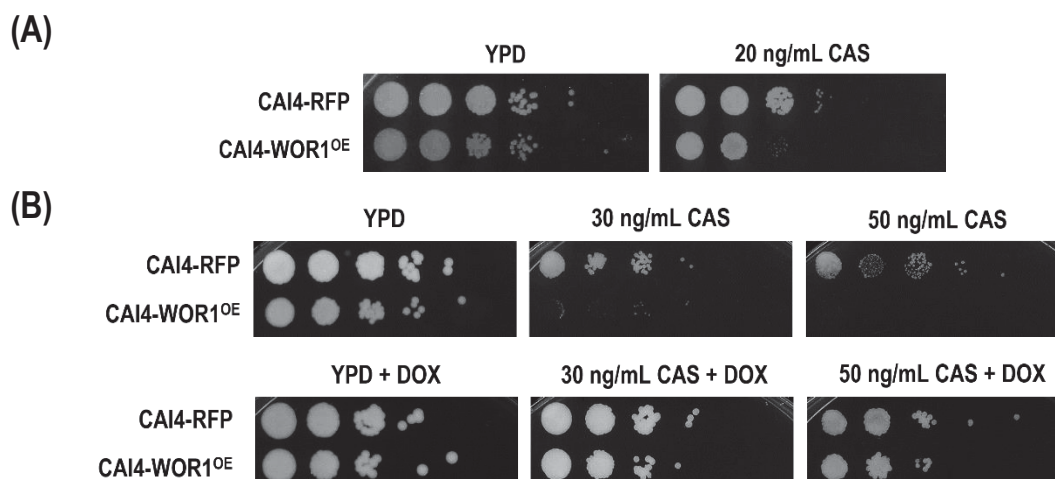


Figura 15. Sensibilidad a caspofungina en medio sólido en las cepas CAI4-WOR1^{OE} y CAI4-RFP.

A partir de células en fase estacionaria de crecimiento se prepararon suspensiones a D.O. 0,8 y se sembraron diluciones seriadas en medio YPD suplementado o no con (A) 20 ng/mL de caspofungina (CAS) o (B) 30 o 50 ng/mL de caspofungina \pm 20 μ g/mL de doxiciclina. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C antes de ser escaneadas.

b) La cepa CAI4-WOR1^{OE} no presenta alteraciones en la exposición de β -(1,3)-glucanos

Las alteraciones en la composición o distribución de β -glucanos en la pared celular fúngica pueden alterar la susceptibilidad a caspofungina (Wheeler & Fink, 2006). Con el objetivo de determinar si existen diferencias en la exposición de β -(1,3)-glucanos cuando se sobreexpresa *WOR1*, se llevó a cabo una inmunodetección indirecta de este componente y posterior análisis por citometría de flujo. En el experimento se usaron como control positivo células muertas inactivadas por calor (*heat-killed*, HK), cuyo tratamiento desorganiza su pared celular exponiendo sus componentes. Tras 24 horas de crecimiento en medio YPD y mediante citometría de flujo, no se encontraron diferencias significativas entre la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la cepa silvestre y la cepa *WOR1^{OE}* (Figura 16), indicando que la exposición/accesibilidad del glucano es similar en ambas cepas.

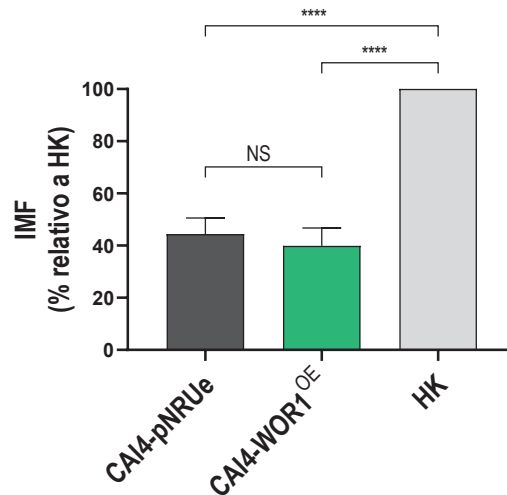


Figura 16. Exposición de β -(1,3)-glucanos en las cepas CAI4-WOR1^{OE} y CAI4-pNRUe.

Inmunodetección de β -(1,3)-glucanos en células en fase estacionaria de crecimiento y análisis por citometría de flujo. El gráfico muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) en % relativo al valor de las células HK (inactivadas por calor, *heat-killed*, HK) detectadas en el canal FL-1. Los resultados muestran la media \pm SD de tres resultados independientes. NS: no significativo, **** $p < 0,0001$.

c) La sobreexpresión de *WOR1* en fondo silvestre incrementa la resistencia a azoles

El ergosterol es el esteroles mayoritario en las células de *C. albicans* y es necesario para mantener la integridad celular y la rigidez, la fluidez y la heterogeneidad de la membrana plasmática. Una de las enzimas clave en la síntesis de ergosterol es la 14- α -lanosterol desmetilasa, producto del gen *ERG11*, y está involucrada en el paso de lanosterol a ergosterol. Los antifúngicos del grupo de los azoles inhiben esta enzima bloqueando dicha conversión, reduciendo así el contenido de ergosterol en membrana, y como consecuencia, se acumulan esteroides aberrantes que resultan tóxicos para la célula (Lv *et al.*, 2016). En condiciones de hipoxia, las cuales podríamos encontrar a lo largo del TGI donde la concentración de oxígeno es menor, se aumenta la expresión de genes relacionados con la síntesis de ergosterol, como *ERG11* (Setiadi *et al.*, 2006).

Evaluamos la sensibilidad a azoles de células que sobreproducen *Wor1* en condiciones de normoxia y microaerofilia. Para ello, se realizó un ensayo de crecimiento en medio sólido suplementado con fluconazol (FZ) o miconazol (MZ) en medio sólido incubando las placas en las atmósferas de oxígeno indicadas (Figura 17). En condiciones de normoxia, la cepa CAI4-WOR1^{OE} es ligeramente más resistente a fluconazol que su control (CAI4-RFP) (Figura 17A y B) y a miconazol (Figura 17B), y mucho más cuando se incubaba en condiciones de microaerofilia (Figura 17C). Uno de los mecanismos

por los cuales ciertas cepas se muestran resistentes a fluconazol es el aumento de la expresión de *ERG11* (Morschhauser, 2002). Ante los resultados obtenidos en el apartado anterior, procedimos a la cuantificación de mRNA de *ERG11* mediante RT-qPCR (Figura 17). Los datos obtenidos, sin embargo, muestran que las células *WOR1*^{OE} expresan menos *ERG11* en comparación con su cepa control. Estos resultados indican que la sobreproducción de Wor1 genera resistencia a azoles dependiente de la concentración de oxígeno por mecanismos independientes a la sobreexpresión de *ERG11*.

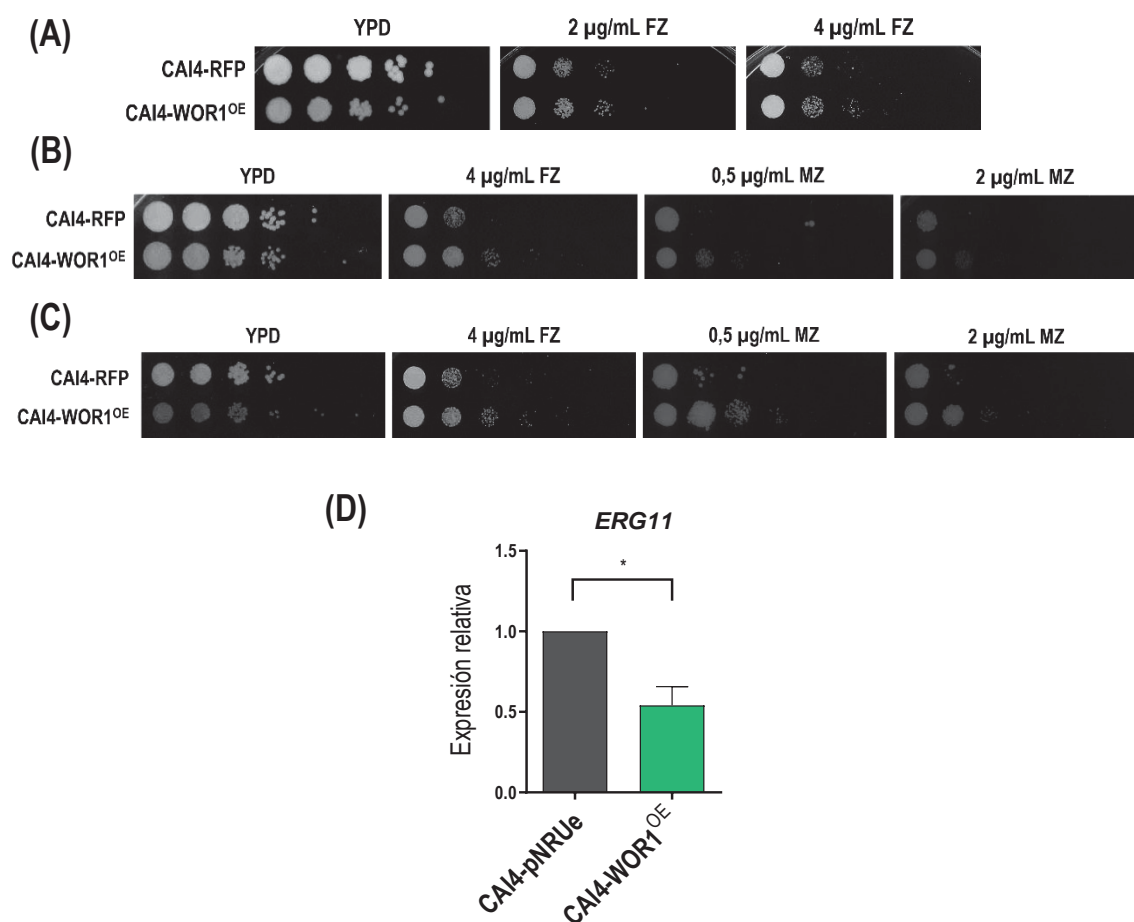


Figura 17. Efecto de la sobreexpresión de *WOR1* en la sensibilidad a fluconazol/miconazol y la expresión de *ERG11*.

A partir de suspensiones a D.O. 0,8 se realizan diluciones decimales, se depositan en YPD suplementado o no con las concentraciones indicadas de fluconazol (FZ) o miconazol (MZ) y se incubaron a 37°C en normoxia (A y B) o microaerofilia (C) durante 24 o 48 horas para FZ o MZ respectivamente. (D) Niveles de expresión de mRNA de *ERG11* en células en fase de crecimiento exponencial normalizada a la expresión de *ACT1*. La expresión se comparó usando como referencia el valor de la cepa CAI4-pNRUe. El gráfico muestra la media \pm SEM de tres experimentos independientes NS: no significativo, *p < 0,05.

C.3. Las células *WOR1^{OE}* son más sensibles a otros compuestos que generan estrés de pared y de membrana celular

d) Compuestos que afectan a la pared celular

Dada la sensibilidad a caspofungina que presentaban las cepas *WOR1^{OE}*, analizamos su comportamiento frente a otros compuestos que afectan a la pared celular. Tanto el blanco de calcoflúor (CFW) como el rojo Congo (RC) se unen a las fibras de quitina e interfieren con el correcto ensamblaje de la pared celular; además, el rojo Congo también inhibe la síntesis de β -(1,3)-glucanos.

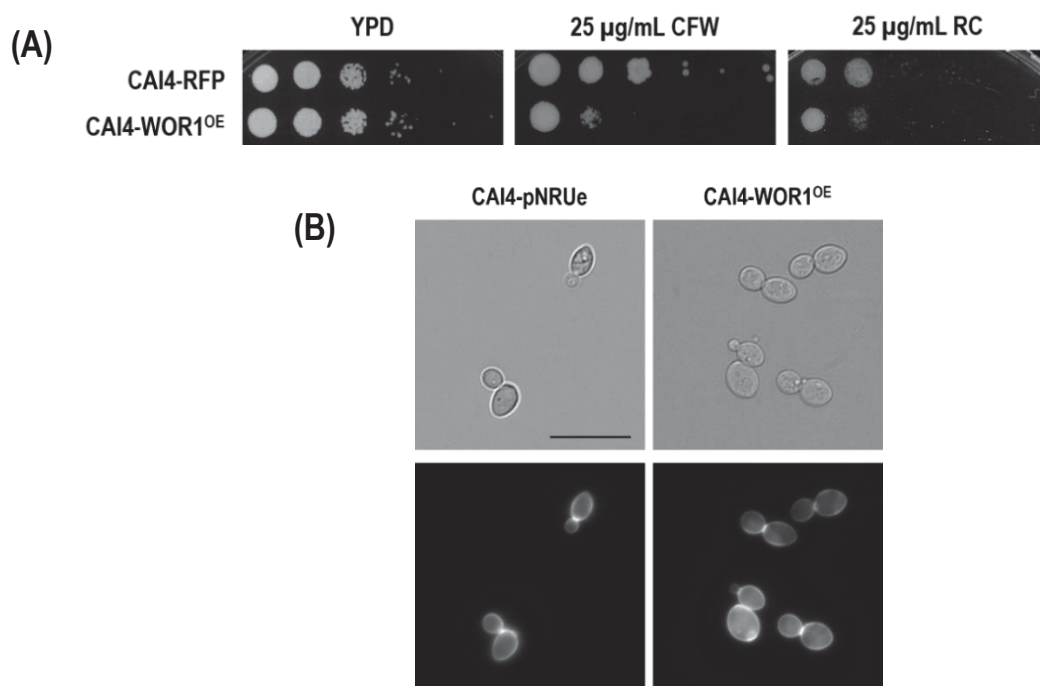


Figura 18. Sensibilidad a blanco de calcoflúor y rojo Congo y distribución de quitina en células *WOR1^{OE}* y silvestres.

(A) Crecimiento en placas de YPD suplementadas con 25 µg/mL de blanco de calcoflúor (CFW) o con 25 µg/mL de rojo Congo (RC). Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C. (B) Células crecidas en medio YPD líquido a 37°C se tiñeron con 5 µg/mL de blanco de calcoflúor y se tomaron fotografías en el microscopio de fluorescencia usando luz ultravioleta. La barra de escala (en negro) corresponde a 10 µm de tamaño.

Como se puede observar en la Figura 18A, la sobreproducción de *Wor1* confiere una mayor sensibilidad a ambos compuestos. Para comprobar si existen diferencias en la distribución de quitina en las células que sobreexpresan *WOR1*, se llevó a cabo una tinción con blanco de calcoflúor (Figura

18B); no se observaron diferencias significativas en la distribución de quitina entre la cepa control y la cepa CAI4-WOR1^{OE} que pudieran explicar el aumento de la sensibilidad a estos compuestos.

e) Compuestos que generan estrés de membrana celular

El establecimiento de las células en el tracto gastrointestinal podría depender, en parte, de la capacidad de resistir al efecto de las sales biliares a su paso por el intestino. La cepa WOR1^{OE} en fondo silvestre es más sensible a la acción de estas, lo cual ya había sido descrito con anterioridad por nuestro grupo (Prieto *et al.*, 2017). Para confirmar el defecto que poseen estas células para hacer frente a este tipo de estrés, se realizó un ensayo de crecimiento en presencia de sales biliares (SB) que actúan como un detergente emulsionando los lípidos, y de SDS, un detergente que actúa generando estrés de membrana de manera similar a estas. (Figura 19). Los resultados muestran que la cepa CAI4-WOR1^{OE} es más sensible a la acción del SDS al igual que cuando se exponen a sales biliares.

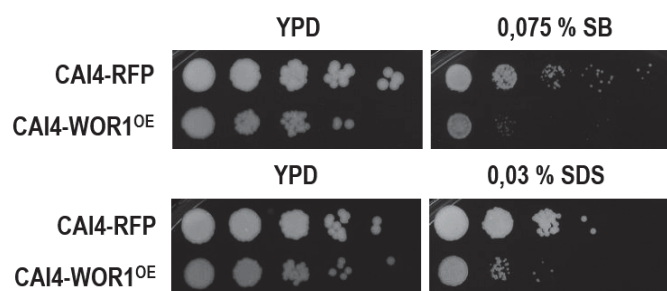


Figura 19. Sensibilidad a compuestos que provocan estrés de membrana en células WOR1^{OE} y silvestres.

Diluciones seriadas de una suspensión a D.O. 0,8 de células en fase estacionaria se depositaron en placas de YPD suplementadas con 0,075 % de sales biliares (SB) o 0,03 % de SDS. Las placas se incubaron durante 24-48 horas a 37°C antes de ser escaneadas.

C.4. Respuesta a estrés oxidativo y osmótico

La capacidad de hacer frente a estrés oxidativo, bien producido por las células del sistema inmunitario o por el propio metabolismo celular de *C. albicans*, y al estrés osmótico que se pudiera encontrar a su paso por el TGI, puede influir en la colonización de este nicho. Hog1 es la principal MAPK responsable de activar la respuesta adaptativa frente a ambos tipos de estrés (Alonso-Monge *et al.*, 1999, Alonso-Monge *et al.*, 2003, Enjalbert *et al.*, 2006), y los mutantes *hog1* son más sensibles a

compuestos oxidantes y osmoestresantes. Con el fin de determinar cómo afectaba la sobreexpresión de *WOR1* al crecimiento en estas condiciones, se propuso analizar su comportamiento *in vitro*.

f) Las células *WOR1^{OE}* son más sensibles a agentes oxidantes

Como primera aproximación, determinamos la capacidad de crecimiento *in vitro* en respuesta a los agentes oxidantes peróxido de hidrógeno (H_2O_2), diamida o menadiona (Figura 20). Como se puede observar en la figura, la sobreexpresión de *WOR1* incrementa la sensibilidad a todos estos oxidantes.

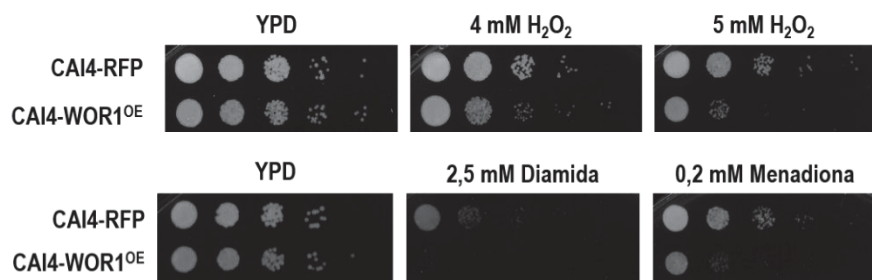


Figura 20. Respuesta a agentes oxidantes en las cepas CAI4-*WOR1^{OE}* y CAI4-RFP.

Diluciones seriadas realizadas a partir de una suspensión a D.O. 0,8 de células en fase estacionaria se depositaron en placas de YPD suplementadas con 4 o 5 mM de H_2O_2 , 2,5 mM de diamida o 0,2 mM de menadiona y se incubaron a 37°C durante 24 horas antes de ser escaneadas.

g) Activación de Hog1 en respuesta a estrés oxidativo en células *WOR1^{OE}*

Dada la sensibilidad que presentan las células *WOR1^{OE}* a agentes oxidantes, se propuso determinar si existe un defecto en la activación de Hog1 en respuesta a peróxido de hidrógeno. Para ello se partió de células creciendo en medio YPD a las que se les añadió H_2O_2 a 3 mM y se recogieron muestras a distintos tiempos para el análisis de la fosforilación de Hog1 mediante inmunodetección por *western blot* (Figura 21). En condiciones basales y de crecimiento exponencial (D.O.=1), se observa una ligera activación basal de Hog1 en las células que sobreexpresan *WOR1*. Tras la adición de H_2O_2 , Hog1 se fosforila (P-Hog1) rápidamente a los 30 segundos en la cepa silvestre, mientras que se detecta un cierto retraso en la cepa *WOR1^{OE}*, manteniendo niveles bajos de fosforilación hasta los 5 minutos. La activación es más intensa a los 10 minutos y se prolonga hasta mínimo los 30 minutos en células *WOR1^{OE}*, mientras que en la cepa silvestre los niveles decaen a los 30 minutos. Por tanto, la sobreproducción de *Wor1* implica un retraso en la respuesta a estrés oxidativo mediada por la ruta HOG, generando células con mayor sensibilidad a agentes oxidantes.

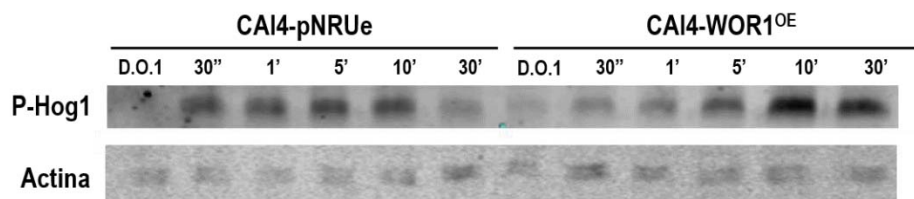


Figura 21. Activación de Hog1 en respuesta a H₂O₂ en las cepas CAI4-WOR1^{OE} y CAI4-pNRUe.

Inmunodetección por *western blot* de la activación de Hog1 en células en fase exponencial expuestas a H₂O₂ a 3 mM. Se recogieron muestras a tiempo inicial (antes de la adición del compuesto, D.O.=1) y a los 30 segundos y 1, 5, 10 y 30 minutos después de añadir H₂O₂. Para detectar la fosforilación de Hog1 (P-Hog1) se utilizó el anticuerpo anti-phospho-Hog1 y el anticuerpo anti-actina como control de carga.

h) La sobreproducción de Wor1 mejora el crecimiento en presencia de arseniato

El arsenito (As (III)) y el arseniato (As (V)) inducen estrés oxidativo en la célula detectado por un incremento de la producción de ROS, un aumento de la actividad catalasa y la acumulación intracelular de trehalosa (Urrialde *et al.*, 2017). El arseniato entra a través de los transportadores de fosfato dada su analogía estructural con este, mientras que el arsenito entra en la célula a través de gliceroporinas y puede ser transportado a la vacuola conjugado con glutatión a través de un transportador de tipo ABC. Una vez el arseniato se encuentra dentro de la célula, se reduce a arsenito por una arseniato reductasa, el cual resulta mucho más tóxico (Mukhopadhyay & Rosen, 2002).

Para comprobar la sensibilidad a estos compuestos, se analizó el crecimiento en presencia de arsenito y arseniato en la cepa WOR1^{OE} (Figura 22). Como se observa en la figura, estas células no presentan diferencias de crecimiento en arsenito comparado con el control, incluso a concentraciones de 6 mM (datos no mostrados). Los resultados de crecimiento en arseniato muestran una ligera mejora en el crecimiento cuando se sobreexpresa *WOR1*, indicando que puede existir cierta resistencia a As (V) en estas células.

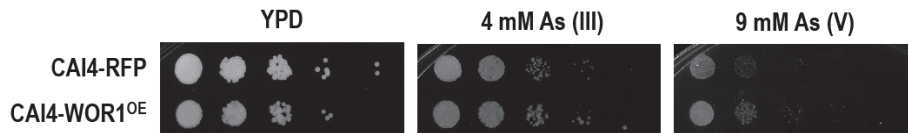


Figura 22. Crecimiento en As (III) y As (V) en células *WOR1*^{OE} y silvestres.

Diluciones seriadas de una suspensión a D.O. 0,8 de células en fase estacionaria se depositaron sobre agar YPD suplementado con 4 mM de arsenito sódico (As (III)) o 9 mM de arseniato sódico (As (V)). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas.

i) Las células *WOR1*^{OE} son más sensibles a estrés osmótico

Para determinar si la sobreproducción de *Wor1* confiere también un defecto en el crecimiento en presencia de cloruro sódico (NaCl), se realizó un ensayo de crecimiento en YPD suplementado con NaCl a 1,5 M (Figura 23). Como se puede observar, las células *WOR1*^{OE} presentaron mayor sensibilidad al estrés osmótico producido por el NaCl.

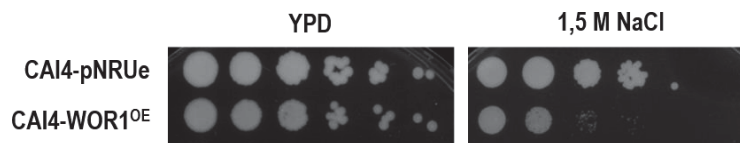


Figura 23. Sensibilidad a estrés osmótico en las cepas CAI4-WOR1^{OE} y CAI4-pNRUe.

A partir de una suspensión a D.O. 0,8 de células en fase estacionaria se realizaron diluciones seriadas y se depositaron sobre agar YPD suplementado con 1,5 M de cloruro sódico (NaCl). Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas.

D. Capacidad de filamentación y de formación de biopelículas

La plasticidad morfológica que posee *C. albicans* para poder crecer como levadura o hifa en distintas situaciones es esencial tanto en su carácter comensal (capacidad de adhesión) como patógeno (invasión de tejidos y diseminación). Tal y como hemos mencionado en la introducción, la capacidad de adhesión y de invasión se ve favorecida en la forma hifal tras la expresión de adhesinas e invasinas específicas. Algunas infecciones producidas por este microorganismo están asociadas a la formación

de biopelículas, en las cuales se pueden encontrar morfologías tanto de levaduras, pseudohifas e hifas, aunque los filamentos resultan esenciales para formar una biopelícula bien estructurada.

D.1. La sobreproducción de Wor1 en fondo silvestre bloquea parcialmente la filamentación

La filamentación puede ser inducida en respuesta a distintas condiciones ambientales y nutricionales e implica la activación de distintas rutas de transducción de señales (cAMP, ruta HOG o la ruta mediada por la MAPK Cek1, entre otras) que a través de factores de transcripción (Czf1, Cph1, Efg1, Nrg1 o Tup1, por citar algunos) regulan la expresión de genes específicos de hifas (*HWP1*, *EFH1*, *ECE1*, *RBT4*, *HYR1*, etc.). En condiciones inductoras, como es la presencia de suero, *C. albicans* filaminta mientras que los mutantes *efg1* son incapaces de formar filamentos verdaderos (Lo *et al.*, 1997). Dada la menor expresión de *EFG1* en la cepa CAI4-WOR1^{OE}, se propuso estudiar su capacidad de filamentar en presencia de suero bovino fetal (FBS).

Para ello las células crecieron en YPD suplementado con un 5 % o en 100 % de FBS y se incubaron a 37°C durante 48 horas. Como se observa en la Figura 24A, mientras que la cepa silvestre es capaz de formar filamentos tras 2 horas de incubación en las distintas concentraciones de suero usadas, la cepa CAI4-WOR1^{OE} (Figura 24B) mostró defectos claros en la capacidad de filamentación, observándose un predominio de células levaduriformes y una parte de filamentos cortos o pseudohifas y de células aberrantes. A las 48 horas de incubación, se observó una menor filamentación en ambos casos, sobre todo en el caso de la cepa CAI4-WOR1^{OE} donde además las células presentaban un aumento de tamaño considerable. Esto demuestra que la sobreexpresión de *WOR1* en fondo silvestre conlleva un defecto en la capacidad de filamentación, probablemente por la baja expresión de *EFG1*.

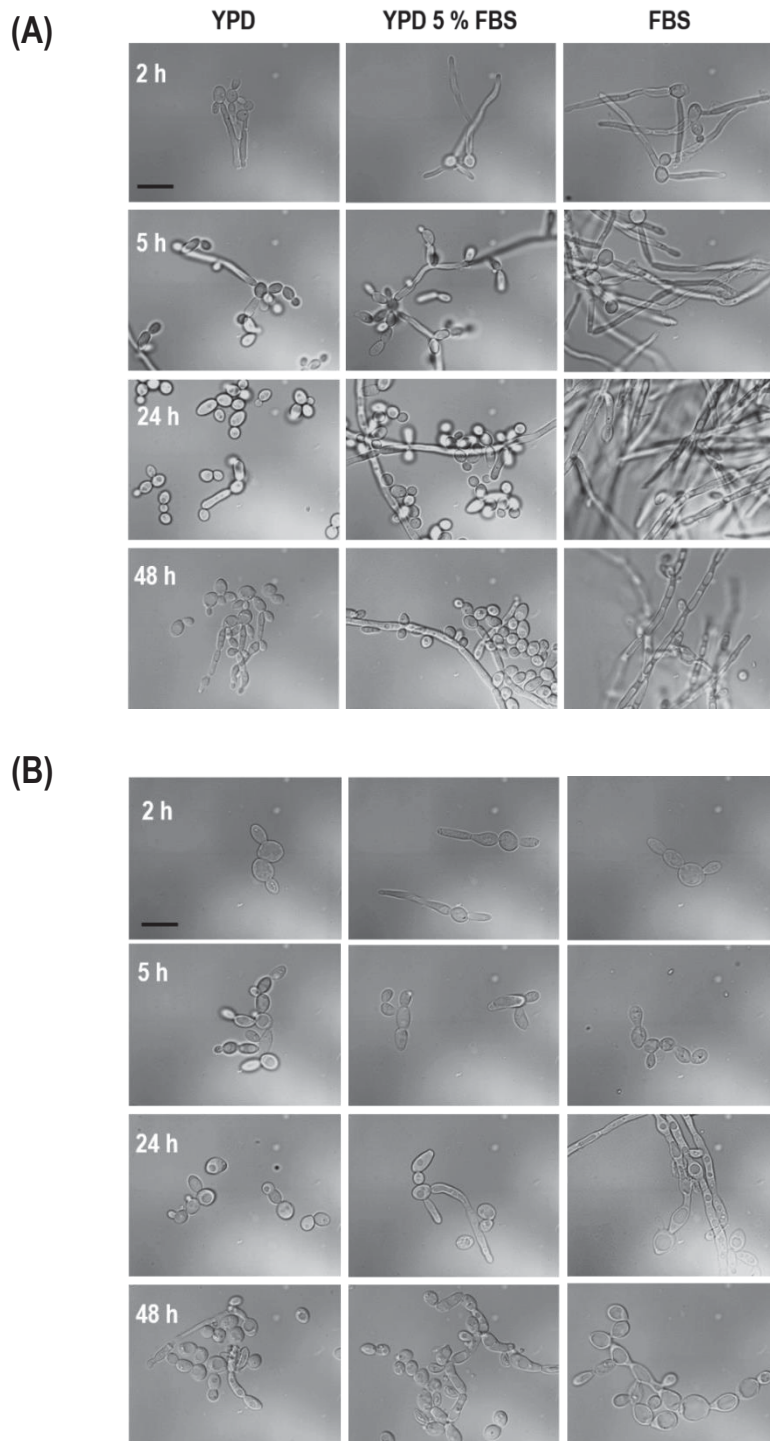


Figura 24. Análisis de la filamentación en presencia de suero en las cepas CAI4-WOR1^{OE} y CAI4-pNRUe.

Filamentación de las cepas (A) CAI4-pNRUe o (B) CAI4-WOR1^{OE} en YPD líquido suplementado o no con un 5 % o en 100% de FBS. Los cultivos fueron incubados a 37°C en agitación y se tomaron fotografías a los tiempos indicados para observar la capacidad de filamentar de estas cepas. La barra de escala negra corresponde a un tamaño celular de 10 μ M.

D.2. La sobreproducción de Wor1 en fondo silvestre impide la formación de biopelículas estructuradas

La capacidad de formación de biopelículas estructuradas depende a su vez de la capacidad de filamentación de las células. Dado que la cepa CAI4-WOR1^{OE} presenta defectos de filamentación, se procedió a estudiar la estructura y morfología de las células que conforman sus biopelículas. Para ello, las células se incubaron en medio RPMI-MOPS en placa multipocillo durante 48 horas a 37°C y las biopelículas se observaron al microscopio. En la Figura 25A se observa que la cepa silvestre desarrolló una biopelícula estructurada, presentando levaduras e hifas, esta segunda en mayor abundancia; sin embargo, la biopelícula formada por la cepa CAI4-WOR1^{OE} estaba formada principalmente por levaduras en cadenas y algunas hifas. Posteriormente las biopelículas se resuspendieron y se observó la morfología celular al microscopio (Figura 25B). Mientras que la cepa silvestre desarrolló en su mayoría hifas de gran longitud, la cepa CAI4-WOR1^{OE} presentó una gran mayoría de levaduras en cadenas y una menor proporción de filamentos con menor longitud. La observación con un aumento de 100x (Figura 25C) nos permitió observar que, aunque la cepa WOR1^{OE} fue capaz de formar pseudohifas e hifas de morfología similar a una cepa silvestre, crecía también en forma de filamentos más cortos con zonas de ensanchamiento. Además, las levaduras que se encontraron formando cadenas presentaban un tamaño celular más grande de lo normal y con formas aberrantes en muchos casos. Estos resultados confirman que la sobreproducción de Wor1 afecta a la capacidad de filamentación y a la morfología celular, afectando a su capacidad de formar biopelículas estructuradas.

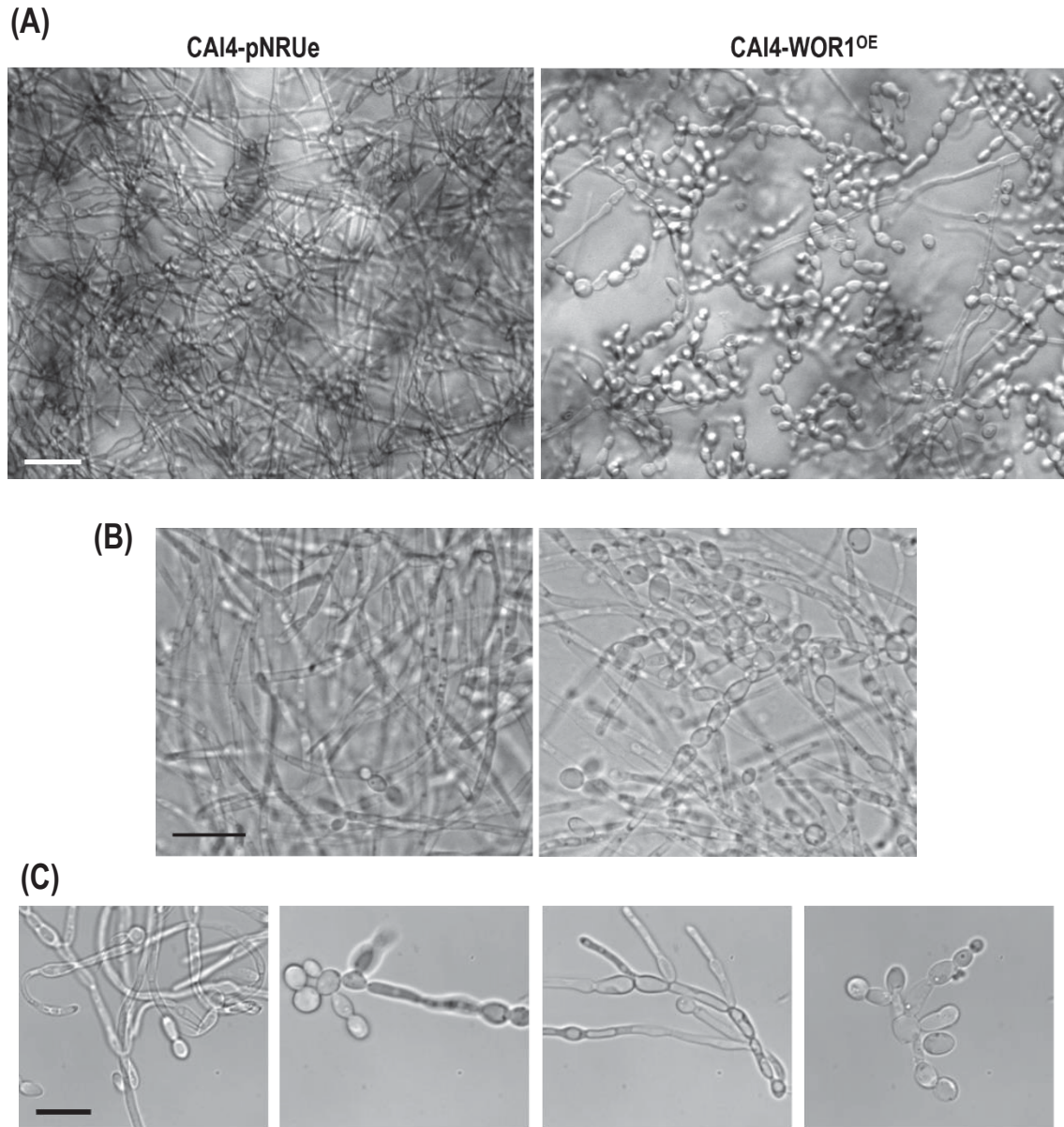


Figura 25. Análisis de la estructura de biopelículas y de la morfología de células *WOR1^{OE}* y silvestres.

Crecimiento de biopelículas en medio RPMI-MOPS a 37°C en placa multipocillo durante 48 y 72 horas. (A) Imágenes en microscopio de las biopelículas a las 48 horas con un aumento de 20x. La barra de escala blanca corresponde a un tamaño de 20 μm . (B) Imágenes de las células a las 72 horas. Las células de los pocillos se resuspendieron y se tomó una muestra para observar al microscopio con un aumento de 40x. La barra de escala negra corresponde a un tamaño de 20 μm . (C) Detalles del crecimiento de las células de la cepa CAI4-WOR1^{OE} en el microscopio con un aumento de 100x. La barra de escala negra corresponde a un tamaño de 10 μm .

E. Papel de Als3 y otras proteínas que participan en la patogénesis

La adhesión al hospedador es una fase necesaria para la patogénesis que requiere la invasión del tejido, y este proceso está favorecido por la capacidad de filamentar y por la secreción de hidrolasas. Con el fin de determinar la importancia de estas proteínas en la cepa CAI4-WOR1^{OE}, se analizó la expresión de algunas que participan en la adhesión, así como el papel de una de ellas, Als3, en la capacidad de colonización del TGI utilizando el modelo murino de comensalismo y de adhesión a mucosa intestinal.

E.1. Expresión de *ALS3*, *HWP1*, *EAP1*, *ALS6* y *ECE1*

Algunas de las proteínas fúngicas mejor estudiadas que participan en adhesión son las proteínas de la familia Als (Kapteyn *et al.*, 2000, Filler & Sheppard, 2006, Phan *et al.*, 2007), Hwp1 (Staab *et al.*, 1999) y Eap1 (Li & Palecek, 2003). Als3, Hwp1 y Eap1 participan en los procesos de adhesión, invasión, y en la formación y mantenimiento de biopelículas. Ece1, por su parte, es una proteína cuyo procesamiento da lugar al péptido candidalísina que produce daño en el epitelio durante el desarrollo de la infección. Estas proteínas están reguladas por Efg1 (Leng *et al.*, 2001, Li & Palecek, 2003) y la expresión de *ALS3*, *HWP1* y *ECE1* aumenta durante el curso de la filamentación (Fan *et al.*, 2013). La regulación de Efg1 sobre *ALS6* se desconoce, aunque esta adhesina presenta interés ya que su delección aumenta la adhesión de *C. albicans* a células del endotelio vascular y del epitelio bucal a diferencia del resto de adhesinas (Zhao *et al.*, 2007).

Para comprobar cómo afectaba la sobreexpresión de *WOR1* a la expresión de estas proteínas, se cuantificó la expresión de mRNA de *ALS3*, *HWP1*, *EAP1*, *ALS6* y *ECE1* mediante RT-qPCR (Figura 26). Dado que es la forma levaduriforme la que por lo general lleva a cabo el primer contacto con las células epiteliales del hospedador, se optó por estudiar la expresión de estas proteínas en células con esta morfología y no en filamentos en células que sobreproducen Wor1. No se detectó una expresión significativa de *ALS3*, *HWP1* o *ECE1* en estas condiciones y no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de *EAP1*; sin embargo, se encontró una diferencia significativa en la expresión de mRNA de *ALS6*, la cual disminuye cuando se sobreexpresa *WOR1*. Estos resultados indican que las células *WOR1*^{OE} regulan efectivamente la expresión de estas proteínas.

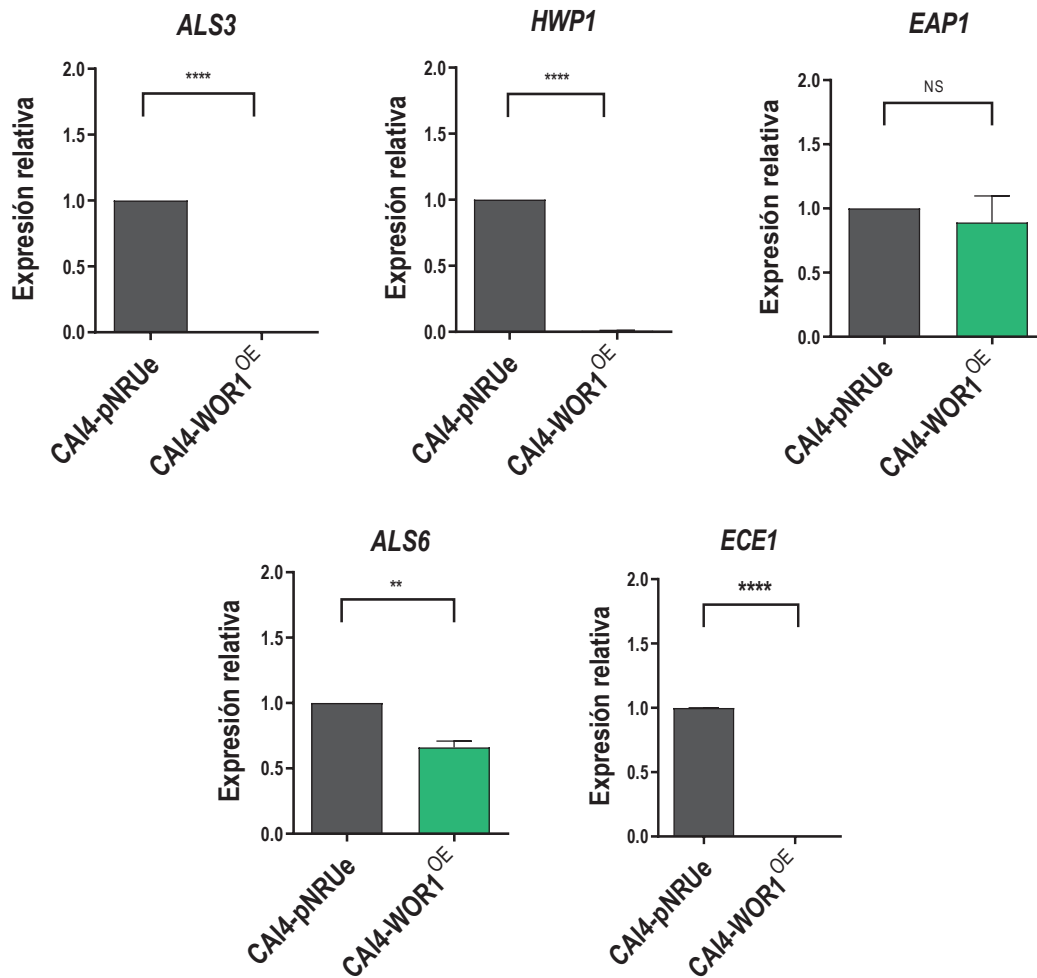


Figura 26. Expresión de mRNA de *ALS3*, *HWP1*, *EAP1*, *ALS6* y *ECE1* en células *WOR1^{OE}* y silvestres.

A partir de células en fase exponencial de crecimiento incubadas a 37°C, se extrajo RNA y se procedió a sintetizar cDNA para cuantificar la expresión génica por RT-qPCR. La expresión de adhesinas se normaliza a la expresión de *ACT1*, y se toma la expresión de la cepa CAI4-pNRUe como referencia. El gráfico muestra la media \pm SEM de tres experimentos independientes. NS: no significativo, ** $p < 0,01$, **** $> 0,0001$.

E.2. Papel de Als3 en la adhesión y colonización del TGI del ratón

Als3 es una adhesina e invasina para la cual se han descrito diferentes funciones que resultan esenciales en la biología celular y en la patogénesis de *C. albicans*. Durante su establecimiento en el hospedador, esta proteína participa en las uniones célula-célula y en la unión a las células epiteliales a través de sus receptores, induciendo la endocitosis y permitiéndole invadir los tejidos (Phan *et al.*, 2007, Liu & Filler, 2011). Participa en la formación y mantenimiento de biopelículas y, por otro lado,

participa en la homeostasis del hierro ya que es capaz de unir ferritina para cubrir las necesidades de celulares (Noble, 2013). Los resultados presentados en el apartado anterior indican que la cepa CAI4-WOR1^{OE} tiene menores niveles de expresión de estas adhesinas, incluyendo Als3, en las condiciones analizadas. Dado que no se ha demostrado hasta la fecha el papel de dicha proteína en modelos *in vivo*, en este apartado analizamos si Als3 es esencial para el comensalismo mediante experimentos que determinan la adhesión *ex vivo* a mucosa intestinal y la capacidad de colonización de un mutante *als3*.

a) El mutante *als3* no es esencial para la adhesión a mucosa intestinal

Con el fin de analizar si el mutante *als3* presenta defectos de adhesión, se llevó a cabo un ensayo de adhesión *ex vivo* a mucosa intestinal en competición que nuestro grupo ha usado previamente (Prieto *et al.*, 2014).

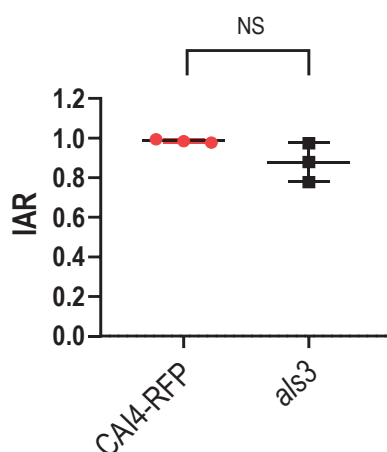


Figura 27. Análisis de adhesión *ex vivo* a mucosa intestinal en un mutante *als3* y la cepa silvestre CAI4-RFP.

A partir de una suspensión celular en proporción 1:1 en RPMI se depositan 10^6 células sobre la porción del intestino. El tejido disgregado se siembra para el recuento de UFCs/mL. El índice de adhesión relativa (IAR) se calcula dividiendo el valor de UFCs/mL en porcentaje de las células adheridas entre el valor del inóculo inicial. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm SD de tres resultados. NS: no significativo.

Para ello, se usa una porción de intestino grueso de ratón que se expone sobre el lumen y se forma un pocillo sobre el cual una mezcla en proporción 1:1 de las cepas CAI4-RFP y *als3* son incubadas en medio RPMI a 37°C. El tejido se disgrega posteriormente y se realizan diluciones seriadas que se siembran en medio SD para realizar un recuento de las colonias rojas (CAI4-RFP) y de las blancas

(mutante *als3*). Como se observa en la Figura 27, no se encontraron diferencias significativas entre ambas cepas cuando compiten, lo cual sugiere que Als3 no es esencial para la adhesión a la mucosa intestinal del ratón.

b) Als3 no es esencial para el establecimiento de *C. albicans* en el TGI del ratón

Para analizar la importancia de Als3 durante la colonización, se llevó a cabo un ensayo de competición del tracto gastrointestinal del ratón utilizando el modelo de comensalismo descrito anteriormente. Para ello, se inoculó una suspensión celular en proporción 1:1 de la cepa CAF2-RFP y del mutante *als3* y se recogieron muestras fecales de los ratones a los tiempos indicados. Las muestras fueron procesadas y sembradas en placas de agar SD cloranfenicol y se incubaron a 37°C para posteriormente realizar un recuento de colonias rojas y blancas como en el experimento anterior. Como se observa en la Figura 28, ambas cepas colonizan a los mismos niveles durante los primeros 3 días, momento a partir del cual se observa una pequeña disminución en las tasas de colonización del mutante *als3* que se mantiene hasta el final del experimento. Estos resultados indican que Als3 no es esencial para la colonización de *C. albicans* del tracto gastrointestinal del ratón, ya que el mutante es capaz de establecerse compitiendo con una cepa silvestre.

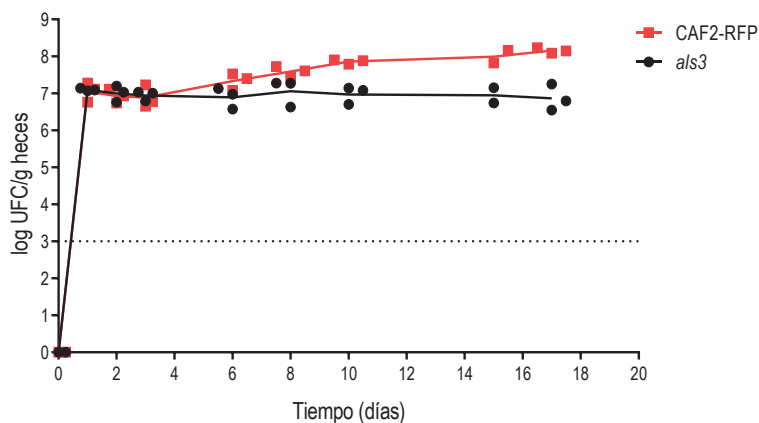


Figura 28. Co-colonización del TGI del ratón del mutante *als3* y de la cepa silvestre CAF2-RFP.

Niveles de colonización en los ensayos de competición de la cepa CAF2-RFP y del mutante *als3*. Los resultados se muestran en UFCs/g de heces en unidades logarítmicas de cada individuo en cada uno de los grupos \pm SD (n=3). La línea punteada indica el límite de detección.

F. Actividad fosfolipasa y proteasa

La secreción de enzimas que desorganizan y rompen las barreras del hospedador incrementa la capacidad de *C. albicans* de invadir los tejidos. Las fosfolipasas y las proteasas causan daño en las células nivel de membrana y pared celular, pero también les sirven para obtener nutrientes del hospedador. Las proteasas son responsables de hidrolizar proteínas diversas como mediadores del sistema inmunitario como inmunoglobulinas, proteínas del sistema del complemento y citoquinas (Schaller *et al.*, 2005, Scholfield *et al.*, 2005); por lo tanto, la capacidad de producir este tipo de enzimas juega un papel muy importante en la patogénesis de este hongo. Por ello, determinamos la producción de este tipo de enzimas.

La determinación de la actividad fosfolipasa fue llevada a cabo en los medios de cultivo SEA (agar Sabouraud huevo) y MEA (agar malta huevo) a diferentes concentraciones de cloruro sódico y disponibilidad de oxígeno (Figura 29). La observación de actividad fosfolipasa se determinó mediante la medida del radio de la zona o halo de hidrólisis. Tal y como se puede observar, el incremento de cloruro sódico de 0,5 M a 1 M disminuye la actividad fosfolipasa de las cepas, pero no su crecimiento, y los halos de hidrólisis son mayores en el agar MEA que está suplementado con extracto de malta y peptona entre otros componentes. La sobreproducción de *Wor1* incrementa la actividad fosfolipasa en ambos medios de cultivo comparado con su respectivo control, fenotipo que es independiente de la disponibilidad de oxígeno ya que no se detectaron diferencias en condiciones de normoxia o de microaerofilia.

Para la determinación de la actividad proteasa se llevó a cabo un experimento similar en medio BSA (albúmina de suero bovino) en condiciones de normoxia y microaerofilia. Como se muestra en la Figura 30, la sobreexpresión de *WOR1* también incrementó la actividad proteasa en ambas condiciones. Estos resultados, en conjunto, indican que la sobreproducción de *Wor1* incrementa la producción de fosfolipasas y de proteasas.

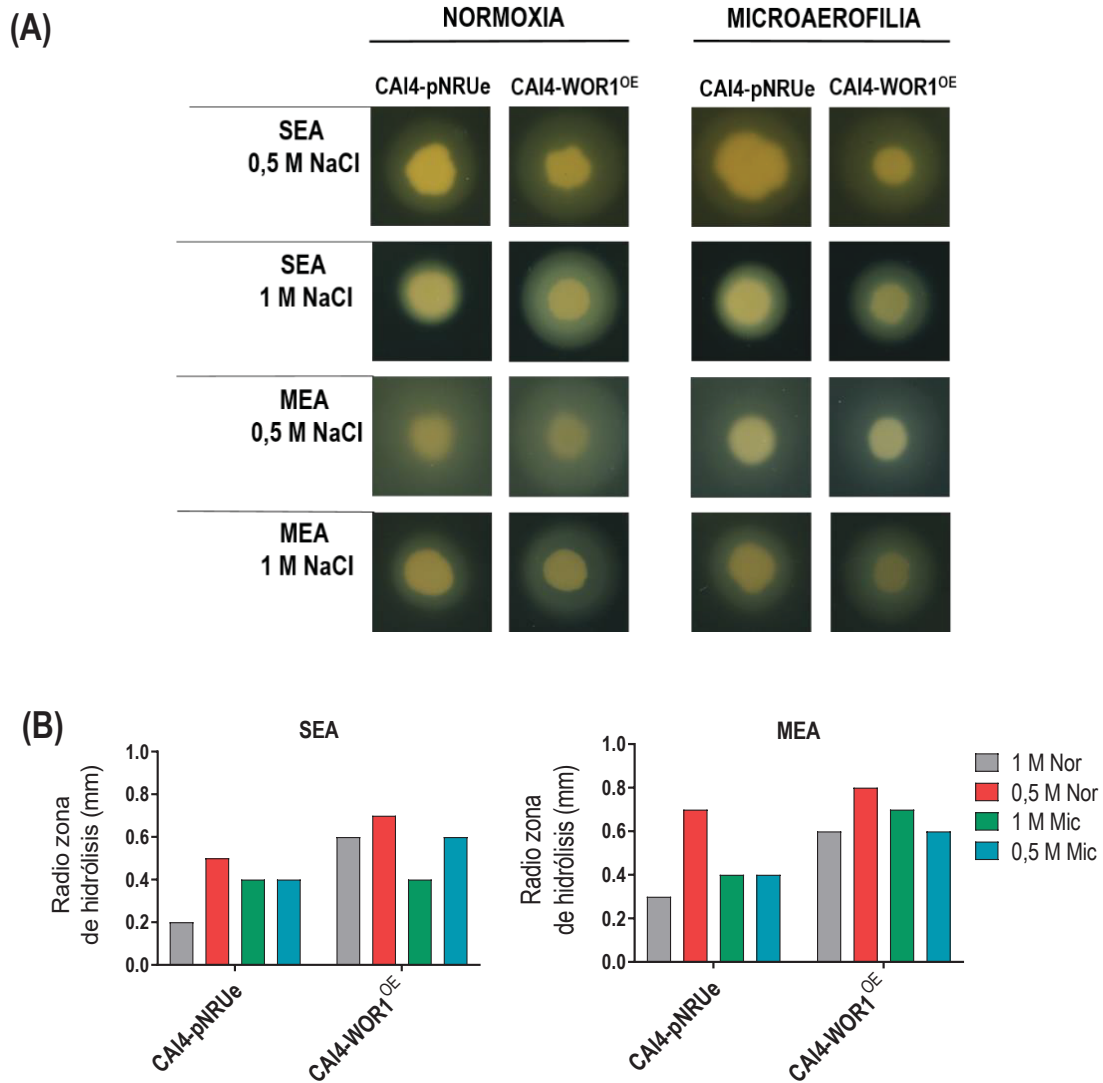


Figura 29. Actividad fosfolipasa en las cepas CAI4-WOR1^{OE} y CAI4-pNRUe.

A partir de una suspensión celular a D.O.=1, se depositaron gotas de las cepas indicadas sobre agar MEA o SEA, y se incubaron durante 96 horas a 37°C en condiciones de normoxia o microaerofilia. (A) Imágenes correspondientes de las placas escaneadas a las 96 horas de incubación y (B) medida del radio de la zona de hidrólisis. Nor, normoxia. Mic, microaerofilia.

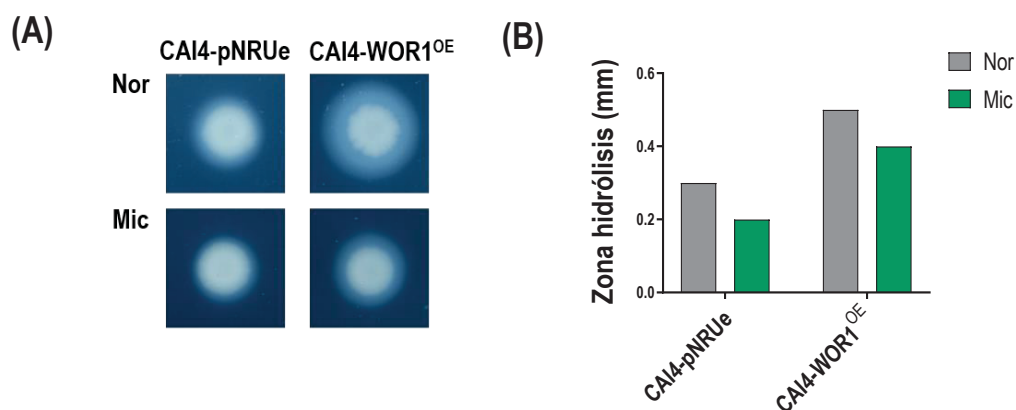


Figura 30. Actividad proteasa en las células que sobreproducen Wor1 y silvestres.

A partir de una suspensión celular a D.O.=1 se depositaron gotas sobre agar BSA y se incubaron durante 120 horas a 37°C en condiciones de normoxia o microaerofilia. Se muestra las imágenes correspondientes de las placas escaneadas a las 120 h de incubación (A) y los radios de los halos de hidrólisis (B). Nor, normoxia. Mic, microaerofilia.

G. Homeostasis de hierro

El hierro (Fe) es un componente esencial de los organismos y participa en muchos procesos biológicos. *C. albicans* es capaz de adaptarse a ambientes extremos a través de sistemas de adquisición y transporte de hierro, y una correcta homeostasis es necesaria para establecerse y colonizar nichos donde su disponibilidad es variable. Asimismo la relación que establezca con el hospedador, bien como comensal o como patógeno, resulta determinante para la regulación de la captación de hierro (Chen *et al.*, 2011, Noble, 2013). Existe una gran disponibilidad de hierro que proviene de la dieta y que puede resultar tóxico para las células que colonizan el TGI; sin embargo, el hospedador pone en marcha mecanismos para restringir la disponibilidad de este a los patógenos en determinadas localizaciones, lo que limita su capacidad de generar una infección sistémica. Por ello, hemos analizado la regulación de la captación, almacenamiento y utilización de este metal tras la sobreproducción de Wor1.

G.1. Las células que sobreproducen *Wor1* en fondo silvestre no presentan diferencias en la adquisición de hierro, pero sí en su almacenamiento

Para comprobar como afectaba la sobreexpresión de *WOR1* a la adquisición de hierro, se analizó la capacidad de crecimiento en condiciones limitantes de este metal. Las células se incubaron durante 8 horas en medio YPD, se lavaron y se diluyeron en medio LIM0 (medio LIM (*low iron medium*) sin FeCl_3) para establecer el ayuno de hierro durante la noche. Posteriormente, se inocularon en pocillos con concentraciones variables de FeCl_3 (0,07-15 μM) y se incubaron durante 48 horas a 37°C. La Figura 31A muestra la relación de la absorbancia a concentración máxima (15 μM) entre la absorbancia obtenida en el resto de las concentraciones. Como se observa, en ausencia de hierro los valores alcanzados fueron muy bajos y similares entre ambas cepas dado el ayuno de hierro prolongado. Según aumenta la concentración de hierro, aumenta la *ratio* correspondiente en ambas cepas de forma similar, si bien se observó una menor *ratio* de absorbancia de la cepa CAI4-*WOR1*^{OE} a LIM1,9. La *ratio* de absorbancia entre LIM4 y LIM16 determina que ambas cepas crecen de la misma manera, incluso a altas concentraciones de hierro, no detectándose efectos de toxicidad. Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de *WOR1* en fondo silvestre no induce defectos en la capacidad de adquisición de hierro.

A continuación, analizamos cómo afectaba la sobreproducción de *Wor1* al almacenamiento y utilización de hierro. El disulfonato batofenantrolina (BPS) es un quelante hierro extracelular que evita que las células puedan adquirir este metal del exterior y, por lo tanto, fuerza a las células a hacer uso de sus reservas intracelulares. Para llevar a cabo el ensayo, las células se incubaron previamente en presencia o ausencia de doxiciclina para reprimir o no la expresión de *WOR1*, y al día siguiente se incubaron en medio SD suplementado con concentraciones decrecientes de BPS \pm doxiciclina. La doxiciclina también actúa como quelante de hierro (Javed & Zahir, 2017), aunque su efecto no es apreciable dada la concentración utilizada en este experimento. Como se observa en la Figura 31B, las células que sobreexpresan *WOR1* son más sensibles a la acción quelante del BPS respecto de la cepa control, donde concentraciones de 15,6 y de 31,6 μM respectivamente son capaces de inhibir considerablemente el crecimiento de las mismas. La cepa silvestre mejora su crecimiento en presencia de doxiciclina, observándose inhibición de crecimiento a 62,5 μM de BPS en lugar de 31,6 μM como se muestra sin doxiciclina. En presencia de doxiciclina, la expresión de *WOR1* es reprimida y las células son igual de sensibles a BPS que la cepa silvestre sin doxiciclina. Este

resultado sugiere que las células *WOR1^{OE}* son más dependientes del hierro intracelular para cubrir sus necesidades metabólicas.

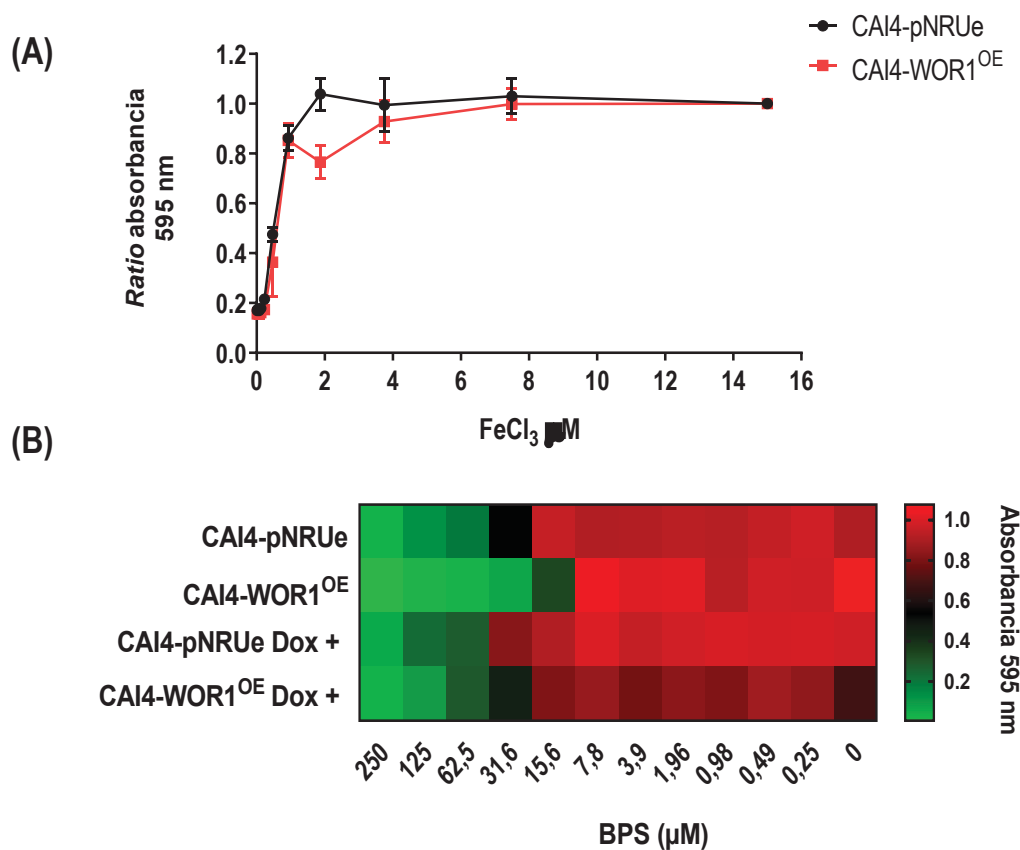


Figura 31. Caracterización del crecimiento en medio con disponibilidad variable de hierro en las cepas CAI4-WOR1^{OE} y CAI4-pNRUe.

(A) 10^4 células en ayuno de hierro se inocularon en medio bajo en hierro (LIM, low iron medium) suplementado con diferentes concentraciones de FeCl_3 (0,07-15 μM) y se incubaron a 37°C. La absorbancia se midió a las 48 horas a 595 nm y se estimó la relación de la *ratio* de absorbancia respecto a la obtenida a 15 μM . Los resultados muestran la media \pm SD. (B) Tras 18 horas de crecimiento en medio YPD \pm 5 $\mu\text{g/mL}$ de doxiciclina, 10^4 células fueron inoculadas en medio SD suplementado con diferentes concentraciones de BPS (250-0,25 μM) \pm 5 $\mu\text{g/mL}$ Dox. La absorbancia se midió a 595 nm tras 48 horas de incubación a 37°C y los datos se representaron en un gráfico de tipo *heat map*.

G.2. Papel de Wor1 en la adquisición y almacenamiento de hierro a través de su estudio en mutantes *sef1*, *sfu1* y *hap43*

C. albicans regula la homeostasis del hierro a través de un sistema compuesto por tres reguladores transcripcionales: Sfu1, Sef1 y Hap43 (Figura 32). En condiciones de alto hierro, Sfu1 reprime la

expresión de *SEF1* y de genes que regulan la adquisición de Fe. Cuando existe una baja concentración de hierro, Sef1 activa la expresión de *HAP43* y de genes necesarios para la adquisición de hierro, así como de factores de virulencia, reprimiéndose *SFU1* vía Hap43 (Chen *et al.*, 2011). La regulación de estos factores de transcripción, por lo tanto, está relacionada con la virulencia y la capacidad de colonización de este hongo. Las células GUT aumentan la expresión de *SFU1* y disminuyen la de *SEF1* dado el alto contenido de hierro que existe en el TGI del ratón mientras que, en sangre, donde este metal se encuentra en baja concentración, las células aumentan la expresión de *SEF1* y disminuyen la de *SFU1*. Para determinar el papel de *Wor1* en la adquisición y utilización de hierro cuando existen deficiencias en su regulación, se sobreexpresó *WOR1* en mutantes *sef1*, *sfu1* y *hap43* y se evaluó su crecimiento en presencia de alta y baja concentración de hierro.

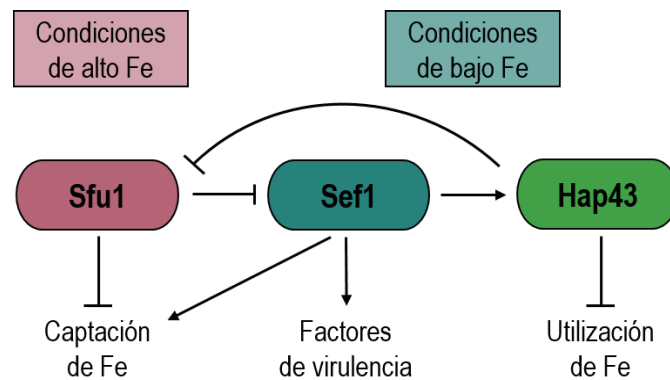


Figura 32. Regulación de la homeostasis del hierro en *C. albicans*.

Los represores transcripcionales Sfu1 y Hap43 y el activador transcripcional Sef1 controlan la homeostasis del hierro (Fe). La expresión de *SFU1* se induce en ambientes con alto hierro mientras que *SEF1*, y como consecuencia *HAP43*, se inducen en condiciones limitantes de este metal. Hap43 a su vez reprime Sfu1. Figura adaptada de (Chen *et al.*, 2011).

a) Obtención de cepas *WOR1^{OE}* en mutantes con defectos en la regulación de hierro

Para la construcción de las cepas utilizamos los vectores pNIM1RX-WOR1-myc, que sobreexpresa *WOR1* en fusión al epítipo Myc en un sistema regulado por doxiciclina, así como la versión vacía de este plásmido (pNIM1RXe). Ambos plásmidos se integraron en el genoma de las cepas SN250, *sef1*, *sfu1*, CAI4-Clp10 (contiene el gen *CaURA3* por la integración del plásmido CIP10 en el locus *RPS1* (Vandeputte *et al.*, 2012)) y *hap43*. La selección de transformantes se llevó a cabo en medio YPD suplementado con 200 µg/mL de nirsotricina, y mediante *dot blot* (datos no mostrados) y *western*

blot usando el anticuerpo anti-myc (materiales y métodos), se comprobó la presencia de la proteína de fusión Wor1-myc, detectándose la banda de tamaño teórico de 89 kDa cuando las células se incuban en YPD, y ausencia de esta cuando se incuban en YPD suplementado con doxiciclina. Estas cepas se denominaron pNIM1RXe, si integraron la versión vacía del plásmido, o WOR1^{OE}, si sobreexpresan *WOR1*. Adicionalmente se observó al microscopio si estas cepas presentaban el fenotipo característico de las células WOR1^{OE} (Figura 33). En todos los fondos genéticos observamos que la sobreexpresión de *WOR1* genera células de mayor tamaño y presentan una vacuola grande.

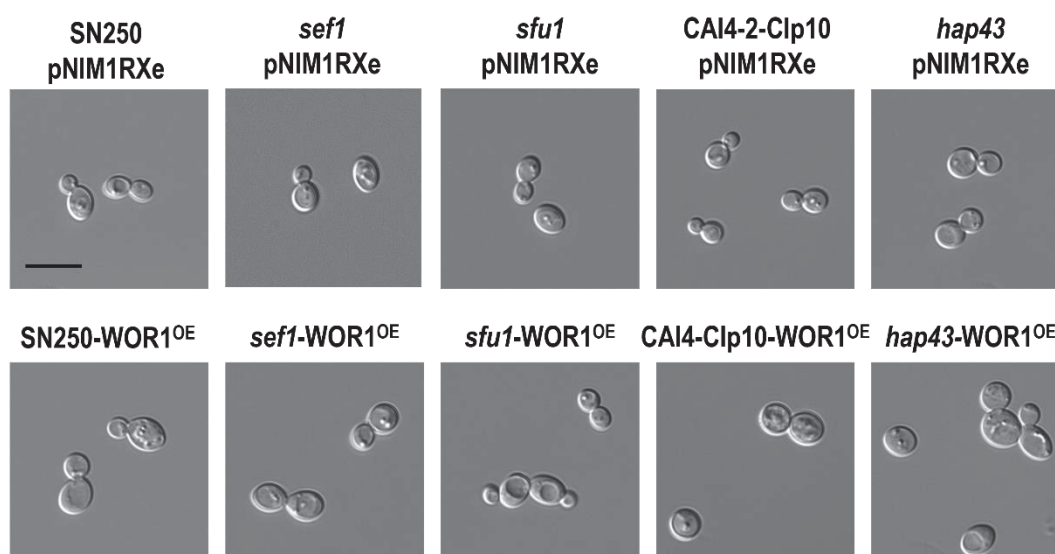


Figura 33. Caracterización de los mutantes con defectos en la regulación de hierro que sobreproducen Wor1.

Las cepas controles pNIM1RXe o WOR1^{OE} fueron incubadas en medio YPD a 37°C durante 24 horas y observadas a microscopio para observar su morfología. La barra de escala negra corresponde con un tamaño de 10 μ M.

b) Adquisición y almacenamiento de hierro en mutantes *sef1*, *sfu1* y *hap43* que sobreproducen Wor1

Con el objetivo de caracterizar la adquisición, almacenamiento y utilización de hierro en estas cepas, se realizó una primera aproximación en medio sólido con BPS y/o alta concentración de hierro (Figura 34A). En presencia de BPS, los mutantes *sef1* y *hap43* parecen más sensibles a la acción de este

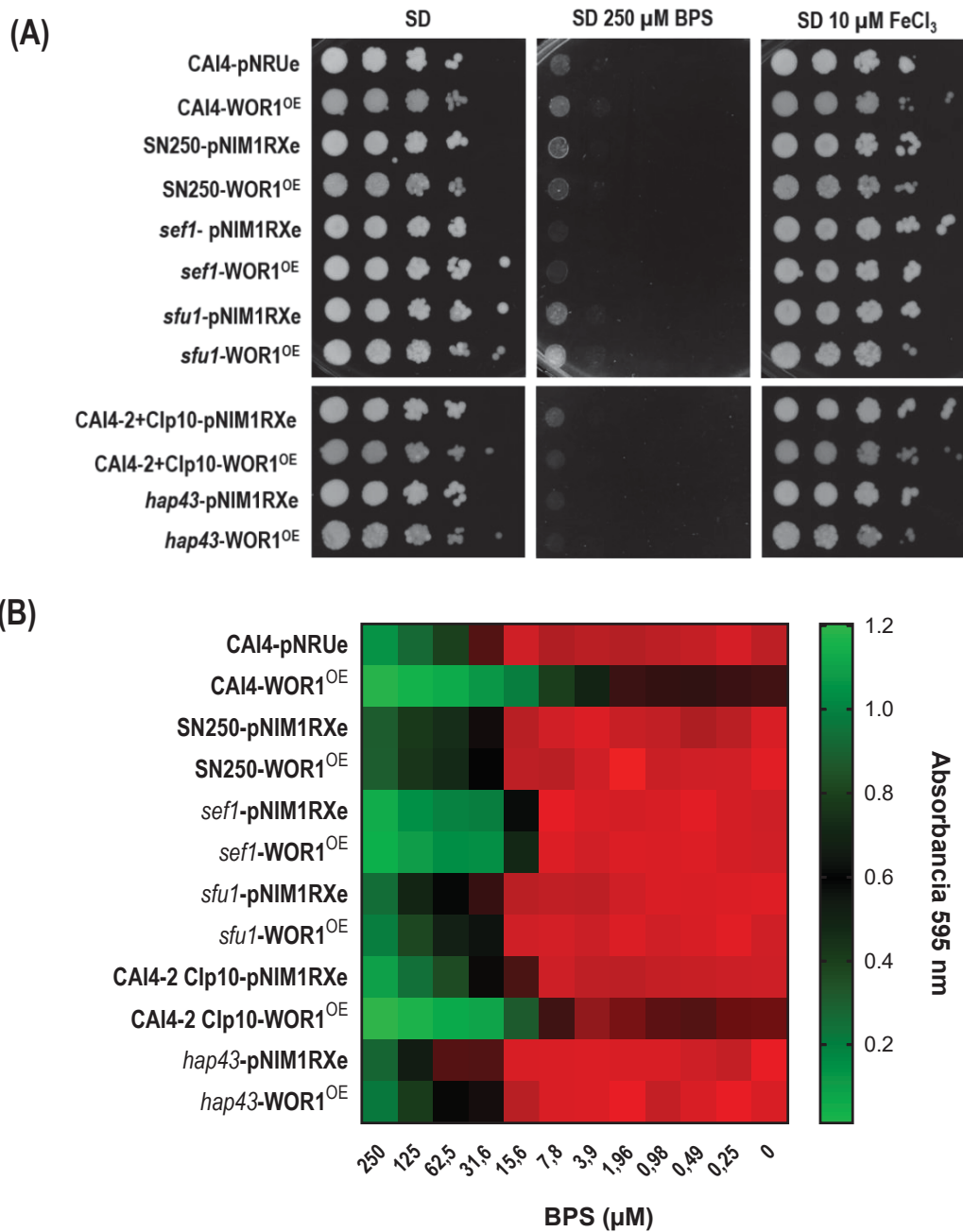


Figura 34. Crecimiento en BPS y alta concentración de Fe de los mutantes en la regulación de hierro que sobreproducen Wor1.

(A) Diluciones seriadas de cultivos a D.O. 0,8 se depositaron sobre agar SD suplementado con 250 μM de BPS o con 10 μM de FeCl_3 y se incubaron a 37°C durante 24-48 horas. (B) A partir de cultivos en fase estacionaria de crecimiento incubados en YPD, se inocularon 10^4 células en placa multipocillo con medio SD suplementado con diferentes concentraciones de BPS (250-0,25 μM) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. La lectura de la absorbancia se realizó a 595 nm y los datos se representaron en un gráfico de tipo *heat map*.

quelante, aunque en general las cepas crecieron de manera similar. No se encontraron diferencias de crecimiento en medio con alto contenido de hierro en ninguna de estas cepas.

Cuando analizamos el crecimiento en medio líquido SD suplementado con cantidades decrecientes de BPS (Figura 34B), se observó que los mutantes *sef1* son más sensibles a la presencia de BPS comparado con su control, encontrando una inhibición del crecimiento a 15,6 μM . No se encontraron diferencias de crecimiento en mutantes *sfu1* que, de forma similar a su correspondiente cepa control SN250, presentaron una inhibición de crecimiento entre 125-62,5 μM . Los mutantes *hap43* tampoco presentaron defectos de crecimiento en BPS, con una inhibición de crecimiento a concentraciones entre 125-62,5 μM similar a la de mutantes *sfu1*. Las células que sobreexpresan *WOR1* en fondo CAI4-2-Clp10 muestran una disminución de crecimiento similar a las células que sobreexpresan *WOR1* en fondo CAI4; sin embargo, este fenotipo no se observa en fondo SN250, por lo que este efecto puede ser debido al fondo genético.

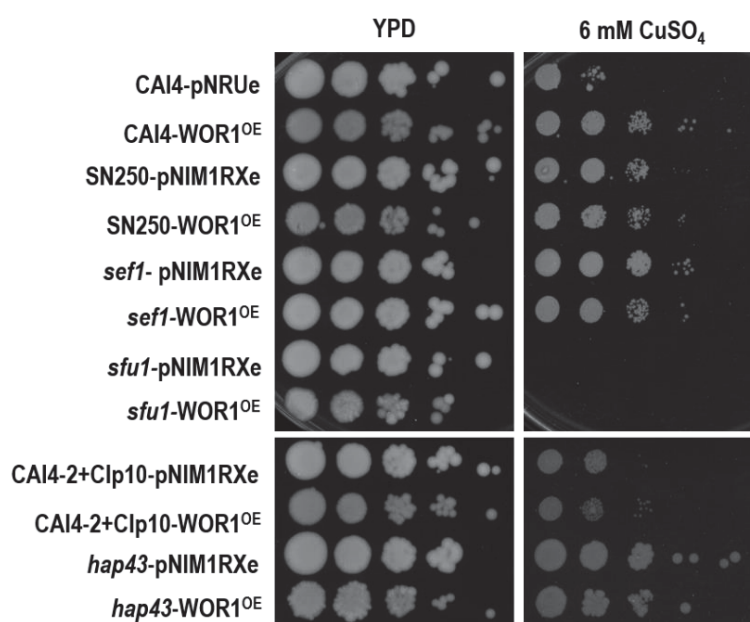


Figura 35. Crecimiento de los mutantes en la regulación del hierro y que sobreproducen Wor1 en medio con alta concentración de cobre.

Diluciones seriadas de una suspensión a D.O. 0,8 de células en fase estacionaria de crecimiento se depositaron sobre agar YPD suplementado con 6 mM de sulfato de cobre (CuSO₄) y se incubaron a 37°C durante 24-48 horas.

Se observó una disminución del crecimiento células *WOR1^{OE}* en los fondos *sfu1* y *hap43*, indicando que Wor1 parece tener un papel en el almacenamiento y utilización de hierro, y su efecto se agrava cuando existen defectos previos en su regulación.

Finalmente, se determinó la capacidad de estas cepas de crecer en presencia de una alta concentración de cobre (Figura 35). Este metal promueve la adquisición de hierro incrementando el ensamblaje de complejos permeasa/oxidasa para obtener Fe del exterior celular. Los mutantes *sfu1*, a diferencia del resto, son incapaces de crecer independientemente de la sobreexpresión de *WOR1*, mientras que sí lo hacen los mutantes *sef1* y *hap43*. Además, observamos de nuevo diferencias entre la cepa SN250 y las cepas CAI4 y CAI4-2-Clp10, mostrando estas últimas un crecimiento menor. Estos resultados corroboran los resultados previos que muestran el papel de Sfu1 para crecer en presencia de cobre, donde la sobreproducción de Wor1 mejora el crecimiento en presencia de sulfato de cobre.

c) Contenido de hierro intracelular

El exceso de hierro intracelular está relacionado con la generación de estrés oxidativo (Gerwien *et al.*, 2018), y dada la alta sensibilidad a estrés oxidativo observada en la cepa CAI4-*WOR1^{OE}*, analizamos el contenido de hierro de esta cepa y de los mutantes *sef1* y *sfu1* con el fin de relacionarlo con alguno de estos fenotipos. Para llevar a cabo el ensayo, las células se incubaron en YPD y se lavaron con EDTA para eliminar el hierro extracelular. Seguidamente, las levaduras se digirieron a 98°C durante 16 horas y se recogió el sobrenadante donde se encuentra el hierro intracelular. La concentración de Fe se cuantificó mediante un ensayo colorimétrico detallado en materiales y métodos. En la Figura 36 se muestran los contenidos de Fe intracelular de las cepas *WOR1^{OE}* en fondos silvestre y de los mutantes en la regulación del hierro, donde se observa que la sobreexpresión de *WOR1* incrementa significativamente el contenido de este metal. En los fondos mutantes, la cepa *sef1* posee menor concentración de Fe intracelular en relación con su control, mientras que no existen diferencias en el contenido del mutante *sfu1*, ni tampoco entre ambos mutantes, indicando que la falta de Sef1 es suficiente para disminuir la concentración de Fe intracelular.

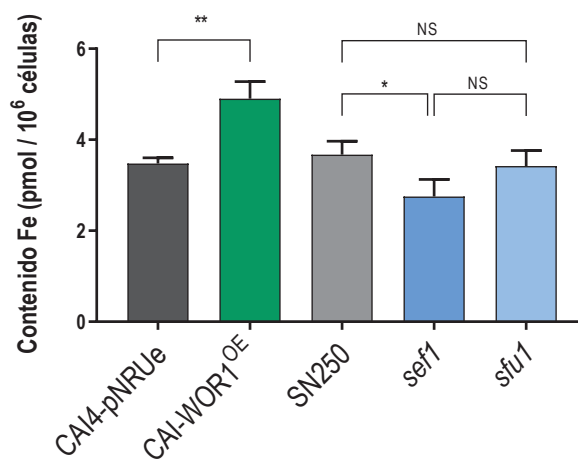


Figura 36. Cuantificación de hierro intracelular en una cepa silvestre, CAI4-WOR1^{OE} y mutantes *sef1* y *sfu1*.

A partir de cultivos incubados O/N (*overnight*) en YPD, se extrajo el contenido celular por digestión con ácido nítrico a 98°C y se realizó un ensayo colorimétrico utilizando BPS para formar complejos BPS-Fe intracelular. Los resultados muestran la media con la desviación estándar de tres resultados independientes. NS: no significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

H. Estudio del metabolismo respiratorio

La mitocondria participa en procesos como morfogénesis, adaptación a estrés oxidativo, resistencia o sensibilidad a antifúngicos y metabolismo de aminoácidos, lípidos y hierro (Shingu-Vazquez & Traven, 2011, Calderone *et al.*, 2015, Ror & Panwar, 2019). Sin embargo, una de las funciones más importantes es la producción de energía en presencia de oxígeno mediante la fosforilación oxidativa. *C. albicans* posee tres rutas respiratorias para producir ATP: la vía clásica, la vía de la oxidasa alternativa y la vía paralela (Figura 37). La vía clásica es utilizada prioritariamente para producir energía, mientras que la alternativa y la paralela se usan como sistemas compensatorios cuando falla la primera (Helmerhorst *et al.*, 2002).

La disponibilidad de oxígeno a lo largo del TGI es variable, siendo mínima o nula en algunas porciones del intestino grueso, y por ello es posible que la adaptación a este nicho requiera cambios en el metabolismo respiratorio. Las células que sobreexpresan *WOR1* en fondo silvestre son capaces de colonizar el TGI y presentan tasas de respiración similares a las de la cepa control (Prieto *et al.*, 2017), sin embargo, con el objetivo de establecer una posible relación entre el metabolismo respiratorio y la capacidad de colonización, se profundizó en el estudio del efecto de la sobreexpresión de *WOR1* en

el crecimiento en función de la concentración de oxígeno y en presencia de inhibidores de la respiración mitocondrial.

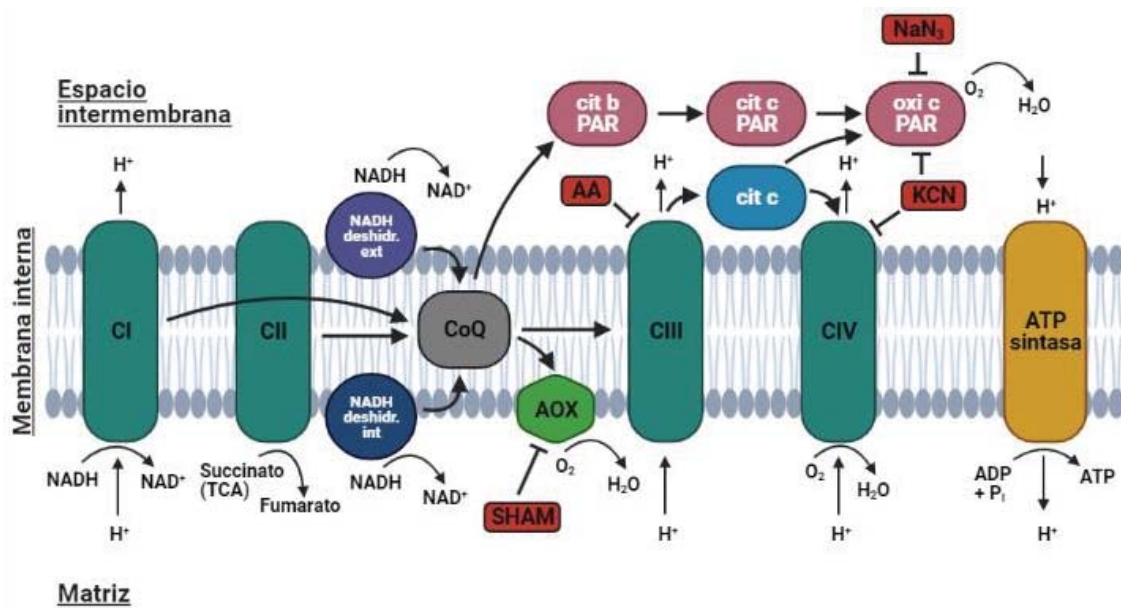


Figura 37. Esquema de las rutas respiratorias clásica, alternativa y paralela en mitocondria y los inhibidores utilizados en este trabajo.

La ruta clásica está formada por los complejos I a IV, la ruta alternativa está formada por oxidasas (AOX) y la paralela (PAR) por el citocromo b (cit b), citocromo c (cit c) y citocromo c oxidasa (oxi c). Los protones (H^+) se transportan al espacio intermembrana como resultado de la transferencia de electrones a lo largo de los diferentes complejos I a IV generando un potencial de membrana a través de esta que se usa para generar ATP a partir de ADP y P_i (fosfato). Los complejos I, II y las NADH deshidrogenasas (NADH deshidr.) externas (ext) o internas (int) también transfieren electrones a la coenzima Q (CoQ). La CoQ a su vez proporciona electrones a los elementos de las rutas alternativa y paralela. Se muestran las dianas de inhibición de antimicina A (AA), azida sódica (NaN_3), cianuro potásico (KCN) o ácido salicilhidroxámico (SHAM).

H.1. Crecimiento en presencia de inhibidores de la respiración

En primer lugar, se analizó si el crecimiento de la cepa CAI4-WOR1^{OE} en condiciones de normoxia y de microaerofilia en medio YPD (glucosa) y YPG (glicerol) presentaba diferencias. El glicerol es un sustrato no fermentable para la oxidación mitocondrial y obliga a las células a respirar cuando se encuentra como única fuente de carbono en el medio de cultivo. Como se muestra en la Figura 38, no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de las cepas en condiciones variables de oxígeno en medio YPD o YPG, si bien la cepa CAI4-WOR1^{OE} crece más lentamente.

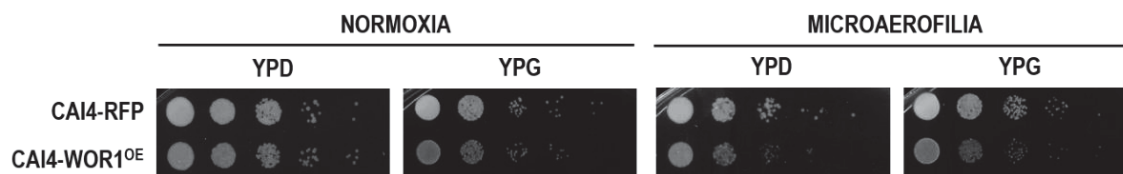


Figura 38. Crecimiento en diferentes fuentes de carbono de las cepas CAI4-WOR1^{OE} y CAI4-pNRUe en condiciones de normoxia y microaerofilia.

A partir de una suspensión a D.O. 0,8 de células en fase estacionaria se realizaron diluciones seriadas que se depositaron en agar YPD o YPG y se incubaron en condiciones de normoxia o microaerofilia a 37°C durante 24 horas.

A continuación, analizamos el crecimiento en presencia de inhibidores de la respiración mitocondrial. La antimicina A (AA) y la azida sódica (NaN_3) inhiben los complejos III y IV de la ruta clásica respectivamente. En condiciones de normoxia (Figura 39A) la cepa CAI4-WOR1^{OE} se muestra más sensible a AA y NaN_3 . En condiciones de microaerofilia (Figura 39B) se reduce ligeramente el crecimiento de las cepas, pero presenta los mismos fenotipos que en normoxia. Por lo tanto, la sobreproducción de Wor1 incrementa la sensibilidad de las células a ambos compuestos.

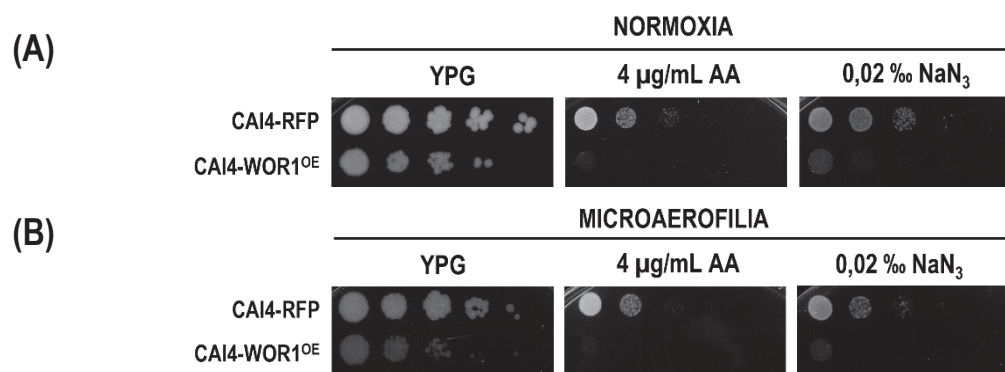


Figura 39. Inhibición de la ruta respiratoria clásica en las cepas CAI4-WOR1^{OE} y CAI4-pNRUe.

Diluciones seriadas de una suspensión a D.O. 0,8 de células en fase estacionaria se depositaron en YPG suplementado con 4 µg/mL de antimicina A (AA) o 0,02 % de azida sódica (NaN_3). Las placas se incubaron a 37°C en (A) normoxia o (B) microaerofilia durante 24-48 horas.

Seguidamente se estudió la eficiencia en la utilización de las rutas respiratorias en medio YPG analizando la inhibición combinada en condiciones de normoxia. Para este ensayo se utilizaron dos compuestos adicionales: el ácido salicilhidroxámico (SHAM), que inhibe la oxidasa alternativa, y el

cianuro potásico (KCN), que inhibe la ruta clásica a nivel del complejo IV y la paralela a nivel de la citocromo c oxidasa. Así, cuando se usa una combinación de AA y SHAM, se fomenta el uso de la ruta paralela, y cuando se usa SHAM y KCN, se promueve el uso de la clásica y paralela, aunque estén inhibidas en sus etapas finales.

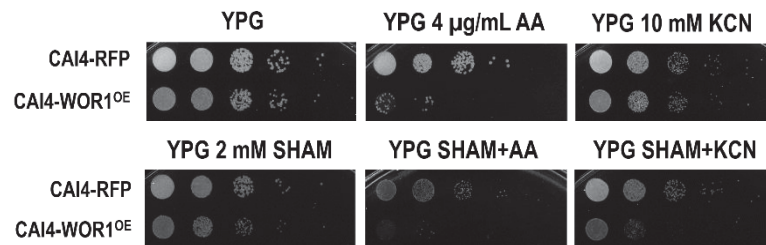


Figura 40. Inhibición combinada de las rutas clásica, paralela y/o alternativa en las cepas CAI4-WOR1^{OE} y CAI4-pNRUe.

Crecimiento de células en fase estacionaria en medio YPG suplementado con 4 μg/mL de antimicina A (AA), 10 mM de cianuro potásico (KCN), 2 mM de ácido salicilhidroxámico (SHAM) o combinación de ellos en condiciones de normoxia. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Los resultados obtenidos muestran que ni el KCN ni el SHAM por separado generan ningún defecto de crecimiento y, por tanto, sugieren que las otras rutas respiratorias son funcionales para permitir su crecimiento (Figura 40). Sin embargo, sí se observaron diferencias con el uso de los compuestos combinados. Cuando se combina el uso de SHAM y AA o de SHAM y KCN, las células *WOR1^{OE}* son más sensibles a estos compuestos. Estos resultados sugieren que células que sobreproducen *Wor1* son más dependientes de la ruta clásica.

H.2. Estudio de la actividad mitocondrial

Como se ha ido mostrando a lo largo de este trabajo, las células que sobreexpresan *WOR1* en fondo silvestre son más sensibles a estrés oxidativo y a inhibidores de la respiración mitocondrial. Con el objetivo de determinar si la sobreproducción de este factor de transcripción conlleva defectos en la actividad mitocondrial, se propuso estudiar en más detalle otros aspectos de este orgánulo.

a) Crecimiento en presencia de cloranfenicol

Para analizar si otros inhibidores de la función mitocondrial afectan a esta cepa, se analizó su crecimiento en presencia de cloranfenicol, un antibiótico que se une a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano bloqueando la síntesis de proteínas, incluidas las proteínas mitocondriales. Para ello, las

células se incubaron en medio YPD o YPG suplementado con 2 o 4 mg/mL de cloranfenicol (Figura 41).

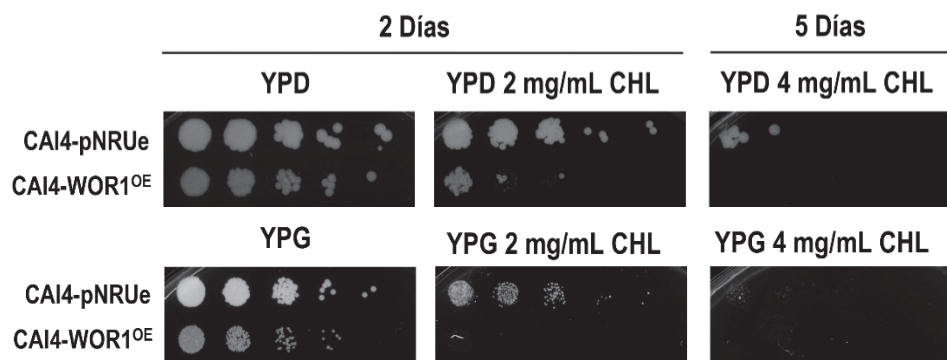


Figura 41. Crecimiento en presencia de cloranfenicol de células *WOR1^{OE}* y silvestres.

Diluciones seriadas de cultivos a D.O. 0,8 se depositaron sobre agar YPD o YPG suplementado con 2 o 4 mg/mL de cloranfenicol (CHL). Las placas se incubaron durante 5 días a 37°C.

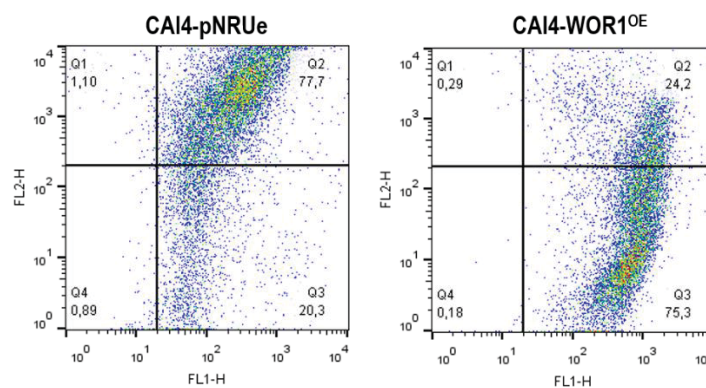
Cuando las células crecen en YPD suplementado con 2 o mg/mL de cloranfenicol se observa un defecto de crecimiento en la cepa CAI4-WOR1^{OE}, efecto más acusado en medio con glicerol como única fuente de carbono y a concentraciones mayores de antibiótico (4 mg/mL). Estos resultados evidencian una vez más que la sobreexpresión de *WOR1* en fondo silvestre provoca defectos en la actividad mitocondrial, los cuales se agravan cuando la célula se ve obligada a respirar.

b) Determinación del potencial de membrana

Para comprobar posibles anomalías en mitocondria, se analizó el potencial de membrana mitocondrial en condiciones basales. El colorante catiónico JC-1 se acumula en este orgánulo y emite fluorescencia que se detecta en el canal verde o rojo dependiendo del potencial de membrana. Los agregados de JC-1 en mitocondrias polarizadas emiten fluorescencia roja, mientras que los monómeros en membranas despolarizadas emiten fluorescencia verde; por lo tanto, las mitocondrias funcionales tienen una *ratio* de fluorescencia roja/verde más elevada. Para llevar a cabo el ensayo partimos de células crecidas en medio YPG y se incubaron con JC-1 para su posterior análisis en el citómetro de flujo.

Como se puede observar en la Figura 42, las células que sobreproducen *Wor1* representan una población muy heterogénea, mientras que la cepa silvestre posee una población homogénea con alto

potencial de membrana. Las células *WOR1^{OE}* mostraron mitocondrias con alto potencial de membrana en el canal FL-2, otras intermedias distribuidas entre ambos canales y una gran población con mitocondrias poco activas en el canal FL-1. Las intensidades medias de fluorescencia y las *ratio* se muestran en la tabla asociada a la figura. La relación de fluorescencia FL-2/FL-1 es mayor para la cepa control (6,04) mientras que es más bajo para la cepa *WOR1^{OE}* (0,4). Estos resultados indican que la sobreexpresión de *WOR1* disminuye el potencial de membrana mitocondrial de al menos una gran población de células.



Cepa	FL-2	FL-1	FL-2/FL-1
CAI4-pNRUe	2471	409	6,04
CAI4-WOR1 ^{OE}	333	816	0,4

Figura 42. Potencial de membrana en las cepas CAI4-WOR1^{OE} y CAI4-pNRUe.

Representación biparamétrica del potencial de membrana mitocondrial tras la incubación con JC-1. Células en fase exponencial se incubaron en YPG durante 30 minutos a 37°C, se tiñeron con 1,5 μ M de JC-1 y se incubaron otros 30 minutos en las mismas condiciones antes de ser analizadas por citometría de flujo en los canales FL-1 y FL-2. La intensidad media de fluorescencia en ambos canales y la *ratio* de estas se recoge en la tabla.

I. Análisis del contenido lipídico

Los lípidos son esenciales para procesos como la proliferación celular, viabilidad, señalización celular o virulencia (Cassilly & Reynolds, 2018, Pan *et al.*, 2018, Wong *et al.*, 2019, Tams, 2020). Estos pueden sintetizarse *de novo* o ser adquiridos del exterior pudiendo además ser reutilizados dentro de la célula. Los ácidos grasos, la base de los lípidos, pueden incorporarse en fosfolípidos o esfingolípidos (lípidos polares) para formar parte de la membrana celular y participar en la

señalización celular. Además, pueden incorporarse en triacilgliceroles o ésteres de esteroles (lípidos neutros) en gotas lipídicas, funcionando como almacén en caso de necesidad energética o como precursores para la síntesis de otros lípidos. Además, los ácidos grasos participan en la modificación postranscripcional de proteínas y son reguladores transcripcionales. Dada la importancia en los diferentes procesos celulares, nos propusimos estudiar el papel de Wor1 en la distribución y composición de los lípidos tanto intracelulares como de membrana celular.

I.1. La tinción con rojo de Nilo aumenta en células *WOR1^{OE}*

El rojo de Nilo es un colorante fluorescente lipofílico que dependiendo de la longitud de onda utilizada para su excitación y emisión permite observar lípidos considerando su hidrofobicidad (Greenspan *et al.*, 1985). Cuando se usa una longitud de onda de excitación/emisión de 488/535 nm se pueden detectar lípidos neutros, que aparecen como pequeñas gotas a lo largo del citoplasma. El uso de una longitud de onda de 535/590 nm permite observar a la vez lípidos neutros y polares, que tiñen tanto gotas lipídicas como lípidos de membrana.

Para comprobar si la sobreexpresión de *WOR1* tiene un efecto en el contenido lipídico, se realizó una tinción con rojo de Nilo de células en fase estacionaria, momento en el que presentan mayor acúmulo de gotas lipídicas (Beopoulos *et al.*, 2011). Como control se utilizó el mutante *hog1* incubado en YPD suplementado con NaCl 1 M, el cual se ha descrito que comienza a acumular gotas lipídicas en presencia de estrés osmótico (Herrero de Dios *et al.*, 2020). El análisis por citometría de flujo en el canal FL-2 (Figura 43A) muestra que la sobreproducción de Wor1 en fondo silvestre aumenta los niveles de fluorescencia tras la tinción con rojo de Nilo, en concordancia con un mayor número de gotas lipídicas, tal y como se muestra en las fotografías del microscopio de fluorescencia con el filtro verde que permite detectar tanto gotas lipídicas como lípidos de membrana (Figura 43B).

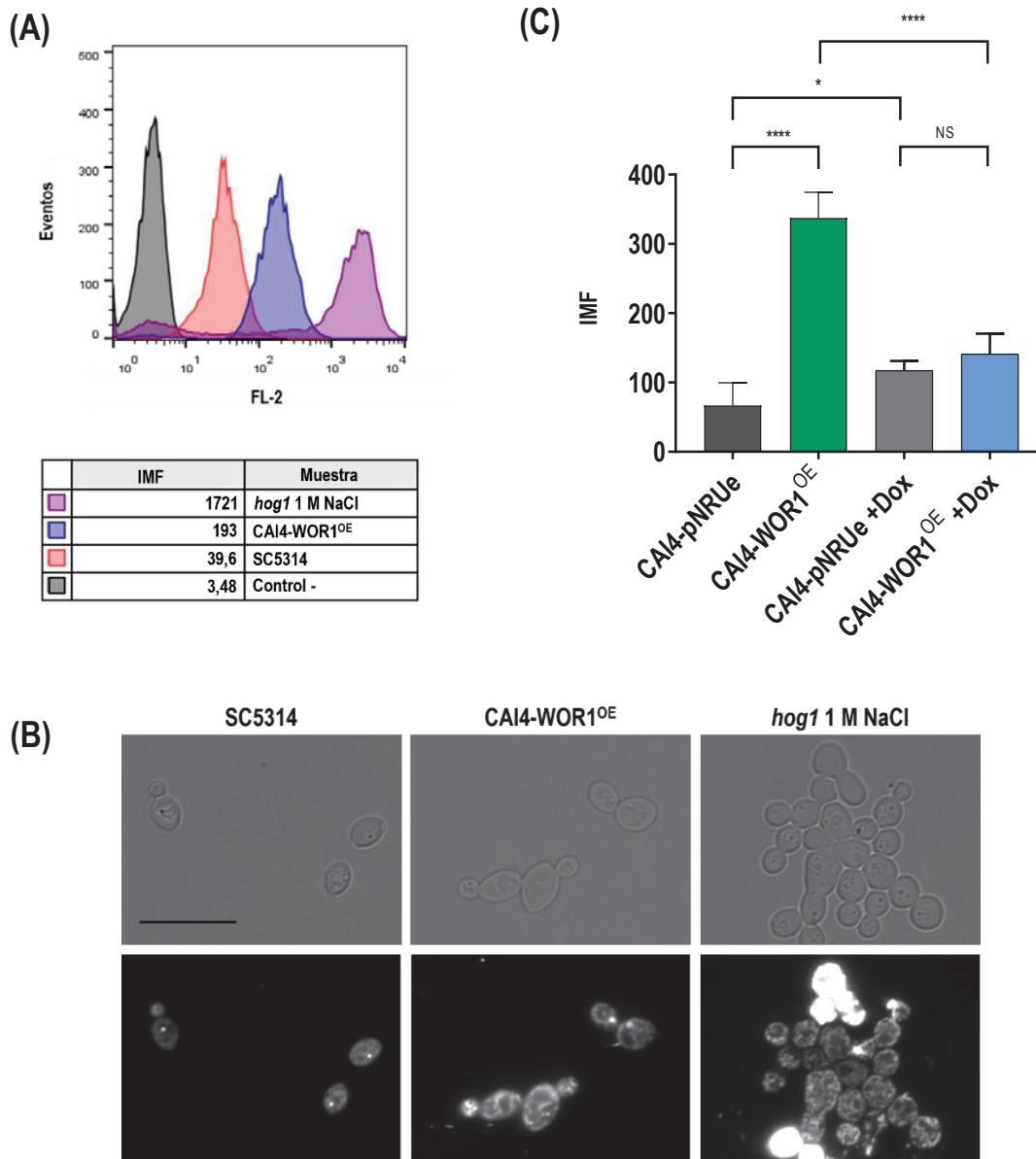


Figura 43. Tinción con rojo de Nilo de células *WOR1^{OE}* y silvestres.

Células en fase estacionaria crecidas en YPD a 37°C fueron teñidas con 5 µg/mL de rojo de Nilo en PBS durante 20 minutos en hielo y oscuridad. (A) Análisis por citometría de flujo de la intensidad media de fluorescencia (IMF) en el canal FL-2 usando el láser azul para la detección de gotas lipídicas. Un cultivo de células del mutante *hog1* incubadas O/N en YPD con NaCl a 1 M se utilizó como control de observación de gotas lipídicas (B) Fotografías al microscopio de fluorescencia de las mismas células usando el filtro verde para la observación de lípidos neutros y apolares (gotas lipídicas y resto de lípidos). La barra de escala (en negro) corresponde a un tamaño celular de 10 µM. (C) Análisis por citometría de flujo de la intensidad media de fluorescencia (IMF) en el canal FL-2. Las células fueron incubadas durante 48 horas con o sin 20 µg/mL de doxiciclina, fueron lavadas, teñidas y fijadas para su análisis. Los resultados mostrados corresponden a las medias ± SD de cinco resultados. NS: no significativo, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

Posteriormente las células se incubaron en YPD suplementado o no con doxiciclina (Figura 43C). En ausencia de doxiciclina, *WOR1* se está sobreexpresando dando como resultado el aumento de la señal comparado la cepa control. En presencia de doxiciclina, y por lo tanto en condiciones de represión de la expresión de *WOR1*, las células *WOR1^{OE}* no presentan diferencias significativas con su control. Curiosamente se observó un ligero aumento en la señal en las células silvestres en presencia de doxiciclina. Estos resultados demuestran que Wor1 participa en la formación de gotas lipídicas, cuyo número o contenido parece aumentar por su efecto.

I.2. Contenido total de lípidos

Dado que las células que sobreexpresan *WOR1* poseen un aumento en la tinción con Rojo de Nilo que se correlaciona con un aumento de gotas lipídicas observadas al microscopio, realizamos un análisis cuantitativo de los lípidos totales para detectar posibles diferencias entre una cepa silvestre y la cepa CAI4-*WOR1^{OE}*.

Para llevar a cabo la cuantificación se realizó una extracción de los lípidos totales mediante rotura mecánica y extracción en metanol. Los residuos se trataron de distinta manera para cada especie lipídica para su posterior análisis mediante cromatografía LC-HRMS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución) conectado a un detector TOF (*Time of Flight*). Los resultados, expresados en una *ratio* CAI4-*WOR1^{OE}*/CAI4-pNRUe de concentraciones en pmol equivalentes relativos/densidad óptica (pmol eq./u.d.o.) a cada patrón interno utilizado, se detallan en la Figura 44.

Los triacilgliceroles (TAG) se encuentran dentro de las gotas lipídicas y se degradan por la acción de lipasas a diacilgliceroles (DAG). No se observaron diferencias en el contenido de TAG total entre ambas cepas (1,3 *ratio*); sin embargo, sí las hay entre especies moleculares (Figura 45A). En concreto 9 especies (C44, 46, 48, 49, 50, 51, 54 y 56) se encontraron en mayor concentración en la cepa que sobreexpresa *WOR1*, con una *ratio* >2, mientras que no se encontró ninguna especie que estuviera 2 veces menos en concentración (*ratio* = <0). Respecto al contenido de DAG (Figura 45B), tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambas cepas (1,6 *ratio*), pero sí se encontraron 6 especies con una *ratio* en concentración de 2 o más (C32, 34, 36 y 38), destacando especialmente la especie C38:1 (*ratio* 4,8). No se encontró ninguna especie con una *ratio* menor de 2. Estos resultados muestran un aumento de ciertas especies de TAG y de DAG y sugiere la existencia de necesidades energéticas más elevadas en estas células.

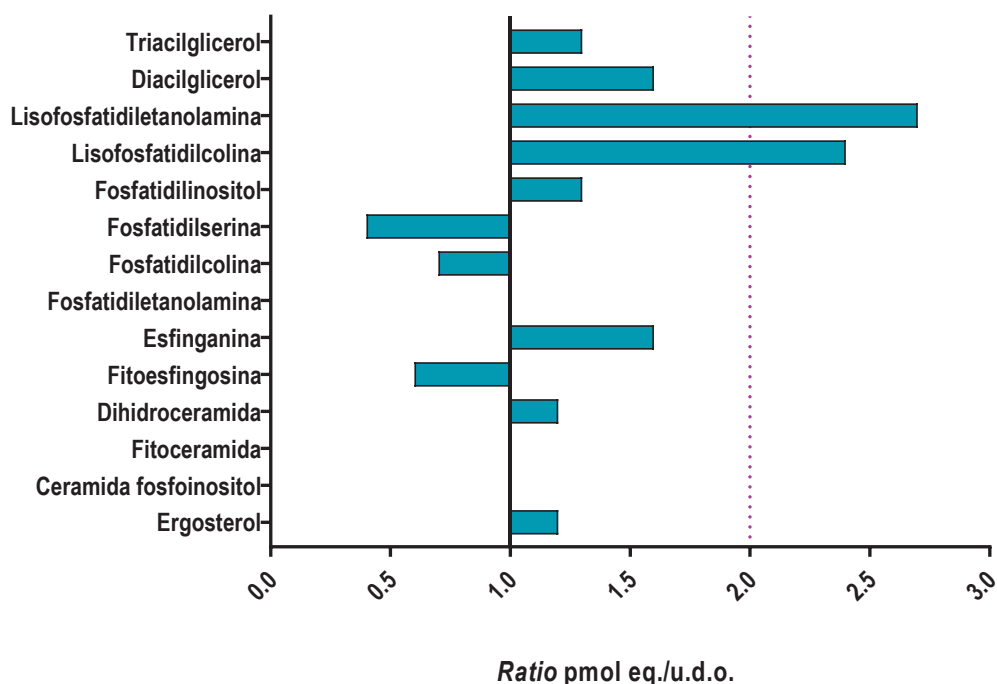


Figura 44. Cuantificación de lípidos totales mediante LC-HRMS en las cepas CAI4-WOR1^{OE} y CAI4-pNRUe.

Células en fase estacionaria crecidas en YPD a 37°C durante 24 horas fueron lisadas por rotura mecánica en MeOH (metanol) + BHT (butilhidroxitolueno) y se extrajo el residuo seco para su posterior análisis en el cromatógrafo. El contenido total de lípidos de cada tipo se ha calculado con la suma de todas las especies moleculares encontradas en pmol eq./unidad de densidad óptica (u.d.o.) y se expresa en una *ratio* CAI4-WOR1^{OE} /CAI4-pNRUe. La línea punteada morada indica una *ratio* de 2 en el eje.

Respecto a los fosfolípidos (PL) (Figura 46), la cepa WOR1^{OE} presenta mayor contenido de lisofosfatidiletanolamina (LPE) (Figura 46A) y de lisofosfatidilcolina (LPC) (Figura 46B), con una *ratio* de 2,7 y 2,4 respectivamente. Se encontraron dos especies moleculares de LPE con una *ratio* de 4,7 (C16:0) y 7,1 (C18:0), y tres especies de LPC con una *ratio* de 4,4 (C16:0), 3 y 2,2 (C18:0 y C18:1) respectivamente. No se encontraron cambios significativos de fosfatidilinositol (PI) (Figura 46C), con una *ratio* de cepas de 1,3, pero sí se encontraron dos especies con una *ratio* >2 (2,3 para C34:0 y 3 para C36:2). No se encontró ninguna especie molecular de LPE, LPC o PI con una concentración 2 veces menor. Estos resultados muestran que Wor1 también actúa aumentando el contenido de algunos de estos lípidos.

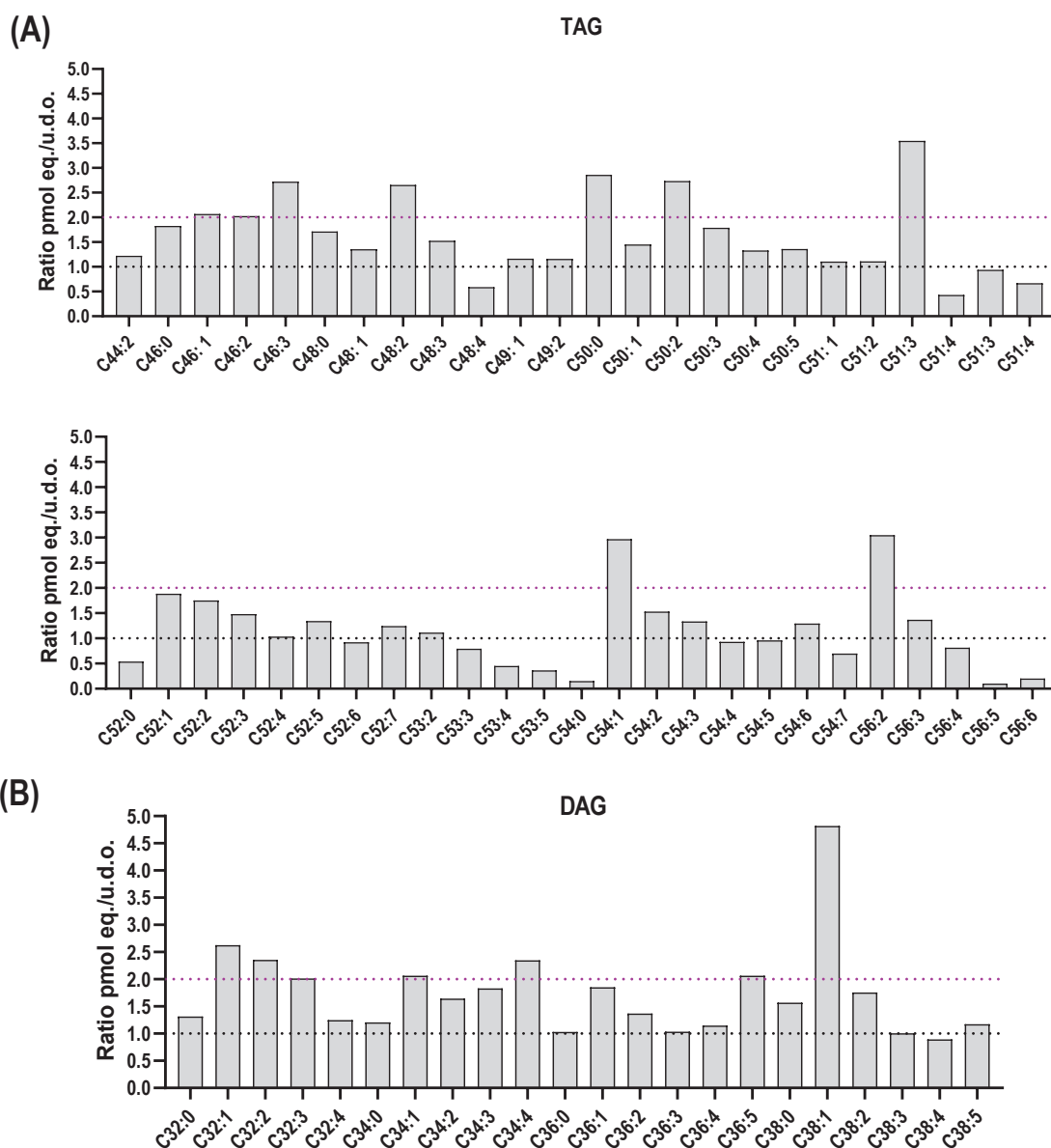


Figura 45. Contenido de TAG y DAG por especies moleculares.

Ratio CAI4-WOR1^{OE}/CAI4-pNRUe por pmol eq./u.d.o. de especies moleculares de (A) TAG y (B) DAG. Las líneas punteadas negras y moradas indican una *ratio* de 1 y 2 respectivamente en el eje.

El contenido total de fosfatidilserina (PS) o de fosfatidilcolina (PC) disminuye ligeramente (*ratio* entre cepas de 0,4 y 0,6 respectivamente). Para observar qué especies moleculares se encontraban en este caso disminuidas, se calculó una *ratio* CAI4-pNRUe/CAI4-WOR1^{OE} donde >2 significa mayor contenido en la cepa control respecto a la cepa WOR1^{OE}. En el caso de PS (Figura 46D), todas las

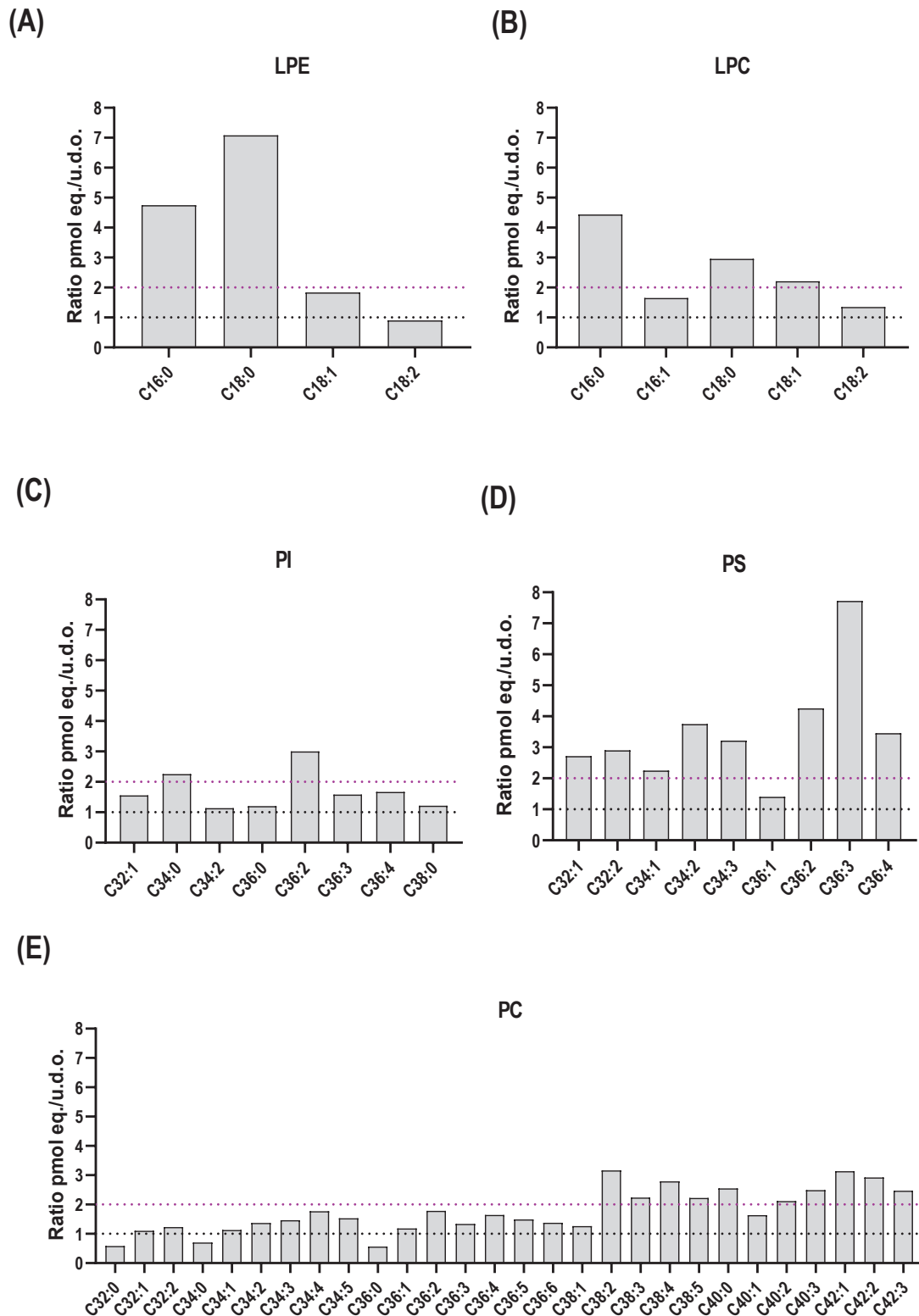


Figura 46. Contenido de fosfolípidos por especies moleculares.

(A), (B) y (C) $Ratio\ CAI4\text{-}WOR1^{OE}/CAI4\text{-}pNRUe$ por pmol eq./u.d.o. de especies moleculares de LPE, LPC y PI. (D) y (E) $Ratio\ CAI4\text{-}pNRUe/CAI4\text{-}WOR1^{OE}$ de PS y PC. Las líneas punteadas negras y moradas indican una *ratio* de 1 y 2 respectivamente en el eje.

especies identificadas menos una se encontraban en mayor concentración en la cepa control. Las especies moleculares de PC (Figura 46E) que se encontraron con una *ratio* >2 en la cepa control son las que poseen mayor número de carbonos (C38 a 42), mientras que las que poseen menor número (C32 a 38) no presentaron diferencias entre cepas. Por último, se encontraron los mismos niveles totales de fosfatidiletanolamina (PE) en ambas cepas, y solo se encontró una especie molecular mayoritaria en la cepa *WOR1^{OE}* (C34:0) con una *ratio* de 2,1 (datos no mostrados).

Respecto a los esfingolípidos identificados, no se encontraron diferencias significativas cuando se calculó la *ratio* CAI4-*WOR1^{OE}*/CAI4-pNRUe, sin embargo, sí pudieron observarse cambios a nivel de especies moleculares en alguno de ellos. Así, se identificaron esfingáninas (*ratio* 1,6), precursor del resto de esfingolípidos identificados, y fitoesfingosinas (*ratio* 0,6), aunque no se identificaron especies moleculares que aportaran más información. No se encontraron cambios significativos en las *ratio* de las dihidroceramidas (*ratio* 1,2), fitoceramidas (*ratio* 1) y ceramidas fosfoinositol (*ratio* 1), aunque una especie molecular de dihidroceramida (d18:0/18:0) de las cuatro identificadas se encontraba en mayor contenido (*ratio* 4,6). No se encontró ninguna especie de fitoceramidas con diferencias de una *ratio* de 2 o más o que estuviera en menor concentración en la cepa *WOR1^{OE}*. Por último, solo dos de once especies de ceramidas fosfoinositol se encontraban en mayor contenido (t42:0/d42:0 y t44:0/d44:0), con una *ratio* de 2,8 y 2,7 respectivamente. Finalmente se observó una *ratio* entre cepas de 1,2 para ergosterol, por lo tanto, no parecen existir diferencias en el contenido y no se identificaron especies que aportaran más información.

J. Metabolismo de fuentes de carbono

La flexibilidad metabólica que posee *C. albicans* le permite establecerse en nichos donde la concentración de glucosa es muy baja, como ocurre en ciertas localizaciones del intestino en donde depende principalmente de fuentes de carbono alternativas (Miramon & Lorenz, 2017). Durante su paso por el tracto gastrointestinal pasa a convertir ácidos grasos y otras fuentes de carbono en glucosa mediante la glucólisis, la β -oxidación de ácidos grasos, el ciclo del glioxilato, la degradación de aminoácidos o mediante el uso de componentes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). El uso de las diferentes fuentes de carbono implica cambios a nivel de crecimiento y de su relación con el hospedador, influyendo en la virulencia y en el reconocimiento de este hongo por parte del sistema inmunitario (Williams & Lorenz, 2019). Dado el papel de *Wor1* como favorecedor de la colonización, se propuso analizar la capacidad de la cepa CAI4-*WOR1^{OE}* de crecer en fuentes de carbono alternativas, haciendo hincapié en la β -oxidación de ácidos grasos y en el ciclo del glioxilato.

J.1. La cepa CAI4-WOR1^{OE} posee mayor número peroxisomas y más grandes en condiciones basales e inductoras

Cuando *C. albicans* crece en presencia de glucosa como única fuente de carbono solo mantiene un pequeño número de peroxisomas; sin embargo, cuando crece en presencia de ácidos grasos, estos orgánulos aumentan en cantidad y tamaño (Sibirny, 2016). Los ácidos grasos entran en la ruta de la β -oxidación en peroxisomas y se genera acetil-CoA, el cual entra posteriormente en el ciclo del glioxilato. Con el fin de relacionar la sobreproducción de Wor1 con una posible mejora en la utilización de ácidos grasos, analizamos la capacidad de generar peroxisomas mediante el marcaje fluorescente de la proteína Pxp2, que se encuentra específicamente en estos orgánulos y que participa en la β -oxidación.

a) Construcción de la proteína de fusión GFP-Pxp2M para el marcaje fluorescente de peroxisomas

Para la visualización de peroxisomas se procedió a la construcción de vectores de expresión para la producción de la proteína fusión GFP-Pxp2M en fase amino. La proteína Pxp2 es una acil-CoA oxidasa que participa en la β -oxidación de los ácidos grasos en este orgánulo, de tal manera que se correlaciona un aumento de esta proteína en peroxisomas con un mayor metabolismo de estos. En primer lugar, se construyó el vector pDS3-GFP-PXP2M para expresar la proteína GFP-Pxp2M en las cepas CAI4-pNRUe y CAI4-WOR1^{OE} tras su integración en el locus *ARD1* y con marcador dominante que confiere resistencia a nirsotricina. La expresión de la proteína se verificó mediante *western blot* utilizando el anticuerpo anti-GFP-JL8 (ver materiales y métodos). Estas cepas se denominaron GFP-PXP2M (M de modificado, debido a la eliminación del punto *Kpn* I en la secuencia del gen *PXP2* necesario para la digestión del vector y posterior integración en el genoma).

b) Análisis de formación de peroxisomas en condiciones basales e inductoras

Con el fin de determinar si la sobreexpresión de *WOR1* tiene como consecuencia un aumento de la β -oxidación a través de la visualización de la proteína GFP-Pxp2M, las células se incubaron en medio YPD o YNB suplementado con aceite de oliva/Tween 80 y se observaron al microscopio de fluorescencia (Figura 47). La sobreproducción de Wor1 aumenta el número de peroxisomas comparado con la cepa control cuando crecen en medio YPD, cuya fuente de carbono principal es la glucosa. Cuando las células crecen en medio YNB suplementado con aceite de oliva/Tween 80, aumenta el número y tamaño de los peroxisomas en ambas cepas; este aumento es ligeramente

mayor en la cepa WOR1^{OE}. Estos resultados sugieren que la sobreproducción de Wor1 aumenta la formación de peroxisomas en medio suplementado con ácidos grasos, e incluso en medio con glucosa, donde ya se observa más señal en comparación con la cepa silvestre.

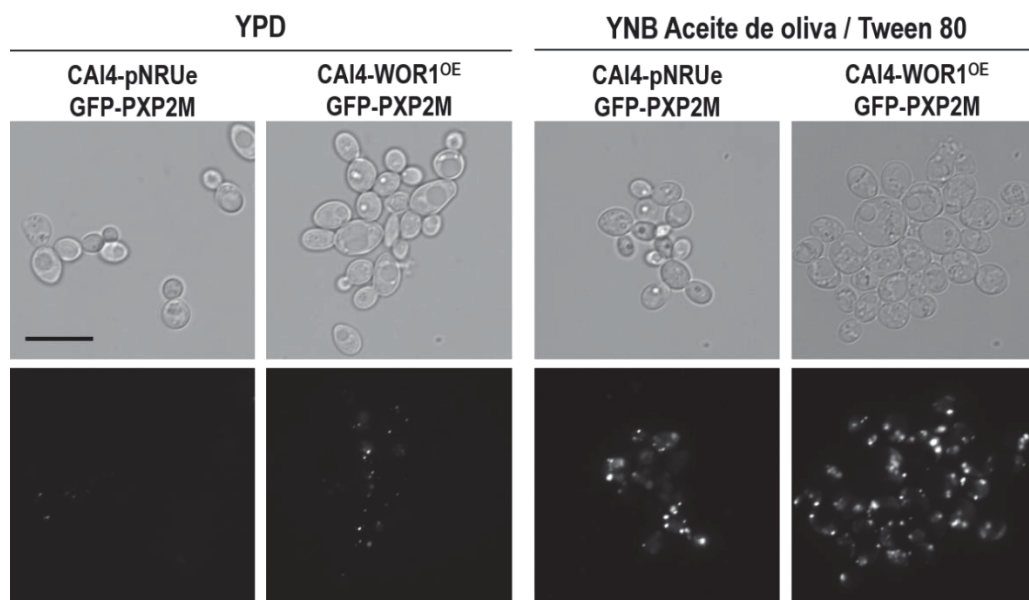


Figura 47. Observación de peroxisomas en las cepas CAI4-WOR1^{OE} y CAI4-pNRUe a través de la proteína GFP-Pxp2 en medio YPD y YNB aceite de oliva/Tween 80.

Fotografías tomadas en el microscopio de fluorescencia de la proteína GFP-Pxp2M utilizando el filtro azul. Las células fueron incubadas durante 72 horas en YPD o YNB con 0,1 % aceite de oliva/0,18 % Tween 80 a 37°C y visualizadas posteriormente. La barra de escala negra corresponde a 10 μ m de tamaño.

J.2. Crecimiento en fuentes de carbono fermentables y no fermentables

La capacidad de utilizar de forma eficiente fuentes de carbono tanto fermentables (glucosa, fructosa, galactosa) como no fermentables o alternativas (acetato, citrato, etanol, glicerol, aminoácidos), tal y como hemos comentado anteriormente, puede jugar un papel importante durante la colonización gastrointestinal. El ciclo del glioxilato utiliza estos compuestos, los convierte en acetyl-CoA y, finalmente, en compuestos de 4 átomos de carbono (C4) que pueden ser usados para la síntesis de otras moléculas. Las enzimas clave del ciclo del glioxilato, como la isocitrato liasa (Icl1), se encuentran en peroxisomas y su pérdida implica la incapacidad de crecer en fuentes alternativas de carbono

como ácidos grasos o etanol (Piekarska *et al.*, 2008). Con el objetivo de analizar si el uso de diferentes fuentes de carbono implica mejoras en el crecimiento de estas células, se sembraron diluciones seriadas sobre medio YNB con glucosa, acetato, citrato, etanol o glicerol como únicas fuentes de carbono (Figura 48). Dado que el mutante *icl1* no es capaz de utilizar estas fuentes de energía (a excepción de glicerol) y el reintegrante *icl1* pICL1 puede utilizarlas todas (Ramirez & Lorenz, 2007), se utilizaron adicionalmente como control durante el ensayo. El crecimiento de las cepas en glucosa no mostró diferencias; sin embargo, la cepa WOR1^{OE} presenta un defecto de crecimiento sobre todas las fuentes de carbono alternativas, a excepción de aceite de oliva donde no se encontraron diferencias (datos no mostrados). Esto demuestra que la sobreexpresión de *WOR1* dificulta la utilización de estas fuentes de carbono alternativas.

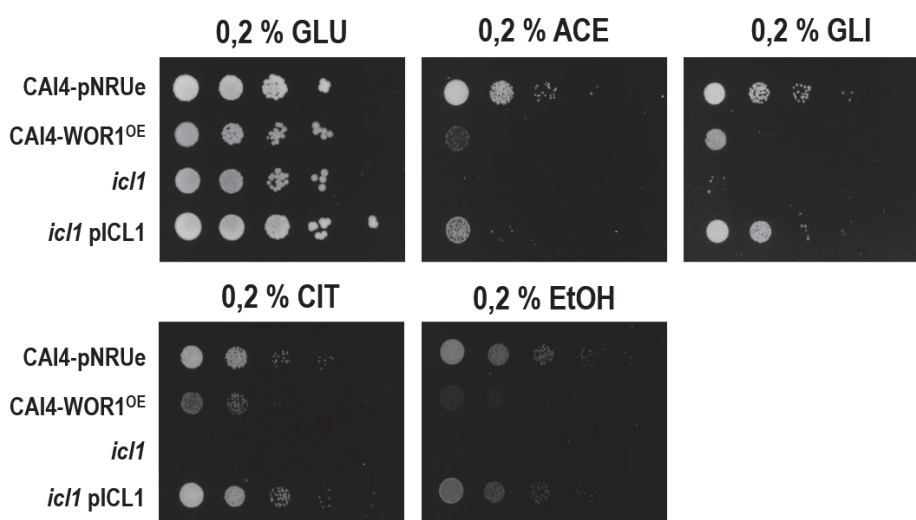


Figura 48. Crecimiento de en las cepas CAI4-WOR1^{OE} y CAI4-pNRUe en diferentes fuentes de carbono.

Diluciones seriadas de una suspensión a D.O. 0,8 de células en fase estacionaria fueron depositadas sobre medio YNB con un 0,2 % de glucosa (GLU), acetato sódico (ACE), citrato sódico (CIT), etanol (EtOH) o glicerol (GLI). Las placas se incubaron a 37°C durante 72 horas.

J.3. Caracterización de la sobreexpresión de *WOR1* sobre fondo *icl1*

Los resultados del análisis proteómico muestran una menor abundancia de la proteína Icl1 en la cepa WOR1^{OE}, y junto a la incapacidad de estas células de utilizar fuentes de carbono alternativas con eficiencia, sugiere una posible relación entre Icl1 y Wor1 (Hidalgo-Vico *et al.*, 2021). Nuestro grupo había observado que la sobreexpresión de *WOR1* en un mutante *icl1* altera algunos fenotipos, como

la mayor sensibilidad a sales biliares, a antimicina A y a arsenito en medio YPD (A.Sorarrain, Trabajo de Fin de Máster). En esta parte del trabajo hemos profundizado en su caracterización y analizado su influencia en la capacidad de colonizar el TGI del ratón, ampliando así la información de la que disponíamos.

c) Crecimiento en fuentes de carbono alternativas

Para comprobar si la sobreproducción de Wor1 implica cambios en la utilización de las fuentes de carbono que los mutantes *icl1* no pueden usar, las células se incubaron en medio mínimo YNB suplementado con un 2 % de glucosa, acetato sódico, citrato sódico, etanol, glicerol o aceite de oliva/Tween 80.

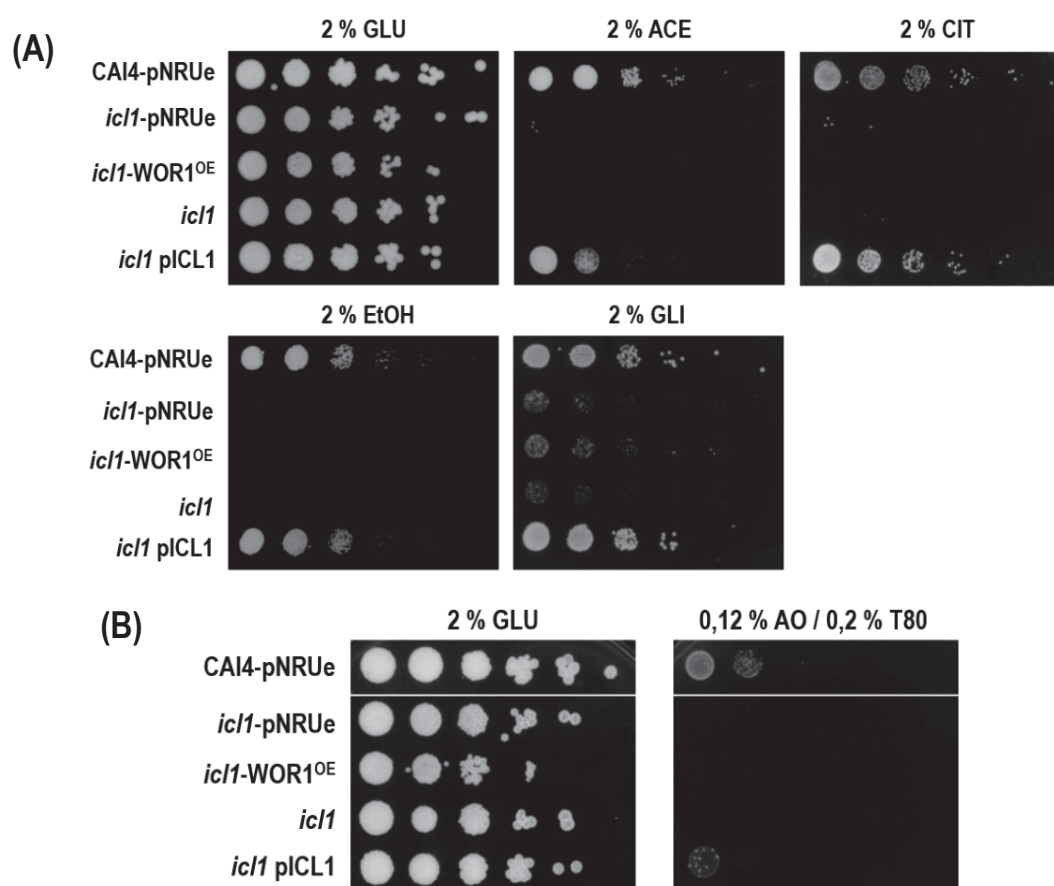


Figura 49. Crecimiento en fuentes de carbono fermentables y no fermentables de células mutantes *icl1*-WOR1^{OE}, *icl1* y reintegrante *ICL1*.

A partir de una suspensión a D.O. 0,8 de células en fase estacionaria se realizaron diluciones seriadas y se depositaron sobre YNB suplementado con (A) un 2 % de glucosa (GLU), acetato sódico (ACE), citrato sódico (CIT), etanol (EtOH) o glicerol (GLI) o (B) con 0,12 % aceite de oliva/0,2 % Tween 80 (AO/T80). Las placas se incubaron a 37°C durante 72-120 horas.

El mutante *icl1* con la versión vacía del plásmido (pNRUe), el mutante *icl1* y el reintegrante *icl1* pICL1 se utilizaron como controles. La Figura 49A muestra que la sobreexpresión de *WOR1* en fondo *icl1* no permite el crecimiento en acetato, citrato o etanol, por lo tanto no revierte el fenotipo del mutante *icl1*, mientras que mejora ligeramente el crecimiento en presencia de glicerol, pero no alcanza el crecimiento de una cepa silvestre. Estos datos corresponden a condiciones de normoxia, no observándose diferencias en el crecimiento en condiciones de microaerofilia a las 72 horas de incubación (datos no mostrados). Los mutantes *icl1* tampoco pueden usar aceite de oliva/Tween 80 como fuente de carbono, y la sobreproducción de *Wor1* en este fondo genético no suprime la incapacidad de mutantes *icl1* de crecer en esta fuente de carbono (Figura 49B).

d) Crecimiento en condiciones variables de oxígeno

El estudio de la capacidad de crecimiento de estas cepas en distintos ambientes de oxígeno se realizó mediante ensayos en gota en medio YPD en condiciones de normoxia, microaerofilia o anaerobiosis a 37°C. Como se muestra en la Figura 50, ninguna de las cepas presentó defectos de crecimiento cuando varía la concentración de oxígeno en comparación con la cepa silvestre.

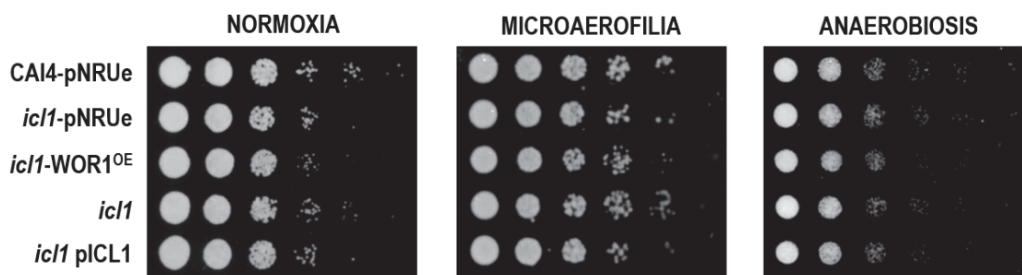


Figura 50. Crecimiento en condiciones variables de oxígeno en los mutantes *icl1-WOR1^{OE}*, *icl1* y reintegrante.

A partir de células en fase estacionaria se realizaron suspensiones a D.O.= 0,8 y diluciones seriadas que se depositaron sobre agar YPD. Las placas se incubaron en condiciones de normoxia, microaerofilia y anaerobiosis a 37°C durante 24-48 horas.

e) Estrés osmótico y oxidativo

Con el fin de determinar si la sobreexpresión de *WOR1* en fondo *icl1* tiene un efecto en la respuesta a estrés oxidativo y osmótico, analizamos la capacidad de crecimiento de las células en medio YPD suplementado con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o cloruro sódico (NaCl). Dado que la cepa CAI4-*WOR1*^{OE} es más sensible a estos tipos de estrés, se utilizó como control positivo. Los mutantes *icl1* no muestran defectos de crecimiento en presencia de estos compuestos; sin embargo, su ausencia suprime el fenotipo de hipersensibilidad de cepas *WOR1*^{OE}, principalmente en condiciones de estrés osmótico (Figura 51).

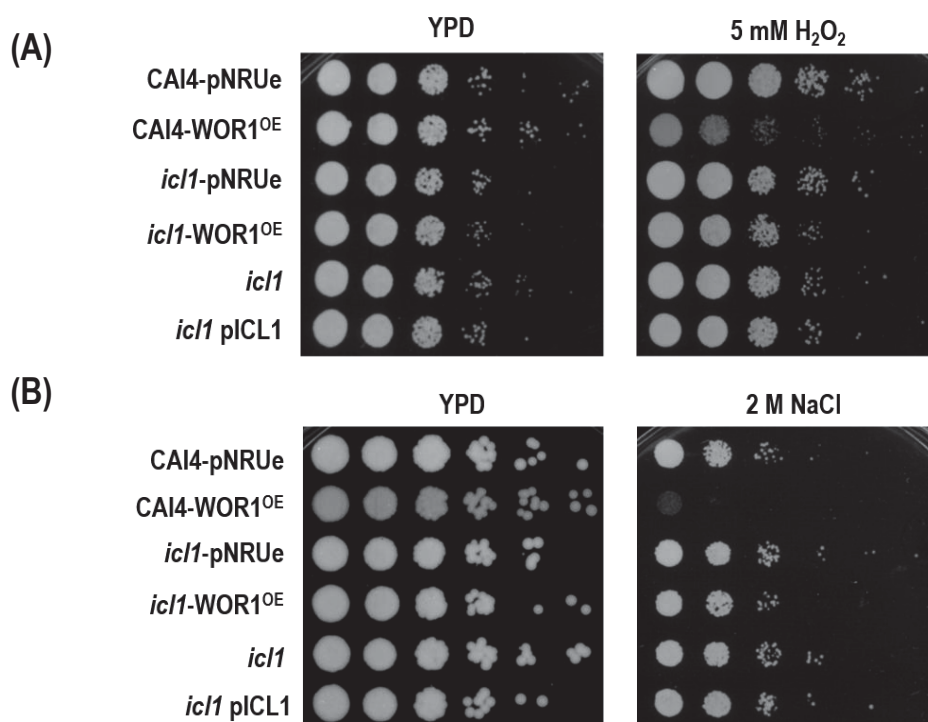


Figura 51. Crecimiento en presencia de peróxido de hidrógeno y cloruro sódico en mutantes *icl1*-*WOR1*^{OE}, *icl1* y reintegrante.

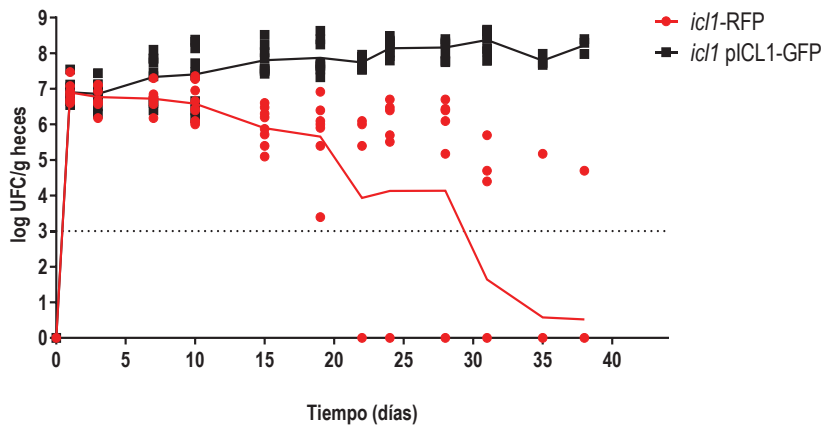
A partir de células en fase estacionaria se realizaron suspensiones a D.O.= 0,8 y diluciones seriadas que se depositaron sobre agar YPD suplementado con (A) 5 mM de H_2O_2 o (B) 2 M de NaCl. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 y 48 horas respectivamente.

f) Capacidad de colonización de los mutantes *icl1*-*WOR1*^{OE}

Estudios previos de nuestro grupo sugieren un papel de *Icl1* en la capacidad de colonización del TGI. Para analizar cómo podía afectar la delección de *ICL1* al establecimiento en el TGI de ratón, se realizó

un ensayo de co-colonización entre las cepas *icl1* e *icl1* pICL1 reintegrante. Como se puede observar en la Figura 52A, la delección de *ICL1* permite a las células establecerse en el TGI a tiempos cortos de colonización (1 a 15 días aproximadamente), pero no a tiempos largos y acaban perdiéndose cuando compite por establecerse con un reintegrante *icl1* pICL1. Dado el papel de *Wor1* en comensalismo, analizamos si la sobreexpresión de *WOR1* en fondo *icl1* mejoraba la capacidad de este mutante de establecerse en el TGI del ratón mediante el mismo ensayo de co-colonización con mutantes *icl1*-RFP e *icl1*-*WOR1*^{OE}. Como se puede observar en la Figura 52B, las células que sobreproducen *Wor1* en este fondo colonizan a los mismos niveles que el mutante *icl1* y, a diferencia del caso anterior, no se observa que las cepas compitan por establecerse. Por lo tanto, *Wor1* no parece mejorar los niveles de colonización en ausencia de *Icl1*.

(A)



(B)

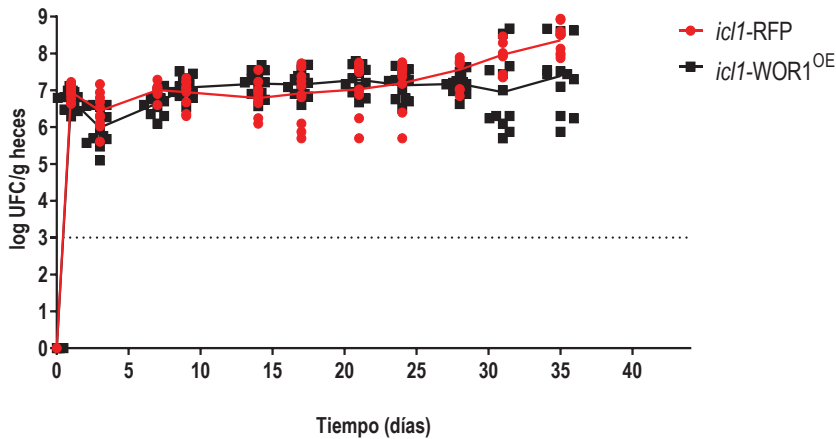


Figura 52. Ensayos de co-colonización en mutantes *icl1*.

Niveles de colonización del ensayo de competición entre las cepas (A) *icl1*-RFP e *icl1* pICL1-GFP (n=9) y (B) *icl1*-RFP y *icl1*-*WOR1*^{OE} (n=12). Los resultados muestran la media en UFCs/g de heces en unidades logarítmicas en función del tiempo. La línea punteada indica el límite de detección.

J.4. Papel de *ICL1* en el *switching*

Los resultados de comensalismo y de proteómica sugieren una probable relación de epistasia entre *Wor1* e *Icl1*. Dado el papel esencial de *Wor1* en *switching*, en este apartado determinamos si los mutantes *icl1* presentan además defectos en dicho proceso.

g) La sobreexpresión de *WOR1* en fondo *icl1* genera colonias que se tiñen con floxina B y una población de células de mayor tamaño

En primer lugar, se determinó si la cepa *icl1-WOR1^{OE}* generaba células que se tiñen con floxina B y de morfología similar a la cepa *CAI4-WOR1^{OE}*. Tal y como se observa en la Figura 53, la delección de *ICL1* da lugar a colonias blancas; sin embargo, la sobreexpresión de *WOR1* en fondo *icl1* generó colonias que se tiñen con floxina B de rosa intenso, pero más pequeñas, al igual que ocurre en la cepa *CAI4-WOR1^{OE}*.

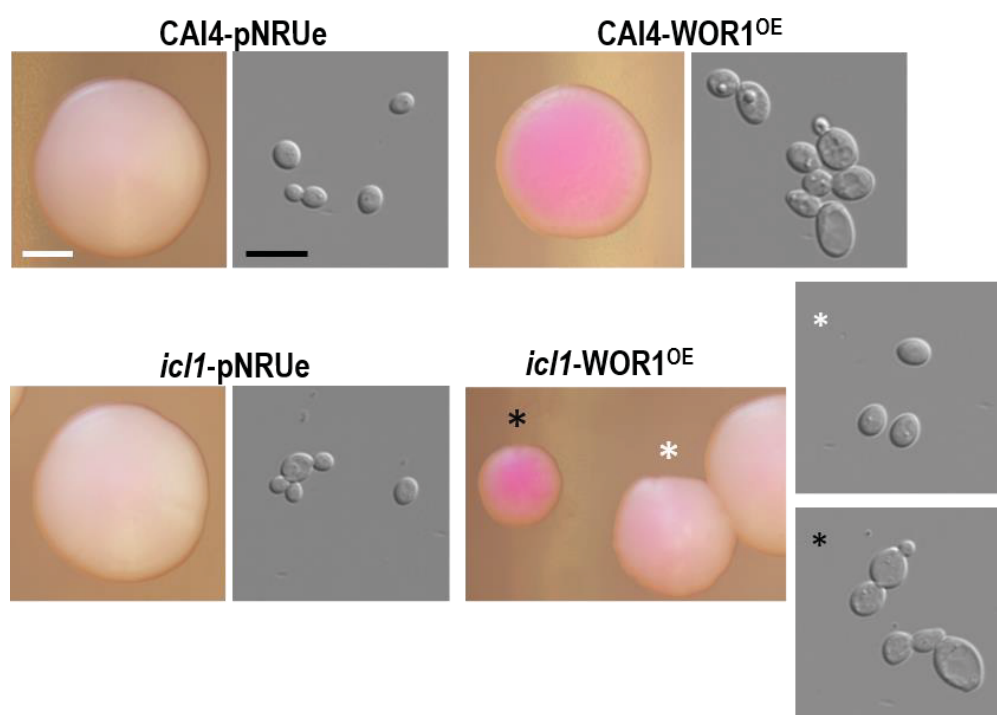


Figura 53. Crecimiento de las cepas *WOR1^{OE}* en fondo silvestre e *icl1* sobre floxina B.

Fotografías a la lupa de las colonias (x25) y al microscopio de las células (100x). A partir de células en fase estacionaria, se prepararon suspensiones para depositar aproximadamente 200 células por placa de agar YPD suplementado con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de floxina B. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C. Asterisco negro: colonia teñida de rosa intenso; asterisco blanco: colonia teñida de rosa pálido. Las barras de escala corresponden a tamaños de 0,5 mm (en blanco) y 10 μm (en negro).

Este fenotipo, sin embargo, no es homogéneo y tan solo se observa en un 50% de la población, mientras que el resto permanecen teñidas de un rosa más claro. Las colonias teñidas de rosa intenso presentaron una morfología celular similar a las células CAI4-WOR1^{OE}, con células más grandes, mientras que las colonias teñidas de rosa claro poseían una morfología parecida a las células blancas silvestres, con células de tamaño similar.

h) La frecuencia de *switching* es más baja en los mutantes *icl1-mtla1*

La transición célula blanca a célula opaca está regulada por el locus *MTL* (Hull & Johnson, 1999), de forma que la delección de *MTLA1* suprime la formación del heterodímero $\alpha 1$ - $\alpha 2$ y, en consecuencia, se induce el paso a de célula blanca a célula opaca. Ante los resultados obtenidos en el apartado anterior donde se observa que la sobreexpresión de *WOR1* en fondo *icl1* parece afectar a la tinción con floxina B, analizamos el posible efecto de la delección de *MTLA1* en mutantes *icl1* sobre el *switching*.

La delección de *MTLA1* se llevó a cabo mediante el sistema CRISPR-Cas9 transitorio (Min *et al.*, 2016) en las cepas *icl1* e *icl1* pICL1, cuyo proceso se describe en materiales y métodos. A continuación, cuantificamos la frecuencia de *switching* en las cepas *icl1-mtla1* e *icl1* pICL1-*mtla1*. Para ello, las células se incubaron en medio YPD líquido O/N, se sembraron en medio sólido YPD floxina B (5 μ g/mL) a pH=6 y se incubaron durante 3 días a 28°C, 5 % CO₂ y en oscuridad para fomentar el *switching*. Tras ese tiempo, se realizó el recuento de colonias que presentaban coloración rosa intenso, rosa pálido y con sectores (Figura 54A, B y C respectivamente). Como se muestra en el gráfico en la Figura 54D, el mutante *icl1-mtla1* posee una frecuencia de *switching* más baja comparada con el reintegrante *icl1* pICL1-*mtla1*, dado que se contaron menos colonias opacas. Sin embargo, se encontró un número muy variable de colonias rosa pálido en el reintegrante, no pudiendo hacer una distinción real entre cepas. Por último, se contaron las colonias que presentaban sectores blancos y rosas, tampoco encontrando una diferencia significativa entre ambas. Esto confirma que la ausencia de *ICL1* disminuye la frecuencia de aparición de células que se tiñen con floxina B y realizan el paso de célula blanca a célula opaca, aun en condiciones inductoras.

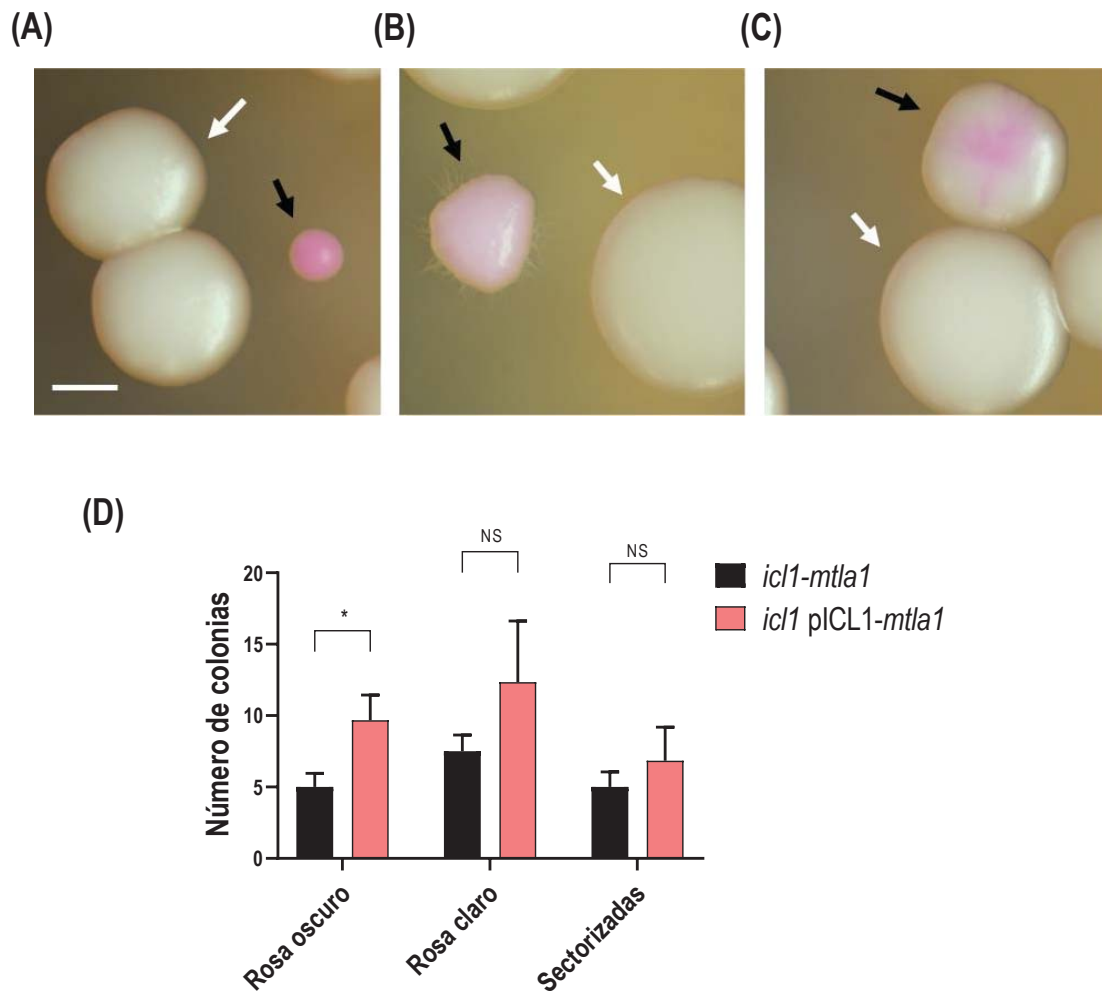


Figura 54. Recuento de colonias teñidas encontradas en condiciones de inducción de *switching* en el mutante *icl1-mtla1* y cepa *icl1 pICL1-mtla1*.

Fotografías a la lupa de las diferentes colonias encontradas; rosa oscuro y blancas (A), rosa claro y blancas (B) y sectorizadas y blancas (C). Las colonias blancas se encuentran señalizadas con una flecha blanca y las que presentaban color rosa con una negra. La barra de escala corresponde a un tamaño de 1 mm. (D) Recuento de colonias rosa oscuro, rosa claro y con sectores rosas y blancos. Los resultados muestran la media \pm SEM de seis experimentos independientes con un recuento de $n=2000-3000$ colonias por ensayo. NS: no significativo, $*p<0,05$.

2. Caracterización de cepas microevolucionadas en el tracto gastrointestinal de ratón

Tal y como hemos comentado con anterioridad, el paso a través del tracto gastrointestinal desencadena una serie de cambios que permiten optimizar la capacidad de *C. albicans* de establecerse (Pande *et al.*, 2013). Con el objetivo de analizar las posibles adaptaciones que desarrollan las células de tras su paso por el TGI y que favorecen su establecimiento en este nicho biológico, hemos generado y analizado cepas adaptadas al intestino de ratón por microevolución. Para ello, las cepas, que denominamos microevolucionadas (μEv), se mantuvieron durante 366 días en el tracto gastrointestinal del ratón mediante pases sucesivos (ver materiales y métodos).

A. Estudios de colonización en cepas μEv

Como primera aproximación, analizamos si el paso sucesivo por el TGI del ratón permite a las células adquirir una ventaja en su capacidad de colonizar. Para ello nuestro grupo ha llevado a cabo varios ensayos de co-colonización mediante la inoculación de una suspensión celular en proporción 1:1 de la cepa silvestre CAF2-GFP y μEv93 (D. Prieto, sin publicar). Los resultados demuestran que la cepa μEv93 es capaz de desplazar completamente a la cepa silvestre durante los días 4 y 8 de colonización. Dicha mejora en la adecuación biológica es estable y no se pierde tras sucesivos pases *in vitro* de las células en medio YPD líquido durante 11 días consecutivos ya que, pasado este tiempo, la cepa μEv93 sigue siendo capaz de desplazar a la cepa silvestre CAF2-GFP (D. Prieto, sin publicar).

B. Análisis de fenotipos relacionados con las células GUT y células opacas

B.1. La expresión de *WOR1* en las cepas microevolucionadas aumenta a medida que las células pasan por el TGI

C. albicans aumenta la expresión de *WOR1* tras su paso por el tracto gastrointestinal del ratón (Pande *et al.*, 2013). Dada la mayor adecuación biológica al TGI de las cepas microevolucionadas, nos preguntamos si la expresión de este gen era distinta en dichas cepas.

Cuantificamos los niveles de mRNA de *WOR1* en células que se han conservado en agar YPD aproximadamente un mes (Figura 55A) y en células recuperadas de las heces del ratón y congeladas

directamente en glicerol (Figura 55B). Tal y como se muestra, las células que se han conservado *in vitro* reprimen la expresión de *WOR1* durante los primeros 20 días de colonización ($\mu\text{Ev}20$), con un aumento a los 114 días ($\mu\text{Ev}114$) donde dobla su expresión en comparación con la cepa inicial CAF2-RFP. Dichos niveles se mantienen hasta los 156 días ($\mu\text{Ev}156$), encontrando que a los 180 días ($\mu\text{Ev}180$) las diferencias con respecto la cepa inicial CAF2-RFP no son significativas; sin embargo, los niveles de mRNA de *WOR1* en células que se han conservado en congelación inmediatamente después de ser aisladas de heces de ratón, son 6-7 veces más altos desde el día 93 y hasta los 366 días. Estos resultados muestran que la expresión de *WOR1* se induce como consecuencia del paso de las células a través del TGI, y disminuye sus niveles durante su conservación *in vitro*, aunque se mantienen por encima en algunas cepas microevolucionadas.

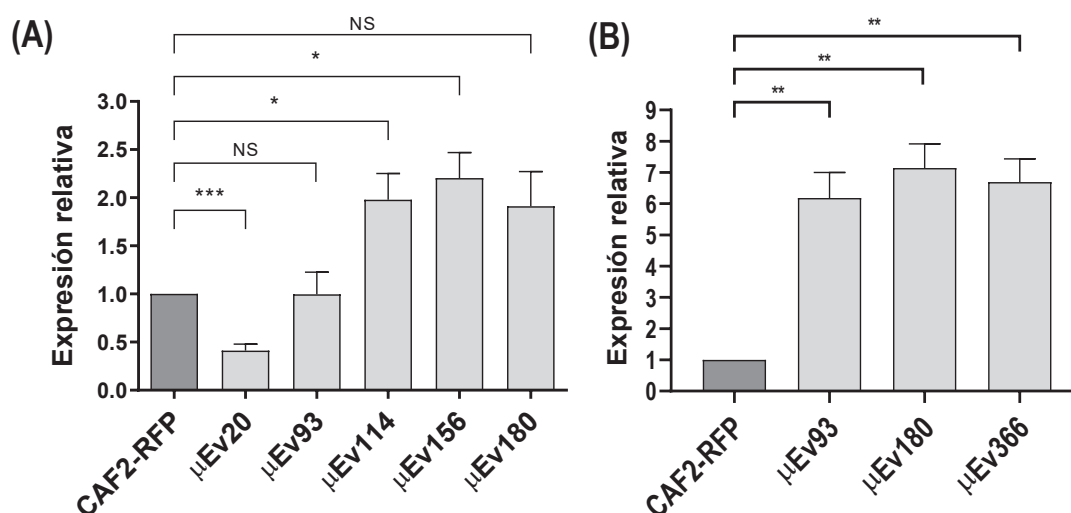


Figura 55. Expresión de *WOR1* en las cepas microevolucionadas.

Niveles de expresión en células en fase exponencial de crecimiento. La expresión de *WOR1* en todas las cepas se normaliza a la de *ACT1* y se muestran tomando como referencia la expresión en la cepa CAF2-RFP. (A) Expresión en células conservadas *in vitro* en medio YPD sólido. (B) Expresión en células que provienen del glicerol recuperadas de las heces de ratón. Los resultados muestran la media de expresión relativa \pm SEM de tres resultados independientes. NS: no significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

B.2. Las células microevolucionadas son más grandes y se tiñen con floxina B

Una de las características que presentan las células GUT es que difieren morfológicamente tanto de las células blancas como de las opacas. El análisis microscópico de las cepas μEv tras su crecimiento

O/N en YPD a 37° C permite observar células de mayor tamaño y más alargadas, fenotipo que es visible al menos desde el día 93 y que se mantiene hasta 366 días de adaptación al TGI (Figura 56A). También se analizó el crecimiento mediante ensayos de dilución en gota en medio YPD suplementado o no con floxina B (Figura 56B). Tal y como era de esperar, en ausencia de doxiciclina la cepa CAF2-RFP posee leve coloración rojiza debido a la expresión de *RFP*; sin embargo, ya en la cepa obtenida a día 93 y en adelante, las células se tiñen intensamente con floxina B. Estos resultados confirman que las células μ Ev poseen un fenotipo similar a las células opacas o GUT previamente descritas.

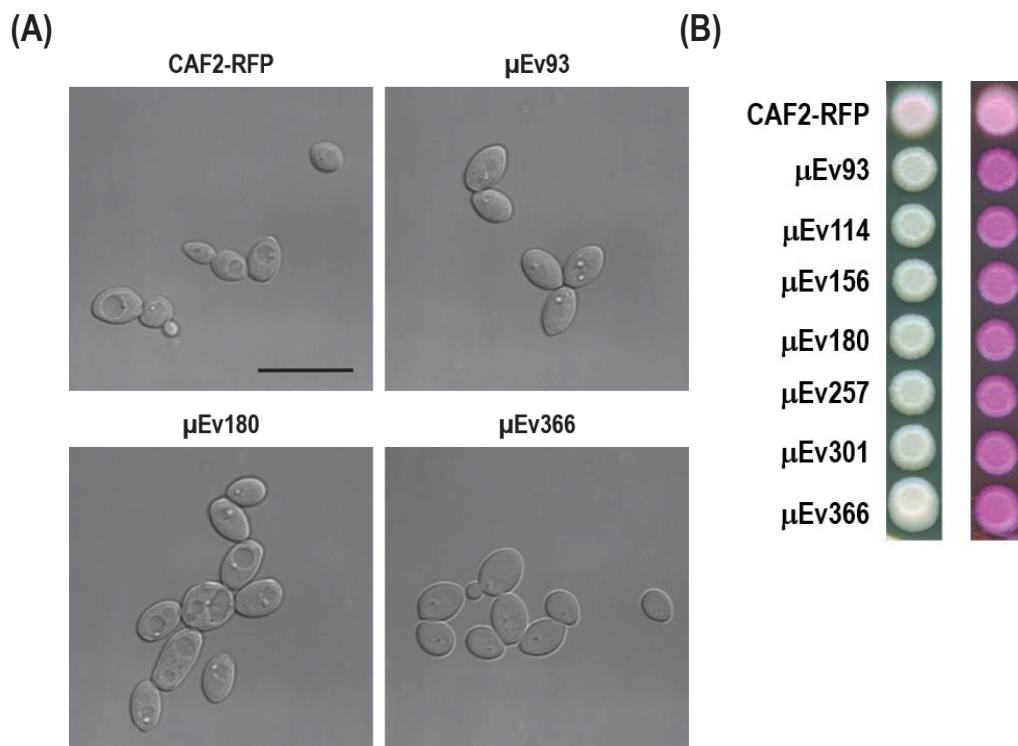
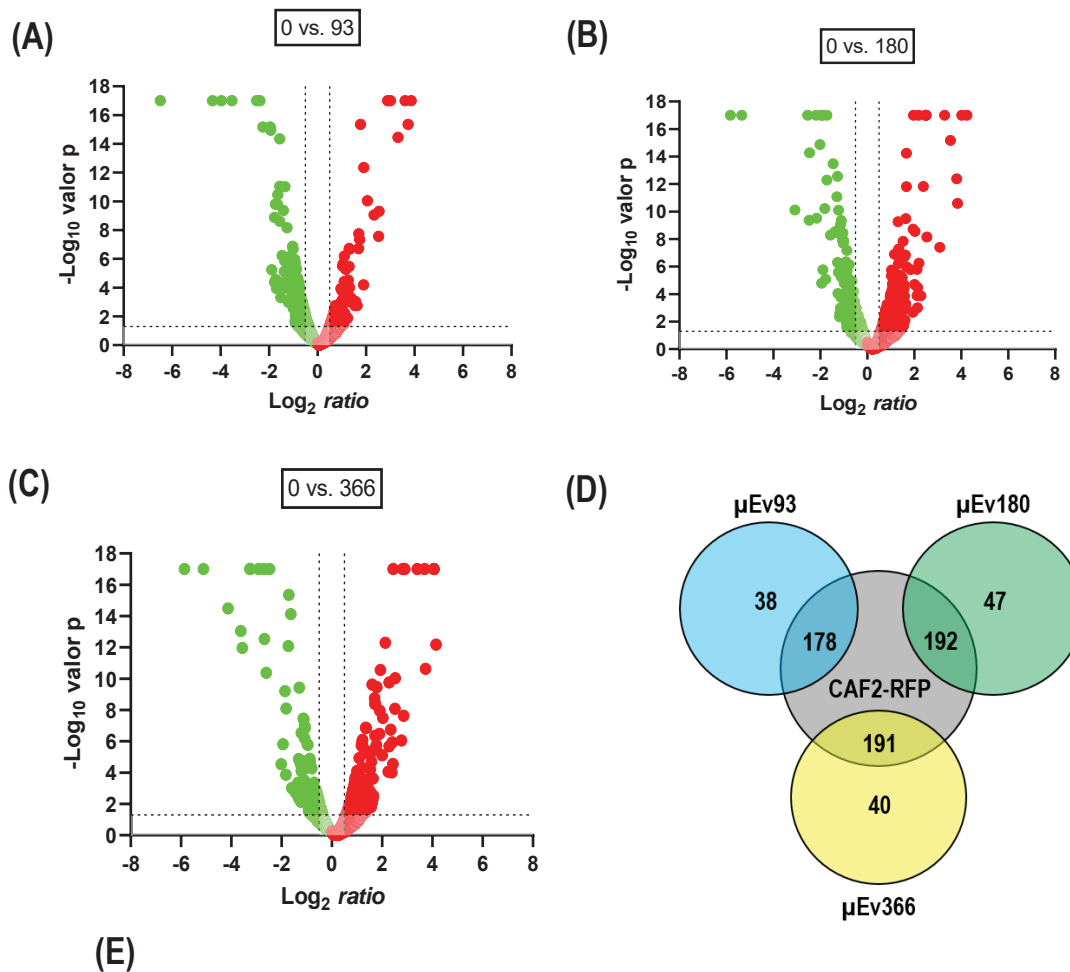


Figura 56. Determinación del fenotipo opaco en las cepas μ Ev mediante microscopía y tinción con floxina B.

(A) Fotografías al microscopio de las cepas CAF2-RFP y μ Ev 93, 180 y 366 tras la incubación en YPD a 37°C durante 24 horas. La barra de escala (en negro) corresponde a un tamaño celular de 10 μ m. (B) Crecimiento en gota en YPD (izquierda) o YPD suplementado con 10 μ g/mL de floxina B (derecha) tras 24 horas de incubación a 37°C.

C. Análisis del proteoma de las cepas μ Ev

Con el objetivo de determinar qué elementos son importantes durante el proceso de adaptación al TGI del ratón, realizamos un análisis comparativo del proteoma de las cepas μ Ev y se comparó con el de la cepa CAF2-RFP inicial. Se identificaron un total de 2449 proteínas, de las cuales solo se consideraron aquellas que tenían una *ratio* de abundancia CAF2-RFP/ μ Ev con valor $p < 0,05$ (expresado en $-\log_{10} p > 1,3$). Se identificaron como proteínas que presentaban cambios aquellas con una *ratio* de abundancia expresada en \log_2 de $< -0,5$ si aumentan y de $> 0,5$ si disminuyen, así como proteínas encontradas de manera única en cada una de las cepas cuando la *ratio* de abundancia expresada en \log_2 era de 6,64 para la cepa control o de -6,64 para las cepas microevolucionadas. Como se puede observar en el gráfico en volcán (Figura 57A, B y C), el paso de la cepa CAF2-RFP a través del TGI a los distintos tiempos desencadena cambios muy acentuados en su proteoma, con una gran cantidad de proteínas que aumentaron o disminuyeron. Adicionalmente se observaron las proteínas identificadas que presentaban una *ratio* de variabilidad de $< 30\%$ entre réplicas (Figura 57D y E), encontrando 261 proteínas en los análisis entre las cepas CAF2-RFP/ μ Ev93, 313 proteínas en las cepas CAF2-RFP/ μ Ev180 y 297 proteínas en las cepas CAF2-RFP/ μ Ev366 (Anexo 2, 3 y 4 respectivamente).



Nº de proteínas				
Cepa	Identificadas	Aumentadas	Disminuidas	Únicas
$\mu\text{Ev}93$	261	108	70	38
$\mu\text{Ev}180$	313	91	101	47
$\mu\text{Ev}366$	297	100	91	40

Figura 57. Cambios proteómicos en las cepas μEv tras su paso por el TGI del ratón.

Representación en gráfico en volcán de la abundancia de la *ratio* CAF2-RFP/ μEv de las proteínas identificadas que disminuyeron su abundancia en rojo y las que aumentaron en verde en las cepas (A) $\mu\text{Ev}93$, (B) $\mu\text{Ev}180$ y (C) $\mu\text{Ev}366$ comparadas con la cepa inicial CAF2-RFP (0). Las líneas discontinuas marcan los límites a partir de los cuales las proteínas se consideran que disminuyen ($-\log_{10}$ valor $p > 1,3$; \log_2 *ratio* $< -0,5$) o aumentan ($-\log_{10}$ valor $p > 1,3$; \log_2 *ratio* $> 0,5$). (D) Diagrama de Venn donde se representa las proteínas las que cambiaron de manera conjunta en la intersección y el número de proteínas que se encontraron de manera única en cada cepa. Solo se tomaron aquellas que presentaban una *ratio* de variabilidad de la abundancia de $< 30\%$. (E) Tabla con detalle de las proteínas identificadas en las cepas microevolucionadas respecto a la cepa inicial. Los resultados corresponden a 3 experimentos independientes.

C.1. Proteínas identificadas que aumentaron o disminuyeron

El análisis por componente celular se determinó con la herramienta *Candida Genome Database GO Slim Mapper*, mientras que el análisis de enriquecimiento ontológico por proceso biológico se llevó a cabo por *PathoYeastRank by GO*, utilizando en ambos casos la base de datos *Candida Genome Database (CGD)*. Los datos obtenidos muestran que el paso de la cepa CAF2-RFP por el TGI del ratón lleva asociado un cambio en la abundancia de 178 proteínas a los 93 días, de 192 proteínas a los 180 días y de 191 proteínas a los 366 días, comparado con la cepa CAF2-RFP inicial (Figura 57D y E).

Las proteínas identificadas se analizaron por proceso biológico, encontrando 70 proteínas en menor abundancia en la cepa $\mu\text{Ev}93$, 101 proteínas en la cepa $\mu\text{Ev}180$ y 91 proteínas en la cepa $\mu\text{Ev}366$. En la Tabla 3 se señalan con una x las proteínas y las cepas en las que se identificaron. La *ratio* (\log_2) y el valor *p* (\log_{10}) pueden ser consultados en el Anexo 2, 3 y 4 de este trabajo.

En la cepa $\mu\text{Ev}93$ destacaron varias proteínas relacionadas con la filamentación, como son Big1, Cbk1, Kem1 Kre5 y Rho1, entre otras. Big1 y Kre5 participan además en la síntesis de β -1,6-glucanos, mientras que Rho1 está implicada en su regulación. Respecto a proteínas implicadas en metabolismo de fuentes de carbono, se observó una disminución de Adh2 y de Ara1, y en cuanto a proteínas involucradas en el aprovechamiento de lípidos, se encontró una disminución de la fosfolipasa Plb3 y una enzima que cataliza la formación de triacilglicerol en gotas lipídicas.

Por otro lado, en la cepa $\mu\text{Ev}180$ destacan de nuevo proteínas relacionadas con la filamentación como Efg1 o Ctn3, así como de Ywp1 que participa en la adhesión y formación de biopelículas en el hospedador y que es específica de levaduras. Curiosamente se encontró disminuida Kex1, una proteína implicada en la maduración de la candidalísina Ece1. Se identificaron varias proteínas que participan en el transporte (Obpa, Osh3) y síntesis de esteroides (Erg20) y en la síntesis de fosfatiletanolamina (Muq1). Por otro lado, se encontraron disminuidas proteínas con un papel en la respuesta a estrés oxidativo, como son Glx3 o Gst2. También se encontraron proteínas relacionadas con la respiración celular como Nad5 o Cox2.

En la cepa $\mu\text{Ev}366$ se identificaron de nuevo proteínas relacionadas con el metabolismo de fuentes de carbono (Ara1 y Ubc8) y a Kex1 al igual que en la cepa $\mu\text{Ev}180$. Entre otras proteínas que destacaron, se identificaron enzimas relacionadas con la respuesta a estrés oxidativo como a Cat1, Trx1, Cka2 o Glx3. Se identificaron de nuevo proteínas que participan en el transporte y síntesis de ergosterol, como Obpa y Erg6 respectivamente, y nuevamente a Muq1.

Tabla 3. Proteínas que disminuyen en las cepas microevolucionadas en comparación con la cepa CAF2-RFP inicial.

Proteína	orf	Descripción	μEv93	μEv180	μEv366
Filamentación					
Big1	orf19.2334	Participa además en adhesión y en la síntesis de β-glucanos	x		
Cbk1	orf19.4909	Quinasa de pared celular	x		
Cdc42	orf19.390	GTPasa tipo Rho, participa en la gemación	x		
Ctn3	orf19.2809	Carnitina acetil transferasa de peroxisoma, involucrada además en metabolismo de fuentes de carbono no fermentables	x	x	x
Kem1	orf19.4969	5'→3' exorribonucleasa	x		
Kre5	orf19.290	Involucrada también en síntesis de β-glucanos	x		
Snf5	orf19.5871	Participa en procesos de regulación transcripcional	x		
Bud6	orf19.5087	Formación de Spitzenkörper	x		
Rho1	orf19.2843	Regulador de la síntesis de β-glucanos	x		
Efg1	orf19.610	Factor de transcripción, transición célula blanca-opaca		x	
Bni1	orf19.4927	Formina, participa además en la organización del citoesqueleto		x	
Sit4	orf19.5200	Fosfatasa		x	
Lmo1	orf19.5147	Involucrada en el crecimiento invasivo, integridad de pared celular		x	
Metabolismo de fuentes de carbono					
Adh2	orf19.5113	Alcohol deshidrogenasa	x		x
Ara1	orf19.2172	Arabinosa deshidrogenasa	x	x	x
Hgt6	orf19.2020	Transportador de glucosa	x		
C4_04750qp_a	orf19.3806	Regulan negativamente la gluconeogénesis		x	
Ubc8	orf19.4540	Regulan negativamente la gluconeogénesis		x	x
Síntesis y aprovechamiento de lípidos					
Plb3	orf19.6594	Fosfolipasa B	x		
C3_03760wp_a	orf19.6941	Formación de triacilglicerol en gotas lipídicas	x		
Obpa	orf19.3198	Transporte de esteroides		x	x
Osh3	orf19.1317	Transporte de esteroides		x	
Erg20	orf19.4491	Síntesis de ergosterol		x	
Muq1	orf19.2107	Síntesis de fosfatidiletanolamina		x	x
C1_09980cp_a	orf19.4864	Lipasa C		x	
Erg6	orf19.1631	Síntesis de esteroides			x
Erg12	orf19.4809	Síntesis de esteroides			x
Adhesión					
Ywp1	orf19.3618	Adhesión y formación de biopelículas, específica de forma levaduriforme		x	

Virulencia					
Kex1	orf19.7020	Implicada en la maduración de candidalislina (Ece1)		x	x
Respuesta a estrés oxidativo					
Glx3	orf19.251	Inducida en estrés oxidativo vía Cap1		x	x
Gst2	orf19.2693	Inducida en estrés oxidativo, filamentación		x	
Trx1	orf19.7611	Tiorredoxina			x
Cka2	orf19.3530	Subunidad de la proteína quinasa CK2			x
Cat1	orf19.6229	Catalasa			x
Cip1	orf19.113	Posible oxidorreductasa, involucrada en estrés oxidativo y por alta concentración de metales pesados		x	x
Función mitocondrial					
Nad5	Sin caracterizar	Subunidad V de NADH ubiquinona oxidorreductasa, complejo I de la cadena transportadora de electrones		x	
Cox2	Sin caracterizar	Subunidad II de la citocromo c oxidasa, complejo IV de la cadena transportadora de electrones		x	
Cox5	orf19.4759	Subunidad V de la citocromo c oxidasa, complejo IV de la cadena transportadora de electrones		x	

Dos proteínas, Ara1 y Ctn3, se encontraron disminuidas en las tres cepas microevolucionadas. Adicionalmente se analizaron por proceso biológico aquellas proteínas que aparecían en menor abundancia y que se repetían entre las cepas $\mu\text{Ev}93$ - $\mu\text{Ev}180$, $\mu\text{Ev}93$ -366 o $\mu\text{Ev}180$ - $\mu\text{Ev}366$; no se encontró relación entre más de dos proteínas, y por lo tanto, no aporta información relevante al análisis.

Durante el análisis de las proteínas que aumentaron su abundancia respecto a la cepa CAF2-RFP inicial, encontramos 108 proteínas en la cepa $\mu\text{Ev}93$, 91 proteínas en la cepa $\mu\text{Ev}180$ y 100 proteínas en la cepa $\mu\text{Ev}366$. La Tabla 4 recoge las proteínas identificadas y marcadas con una x en la cepa en la que se ha encontrado. La *ratio* y valor p pueden ser consultados en el Anexo 2, 3 y 4.

El análisis por proceso biológico en la cepa $\mu\text{Ev}93$ identificó varias proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, como Ard1, Pfk2 o Gca2, así como del transporte de galactosa y glucosa (Gal1 y Hgt2, respectivamente). También se encontraron proteínas de la ruta de síntesis de esfingolípidos y de ergosterol (Des1, Erg3). Además, destacaron las proteínas Aox2, que pertenece a la ruta alternativa de respiración mitocondrial, y Pst3, que participa en la respuesta a estrés oxidativo.

Tabla 4. Proteínas que aumentaron en las cepas microevolucionadas en comparación con la cepa CAF2-RFP inicial.

Proteína	orf	Descripción	μEv93	μEv180	μEv366
Metabolismo de fuentes de carbono					
Ard1	orf19.6322	Catabolismo de D-arabitol y D-arabinosa	x	x	x
Pfk2	orf19.6540	Metabolismo de la fructosa-1,6-bifosfato	x		
Hxk2	orf19.542	Hexoquinasa			x
Eno1	orf19.395	Enolasa			x
Cdc19	orf19.3575	Piruvato quinasa			x
Adh1	orf19.3997	Alcohol deshidrogenasa			x
Xyl2	orf19.7676	Xilulosa reductasa			x
Gca2	orf19.999	Glucamilasa, actividad hidrolasa	x	x	x
Transporte					
Gal1	orf19.3670	Transporte de galactosa	x	x	
Gal7	orf19.3675	Transporte de galactosa			x
Gal10	orf19.3672	Transporte de galactosa			x
Gnp1	orf19.1193	Transporte de aminoácidos	x		
Hgt2	orf19.3668	Transporte de glucosa	x	x	x
Hgt6	orf19.2020	Transporte de glucosa			x
Hxt5	orf19.4384	Transporte de glucosa			x
Cdr2	orf19.5958	Transporte de fosfolípidos	x	x	x
Arf3	orf19.1702	Transportador de aminoácidos		x	x
Vcx1	orf19.405	Antiportador vacuolar H ⁺ /Ca ²⁺		x	x
Csh3	orf19.3366	Permeasa de aminoácidos	x	x	x
Síntesis de lípidos					
Des1	orf19.4048	Síntesis de esfingolípidos	x	x	x
Erg3	orf19.767	Síntesis de ergosterol	x		
Erg5	orf19.5178	Síntesis de ergosterol	x	x	x
Erg27	orf19.3240	Síntesis de ergosterol			x
Sur2	orf19.5818	Síntesis de ergosterol	x		x
Función mitocondrial					
Aox2	orf19.4773	Ruta alternativa de la respiración mitocondrial	x	x	
Shy1	orf19.4841	Síntesis de la citocromo c oxidasa		x	x
Respuesta a estrés oxidativo					
Pst3	orf19.5285	Inducida en estrés oxidativa y virulencia	x	x	x
Síntesis de componentes de pared					
Kre9	orf19.5861	Regulador de la síntesis de β-1,6-glucanos		x	
Alg6	orf19.1843	Síntesis de mananos		x	
Alg1	orf19.4410	Glucosidasa, modificación de pared			x
Phr1	orf19.3829	Glucosidasa, modificación de pared			x
Interacción con el hospedador					
Gpd2	orf19.691	Unión de Factor H, FHL-1 y plasminógeno			x

En la cepa $\mu\text{Ev}180$ se volvieron a encontrar en mayor abundancia *Ard1*, *Gca2*, *Aox2*, *Pst3*, *Des1*, *Erg5*, *Gal1*, *Hgt2* y *Cdr2*. Entre los transportadores, se identificó a *Arf3* que transporta aminoácidos y al antiportador vacuolar $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ *Vcx1*. Se identificaron varias proteínas que participan en la síntesis de componentes de pared celular, como *Kre9* (β -1,6-glucanos) y *Alg6* (mananos), y de síntesis del componente de membrana celular fosfatidilcolina (*Pct1*). Por último, destacó la identificación de *Shy1*, una proteína que participa en el ensamblaje del complejo IV en mitocondria.

Entre aquellas proteínas que destacaron en cepa $\mu\text{Ev}366$, se volvieron a identificar algunas proteínas involucradas en el transporte (*Hgt2*, *Cdr2*) y también se identificaron otros transportadores que participan en la utilización de la galactosa (*Gal7*, *Gal10*). Se identificaron otras que participan en el metabolismo de fuentes de carbono (*Hxk2*, *Eno1*, *Adh1*). Se encontraron de nuevo proteínas involucradas en rutas de síntesis de lípidos (*Des1* y proteínas *Erg*) y proteínas que participan en la modificación de compuestos de pared celular (*Phr1* y *Alg1*). Destacó la proteína *Gpd2*, que participa en la unión de Factor H, FHL-1 y plasminógeno del hospedador. Se identificó de nuevo de *Shy1*, *Arf3* y *Vcx1* al igual que la cepa $\mu\text{Ev}180$, y a *Pst3* al igual que en la $\mu\text{Ev}93$ y $\mu\text{Ev}180$.

Entre todas las proteínas identificadas, aquellas que se encontraron aumentadas en las tres cepas microevolucionadas respecto a la cepa inicial CAF2-RFP fueron: *Ard1*, *Cdr2*, *Gca2*, *Csh3*, *Des1*, *Hgt2*, *Oye23*, *Pst3* y una gran parte de proteínas de ribosoma como *Rpl13*, *Rpl38* o *Rsr1*. Las proteínas identificadas que se repetían en los análisis entre las cepas $\mu\text{Ev}93$ - $\mu\text{Ev}180$, $\mu\text{Ev}93$ -366 o $\mu\text{Ev}180$ - $\mu\text{Ev}366$ fueron analizadas mediante proceso biológico, no encontrando procesos relevantes en los cuales participarían más de dos proteínas.

C.2. Proteínas identificadas de manera única en cada cepa microevolucionada

Se identificaron de manera única 38 proteínas en la cepa $\mu\text{Ev}93$, 47 proteínas en la cepa $\mu\text{Ev}180$ y 40 proteínas en la cepa $\mu\text{E}366$ en comparación con la cepa inicial CAF2-RFP (Tabla 5). En primer lugar, se analizaron las proteínas encontradas en la cepa $\mu\text{Ev}93$. Entre ellas destacaron *Npr1* que regula la utilización del nitrógeno, *Cr_03180wp_a*, que participa en la respuesta celular a la deficiencia de nitrógeno y a *Gir2* que participa en la regulación positiva en respuesta a la deficiencia de aminoácidos. Por otro lado, se encontró a la proteína *Vm10*, una subunidad de la ATPasa vacuolar, *Bet2*, que media el transporte de retículo a Golgi, y *Rta4*, involucrada en el transporte de ácidos grasos. Se identificaron a las proteínas *Ira2* y *Gis2*, que se encuentran en la respuesta a estrés oxidativo, y esta segunda está también asociada a respuesta a estrés osmótico. También se identificó

a Tpk1, que participa en la regulación de la filamentación, del *switching* y del apareamiento. Curiosamente se encontró a la proteína Wh11 de manera repetida en esta cepa y posteriores.

El análisis en la cepa μ Ev180, volvió a identificar a Ira2, Gis2, Gir2, Tpk1, Npr1, Vma10 y Rta4, entre otras. También se encontró la succinato deshidrogenasa Sdh1, que participa en la respiración mitocondrial y en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, y se identificó a la proteína Are2 que está involucrada en la síntesis de ergosterol.

Entre las proteínas encontradas de manera única en la cepa μ Ev366, se identificaron de nuevo a las proteínas Ira2, Gis2, Sdh1, Tpk1, Rta4, Bet2 y Vma10 entre otras. También se identificó a la glucoamilasa Gca1 y al transportador de glucosa Hgt7. Por otro lado, se identificó a la proteína Msb2, que actúa vía Cek1 para mantener la integridad celular y permite el crecimiento de filamentos, y Alg6, que participa en la síntesis de mananos de pared celular. Seguidamente se analizaron aquellas proteínas que se identificaron en las tres cepas microevolucionadas repetidamente y que se listan en la Tabla 5.

Tabla 5. Proteínas que se encontraron de manera única y repetida en las cepas μ Ev93, μ 180 y μ Ev366 en comparación con la CAF2-RFP inicial.

Proteína	orf	Descripción
Transporte		
Bet2	orf19.7563	Transporte retículo endoplasmático a Golgi
Npr1	orf19.6232	Quinasa, transporte de amonio y regulación de la utilización de nitrógeno
Rta4	orf19.6595	Transporte de ácidos grasos
Respuesta a estrés		
Ira2	orf19.5219	Proteína activadora de GTPasa, respuesta a estrés oxidativo y otros
Gis2	orf19.3182	Respuesta a estrés osmótico y otros
Switching y apareamiento		
Tpk1	orf19.4892	Proteína quinasa dependiente de cAMP, involucrada además en filamentación
Otras		
Pre1	orf19.4025	Subunidad del proteasoma
Vma10	orf19.1866	Subunidad de la ATPasa vacuolar
Wh11	orf19.3548.1	Proteína específica del fenotipo blanco

Finalmente se compararon las proteínas identificadas de manera única en la cepa CAF2-RFP, encontrando 21 proteínas respecto a la cepa μ Ev93, 24 proteínas respecto a la cepa μ Ev180 y 39 proteínas respecto a la cepa μ Ev366. Entre ellas se identificó de manera redundante en los tres análisis comparativos a la MAPK Cek1, a la quitinasa Chs6, a la permeasa Gnp1, al transportador de

calcio de alta afinidad Mid1, a la trehalasa neutra Nth1, al regulador de la filamentación Pho81 y a la proteína Pst2 que está involucrada en la respuesta a estrés oxidativo. Sin embargo, no se encontró enriquecimiento ontológico significativo por proceso biológico de relevancia en los análisis de estas proteínas.

D. Análisis genómico de las cepas μ Ev

Con el fin de comprobar si durante el proceso de adaptación al TGI del ratón las cepas sufrieron modificaciones en su genoma, se extrajo DNA genómico de las cepas CAF2-RFP, μ Ev93, μ Ev180 y μ Ev366 y se secuenció mediante el sistema de secuenciación de nueva generación (NGS, *Next generation sequencing*) de Illumina en colaboración con el Dr. Christophe d'Enfert (Instituto Pasteur, París).

Los resultados preliminares muestran que existen diferencias entre las cepas microevolucionadas. Cuando se analizó la ploidía de las cepas, se observó que la cepa μ Ev93 posee una triploidía del cromosoma 7 (Figura 58A) con fenotipo A/A/B (*ratio* $\approx 0,3$) (Figura 58B), cuyo cambio no se conserva en las cepas posteriores. Además, esta cepa posee una pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 6, que se confirma con la representación en *heat map* de la Figura 58C, donde la densidad más baja (blanco) indica menor heterocigosidad. Estos cambios en el cromosoma 6, sin embargo, sí parecen conservarse en las cepas posteriores.

E. Caracterización fenotípica de las cepas μ Ev

Con el objetivo de determinar la naturaleza de las adaptaciones adquiridas por las cepas microevolucionadas durante el establecimiento en el TGI del ratón, se analizó su sensibilidad a diferentes factores, su capacidad de filantar y su crecimiento en diferentes fuentes de carbono

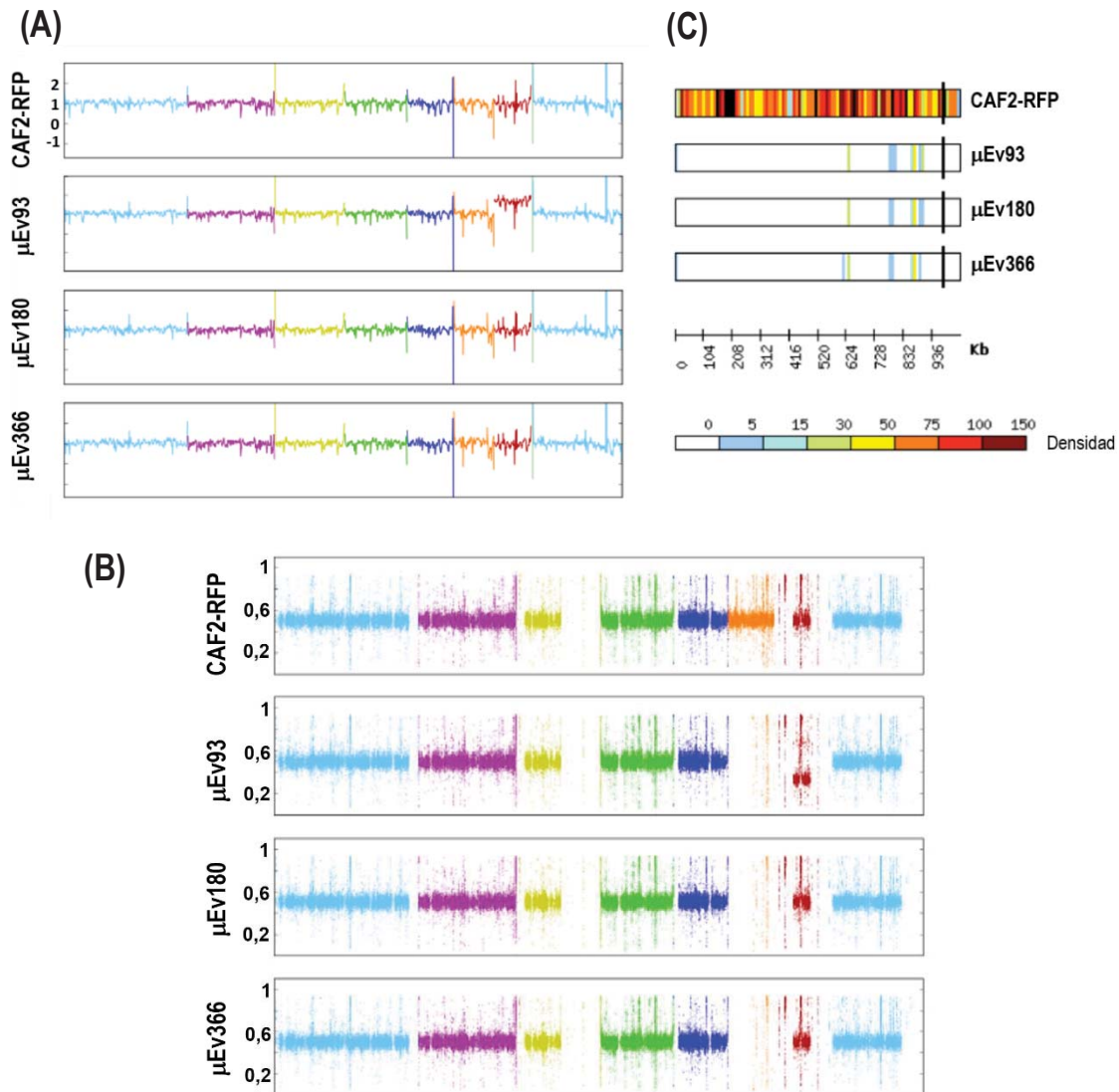


Figura 58. Representaciones de los análisis de ploidía y heterocigosidad en las cepas microevolucionadas.

(A) Representación de la ploidía donde 1 indica $2n$. (B) *Ratio* del recuento de polimorfismos de un único nucleótido (SNP) donde 0,5 indica fenotipo A/B. (C) *Heat map* de heterocigosidad en el cromosoma 6. Una densidad de 0 (blanco) indica menor grado de heterocigosidad y 150 (rojo oscuro) indica mayor grado.

E.1. Sensibilidad a estrés celular

a) Crecimiento en condiciones variables de oxígeno

Para analizar la capacidad de crecer a distintas concentraciones de oxígeno, las células se sembraron sobre YPD y se incubaron en ambiente de normoxia, microaerofilia o anaerobiosis. Como se observa

en la Figura 59, ninguna de las cepas presentó diferencias a la hora de crecer en distintas atmósferas de oxígeno.

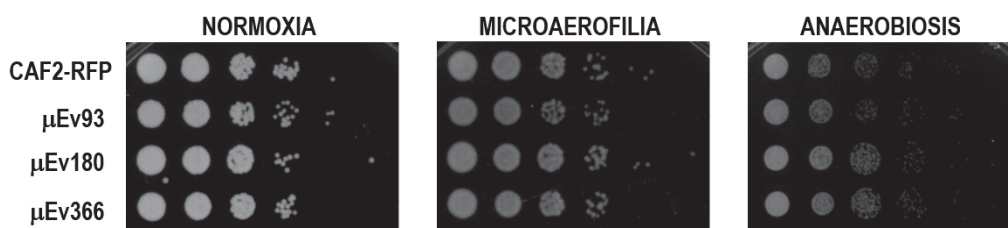


Figura 59. Crecimiento en condiciones de normoxia, microaerofilia y anaerobiosis de las cepas microevolucionadas.

Diluciones seriadas de células en fase estacionaria se depositaron sobre agar YPD. Las placas se incubaron a 37°C en condiciones de normoxia, microaerofilia y anaerobiosis durante 24-48 horas.

b) Sensibilidad a azoles

Los datos de proteómica mostraban un aumento de proteínas relacionadas con la síntesis y transporte de esteroides, lo cual podría implicar un aumento de la resistencia a antifúngicos del grupo de los azoles. Para determinar la capacidad de crecer a distintas concentraciones de este tipo de antifúngicos, se realizó un ensayo en gota en agar YPD suplementado con fluconazol o miconazol y se incubaron en ambiente de normoxia (Figura 60). Como se observa en los resultados, las cepas microevolucionadas son más resistentes a ambos antifúngicos en comparación con la cepa silvestre inicial.

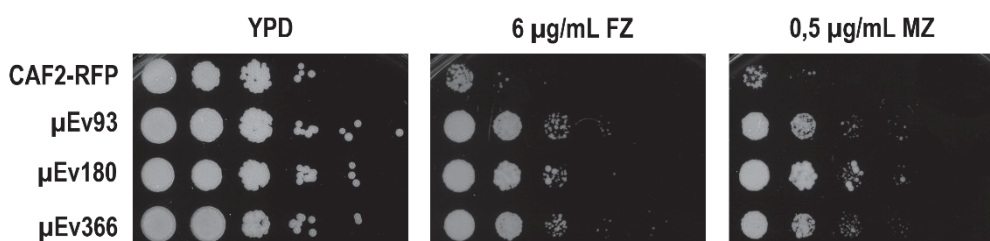


Figura 60. Crecimiento de las cepas microevolucionadas en presencia de fluconazol y miconazol.

Diluciones seriadas de una suspensión celular a D.O. 0,8 se depositaron sobre agar YPD suplementado con fluconazol (FZ) o miconazol (MZ) a las concentraciones indicadas. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas.

c) Sensibilidad a estrés oxidativo y osmótico

Con el objetivo de determinar si presentaban una mayor adaptación a condiciones que generan estrés oxidativo y estrés osmótico, las células se incubaron en presencia de peróxido de hidrógeno y de cloruro sódico. Como controles se utilizaron las cepas CAI4-WOR1^{OE} y *hog1*-pNRUe respectivamente, sensibles a ambos tipos de estrés. Como se observa en la Figura 61, no se observaron diferencias de crecimiento en ambas condiciones con respecto a la cepa silvestre original.

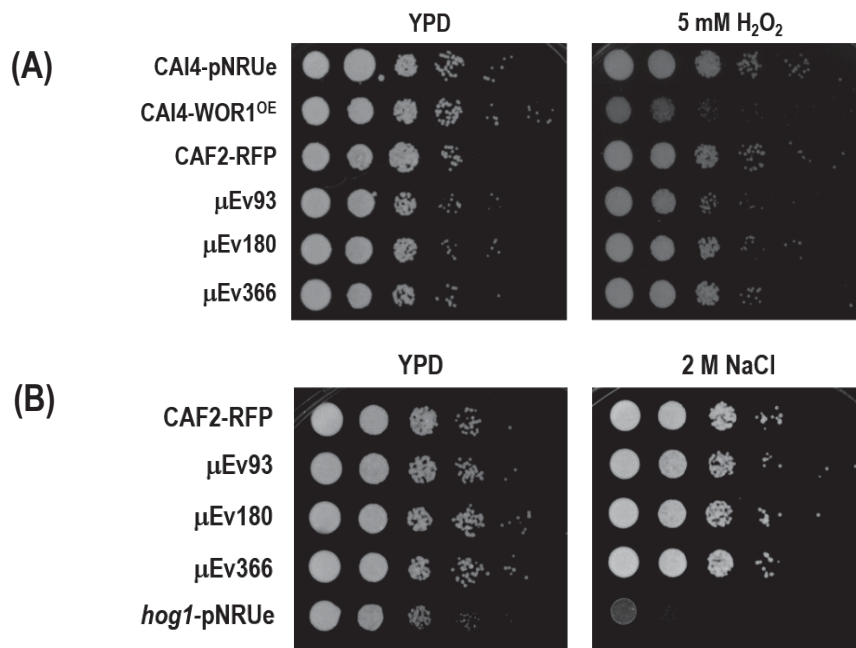


Figura 61. Sensibilidad a estrés oxidativo y osmótico en las cepas microevolucionadas.

A partir de cultivos en fase estacionaria se realizó una suspensión a D.O. de 0,8, se realizaron diluciones seriadas y se depositaron sobre medio YPD suplementado con (A) 5 mM H₂O₂ o (B) 2 M NaCl. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C antes de ser escaneadas.

d) Sensibilidad a sales biliares

Como se había descrito anteriormente, las células que sobreexpresan *WOR1* en fondo silvestre son más sensibles a sales biliares (Prieto *et al.*, 2017). Las cepas μ Ev se exponen a su efecto de manera secuencial tras su paso por el intestino delgado donde son vertidas, por lo que una mejor adaptación al TGI supondría, *a priori*, una mayor resistencia a las mismas. Como se muestra en la Figura 62, la cepa μ Ev20 es más sensible que la cepa CAF2-RFP, mientras que a partir de la cepa μ Ev93 empieza a aumentar la resistencia a sales biliares. La cepa μ Ev114 es más resistente comparada con la

μ Ev93, y esta resistencia se conserva hasta la cepa μ Ev366. Estos datos sugieren que el paso de una cepa silvestre por el TGI del ratón aumenta la resistencia a sales biliares.

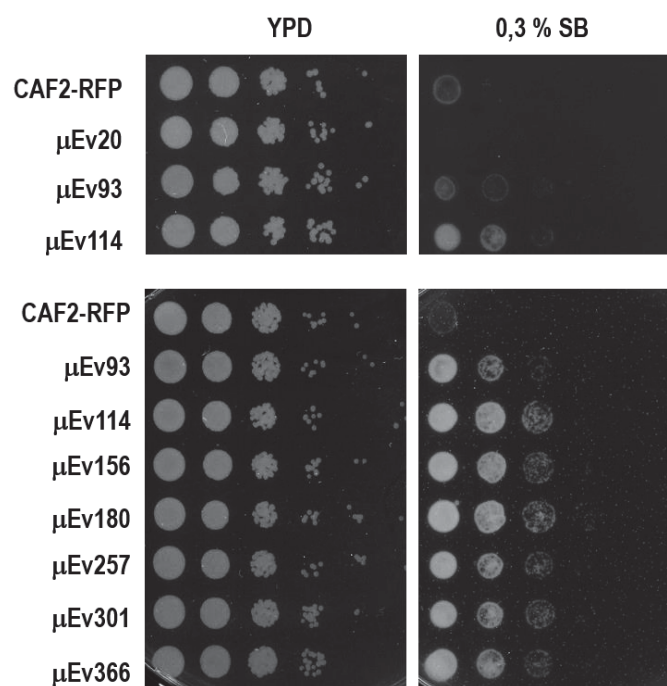


Figura 62. Sensibilidad a sales biliares de las cepas μ Ev.

Diluciones seriadas de las células se depositaron sobre agar YPD suplementado con sales biliares (SB) al 0,3 %. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C.

E.2. Capacidad de filamentación

La cepa que sobreproduce Wor1 en fondo silvestre presenta problemas de filamentación *in vitro*; sin embargo, al igual que ocurre en los mutantes *efg1*, estas cepas mejoran su tasa de colonización en el TGI del ratón. Estudios previos en un modelo de colonización similar han demostrado que el paso secuencial de *C. albicans* por el TGI del ratón tiene como consecuencia la pérdida de la capacidad de filantar de las células (Tso *et al.*, 2018), cuestionando la necesidad de llevar a cabo este cambio morfológico para poder establecerse en este nicho.

Para poder determinar si las cepas μ Ev también habían perdido esta capacidad, se realizó un ensayo de filamentación a distintos tiempos durante 48 horas en YPD con 5 % o 100 % FBS a 37°C.

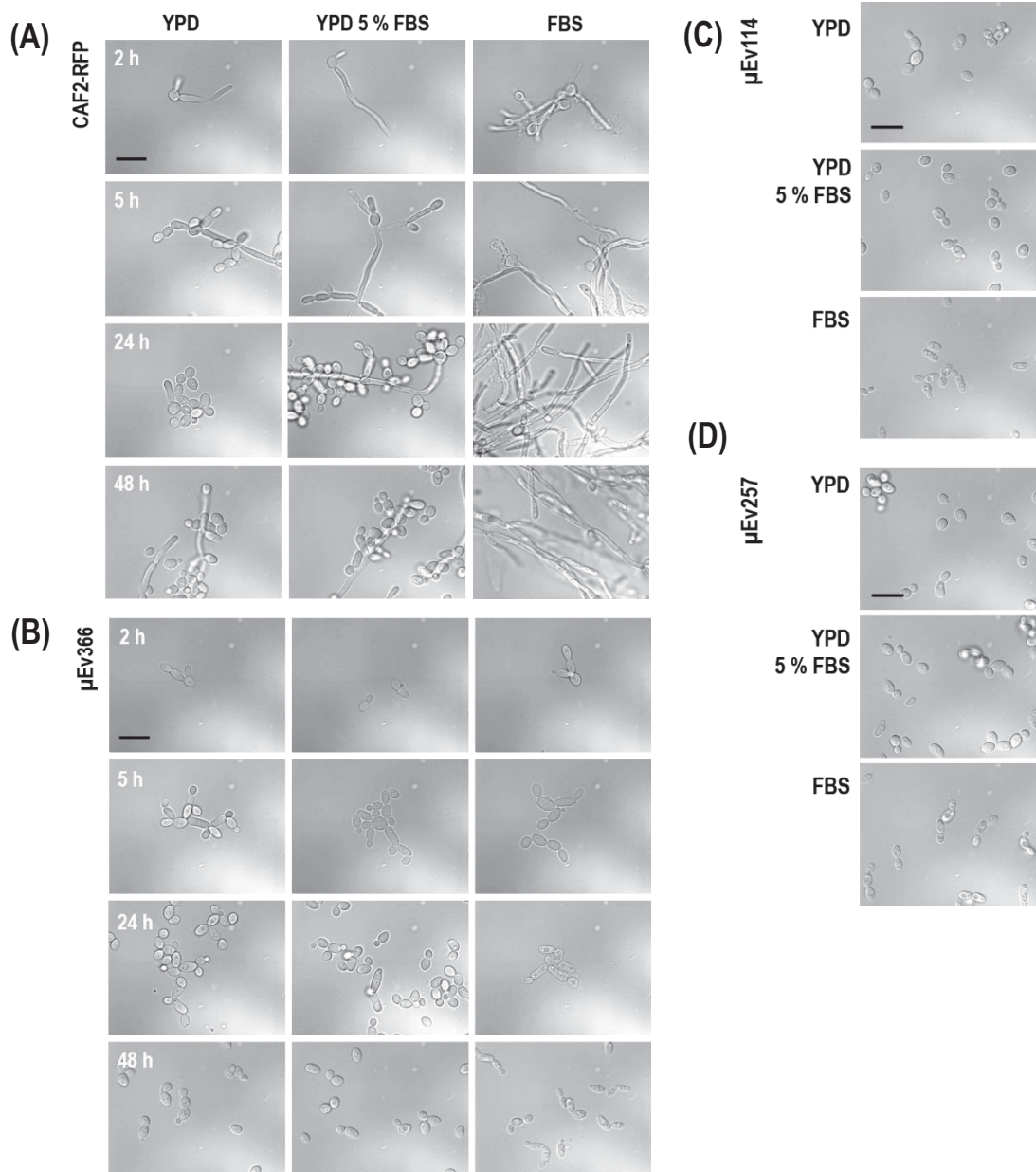


Figura 63. Filamentación en presencia de suero en las cepas microevolucionadas.

Las células fueron incubadas en YPD, YPD 5 % FBS o 100 % FBS durante 48 horas a 37°C en agitación y se tomaron fotografías en el microscopio para observar la evolución. (A) y (B) cepas CAF2-RFP y μ Ev366 respectivamente a las 2, 5, 24 y 48 horas de incubación. (C) y (D) cepas μ Ev114 y μ Ev257 respectivamente a las 48 horas de incubación. La barra de escala negra corresponde a un tamaño de 10 μ m.

Tal y como podemos observar en la Figura 63, mientras que la cepa CAF2-RFP filenta en presencia de suero tras 2 horas de incubación (Figura 63A), la cepa μ Ev366 (Figura 63B) no fue capaz de hacerlo en ninguna de las condiciones o tiempos analizados. Este efecto es común en las cepas microevolucionadas intermedias, μ Ev114 (Figura 63C) y μ Ev257 (Figura 63D), las cuales tampoco

fueron capaz de filamentar tras 48 horas de incubación en presencia de suero. Estos resultados confirman que, a medida que *C. albicans* pasa por el tracto gastrointestinal del ratón, se pierde la capacidad de filamentar, al menos en esta trayectoria evolutiva.

E.3. Producción de fosfolipasas y proteasas

Como se ha mostrado previamente, la sobreexpresión de *WOR1* incrementa la actividad fosfolipasa y proteasa. Para estudiar si dicho efecto ocurre como consecuencia de la adaptación al TGI del ratón,

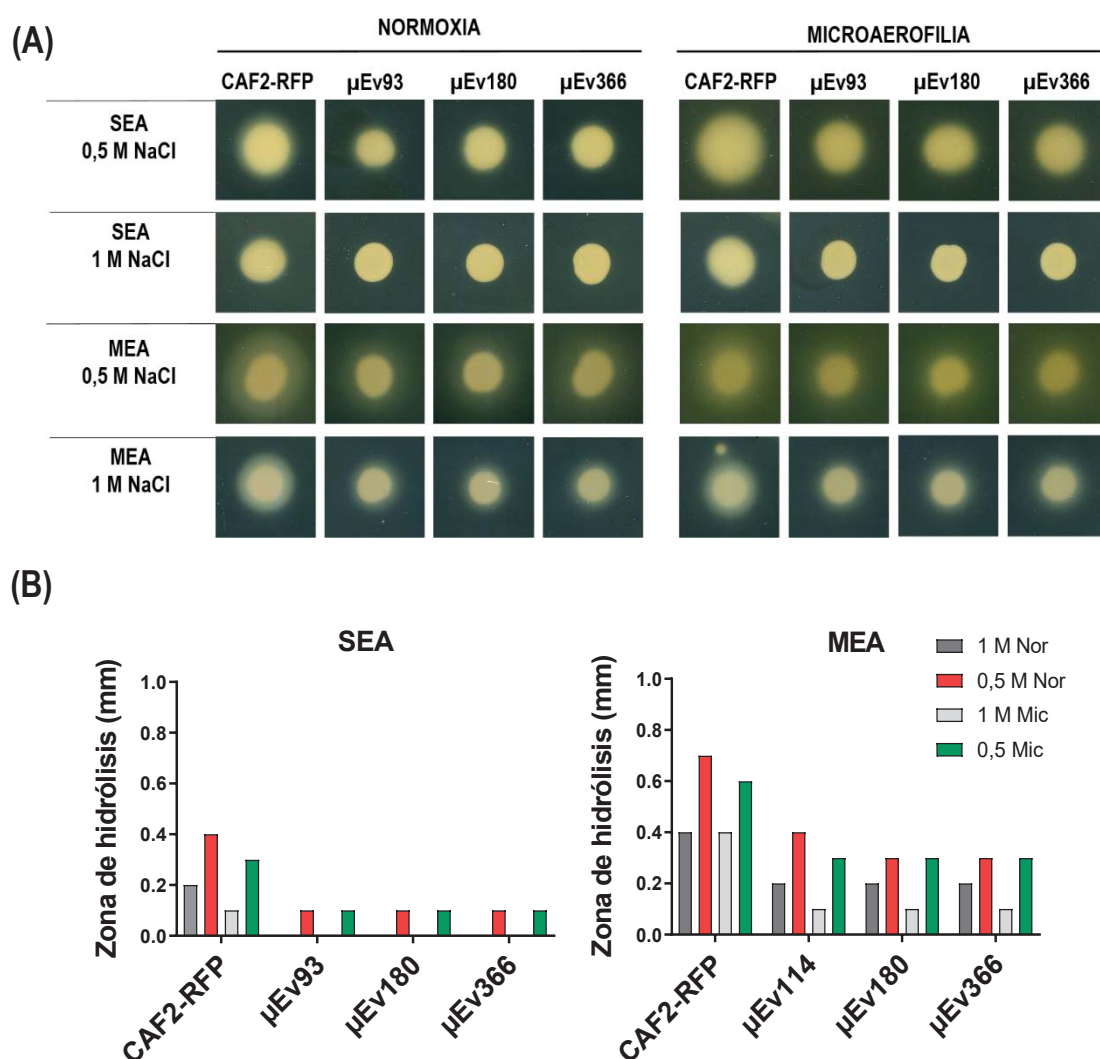


Figura 64. Producción de fosfolipasas en las cepas μ Ev.

Crecimiento sobre agar MEA o SEA. Se realizó una suspensión a D.O.=1 y se depositaron gotas sobre el correspondiente medio de cultivo. Las placas se incubaron durante 96 horas a 37°C en condiciones de normoxia o microaerofilia. (A) Las placas fueron escaneadas para observar la formación de los halos de hidrólisis. (B) Medida del radio de los halos en mm. Nor, normoxia. Mic, microaerofilia.

analizamos el comportamiento de las cepas microevolucionadas en medio MEA, SEA y BSA en condiciones de normoxia o microaerofilia. Tras el tiempo de incubación indicado, se midieron los radios de la zona o halo de hidrólisis. Respecto a la producción de fosfolipasas (Figura 64), las cepas μEv producen menos fosfolipasas en ambas condiciones comparada con la cepa CAF2-RFP inicial, y de nuevo, la alta concentración de NaCl inhibió la producción o la actividad de estas.

Para determinar la actividad proteasa, las células crecieron sobre medio BSA (Figura 65). Independientemente de las condiciones de normoxia o microaerofilia, las zonas de hidrólisis son mayores en la cepa CAF2-RFP en comparación con las cepas microevolucionada, lo que indica que estas últimas poseen menor actividad proteasa. Es importante destacar que, debido a la filamentación, los radios se calcularon sin tener en cuenta los filamentos.

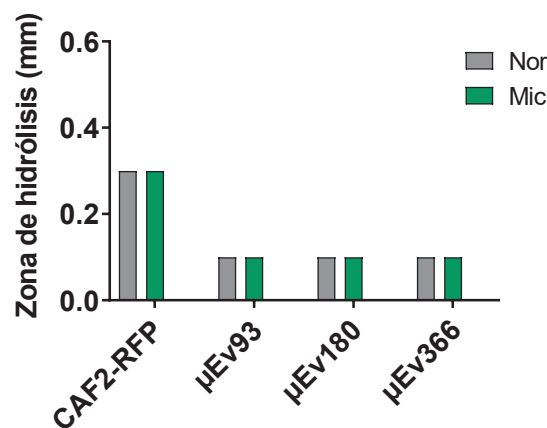


Figura 65. Producción de proteasas en las cepas microevolucionadas.

A partir de una suspensión a D.O.=1, se depositaron gotas sobre el agar BSA. Las placas se incubaron durante 120 horas a 37°C en condiciones de normoxia o microaerofilia y se midieron los radios de los halos de hidrólisis en mm. Nor, normoxia. Mic, microaerofilia.

E.4. La tinción con Rojo de Nilo no varía en las cepas μEv

En este trabajo hemos descrito cómo la sobreproducción de Wor1 en fondo silvestre aumenta la tinción de rojo de Nilo y el número de gotas lipídicas en las células. Con el objetivo de determinar si también ocurre en las cepas microevolucionadas, analizamos cómo afectaba el paso de estas células por el TGI a la tinción con rojo de Nilo mediante citometría de flujo. Para descartar que la proteína fluorescente RFP interfiriera con la detección de la fluorescencia del rojo de Nilo, las células se incubaron en medio YPD suplementado o no con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina (para inhibir o no la

expresión de *RFP*) y se tiñeron con rojo de Nilo para ser analizadas por citometría de flujo (Figura 66).

Los resultados muestran, en primer lugar, que la intensidad media de fluorescencia detectada es la misma independientemente de si las células expresan *RFP* o no y, por tanto, no interfiere en la señal que se detecta en el canal FL-2. En segundo lugar, las células μ Ev no presentan un aumento de la intensidad media de fluorescencia comparado con la cepa CAF2-RFP. Para descartar que el efecto fuera consecuencia del fondo genético, se realizó el mismo experimento utilizando la cepa silvestre SC5314, no observándose diferencias en la señal obtenida con respecto a la CAF2-RFP (datos no mostrados). Estos resultados indican que las cepas μ Ev no presentan un aumento de la señal con rojo de Nilo.

Dox	CAF2-RFP	μ Ev20	μ Ev93	μ E114	μ Ev156	μ Ev180
-	63,1	49,3	96,1	62,5	73,5	76
+	66,5	51,5	96	65,3	71,9	84,76

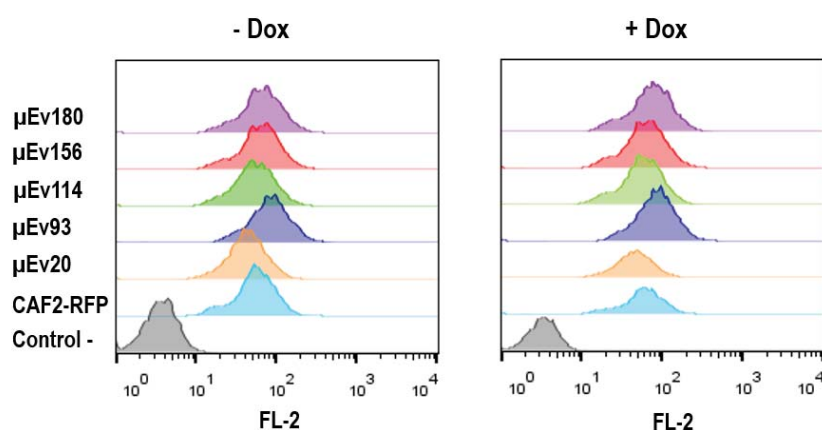


Figura 66. Tinción con Rojo de Nilo en las cepas microevolucionadas.

Análisis de la tinción con Rojo de Nilo mediante citometría de flujo. Las células fueron incubadas en YPD \pm doxiciclina (Dox) y posteriormente teñidas con Rojo de Nilo. La tabla y los histogramas muestran la medida de la intensidad media de fluorescencia recogida en el canal FL-2.

E.5. Utilización de fuentes de carbono

Como se ha mencionado con anterioridad, las fuentes de carbono no fermentables se encuentran en mayor concentración en el TGI mientras que la glucosa, cuya absorción ocurre en el intestino delgado, no se encuentra disponible en grandes cantidades en otras porciones del intestino como es el intestino grueso. Para analizar si las cepas μ Ev presentaban alguna mejora en el crecimiento sobre fuentes

de carbono no fermentables, se analizó su crecimiento en medio YNB suplementado con glucosa, acetato, citrato, etanol, glicerol (Figura 67A) o aceite de oliva/Tween 80 (Figura 67B). Los resultados muestran que no existe ninguna alteración en el crecimiento en las cepas microevolucionadas con respecto a la cepa inicial, indicando que pueden utilizar todas las fuentes de carbono sin problemas.

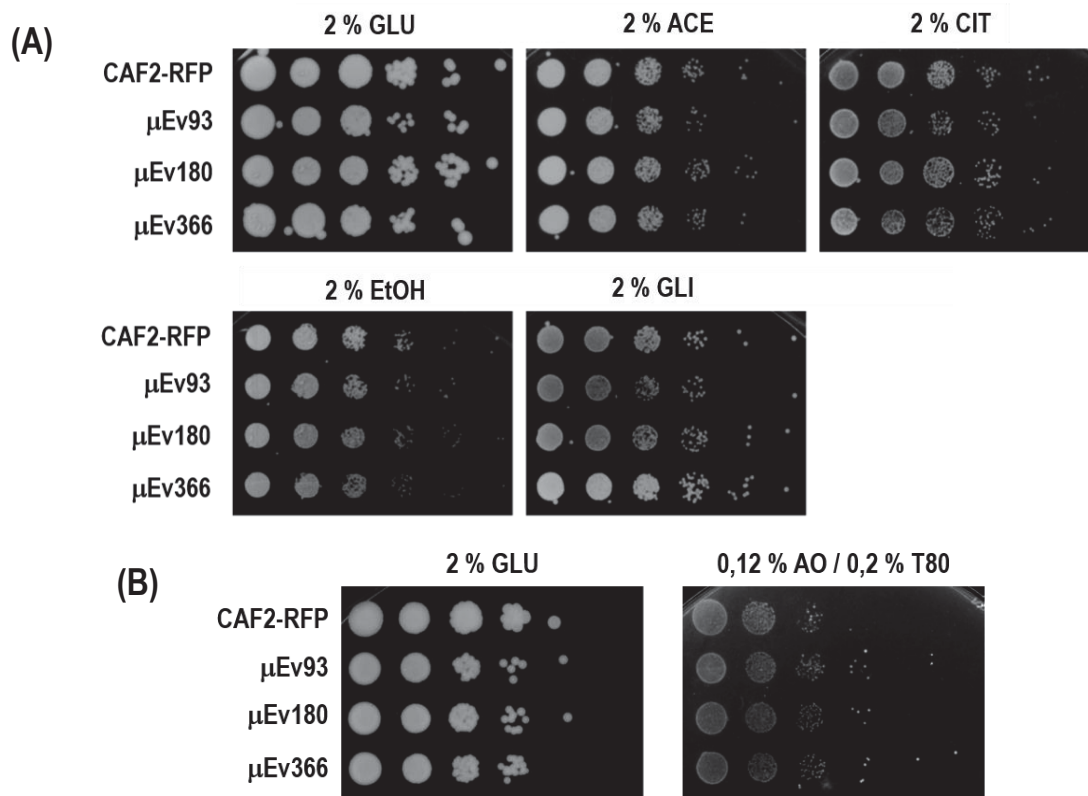


Figura 67. Crecimiento de las cepas μ Ev sobre diferentes fuentes de carbono.

A partir de cultivos en fase estacionaria, se realizaron diluciones seriadas en (A) medio mínimo suplementado con un 2 % de glucosa (GLU), acetato sódico (ACE), citrato sódico (CIT), etanol (EtOH) y glicerol (GLI) o (B) YNB 2 % glucosa o 0,12 % aceite de oliva/0,2 % Tween 80 (AO/T80). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 72-120 horas.

F. Papel de *FLO8* en la adaptación al estado comensal

Flo8 es un factor de transcripción que participa en procesos esenciales como la filamentación, la virulencia y el *switching* inducido por CO₂; en concreto, su interacción con Efg1 en la ruta cAMP/PKA resulta en la regulación de la expresión de genes específicos de la filamentación (Cao *et al.*, 2006, Du *et al.*, 2012). Ciertos trabajos han señalado que *FLO8* sufre modificaciones en su secuencia tras su paso por el hospedador, un hecho que se ha puesto de manifiesto tanto en modelos de

comensalismo en ratón (Tso *et al.*, 2018) como en cepas que provienen de aislados clínicos (Liu *et al.*, 2015). Dado que las cepas μEv son incapaces de filamentar y sufren una pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 6 donde se localiza *FLO8*, se propuso caracterizar su papel mediante la reintegración de una copia silvestre de este gen en estas cepas y analizar su relevancia en alguno de los fenotipos encontrados en las cepas microevolucionadas.

F.1. Flo8 revierte la capacidad de la cepa μEv93 de desplazar a una cepa silvestre

Para reintegrar *FLO8* (pFLO8) se procedió a la construcción del plásmido pNTHg-FLO8 que posee una copia silvestre de *FLO8*. Asimismo, se generó una cepa control (eHygB) en la cual se integra una versión vacía del plásmido pDUP3-HygB (ver materiales y métodos). Ambas construcciones poseen el marcador *HPH* de resistencia a higromicina B y se integraron en el locus neutral *NEUT5L* de la cepa μEv93 .

Para analizar la capacidad de colonización de estas cepas, se realizó un ensayo de co-colonización en ratones mediante la inoculación de las cepas silvestre CAF2-GFP y μEv93 pFLO8. Como se observa en la Figura 68A, la cepa microevolucionada *FLO8* reintegrante coloniza a niveles más altos que la cepa silvestre pero sin desplazarla, indicando que la presencia de Flo8 es suficiente para que la cepa μEv93 pierda en gran medida la ventaja que se había mostrado con anterioridad. La retirada de los antibióticos determina en ambas cepas la pérdida de colonización al reestablecerse la microbiota bacteriana comensal, si bien la caída en los niveles de la cepa μEv93 pFLO8 es mucho más pronunciada y llega a perderse por completo. A continuación, se analizó la capacidad de colonización de una cepa μEv93 en competición con la misma cepa *FLO8* reintegrante (μEv93 pFLO8). Como se observa en la Figura 68B, la cepa μEv93 coloniza a niveles más altos que la cepa μEv93 pFLO8, comportándose en cierta manera como una cepa CAF2-RFP silvestre. La retirada de los antibióticos, en este caso, hace que ambas cepas se pierdan a la misma velocidad.

F.2. La pérdida de la capacidad de filamentar en las cepas μEv es dependiente de Flo8, pero no de la ausencia de Wor1

Tal y como hemos mencionado anteriormente, las cepas microevolucionadas pierden la capacidad de filamentación. Para determinar si Flo8 y no Wor1 es responsable de dicho defecto, se procedió a

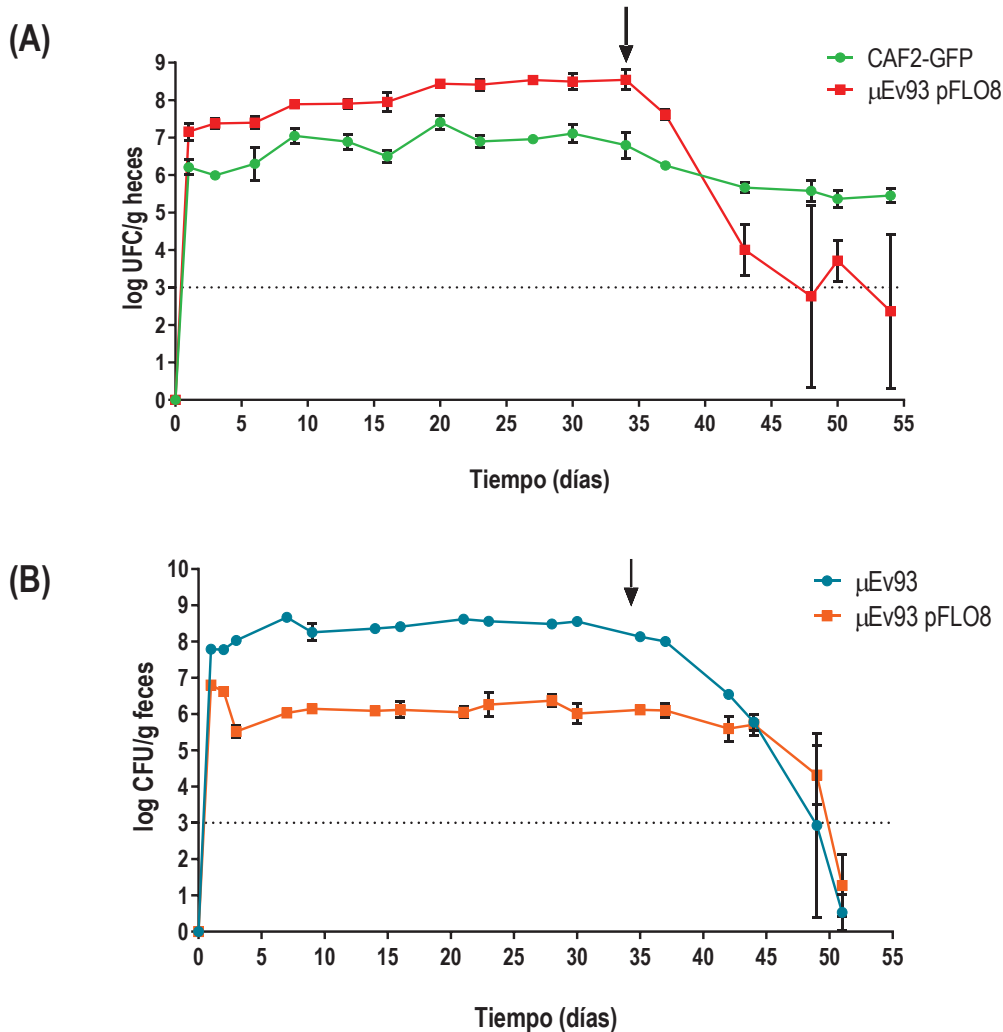


Figura 68. Ensayo de competición en el TGI de ratón en cepas silvestre CAF2-GFP, μ Ev93 y μ Ev93 pFLO8.

Niveles de colonización en los ensayos de competición de las cepas (A) CAF2-GFP y μ Ev93 pFLO8 y (B) μ Ev93 y μ Ev93 pFLO8. La flecha negra indica el día en que se retiran los antibióticos del agua de bebida de los ratones (día 34). Los resultados muestran la media en UFCs/g de heces en unidades logarítmicas de cada individuo en cada uno de los grupos \pm SD ($n=3$). La línea punteada indica el límite de detección.

la reintegración de un alelo silvestre *FLO8* (pFLO8) en las cepas μ Ev o a la delección de *WOR1* mediante el sistema CRISPR-Cas9 transitorio (ver materiales y métodos) y posterior reintegración de una copia de *FLO8* en las cepas μ Ev *wor1* Δ . Ensayos previos de competición entre cepas CAF2-GFP y μ Ev93 *wor1* Δ demuestran que la ausencia de *Wor1* no produce cambios en los niveles de colonización, encontrando que la cepa microevolucionada desplaza de nuevo a la cepa silvestre entre los días 11 y 14 post-inoculación, y sugiriendo que las adaptaciones que presenta esta cepa no se deben a la mayor expresión de *WOR1* (D. Prieto, datos sin publicar).

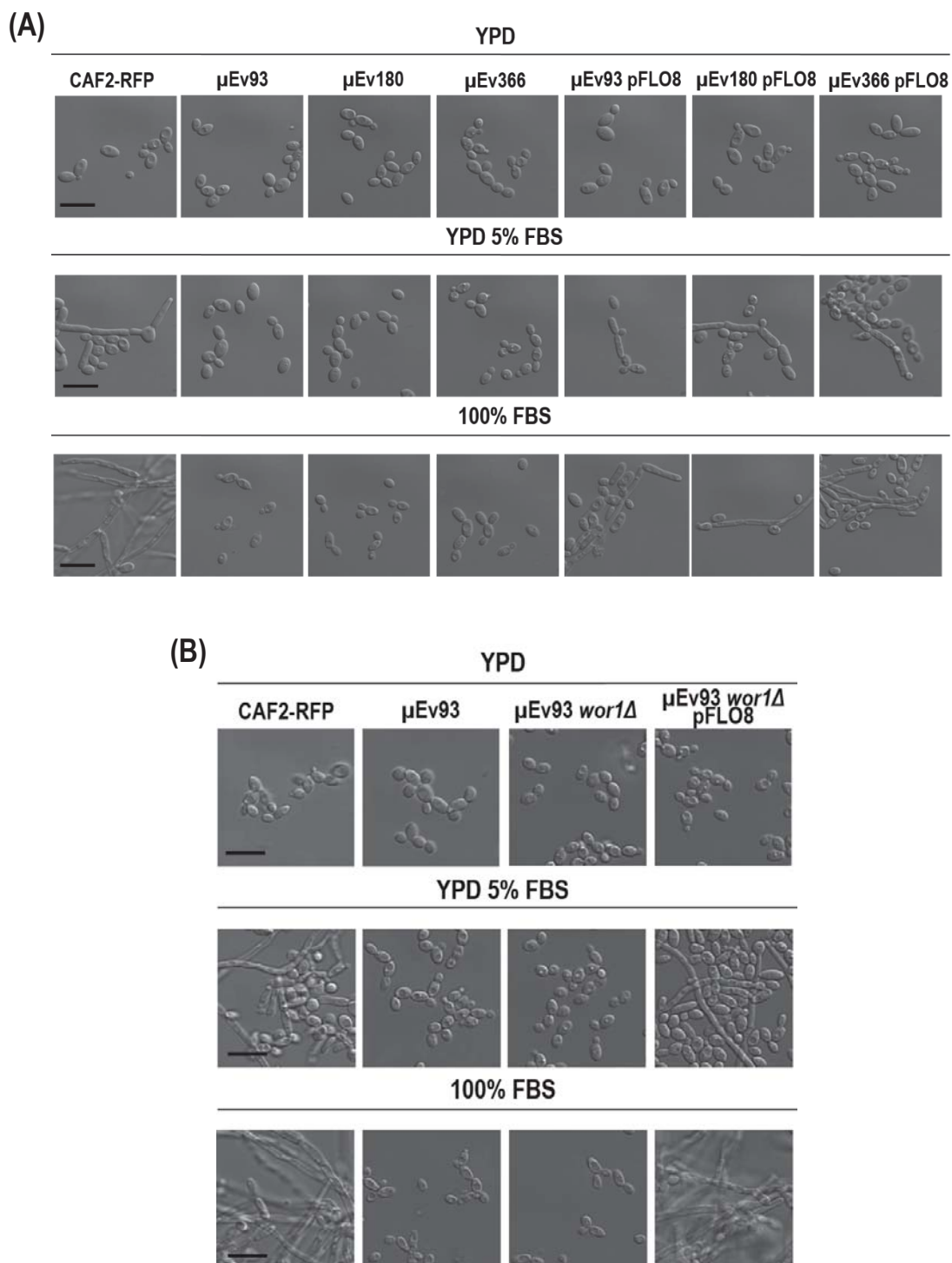


Figura 69. Ensayo de filamentación en presencia de FBS en cepas CAF2-RFP, μ Ev, μ Ev *wor1* Δ y μ Ev pFLO8.

(A) Filamentación de las cepas CAF2-RFP, μ Ev93, μ Ev180 y μ Ev366 (con o sin pFLO8) o (B) en las cepas CAF2-RFP y μ Ev93 (con o sin *wor1* Δ o pFLO8) en YPD líquido suplementado o no con un 5 % o 100% FBS. Los cultivos fueron incubados a 37°C en agitación y se tomaron fotografías a las 24 horas para observar la formación de filamentos. La barra de escala negra corresponde a un tamaño celular de 10 μ m.

Seguidamente se analizó la filamentación a las 24 horas en condiciones inductoras (5 % y 100 % FBS). Como se observa en la Figura 69A, las cepas μ Ev pFLO8 recuperaron el fenotipo silvestre. La ausencia de *Wor1* no revierte la incapacidad de formar filamentos, mientras que las cepas *wor1* Δ pFLO8 (solo se muestra μ Ev93) vuelven a recuperar el fenotipo silvestre (Figura 69B). Esto implica a *Flo8* en la ausencia de formación de filamentos en estas cepas, pero no a *Wor1*.

F.3. La resistencia a sales biliares es dependiente de *Flo8*, pero no de *Wor1*

Previamente habíamos detectado en las cepas microevolucionada fue la mayor resistencia a sales biliares, por ello, analizamos si este comportamiento era dependiente o no de *Wor1* y/o *Flo8*.

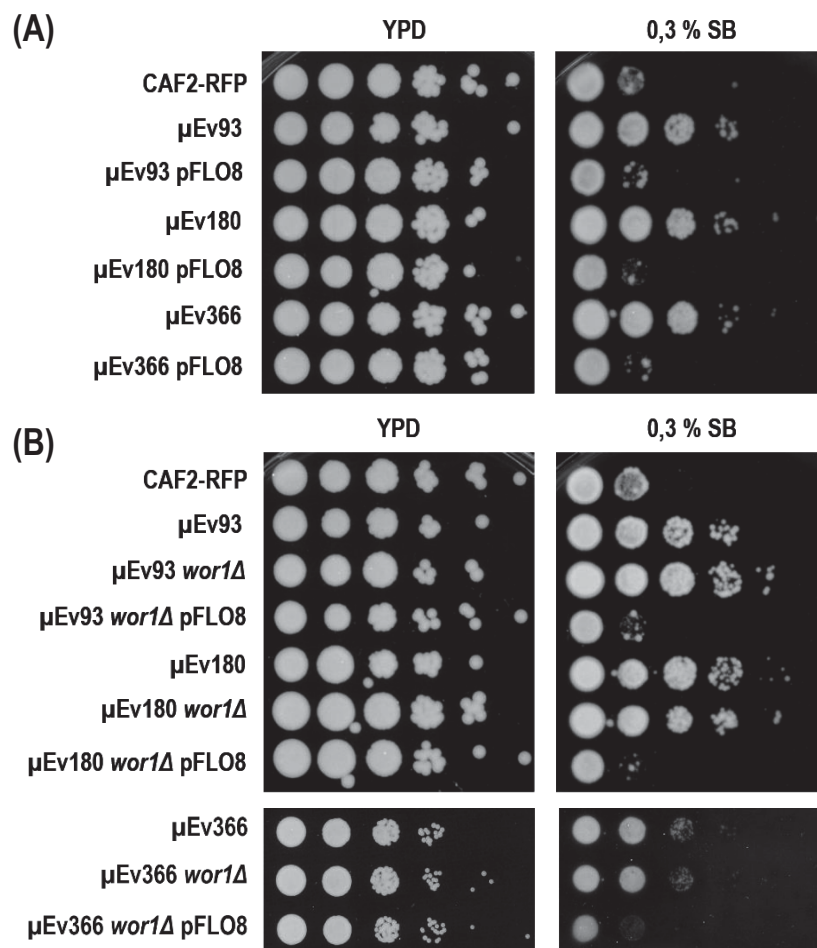


Figura 70. Sensibilidad a sales biliares en cepas CAF2-RFP, μ Ev *wor1* Δ y *FLO8* reintegrantes.

Ensayo de crecimiento en gota en presencia de sales biliares en (A) μ Ev o μ Ev pFLO8 o (B) μ Ev *wor1* Δ y μ Ev *wor1* Δ pFLO8. A partir de una suspensión a D.O. 0,8 se realizaron diluciones decimales y se depositaron gotas en YPD suplementado con sales biliares al 0,3 %. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C antes de ser escaneadas.

El crecimiento en presencia de sales biliares en las cepas μ Ev *wor1* Δ es similar y dichas las células muestran una mayor resistencia respecto a la cepa control; sin embargo, la reintegración de *FLO8* es suficiente para revertir dicho fenotipo de resistencia y las células se hacen más sensibles que la cepa control CAF2-RFP (Figura 70B). Estos resultados corroboran el papel de *FLO8* en la resistencia a sales biliares en estas cepas, proceso que es independiente de la expresión de *WOR1*.

F.4. Estudio de los fenotipos a través de mutantes *flo8* Δ

Estudios previos han demostrado que el mutante *flo8* Δ no filamta en condiciones inductoras y es avirulento en un modelo de infección sistémica (Cao *et al.*, 2006). Con el objetivo de determinar cómo afecta la delección de *FLO8* a la capacidad de colonizar el TGI de ratón, a la formación de filamentos y a la sensibilidad a sales biliares, se obtuvo al mutante *flo8* Δ marcado fluorescentemente en rojo (RFP) o verde (GFP) y, posteriormente, se reintegró una copia de *FLO8* o una versión vacía del vector como control (ver materiales y métodos).

a) La ausencia de Flo8 mejora la capacidad de colonizar el TGI del ratón

La reintegración de una copia silvestre de *FLO8* en un mutante *flo8* Δ revierte los defectos de filamentación del mutante en presencia de FBS (datos no mostrados) como ocurre en las cepas μ Ev. A continuación, analizamos la capacidad de colonizar de un mutante *flo8* Δ -GFP y de la cepa reintegrante *flo8* Δ -GFP p*FLO8* mediante ensayos de competición con una cepa silvestre CAF2-RFP. Cuando una cepa mutante *flo8* Δ compite con una cepa silvestre en el TGI del ratón (Figura 71A) alcanza niveles más altos de colonización, pero no la desplaza. Esto sugiere que la delección de *FLO8* solo le confiere cierta ventaja a la hora de establecerse; sin embargo, cuando analizamos el comportamiento de la cepa *flo8* Δ con una copia de *FLO8* reintegrada observamos un comportamiento similar (Figura 71B). Con la retirada del antibiótico a los 33 días la cepa silvestre persiste, aunque a niveles más bajos, mientras que las cepas *flo8* Δ y *FLO8* reintegrante se pierden; en concreto, el mutante *flo8* Δ se pierde con mayor rapidez que el mutante *flo8* Δ p*FLO8*. Curiosamente, si nos fijamos en las tasas de colonización a tiempos cortos sí existen diferencias: en un nuevo ensayo de competición y usando las mismas cepas, pudimos comprobar que mientras que la cepa *flo8* Δ -GFP tiene unos niveles más altos que la cepa CAF2-RFP desde el primer día, el reintegrante *flo8* Δ -GFP p*FLO8* alcanza dichos niveles a los 3 días (Figura 71C y D). Con el objetivo de determinar si existían diferencias en la localización de estas cepas a nivel del tracto gastrointestinal 35 días después de esta co-colonización, se obtuvieron las distintas porciones de este y analizamos la carga fúngica mediante el recuento de UFCs de su contenido (Figura 71E y F).

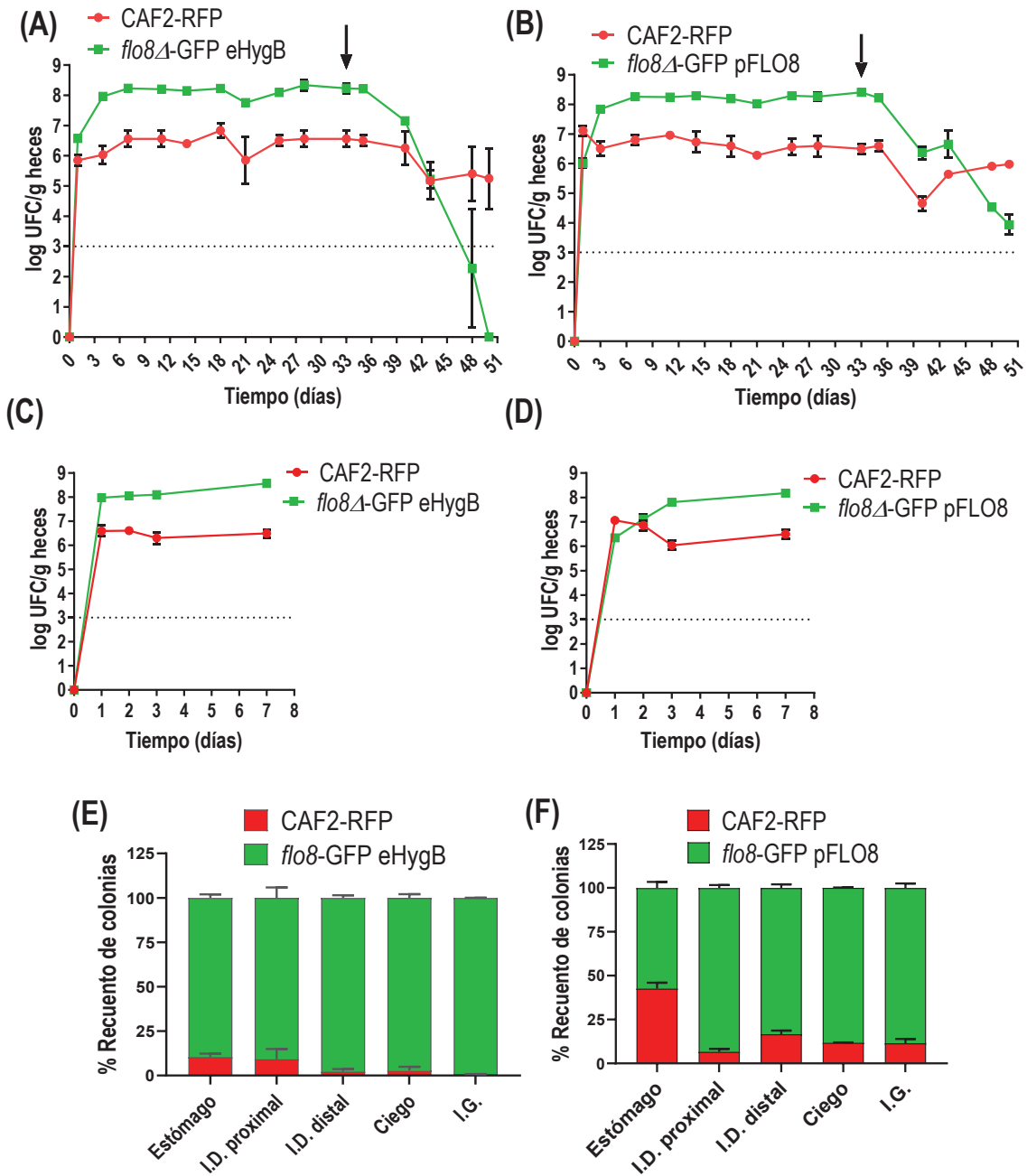


Figura 71. Ensayo de co-colonización en el TGI de ratón en mutantes *flo8Δ* y *FLO8* reintegrante frente a una cepa silvestre CAF2-RFP.

Niveles de colonización en los ensayos de competición de la cepa CAF2-GFP y (A) *flo8Δ*-GFP eHygB o (B) *flo8Δ*-GFP pFLO8. La flecha negra indica cuando se retiran los antibióticos del agua de los ratones (día 33). (C) Niveles de colonización a tiempos cortos (7 días) en un nuevo ensayo con las cepas CAF2-GFP y *flo8Δ*-GFP eHygB o (D) CAF2-GFP y *flo8Δ*-GFP pFLO8. Los resultados muestran la media en UFCs/ g de heces en unidades logarítmicas de cada individuo en cada uno de los grupos \pm SD (n=3). (E) Recuento de UFCs procedente de los contenidos de estómago, intestino delgado (I.D) proximal, distal, ciego e intestino grueso (I.G) a los 35 días de la co-colonización en (C) o (F) de los contenidos de la co-colonización a los 35 días en (D). Se tomó como 100% el total de colonias rojas y verdes y se estimó el porcentaje de cada recuento por separado. Los resultados muestran la media de los % \pm SD.

La cepa *flo8Δ*-GFP eHygB mostró una presencia del 90 % en todas las localizaciones en comparación con la cepa CAF2-RFP (Figura 71E), mientras que la cepa *flo8Δ*-GFP pFLO8 representaba entre un ~60 % (estómago) y un ~90 % (resto de porciones) del total respecto a la cepa CAF2-RFP (Figura 71F). Estos resultados indican que el mutante *flo8Δ* muestra una gran competitividad desde el primer día y hasta los 35 días de co-colonización, y que la reintegración de un alelo *FLO8* revierte parcialmente este fenotipo.

Por último, para determinar cómo se comportaban ambos mutantes en un ensayo de competición, analizamos la capacidad de colonizar de un mutante *flo8Δ*-RFP frente a un mutante *flo8Δ*-GFP pFLO8 (Figura 72). Como se observa en la figura, el mutante *flo8Δ*-RFP eHygB desplaza por completo a la cepa *flo8Δ*-GFP pFLO8 cuando compiten por establecerse en el TGI a diferencia de lo que ocurre cuando se introduce una cepa CAF2-RFP en cualquiera de los dos casos.

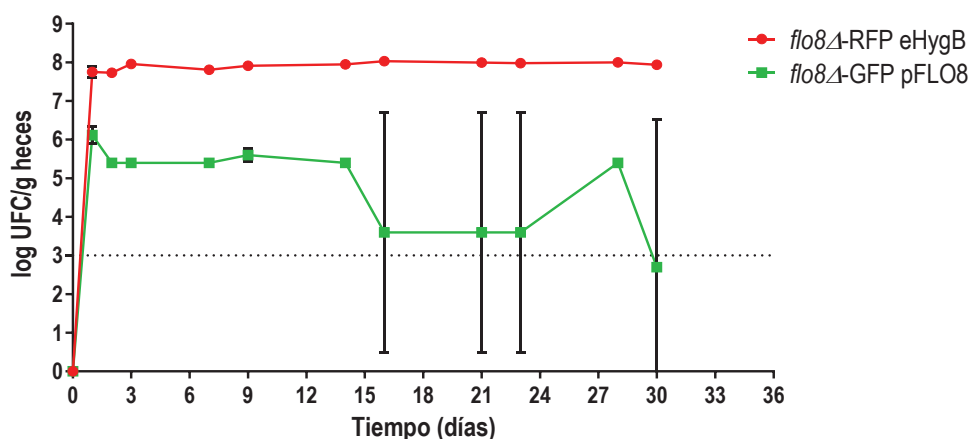


Figura 72. Ensayo de co-colonización en el TGI de ratón en mutantes *flo8Δ* y *flo8Δ FLO8* reintegrante.

Niveles de colonización en un ensayo de competición de la cepa *flo8Δ*-RFP eHygB y *flo8Δ*-GFP pFLO8. Los resultados muestran la media en UFCs/g de heces en unidades logarítmicas de cada individuo (n=3) en cada uno de los grupos \pm SD. La línea punteada indica el límite de detección.

b) La resistencia a sales biliares se relaciona con la expresión de manosiltransferasas reguladas por *Flo8*

Dado que la resistencia a sales biliares parece ser dependiente de la expresión de *FLO8* en cepas microevolucionadas, analizamos el comportamiento de las cepas *flo8Δ* y *FLO8* reintegrante en fondo *flo8Δ* en presencia de estas. La ausencia de *FLO8* incrementa la resistencia a sales biliares en

comparación con una cepa silvestre, y de nuevo la reintegración de un alelo *FLO8* suprime dicho fenotipo hasta niveles similares a la cepa control CAF2-RFP (Figura 73A).

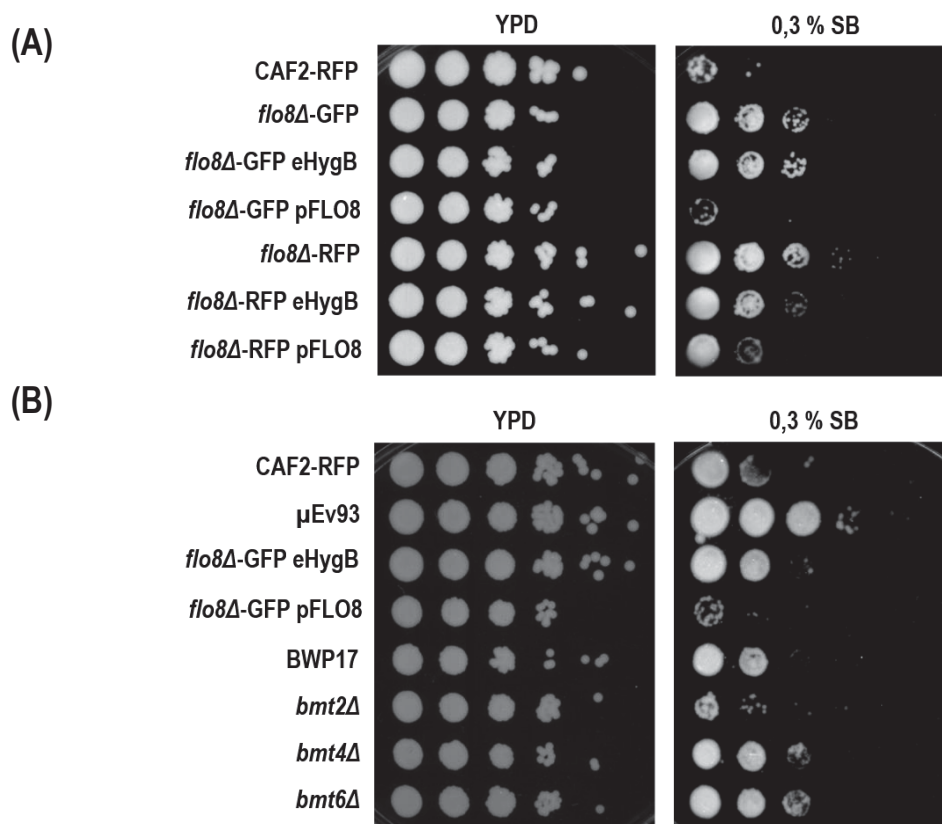


Figura 73. Crecimiento en presencia de sales biliares en mutantes *flo8Δ*, *FLO8* reintegrantes y mutantes en manosiltransferasas.

Diluciones seriadas a partir de una suspensión a D.O. 0,8 se depositaron sobre placas de YPD suplementado con sales biliares al 0,3 %. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas.

Estudios previos han demostrado que Flo8 regula la expresión de varios genes, entre ellos *BMT* (manosiltransferasas) que intervienen en la incorporación de β -manosas a los mananos (Mille *et al.*, 2008, Mille *et al.*, 2012). Flo8 regula positivamente la expresión de *BMT4* y *BMT6* en condiciones basales de crecimiento y negativamente la expresión de *BMT2* en presencia de suero (Polvi *et al.*, 2019). Además, se ha descrito que los mutantes *flo8Δ* inducen una mayor exposición de mananos en superficie en presencia de suero (Lv *et al.*, 2020). En este contexto, se propuso estudiar si existía una relación entre las posibles diferencias en la manosilación de este componente de pared y la resistencia a sales biliares. Como se muestra en la Figura 73B, mientras que la ausencia de *Bmt2* confiere sensibilidad a sales biliares, la de *Bmt4* y *Bmt6* genera células más resistentes en

comparación con su cepa control (BWP17) y, por tanto, pone de manifiesto que la manipulación de mananos tiene un papel en la resistencia a sales biliares.

DISCUSIÓN

En este trabajo se ha caracterizado el fenotipo de cepas que sobreproducen *Wor1*, un regulador clave de la transición célula blanca a célula opaca, con el objetivo de determinar qué factores determinan su mayor grado de adecuación biológica en el tracto gastrointestinal del ratón y que ha implicado tanto el uso de estudios *in vitro* como *in vivo*. Asimismo, hemos estudiado los cambios que presentan varias cepas obtenidas por microevolución en el TGI de ratón, intentando correlacionarlos con aquellos procesos que se sabe que tienen relevancia en la adaptación a este nicho.

1. Efecto de la sobreexpresión de *WOR1*

A. Caracterización de las células *WOR1^{OE}* y análisis proteómico

Wor1, el principal factor de transcripción que regula la transición de célula blanca a opaca para el apareamiento, promueve también el comensalismo en el TGI murino y está involucrado en procesos como la virulencia en un modelo sistémico de ratón, la adaptación a estrés y el metabolismo de nutrientes entre otros (Pande *et al.*, 2013, Prieto *et al.*, 2017, Hidalgo-Vico *et al.*, 2021). Aunque tanto las células de fenotipo opaco como las células GUT presentan algunas similitudes con las células *WOR1^{OE}* caracterizadas en este trabajo, mediante la sobreproducción de *Wor1* en fondo silvestre hemos encontrado nuevos datos que sugieren qué factores asociados a este factor de transcripción podrían favorecer el estado comensal.

Para analizar y comparar los datos presentados en este trabajo hay que tener en cuenta que las células *WOR1^{OE}* (α/α) utilizadas en este estudio (Prieto *et al.*, 2017) se generaron mediante la expresión ectópica de *WOR1*, y no mediante un cambio epigenético “natural” o espontáneo como ocurre en las células opacas (α o α) (Lockhart *et al.*, 2002, Miller & Johnson, 2002) o como consecuencia de su exposición a señales propias del TGI en las GUT (α/α) (Pande *et al.*, 2013). Los tres tipos celulares tienen en común la represión de *EFG1* como consecuencia de la sobreexpresión de *WOR1*. Las células que sobreproducen *Wor1* generan un fenotipo opaco que es estable en el tiempo y a temperatura de 37°C (Figura 9) a diferencia de las opacas, pero ambos tipos celulares se caracterizan por un aumento del tamaño de las células y por su mayor tinción con floxina B (Figura 7B y 8). Las colonias formadas por las células *WOR1^{OE}* poseen una coloración oscura como las de las opacas (Figura 7A) pero, al igual que las células GUT, carecen de las protuberancias características de estas (Pande *et al.*, 2013, Prieto *et al.*, 2017). *Wor1* aumenta la expresión de genes *FET* (ferroxidasas multicobre) incrementando la producción de melanina, que da color a estas células, y la aparición de protuberancias en células opacas, como consecuencia de la externalización de esta;

dicha producción es mayor en células *WOR1^{OE}* homocigotas para el locus *MTL* que en células heterocigotas, sugiriendo que el heterodímero $\alpha 1$ - $\alpha 2$ ejerce una represión sobre este fenotipo (Dai *et al.*, 2020). La alta concentración de CO_2 y el GlcNAc a 37°C (que mimetiza algunas de las condiciones encontradas en el TGI) también inducen la producción de melanina, y parece proteger de la fagocitosis y frente a daño producido por estrés oxidativo. Estos datos podrían explicar ciertas diferencias entre las células opacas, *WOR1^{OE}* y GUT. Los datos de proteómica *in vitro* de la cepa CAI4-*WOR1^{OE}* coinciden parcialmente con los descritos en trabajos anteriores en células opacas e incluso en células GUT (Lan *et al.*, 2002, Tsong *et al.*, 2003, Tuch *et al.*, 2010, Pande *et al.*, 2013), revelando que efectivamente cada tipo celular pone en marcha diferentes programas morfogénicos. Existen algunas discrepancias en la expresión de proteínas en nuestros análisis, cuyos datos pueden ser consultados en detalle tanto en el Anexo 1 de esta tesis doctoral como en la publicación de nuestro grupo de investigación (Hidalgo-Vico *et al.*, 2021). Entre ellas, algunas proteínas descritas de fase opaca como Fdh1, Pst1 o Icl1 se encuentran en menor abundancia, aunque podría deberse a la metodología empleada (proteómica o transcriptómica, temperatura, medio de cultivo de incubación, etc.); sin embargo, nuestros datos indican que las células *WOR1^{OE}* poseen características comunes con las opacas dada la identificación de proteínas de esta fase, como Op4 o Pxp2, y la disminución de proteínas específicas de la fase blanca, como Wh11 o Gis2.

B. Análisis de la respuesta a estrés de pared y de membrana celular

La pared celular es altamente dinámica y la primera estructura que interacciona con el sistema inmunitario del hospedador, y sufre modificaciones según las condiciones ambientales a las que *C. albicans* se expone, condicionando un mayor o menor reconocimiento por las células del sistema inmunitario (Gow *et al.*, 2007, Netea *et al.*, 2008, McKenzie *et al.*, 2010). Es tal la importancia de la pared celular en la viabilidad de la célula fúngica, que mutantes defectuosos en algunos de sus componentes o en los mecanismos compensatorios que se activan ante daños en la pared conlleva a la muerte celular. Nuestros resultados demuestran que la sobreexpresión de *WOR1* genera células con una elevada sensibilidad a antifúngicos cuyo blanco de acción es la pared celular, como es la caspofungina (Figura 13, 14 y 15) que inhibe la síntesis de β -(1,3)-glucanos (Douglas *et al.*, 1997). Estudios recientes han demostrado que la respuesta transcripcional frente a caspofungina requiere al menos dos factores de transcripción, Efg1 y Cas5, siendo ambos mutantes sensibles a este antifúngico por vías parcialmente independientes (Gregori *et al.*, 2011, Xie *et al.*, 2017, Xiong *et al.*, 2021). La represión de *EFG1* que se produce al sobreexpresar *WOR1* (Figura 6) podría ser la

responsable de la mayor sensibilidad a caspofungina de estas células. El tratamiento con caspofungina lleva asociado un aumento en la exposición de β -(1,3)-glucanos, que desencadena a su vez el aumento de unión al receptor dectina-1 promoviendo la fagocitosis y muerte de las células de *C. albicans*, y un aumento en los niveles de quitina como parte de los mecanismos compensatorios asociados a dicho estrés (Hao *et al.*, 2013, Hasim *et al.*, 2017). Las rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs juegan un papel esencial en la adaptación a situaciones de estrés, incluyendo respuestas a compuestos que afectan a la pared celular. Las MAPKs Mkc1 y Cek1 se fosforilan en respuesta a caspofungina y zimoliasa, una preparación enzimática enriquecida en betaglucanasas, entre otros compuestos (Csank *et al.*, 1998, Navarro-Garcia *et al.*, 1998, Roman *et al.*, 2005, Roman *et al.*, 2009), mientras que las MAPKs Cek1 y Hog1 juegan un papel complementario en la biogénesis de la pared celular (Eisman *et al.*, 2006). Sin embargo, las células que sobreexpresan *WOR1* no muestran una mayor exposición de β -(1,3)-glucanos (Figura 16) ni un mayor contenido de quitina (Figura 18B). Nuestros estudios de activación en células *WOR1^{OE}* tampoco muestran defectos en la activación de Mkc1 o de Cek1 en respuesta a caspofungina que puedan explicar estos resultados (datos no mostrados). La caspofungina es también un potente inductor de ROS intracelular, y la baja resistencia a este antifúngico podría deberse a que son menos eficaces a la hora de hacer frente a dicho estrés oxidativo. De hecho, cuando las células crecen en presencia de este antifúngico y doxiciclina (Figura 15B), se observa una mejora del crecimiento incluso en una cepa silvestre y que podría atribuirse también al potencial efecto antioxidativo que esta última posee (Clemens *et al.*, 2018). Asimismo, las células *WOR1^{OE}* son más sensibles a rojo Congo y a blanco de calcoflúor (Figura 18A), compuestos que se unen a quitina e impiden el correcto ensamblaje de la pared celular (Elorza *et al.*, 1983) y, en el caso del rojo Congo, inhibe además la síntesis de β -(1,3)glucanos (Kopecka & Gabriel, 1992). Este fenotipo es consistente con la mayor sensibilidad que muestran los mutantes *efg1* (Eisman *et al.*, 2006) y *efg1 hog1* (datos no mostrados), mientras que los mutantes *hog1* muestran una mayor resistencia a estos compuestos por mecanismos que, según sugieren los autores, podrían ser debidos a una hiperfosforilación de Cek1 que compensa los defectos de pared que presentan estas células (Roman *et al.*, 2005, Eisman *et al.*, 2006, Desai *et al.*, 2015). Los mutantes *efg1* no muestran una activación basal de Cek1 (Desai *et al.*, 2015), y en nuestro caso, tampoco se ha observado en células *WOR1^{OE}* (datos no mostrados), lo que indica que la ausencia de *Efg1* parece ser responsable del aumento de la sensibilidad, y dicho efecto es dominante sobre la ausencia de *Hog1*.

Durante este trabajo hemos observado que las células que las células *WOR1^{OE}* son más resistentes a fluconazol y a miconazol (Figura 17A), comportamiento más apreciable en condiciones de

microaerofilia. Los antifúngicos del grupo de los azoles inhiben la síntesis de ergosterol de membrana celular a nivel de la enzima 14- α -lanosterol desmetilasa (Erg11), reduciendo el contenido de ergosterol y acumulando esteroides aberrantes en su membrana (revisado en Lv *et al.*, 2016). La resistencia a azoles en aislamientos clínicos se ha asociado a una mayor expresión de transportadores de tipo ABC, como *CDR1* o *CDR2*, o de la bomba *MDR1* de tipo MFS (*Major facilitator superfamily*) que conlleva la expulsión de los compuestos fuera de la célula (Prasad & Kapoor, 2005, Sanglard *et al.*, 2009), así como a la mayor expresión o mutaciones en el gen *ERG11* (Marichal *et al.*, 1999, Sanglard, 2002, Xiang *et al.*, 2013). El mutante *efg1* es más sensible a azoles ya que reduce la expresión de *ERG11*, fenotipo dependiente de dosis génica e independiente del grado de expresión de bombas de expulsión (Prasad *et al.*, 2010). La cepa CAI4-WOR1^{OE} reduce la expresión de *ERG11* en condiciones de normoxia en comparación con una cepa silvestre (Figura 17D); sin embargo, el contenido total de ergosterol detectado en los estudios de lipidoma no difiere del de una cepa silvestre, aunque no se descarta que las diferencias se encuentren a nivel de especies moleculares de las cuales no poseemos datos. Dado que su resistencia es más clara en condiciones de microaerofilia (Figura 17C), este fenotipo podría explicarse por el aumento de la expresión de varios genes involucrados en la síntesis de ergosterol a bajas concentraciones de O₂, entre ellos *ERG11*, *ERG3* o *ERG5*, que podrían contrarrestar el efecto del antifúngico (Setiadi *et al.*, 2006). Asimismo, se ha relacionado la sensibilidad a azoles en el mutante *efg1* con una mayor fluidez de la membrana, asociado a su vez a un menor contenido de ergosterol junto con un aumento de ácido linoleico en la membrana que desencadena la difusión pasiva de compuestos (Prasad *et al.*, 2010). Los datos del proteoma de las células WOR1^{OE} nos han permitido identificar a dos proteínas, Ole2 y Fad2 (Tabla 2), que participan en la síntesis de ácido linoleico sugiriendo un mayor contenido de ácidos grasos no saturados en su membrana y que, junto con las diferencias en el contenido lipídico total y las deficiencias en la actividad mitocondrial que comentaremos a continuación, podrían justificar el comportamiento frente a este tipo de compuestos.

La sobreproducción de Wor1 genera células más sensibles a sales biliares (Figura 19). Las sales biliares son vertidas al duodeno y participan en la digestión y posterior absorción de los ácidos grasos de la dieta, y las bacterias que habitan en el intestino resisten a la acción que este tipo de detergente ejerce a nivel de sus membranas celulares y su DNA (Merritt & Donaldson, 2009). La mayor sensibilidad a sales biliares en estas células es más evidente en condiciones de normoxia que en microaerofilia, y revierte en presencia de doxiciclina (Prieto *et al.*, 2017). Este hecho podría explicar por qué estas células presentan niveles de colonización más bajos durante los primeros días de paso por el TGI. Las células WOR1^{OE} también son más sensibles a la acción del SDS (Figura 19), un

detergente que emulsiona los lípidos y cuyo efecto podría asemejarse al de las sales biliares. De cualquier forma, hacen falta más estudios que revelen la importancia de las sales biliares en el proceso de colonización y la adaptación al estado comensal de esta levadura.

C. Efecto de la sobreexpresión de *WOR1* en la respuesta a estrés osmótico y oxidativo

En el entorno entérico los microorganismos se enfrentan a estrés osmótico y oxidativo. La tolerancia a la alta osmolaridad es contrarrestada por la activación de una respuesta específica en la que la ruta HOG resulta esencial. Hog1 se fosforila frente a un incremento de alta osmolaridad en el medio y promueve la síntesis y acumulación de glicerol, un metabolito osmoprotector, entre otros mecanismos (Alonso-Monge *et al.*, 1999). Las células *WOR1^{OE}* son más sensibles a estrés osmótico generado por cloruro sódico (Figura 23), cuyas condiciones podrían asemejarse a las encontradas en el TGI por la alta osmolaridad debida a la dieta del hospedador. Este fenotipo no parece ser dependiente de la represión de *EFG1*, ya que los mutantes *efg1* no son sensibles a este tipo de estrés (datos no mostrados). La cepa CAI4-*WOR1^{OE}* tiene un retraso en la activación de Hog1 en respuesta a estrés oxidativo (Figura 21) y, aunque no lo hemos estudiado, es posible que dicho defecto sea general a otro tipo de estímulos de la ruta como el incremento de osmolaridad y que podría justificar los niveles inferiores de colonización de células *WOR1^{OE}* durante los primeros días. La sobreproducción de *Wor1* genera células más sensibles a la presencia de agentes oxidantes que inducen el incremento de ROS intracelular, como H₂O₂, diamida o menadiona (Figura 20) y, como hemos mencionado, a caspofungina. En ausencia de estrés, los datos de proteómica identifican en menor abundancia varias proteínas que participan en la respuesta a estrés oxidativo (*Cat1*, *Pst2*) (Tabla 1); sin embargo, los niveles de ROS intracelular no son superiores a los obtenidos en una cepa silvestre (datos no mostrados). En respuesta a estrés oxidativo, las células *WOR1^{OE}* son capaces de activar la ruta HOG aunque con una cinética diferente, detectándose activación a tiempos más largos (Figura 21) y, por tanto, no parece ser este el motivo que justifique su mayor sensibilidad a oxidantes. El crecimiento de estas células en presencia de arsenito o arseniato (Figura 22), que también son inductores de la producción de ROS (Urrialde *et al.*, 2017), no mostró el mismo patrón de comportamiento observado con los oxidantes anteriores. Cuando las células *WOR1^{OE}* crecen sobre arsenito, que es mucho más tóxico que el arseniato, muestran un comportamiento similar al observado en la cepa silvestre; por otro lado, en presencia de arseniato, son más resistentes. El arseniato entra por los transportadores de fosfato de alta afinidad *Pho84* y *Pho89* y otros de baja afinidad (Wysocki & Tamas, 2010), y la mejora en el crecimiento que presentan las células podría deberse en parte a diferencias en el

transporte de fosfato hacia dentro de la célula. *C. albicans*, como organismo comensal del TGI, puede aprovechar la fuente de fosfato que proviene del propio hospedador a través de su actividad fosfolipasa (Bishop *et al.*, 2011), de tal manera que las células que sobreproducen Wor1 podrían presentar diferencias en su adquisición a través de la expresión de transportadores de fosfato. Las células *WOR1^{OE}* no presentan problemas de crecimiento en cantidades variables de fosfato (datos no mostrados), por lo tanto, no parecen existir diferencias en la adquisición de fosfato que puedan explicar su resistencia a arseniato. Por otro lado, la presencia de arseniato desencadena la fosforilación de Hog1 y de Mkc1, mientras que no se activa en presencia de cantidades decrecientes de fosfato (Urrialde *et al.*, 2015). En concreto, el arseniato induce la fosforilación de Hog1 generando una respuesta frente estrés oxidativo, pero también se ha descrito que en presencia de estrés oxidativo (H₂O₂) se induce la expresión de *PHO84* (Enjalbert *et al.*, 2006). Dado que las células *WOR1* muestran deficiencias en la activación de Hog1 en respuesta a H₂O₂, es posible que el aumento de su resistencia a arseniato esté relacionado con el papel de esta MAPK en la homeostasis de fosfato. Una incorrecta función mitocondrial, como la observada en la cepa que sobreproduce Wor1 y que se discutirá a continuación, se ha asociado a diferencias en la sensibilidad o resistencia a azoles, a la incapacidad de mediar estrés oxidativo vía Hog1 y a desequilibrios en la homeostasis de lípidos y de hierro entre otros (Thomas *et al.*, 2013), y podrían explicar muchos de los fenotipos encontrados en las células *WOR1^{OE}*.

D. Mitocondria, homeostasis de hierro y lípidos

El hierro es un micronutriente esencial para muchos microorganismos y está implicado en procesos tan importantes para la célula como la respiración, el metabolismo, el transporte de electrones o la homeostasis de lípidos entre otros. El exceso de hierro es tóxico como consecuencia de la generación de ROS por la reacción de Fenton (Winterbourn, 1995). La biodisponibilidad de hierro en el cuerpo humano es diferente según las localizaciones, siendo baja en sangre y elevada en la cavidad oral y TGI, y por ello los microorganismos patógenos como *C. albicans* poseen mecanismos sofisticados y altamente regulados que modulan los sistemas de captación y almacenamiento de hierro en función de su disponibilidad. Uno de los cambios que sufren las células de *C. albicans* tras su paso por el intestino es la represión de los sistemas de captación de hierro mediante un incremento de la expresión de *SFU1* y disminución de *SEF1*, mientras que, durante la infección sistémica, donde el hierro es limitado, se produce el efecto contrario (Chen *et al.*, 2011, Noble, 2013). La mejora en los niveles de colonización de las células *WOR1^{OE}* podría ser el resultado de una mayor eficiencia en la captación, almacenamiento y/o utilización de este metal en el TGI. Los estudios realizados indican

que esta cepa no presenta alteraciones en los sistemas de captación de hierro, siendo capaz de crecer en cantidades variables de este metal (Figura 31A). Por el contrario, son más sensibles a la acción quelante del hierro extracelular tras la adición de BPS (Figura 31B). Una posible explicación podría ser que existen diferencias en el almacenamiento de hierro, ya que hemos encontrado que las células *WOR1^{OE}* poseen mayor contenido intracelular de hierro (Figura 36), el cual se almacena en mitocondrias y vacuolas (Xu *et al.*, 2014) para prevenir la formación de ROS por la reacción de Fenton. Otra posible explicación es que las células *WOR1^{OE}* posean defectos en la utilización del hierro almacenado o en su movilización de sus reservas. La sobreexpresión de *WOR1* en mutantes *sef1*, *sfu1* y *hap43* solo genera una disminución de crecimiento en los fondos *sfu1* y *hap43* cuando se restringe este metal en el exterior celular (Figura 34). Es posible que la sobreexpresión de *WOR1*, tal y como ocurre en las células GUT, induzca la expresión de *SFU1* y, en consecuencia, reprima los sistemas de adquisición de hierro; esto podría provocar, a su vez, que dichos mutantes muestren un fenotipo de sensibilidad agravado por la sobreproducción de *Wor1*. El crecimiento de estos mutantes en sulfato de cobre, como ya se había descrito (Chen *et al.*, 2011), muestra que efectivamente *Sfu1* es necesario para hacer frente a la toxicidad por alto hierro, mientras que *Sef1* o *Hap43* no lo son; en nuestro caso, la sobreexpresión de *WOR1* no produce cambios si ya existen defectos previos (Figura 35). Cabe destacar que las cepas construidas en los fondos genéticos CAI4 y CAI4-2+Clp10 (esto es, la cepa CAI4-*WOR1^{OE}*, CAI4-2+Clp10-*WOR1^{OE}* y el mutante *hap43*) poseen una delección de ambos alelos *IRO1*. Este gen podría tener un papel en la homeostasis del hierro (García *et al.*, 2001) y sería necesario comprobar si estos fenotipos se cumplen en una cepa con otro fondo genético.

La mitocondria juega un papel esencial en la colonización del TGI, ya que la función respiratoria se ha descrito necesaria para el crecimiento, morfogénesis, resistencia a antifúngicos y virulencia de este hongo (McDonough *et al.*, 2002, Ruy *et al.*, 2006, Shingu-Vazquez & Traven, 2011, She *et al.*, 2015, Duvenage *et al.*, 2019). El TGI, sobre todo en sus porciones distales, es un nicho donde la disponibilidad de oxígeno es limitada (He *et al.*, 1999), y parece lógico que los microorganismos que se establezcan en este entorno sean menos dependientes de un metabolismo oxidativo. Los análisis *post mortem* de la distribución de las células *WOR1^{OE}* en ratones co-colonizados junto con una cepa silvestre muestran que esta se establece preferiblemente en el ciego e intestino grueso donde existe menor concentración de oxígeno (Prieto *et al.*, 2017), lo cual resulta llamativo dadas las alteraciones en el metabolismo respiratorio y que podrían afectar a su supervivencia. Además, la sobreproducción de *Wor1* altera el metabolismo respiratorio *in vitro*. Cuando las células *WOR1^{OE}* crecen en YPG tienen tasas de consumo de oxígeno similares a una cepa silvestre, pero sufren una mayor reducción de dicho consumo que la cepa silvestre cuando se bloquea la ruta clásica, lo que sugiere una mayor

dependencia de dicha ruta (Prieto *et al.*, 2017). Nuestros datos corroboran estos resultados; la inhibición de la ruta paralela o alternativa con KCN o SHAM no afecta a las células *WOR1^{OE}*, mientras que se observa una alta sensibilidad en presencia de AA sola y en combinación con SHAM (Figura 39 y 40). Los datos de proteómica muestran una menor abundancia de la proteína Cox4 (complejo IV de la ruta clásica), de proteínas que participan en el ensamblaje del complejo IV como Cyb5 (citocromo b 5 de la ruta paralela) así como de proteínas de la subunidad Atp20 de la ATPasa (Tabla 1). También se observa una disminución de la abundancia de proteínas que participan en el importe de proteínas a la matriz mitocondrial (proteínas Tim) y al espacio intermembrana (Tom), sugiriendo defectos estructurales en las mitocondrias. La determinación del potencial de membrana mitocondrial en células *WOR1^{OE}* (Figura 42) también corrobora ciertos defectos en las mitocondrias, ya que muestra que poseen una gran población de células (alrededor del 75 %) con mitocondrias con menor potencial de membrana cuando respiran en medio YPG y, además, son más susceptibles a la presencia de cloranfenicol (Figura 41).

El metabolismo de los lípidos tiene lugar en las mitocondrias entre otros orgánulos, y los defectos que presentan las mitocondrias de las células *WOR1^{OE}* sugiere que podría existir a su vez un desequilibrio en la síntesis de los lípidos. Estas células muestran un mayor número de gotas lipídicas (Figura 43) (formadas por triacilgliceroles (TAG) o ésteres de esteroides) que sirven de almacén cuando existe un exceso intracelular de lípidos o una incorrecta biosíntesis de esteroides que puede producir lipotoxicidad (Garbarino & Sturley, 2005). Aunque los estudios de lipidómica (Figura 44) no han mostrado diferencias en el contenido total de TAG, hemos identificado a la proteína Lro1 de forma única en las células *WOR1^{OE}*, que utiliza diacilglicerol (DAG) para sintetizar TAG para su almacenaje en gotas lipídicas, y que podría explicar el aumento de estas estructuras en esta cepa. Los datos sugieren que las células que sobreproducen *Wor1* podrían tener necesidades energéticas más altas y, por lo tanto, poseen un mayor número de gotas lipídicas y una mayor degradación de estas observable por el contenido más alto de DAG, o que dado que existe un desequilibrio en la homeostasis de los lípidos se induce la formación de estos orgánulos.

Los estudios de lipidómica muestran diferencias en el contenido total de fosfatidilserina (PS), cuya disminución podría justificar algunos de los fenotipos observados en las células *WOR1^{OE}*. Las levaduras sintetizan PS a partir de CDP-DAG y serina mediante la enzima Cho1 (fosfatidilserina sintasa), y posteriormente mediante Psd1 y Psd2 (fosfatidilserina descarboxilasas en mitocondria y endosoma respectivamente) convierten PS en PE. El mutante *cho1*, incapaz de sintetizar PS, posee alteraciones en su composición lipídica total, muestra defectos de filamentación, es avirulento en un modelo de infección sistémica en ratón y presenta defectos de pared celular. Este mutante es sensible

a caspofungina, a SDS y a agentes oxidantes que generan radicales superóxido y daño oxidativo en mitocondria por la interrupción del flujo de electrones de la cadena transportadora (Chen *et al.*, 2010, Cassilly *et al.*, 2017), y dichos fenotipos se asemejan a los que produce la sobreexpresión de *WOR1* en células silvestres. Asimismo, y como ocurre en las células opacas que fijan más floxina B, los mutantes *cho1*, *psd1* y *psd2* se tiñen de rosa cuando crecen sobre agar suplementado con azul de tripán y eosina Y, cuya combinación ha demostrado teñir células con deficiencias en la respiración mitocondrial (Chen *et al.*, 2010). El mecanismo por el cual estos mutantes se tiñen es también desconocido, aunque el menor contenido de PS y los defectos en las mitocondrias coinciden en parte con los fenotipos observados en las células *WOR1^{OE}*.

E. Efecto en adhesión, filamentación y formación de biopelículas

Uno de los factores de virulencia más importantes en *C. albicans* es la capacidad de crecer en forma de levaduras o hifas, un proceso esencial para su interacción con el hospedador, tanto en su faceta como comensal o como patógeno. Dado que *Efg1* es un regulador transcripcional de la morfogénesis y se requiere para la formación de biopelículas, el mutante *efg1* no filameta ni forma biopelículas en la mayoría de las condiciones, es avirulento en un modelo de infección sistémica y posee una mayor adaptación para colonizar el TGI del ratón (Lo *et al.*, 1997, Ramage *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos en este trabajo están en concordancia con la represión de *EFG1* que ejerce la sobreproducción de *Wor1*, ya que las células *WOR1^{OE}* tienen defectos en filamentación en presencia de suero (Figura 24B) o forman filamentos cortos y aberrantes y presentan defectos en la capacidad de formación de biopelículas (Figura 25). La filamentación se ha asociado tradicionalmente a virulencia; el mutante *efg1* no filameta ni forma biopelículas en la mayoría de condiciones, mejora su capacidad de colonización en el TGI del ratón y es avirulento en un modelo de infección sistémica (Lo *et al.*, 1997, Ramage *et al.*, 2002); por su parte, el mutante *hog1* posee un fenotipo de hiperfilamentación y puede formar biopelículas, pero no es capaz de colonizar y es avirulento (Alonso-Monge *et al.*, 1999, Prieto *et al.*, 2014, Konstantinidou & Morrissey, 2015). Es por lo que, aunque la filamentación promueva la virulencia, también inhibe el *fitness* de las células en el TGI (Witchley *et al.*, 2019). Hay que tener en cuenta otros muchos factores pueden apoyar una mayor capacidad de este hongo de establecerse en primer lugar como colonizador, y de ser capaz de desarrollar una infección posteriormente.

Las proteínas de pared celular tienen un papel esencial en la adaptación al hospedador y en la patogénesis de este hongo. Las células *WOR1^{OE}* se adhieren al epitelio del intestino delgado con mayor eficiencia que las células silvestres, mientras que presentan una menor adhesión a poliestireno

(Prieto *et al.*, 2017), y estos datos son consistentes con la mayor capacidad de establecerse en el intestino. Algunas de las proteínas que median en la adhesión y que son específicas de la forma hifal son Als3, Hwp1 y Eap1, las cuales están a su vez reguladas por Efg1 (Leng *et al.*, 2001, Li & Palecek, 2003, Fan *et al.*, 2013). Nuestros datos de expresión de mRNA muestran una represión de *ALS3* y *HWP1*, pero no de *EAP1* con respecto a una cepa silvestre (Figura 26) a diferencia de lo descrito en ausencia de Efg1 (Li & Palecek, 2003). Es importante recalcar que los datos obtenidos son en células creciendo en YPD *in vitro*, no siendo comparables a lo que está ocurriendo en el TGI ni en el ensayo de adhesión *ex vivo* a epitelio intestinal de ratón, pero indica que el éxito en su establecimiento en el TGI parece depender de otras proteínas que no implican a estas adhesinas en concreto. De hecho, a pesar de las múltiples funciones que posee Als3 durante el curso de una infección (Phan *et al.*, 2007, Liu & Filler, 2011), los resultados obtenidos en este trabajo en el modelo de comensalismo muestran que Als3 no es esencial para el establecimiento de *C. albicans* en el TGI del hospedador (Figura 28) y que coinciden con lo descrito en otro trabajo (Ost *et al.*, 2021), ni tampoco lo es para la adhesión a mucosa intestinal (Figura 27). La virulencia de este hongo también se asocia a factores que promueven la invasión del epitelio del intestino, donde la secreción de candidalinas y de hidrolasas juegan un papel esencial. La cepa CAI4-*WOR1*^{OE} no expresa mRNA de *ECE1* (Figura 26) como consecuencia de la ausencia de Efg1 (Leng *et al.*, 2001), por lo tanto, estas células no parecen producir candidalinas y no generarían daño en las células ni una respuesta por parte del sistema inmunitario del hospedador por esta vía. La sobreexpresión de *WOR1*, en cambio, aumenta la actividad fosfolipasa (Figura 29) y proteasa (Figura 30) respecto a una cepa silvestre, aunque no poseemos datos sobre qué tipo de hidrolasas podrían estar siendo expresadas en esta cepa y de qué manera contribuirían a su establecimiento en el TGI.

F. Efecto sobre el metabolismo de fuentes de carbono

En este trabajo hemos querido profundizar en el papel que ejerce *WOR1* sobre la capacidad de asimilación de fuentes de carbono alternativas. Dado que la glucosa disponible es limitante en las zonas distales del TGI, las fuentes de carbono alternativas adquieren especial importancia. Los datos de transcriptómica en células GUT y células opacas indican que ambas disminuyen la expresión de genes relacionados con la glucólisis e inducen la expresión de genes para la β -oxidación y gluconeogénesis (Lan *et al.*, 2002, Tsong *et al.*, 2003, Tuch *et al.*, 2010, Pande *et al.*, 2013); en concreto, la expresión de la enzima de la β -oxidación Pxp2 es considerada una proteína de la fase opaca. Nuestros datos de proteómica también muestran que la proteína Pxp2 y el transportador de ácidos grasos a peroxisoma Pxa1 solo se encontraron en esta cepa (Tabla 2) y, además, estas células

contienen un número mayor de peroxisomas cuando crecen en aceite de oliva (Figura 47), sugiriendo un mayor aprovechamiento de esta fuente de carbono. Por otro lado, las células que sobreproducen Wor1 poseen una disminución de la abundancia de Icl1 (Tabla 1), la enzima clave del ciclo del glioxilato, de Pck1 y de Adh5 entre otras, y que concuerda con los defectos de crecimiento observados en presencia acetato, el citrato y etanol como únicas fuentes de carbono. Los mutantes *icl1* son incapaces de crecer en fuentes de carbono alternativas (Ramirez & Lorenz, 2007), además de ser menos virulentos en un modelo de infección sistémica (Lorenz & Fink, 2001) y son desplazados en un modelo de co-colonización del TGI del ratón (Hidalgo-Vico *et al.*, 2021); sin embargo, la sobreexpresión de *WOR1* en fondo *icl1* restaura los valores de colonización de un mutante *icl1* (Figura 52). Los bajos niveles de Icl1 en estas células sugieren que existen mecanismos alternativos que compensan la baja actividad del ciclo del glioxilato y que favorecen la colonización del TGI de manera dependiente de *WOR1*, pero independiente de *ICL1*. También podría explicar los defectos de *fitness* que presentan estas células en ciertos momentos durante el curso de la colonización, aunque cabe destacar que la habilidad de usar fuentes fermentables y no fermentables podría ser solo importante en ciertas localizaciones del TGI.

Los datos que correlacionan a Wor1 e Icl1 nos llevaron a plantear la posibilidad de que los mutantes *icl1* también presentarían irregularidades en el proceso de *switching*. La sobreexpresión de *WOR1* en un mutante *icl1* reduce la generación de células opacas, observables por la tinción con floxina B (Figura 53) (Hidalgo-Vico *et al.*, 2021). La posterior delección del locus *MTLA1* (que suprime la formación del heterodímero $\alpha 1$ - $\alpha 2$ induciendo el paso a célula opaca) en el mutante *icl1* nos ha permitido demostrar que efectivamente la frecuencia de *switching* se ve reducida con la ausencia de Icl1 cuando estas células se exponen a condiciones inductoras (Figura 54B). Estos datos demuestran que el ciclo del glioxilato también está involucrado en la transición célula blanca a célula opaca, y aunque Wor1 tenga un efecto dominante en este proceso, hacen falta más estudios para establecer qué tipo de relación existe y de qué manera podría afectar a este proceso.

2. Analisis de una trayectoria de microevolución en el tracto gastrointestinal de ratón

Cualquier microorganismo que prolifere en el tracto gastrointestinal, y en cualquier otro nicho, debe adaptarse rápidamente a las condiciones encontradas en el mismo y, en este en concreto, interactuar con los mecanismos inmunitarios existentes y la propia microbiota comensal. Mientras que la mayoría de los estudios en hongos patógenos se han centrado en analizar cuáles son los elementos que contribuyen a su patogenicidad, el estudio de los mecanismos implicados en el mantenimiento del estado comensal de *C. albicans* ha proliferado en los últimos años por relevancia en la búsqueda de nuevas estrategias para prevenir y tratar las infecciones causadas por este hongo. El uso de modelos de comensalismo en animales ha permitido definir el papel de ciertos genes que promueven este estado y que participan además en procesos esenciales como son el metabolismo de fuentes de carbono, la transición morfogénica, la homeostasis del hierro, las rutas de señalización o el *switching* entre otros (White *et al.*, 2007, Ramirez-Zavala *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2011, Pierce & Kumamoto, 2012, Pande *et al.*, 2013, Perez *et al.*, 2013, Prieto *et al.*, 2014, Roman *et al.*, 2018).

Para poder determinar qué factores permiten una mejor adaptación a esta localización, nuestro grupo ha llevado a cabo un experimento de microevolución en el cual las células de una cepa silvestre marcada fluorescentemente se mantienen en el TGI del ratón a lo largo de 366 días tras pases sucesivos. Así, las células obtenidas a lo largo del tiempo deberían poseer cambios que favorecen su paso y establecimiento en esta localización. Nuestros resultados demuestran que 93 días de permanencia en el TGI son suficientes para que una cepa silvestre adquiera modificaciones que permiten desplazar a la cepa silvestre CAF2-RFP original en un ensayo de co-colonización (datos no mostrados). Esta mejor adecuación biológica se debe a cambios estables, que se mantienen en el tiempo y que son independientes de su mantenimiento *in vitro*. Nuestros datos van en la línea de trabajos anteriores donde se muestra que el paso por el TGI genera cepas mejor adaptadas (Tso *et al.*, 2018). Tal y como hemos comentado, el paso por el TGI induce un fenotipo de células GUT donde la expresión de *WOR1* aumenta, sugiriendo la relevancia de *Wor1* como promotor de colonización (Pande *et al.*, 2013). El análisis de la expresión de este gen en las cepas microevolucionadas muestra un aumento de *WOR1*, aunque los niveles varían según las condiciones en las que se han analizado. La determinación de la expresión en células congeladas tras su aislamiento en heces de ratón (Figura 55B) muestra niveles entre 6-7 superiores a la cepa silvestre original desde el día 93 de microevolución, y similares en las cepas obtenidas a tiempos más largo de mantenimiento en ratón. Sin embargo, el mantenimiento de las cepas en placa supone que dichos incrementos son menores

y solo significativos en las cepas $\mu\text{Ev}114$ y $\mu\text{Ev}156$ (Figura 55A). Esto sugiere que la expresión de *WOR1* es inducida por señales específicas del TGI y, una vez fuera del hospedador, dicho factor no es relevante y los niveles bajan. Las células μEv también presentan un aumento de tamaño y se tiñen con floxina B a partir de los 93 días y hasta los 366 días (Figura 56), coincidiendo con los fenotipos descritos en la literatura en células opacas (Anderson & Soll, 1987) y con los descritos en este trabajo en células *WOR1^{OE}*.

El análisis de los genomas secuenciados de las cepas microevolucionadas muestran que la cepa $\mu\text{Ev}93$ presenta una triploidía del cromosoma 7 (Figura 58A), y dicho cambio no se conserva en cepas más evolucionadas. Sin embargo, las cepas $\mu\text{Ev}93$, $\mu\text{Ev}180$ y $\mu\text{Ev}366$ presentan una pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 6 (Figura 58C) donde se localizan muchos de los genes relacionados con la filamentación. Estudios previos han demostrado que trisomías en el cromosoma 5 y 6 confieren ventaja competitiva durante una candidiasis orofaríngea, y las células resultan ser menos invasivas ya que causan una menor respuesta inflamatoria y presentan defectos en filamentación (Forche *et al.*, 2019). Estos datos concuerdan con los descritos en trabajos anteriores, en los que cepas que han pasado por tracto gastrointestinal (Tso *et al.*, 2018) o que provienen de aislados clínicos (Hirakawa *et al.*, 2015) presentan estas y otras modificaciones en su genoma. De hecho, las células de *C. albicans* sufren variaciones genéticas cuando se someten a presión selectiva constante, como es la aparición de cepas refractarias al tratamiento por azoles tras su uso continuado en pacientes con HIV (White, 1997) o la adquisición de la capacidad de filamentar de mutantes *cph1 efg1* tras ser sometido a ambientes hostiles como el fagosoma de macrófagos (Wartenberg *et al.*, 2014). La generación de nuevas variantes genotípicas puede deberse a distintos mecanismos, como son mutaciones puntuales, traslocaciones cromosómicas, inversiones, variaciones en el número de copias (CNV, *Copy Number Variations*) o pérdidas de heterocigosidad (LOH, *Lost Of Heterocigosity*) (Forche *et al.*, 2009, Forche *et al.*, 2011, Ene *et al.*, 2018). La microevolución, por tanto, proporciona una gran fuente de variación para la adaptación de *C. albicans* a nuevos entornos. Otro de los aspectos que hemos abordado es la capacidad de filamentar de cepas microevolucionadas dado que estudios previos ya habían demostrado que aquellas adaptadas al TGI murino son típicamente deficientes en la transición levadura-hifa (Pierce & Kumamoto, 2012, Hirakawa *et al.*, 2015, Bohm *et al.*, 2017, Tso *et al.*, 2018). Mediante ensayos de filamentación *in vitro* en presencia de suero, hemos observado que las cepas microevolucionadas pierden la capacidad de formar filamentos (Figura 63). Los datos de proteómica muestran una disminución de proteínas relacionadas con la filamentación, entre las que se encuentran Efg1, Rho1, Cdc42 o Ctn3 (Tabla 3); dicha disminución no se observa en todas ellas, lo que sugiere que cambios específicos pueden ser

temporales a lo largo del proceso de adaptación. Aunque las levaduras y las formas filamentosas cohabitan en el intestino (Witchley *et al.*, 2019), la forma de levadura podría estar más adaptada y es favorecida durante los ensayos de colonización, mientras que los filamentos y los factores de virulencia asociados a la filamentación podrían disminuir su capacidad de establecerse como comensal (Vautier *et al.*, 2015). En este sentido, la pérdida de la capacidad de la filamento podría aportar una ventaja a las células a la hora de establecerse en este nicho, así como se ha visto que la mayoría de cepas que presentan un mayor *fitness* en el TGI no pueden realizar esta transición morfológica. Sin embargo, muchos de los genes que aumentan su expresión durante la filamentación, adhesión e invasión, como los que codifican adhesinas o proteasas, dejarían de expresarse o disminuirían sus niveles pudiendo suponer una desventaja. De hecho, nuestros datos muestran que las cepas μ Ev producen menos fosfolipasas (Figura 64) y proteasas (Figura 65) en condiciones de normoxia y microaerofilia, resultados que están en concordancia con las proteínas identificadas en menor abundancia en las cepas μ Ev180 y μ Ev366 (Tabla 3) en los estudios de proteómica como Kex1, implicada en la maduración de candidalinas Ece1. Además, existe un aumento de la abundancia de Gpd2 (glicerol-3--fosfato deshidrogenasa) (Tabla 4), una proteína que cuando se encuentra en la pared celular une Factor H, FHL1 y plasminógeno humano inhibiendo la activación del sistema del complemento (Luo *et al.*, 2013). Esto sugiere que el paso de estas células por el TGI selecciona variantes que evitan activar mecanismos de respuesta inmunitaria favoreciendo así su mantenimiento como comensal.

Los estudios de resistencia a distintos compuestos comparten con la cepa WOR1^{OE} su resistencia a azoles (Figura 60), además de los defectos en filamentación ya mencionados, sugiriendo que estos son aspectos importantes para mantener una mayor adecuación en el TGI. Es cierto que en ocasiones los datos de abundancia de las proteínas identificadas contradicen los fenotipos observados *in vitro*. Un ejemplo lo tenemos en Erg3, que aumenta en la cepa μ Ev93 (Tabla 4). Estudios previos han demostrado que la delección de *ERG3* confiere la resistencia a azoles (Martel *et al.*, 2010), mientras la disminución de *ERG11* y mutantes *efg1* muestran un aumento en su expresión y son sensibles a esta clase de antifúngicos (Prasad *et al.*, 2010). Aunque no poseemos datos sobre la expresión de *ERG11* en cepas μ Ev, sí se encontró en mayor abundancia (Tabla 4) el transportador Cdr2; el aumento de la expresión de *CDR2* se ha asociado junto al de *CDR1* con una mejora de la resistencia a azoles (Prasad *et al.*, 1995, Sanglard *et al.*, 1997) pudiendo explicar estos resultados. Asimismo, se observan cambios en las proteínas que intervienen en la síntesis de otros lípidos, encontrado una disminución de una fosfolipasa B con actividad lisofosfolipasa, de una proteína implicada en la formación de gotas lipídicas (Tabla 3) y un aumento en la abundancia de Des1 que participa en la

síntesis de esfingolípidos (Tabla 4). Esto parece indicar que la composición de los lípidos de membrana e intracelulares parecen cambiar con la microevolución, cuyo cambio puede generar un posible aumento de la resistencia a ciertos compuestos como se ha demostrado, pero también pudiendo influir a nivel de señalización celular. Por el contrario, la microevolución no confiere la sensibilidad a estrés oxidativo (Figura 61A) o estrés osmótico (Figura 61B). Curiosamente, las células tienen un comportamiento distinto cuando se exponen a sales biliares, encontrando que la cepa $\mu\text{Ev}93$ comienza a presentar mayor resistencia y que se conserva hasta los 366 días (Figura 62). Los datos de proteómica muestran una remodelación de la pared celular en estas cepas, con un aumento en la abundancia en varias proteínas relacionadas con la síntesis y modificación de sus componentes, como Alg6 que participa en la síntesis de mananos, Kre9 que regula la síntesis de β -glucanos, o glucosidasas como Phr1 o Alg1 que modifican la pared (Tabla 4). Aún a pesar de que estos cambios sugieren modificaciones en los componentes de la pared celular, estas cepas no son más susceptibles a la acción de rojo Congo o blanco de calcoflúor (datos no mostrados), por lo tanto, no hay cambios en su susceptibilidad a compuestos que intervienen en la síntesis de quitina o β -glucanos como ocurre en células *WOR1^{OE}*.

Los datos proteómicos obtenidos en las cepas μEv están en concordancia con el análisis transcriptómico de células GUT que indican que la adaptación al TGI implica un cambio metabólico en las células (Pande *et al.*, 2013). Nuestros datos muestran una disminución de la abundancia de proteínas relacionadas con la glucólisis y represión de gluconeogénesis y un aumento de proteínas implicadas en el aprovechamiento de fuentes de carbono alternativas. Una de las proteínas que se encontró en menor abundancia en las 3 cepas analizadas es la carnitina acetil transferasa de peroxisoma Ctn3 (Tabla 3), cuyo gen se reprime en presencia de glucosa y se induce cuando existen fuentes de carbono alternativas como glicerol, oleato, acetato o etanol o en presencia de macrófagos (Zhou, 2001, Priegneau *et al.*, 2003, Zhou & Lorenz, 2008), y que concuerda con las condiciones analizadas. Entre las proteínas que se encontraron en mayor abundancia aparecen transportadores de aminoácidos que se han visto inducidos en modelos de candidiasis oral o en células fagocitadas por macrófagos o neutrófilos (Lorenz *et al.*, 2004, Zakikhany *et al.*, 2007) pero no descritas en un modelo de comensalismo. De cualquier forma, el fenotipo de crecimiento *in vitro* en presencia de fuentes de carbono fermentables de las cepas microevolucionadas y *WOR1^{OE}* es completamente diferente, ya que como hemos mencionado antes, las primeras no presentan defectos (Figura 67) mientras que segundas presentan problemas de crecimiento (Figura 48). *C. albicans* es capaz de fermentar incluso en presencia de glucosa, sin embargo, y como se ha mencionado antes, las fuentes alternativas de carbono solo podrían ser importantes en ciertas localizaciones del TGI. Esto indica

que los fenotipos encontrados en una cepa obtenida por manipulación genética de un único gen no pueden en ningún caso compararse a lo que realmente esté ocurriendo en las cepas que se encuentran *in vivo* y, obviamente, variará según el hospedador.

Durante los análisis de proteómica en las cepas microevolucionadas encontramos que las proteínas Cox2 y Cox5 de la subunidad II del complejo IV (citocromo c oxidasa) de la cadena transportadora de electrones se encontraban en menor abundancia en la cepa $\mu\text{Ev}180$ (Tabla 3). El ensayo en medio sólido suplementado con antimicina A o azida sódica, sin embargo, no muestra una menor resistencia de esta cepa (datos no mostrados); en cambio, la proteína Shy1 que participa en la biosíntesis del complejo citocromo c oxidasa y la oxidasa Aox2 de la ruta alternativa se encuentran en mayor abundancia dependiendo de la cepa microevolucionada que se analice (Tabla 4). Es posible que la microevolución también tenga como consecuencia el desarrollo de defectos en las mitocondrias al igual que en las células *WOR1^{OE}*, y que estas proteínas se encuentren compensando los posibles defectos que pudieran sufrir estas células durante la respiración.

Otro aspecto relevante que se deduce en este trabajo es la importancia de *FLO8* en la colonización. Dicho gen está involucrado en filamentación y en la virulencia en *C. albicans* y su expresión se activa mediante de la ruta cAMP/PKA junto con Efg1 (Cao *et al.*, 2006, Tso *et al.*, 2018). Nuestros datos en cepas microevolucionadas muestran que dicha microevolución está asociada a una pérdida de la capacidad de filamentación y una pérdida de heterocigosidad del cromosoma 6, donde se localiza *FLO8*. Estos datos concuerdan con lo descrito por otros autores, donde *FLO8* sufre mutaciones en su secuencia en células que han pasado por el tracto gastrointestinal (Tso *et al.*, 2018) o que provienen de aislados clínicos (Hirakawa *et al.*, 2015), que provoca que las células pierden la capacidad de filamentar. Los estudios de competición entre cepas μEv con una única copia de *FLO8* reintegrada indican que este factor de transcripción no es el único determinante en la mejora de *fitness* en estas cepas (Figura 68). Por el contrario, la reintegración de este gen suprime la pérdida de la capacidad de filamentación y la resistencia a sales biliares (Figura 69A y 70A). Flo8 también participa en la regulación de la expresión de genes *BMT* (beta-manosiltransferasas), en concreto, induce la expresión de *BMT4* y *BMT6* en condiciones basales y reprime la expresión de *BMT2* en presencia de suero (Polvi *et al.*, 2019). Nuestros resultados indican que un aumento de la expresión de *BMT2* junto a una inhibición de *BMT4* y *BMT6* provocan cambios en la manosilación de mananos de pared, generando a su vez resistencia a sales biliares (Figura 73B) mediante un mecanismo que a día de hoy desconocemos. El mutante *flo8* expone más mananos en su pared cuando crece en presencia de suero (Lv *et al.*, 2020), y esto se ha relacionado con una protección frente a una posterior infección sistémica letal con *C. albicans*, y con la inducción de la producción de IL-10 en macrófagos y células

dendríticas. Como consecuencia de posibles mutaciones en *FLO8* en las cepas microevolucionadas, es posible que el fenotipo observado en sales biliares venga determinado por la exposición o composición de los mananos, para lo cual no hemos encontrado explicación y hacen falta más estudios que determinen la acción de las sales biliares sobre estos. Asimismo, en este trabajo demostramos que la incapacidad de formar filamentos y la resistencia a sales biliares no depende de *Wor1*, ya que la delección de este gen en cepas microevolucionadas no genera cambios, mientras que la reintegración de *FLO8* sobre cepas μ Ev *wor1* sí (Figura 69B y 70B).

Las cepas μ Ev poseen un *fitness* similar al de una cepa mutante *flo8* en un modelo de comensalismo en TGI de ratón, y dicho fenotipo es parcialmente revertido tras la reintegración de *FLO8* (Figura 71A y B). El mutante *flo8* presenta mejores niveles de colonización cuando compete por establecerse con una cepa silvestre CAF2 (Figura 71A). Sin embargo, la reintegración de una copia de *FLO8* en el mutante *flo8* disminuye los niveles de colonización en los primeros días, y alcanzando similares tasas de colonización a tiempos largos (Figura 71B, C y D). De hecho, dicha reintegración produce una disminución de la proporción relativa del mutante *flo8* en los primeros segmentos del TGI (Figura 71E y F). Si bien no podemos atribuir esta bajada a un defecto de crecimiento a los distintos pH que simularían el entorno del TGI mediante ensayos *in vitro* (datos no mostrados), no debemos descartar que una posible explicación podría ser la dosis génica. Mientras que una cepa silvestre porta dos copias del gen, la cepa reintegrante *FLO8* lleva solo una copia, en concreto el alelo B que, además, presenta variaciones en su secuencia respecto al alelo A. Además, el mutante *flo8* utilizado en este trabajo (Cao et al., 2006) no posee una delección total del gen, y mantiene 1242 pb en el extremo 3' de *FLO8* en cuya secuencia se encuentra un dominio LisH y desconocemos si tiene algún efecto sobre los fenotipos observados.

Consideraciones finales

Los principales cambios asociados a la sobreproducción de *Wor1* incluyen modificaciones a nivel morfológico y en su proteoma, generando células con cambios muy acentuados en su susceptibilidad y en la resistencia a compuestos y condiciones que generan estrés oxidativo y osmótico, donde muchos de los cambios surgen como consecuencia de la represión de *EFG1*. Estas células pierden la capacidad de filamentar y dejan de expresar varios factores de virulencia asociados a esta transición, y presentan diferencias en la respiración celular, en la homeostasis del hierro, en el contenido lipídico y en el aprovechamiento de fuentes de carbono. En cualquier caso, dichas características suponen una ventaja durante cierto momento de la colonización del TGI del ratón, al menos en este modelo. Las cepas microevolucionadas sufren variaciones genéticas como

consecuencia de su paso por el TGI, y dichos cambios no se asocian solamente a la mayor expresión de *WOR1*. Entre los cambios observados destaca la pérdida de la capacidad de filamentar, la menor producción de enzimas asociadas a virulencia y su mayor resistencia a sales biliares, y dichos hechos determinan probablemente su mayor adaptación a este nicho. Conocer cuáles son los genes y cómo regulan el estado comensal, mas allá de *WOR1*, resulta esencial para seguir desentrañando los factores que tienen relevancia en la adaptación al TGI y poder prevenir en un futuro las infecciones producidas por este hongo dado el origen endógeno de gran parte de las infecciones sistémicas.

CONCLUSIONES

1. La expresión ectópica de *WOR1* (mediante el sistema TET-OFF) reduce significativamente la expresión de *EFG1* y desencadena un fenotipo opaco estable caracterizado por un aumento del tamaño celular y una mayor tinción con el colorante floxina B.
2. La sobreexpresión de *WOR1* genera cambios importantes en el proteoma, con numerosas proteínas que disminuyen en abundancia. Entre estas se encuentran proteínas que participan en la respuesta a estrés oxidativo, algunas que forman parte de la cadena transportadora de electrones y de transporte a la mitocondria y proteínas que participan en la síntesis y aprovechamiento de fuentes de carbono.
3. La sobreproducción de *Wor1* genera células con mayor sensibilidad a compuestos cuyo blanco de acción son componentes de pared celular, mientras que aumenta su resistencia a compuestos que interfieren en la síntesis de ergosterol de la membrana celular.
4. Las células *WOR1^{OE}* poseen alteraciones en su metabolismo respiratorio, siendo más dependientes de la generación de energía por la ruta clásica. Estas células son más sensibles a estrés oxidativo, poseen un retraso en la activación de la MAPK Hog1 en respuesta a un agente oxidante y sus mitocondrias tienen menor potencial de membrana en condiciones estándar de crecimiento *in vitro*.
5. El contenido lipídico intracelular y de membrana celular cambia tras la sobreproducción de *Wor1*, con un aumento de gotas lipídicas y una disminución de fosfatidilserina.
6. Las células que sobreproducen *Wor1* no poseen diferencias en la captación de hierro, pero sí en su almacenamiento y utilización, lo que indica un desequilibrio en la regulación de este metal.
7. Las células *WOR1^{OE}* tienen una menor capacidad de filamentación y de formación de biopelículas estructuradas. Estas células muestran una menor expresión de genes específicos de la fase hifal como son *ALS3*, *HWP1* o de *ECE1* que codifica para la candidalislina, aunque presentan mayor actividad fosfolipasa y proteasa.
8. La sobreexpresión de *WOR1* disminuye la abundancia de la isocitrato liasa *Icl1* e implica una deficiente utilización de fuentes de carbono alternativas como citrato o etanol. Asimismo, *Icl1* juega un papel relevante en el *switching*, y la expresión ectópica de *WOR1* regula parcialmente dicha transición.
9. El análisis de una trayectoria evolutiva de *C. albicans* en el TGI ha permitido obtener cepas que presentan una mejor adecuación biológica que la cepa silvestre original; dichas cepas se caracterizan por aumentar la expresión de *WOR1*, tener mayor tamaño y teñirse en mayor medida con floxina B.

10. El proteoma de las células de *C. albicans* se ve modificado como consecuencia de la microevolución, con una disminución de proteínas relacionadas con la filamentación y con cambios en proteínas que participan en la síntesis y aprovechamiento de lípidos (intracelulares y de membrana celular) y de fuentes de carbono.
11. Las cepas microevolucionadas analizadas pierden la capacidad de filamentar y son más resistentes a sales biliares como consecuencia de la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 6, donde se localiza *FLO8*, pero no de la alta expresión de *WOR1*. La diferente expresión de beta-manosiltransferasas altera la sensibilidad o resistencia a sales biliares de las células de *C. albicans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos y procedimientos

A. Microorganismos

Los microorganismos empleados en este trabajo se detallan en la Tabla 6. La cepa DH5αF' de *Escherichia coli* se usó para la amplificación y obtención de plásmidos. Las construcciones genéticas obtenidas fueron integradas en el genoma de las distintas cepas de *Candida albicans* como se indica en cada sección correspondiente de este trabajo.

Tabla 6. Microorganismos utilizados en este trabajo.

Microorganismo	Nombre de la cepa	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i>	Dh5αF'	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_Km_K⁺), λ⁻</i>	(Hanahan, 1985)
<i>C. albicans</i>	SC5314	Aislamiento clínico	(Gillum <i>et al.</i> , 1984)
<i>C. albicans</i>	CAI4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i>	(Fonzi & Irwin, 1993)
<i>C. albicans</i>	CAF2	<i>ura3::imm434/ura3::imm434-URA3</i>	(Fonzi & Irwin, 1993)
<i>C. albicans</i>	CAF2-RFP (PPD7)	[CAF2] <i>ADH1/adh1::tTA-TET^{PR}-dTOM2-SAT1</i>	(Prieto <i>et al.</i> , 2014)
<i>C. albicans</i>	CAF2-GFP (COA6-3)	[CAF2] <i>ADH1/adh1::tTA-TET^{PR}-GFP-SAT1</i>	(Prieto <i>et al.</i> , 2014)
<i>C. albicans</i>	CAI4-pNRUe	[CAI4] <i>ADH1/adh1::tTA-TET^{PR}-myc-URA3</i>	(Roman <i>et al.</i> , 2016)
<i>C. albicans</i>	CAI4-RFP	[CAI4] <i>ADH1/adh1::TDH3^{PR}-tTA-TET^{PR}-dTOM2-URA3</i>	(Prieto <i>et al.</i> , 2017)
<i>C. albicans</i>	CAI4-WOR1 ^{OE} (RW1-3)	[CAI4] <i>ADH1/adh1::TDH3^{PR}-tTA-TET^{PR}-WOR1-myc-URA3</i>	(Prieto <i>et al.</i> , 2017)
<i>C. albicans</i>	<i>hog1</i> (HI3-21)	[CAI4] <i>hog1::hisG/hog1::hisG</i>	(Prieto <i>et al.</i> , 2014)
<i>C. albicans</i>	<i>hog1</i> -pNRUe	[CAI4] <i>hog1::hisG/hog1::hisG</i> <i>ADH1/adh1::tTATeT^{PR}-myc-URA3</i>	E. Román, sin publicar.
<i>C. albicans</i>	<i>als3</i> (1954)	<i>iro1-ura3::imm434/iro1-ura3::imm434</i> <i>als3/als3-URA3</i>	(Zhao <i>et al.</i> , 2004)

<i>C. albicans</i>	SN250	<i>his1/his1, leu2::C. dubliniensis (Cd)</i> <i>HIS1/leu2::C. maltosa (Cm) LEU2- arg4/arg4- URA3/ura3::imm434-IRO1/iro1Δ::imm434</i>	(Noble et al., 2010)
<i>C. albicans</i>	<i>sef1</i> (SN330)	[SN250] <i>sef1::C.m LEU2/sef1::C.d.HIS1</i>	(Noble et al., 2010)
<i>C. albicans</i>	<i>sfu1</i> (SN515)	[SN250] <i>sfu1::C.m LEU2/sfu1::C.d.HIS1</i>	(Noble et al., 2010)
<i>C. albicans</i>	CAI4-2-Clp10 (PVY121)	[CAF4-2] RPS1/rps1::[Clp10]	(Vandeputte et al., 2012)
<i>C. albicans</i>	<i>hap43</i> (DSY2989)	<i>hap43::hisG/hap43::hisG-URA3-hisG</i>	(Vandeputte et al., 2012)
<i>C. albicans</i>	SN250-pNRIM1RXe (SU8-1)	[SN250] <i>ADH1/adh1::TDH3^{PR}- tTA-TET^{PR} -myc -SAT1</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	SN250-pNRIM1RX- WOR1-myc (SU32-6)	[SN250] <i>ADH1/adh1::TDH3^{PR}- tTA-TET^{PR}-WOR1-myc- SAT1</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	<i>sef1</i> -pNRIM1RXe (SU9-1)	[<i>sef1</i> SN330] <i>ADH1/adh1::TDH3^{PR}- tTA-TET^{PR} -myc -SAT1</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	<i>sef1</i> -pNRIM1RX- WOR1-myc (SU33-1)	[<i>sef1</i> SN330] <i>ADH1/adh1::TDH3^{PR}- tTA-TET^{PR}-WOR1-myc- SAT1</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	<i>sfu1</i> -pNRIM1RXe (SU10-1)	[<i>sfu1</i> SN515] <i>ADH1/adh1::TDH3^{PR}- tTA-TET^{PR}-myc -SAT1</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	<i>sfu1</i> -pNRIM1RX- WOR1-myc (SU13-2)	[<i>sfu1</i> SN515] <i>ADH1/adh1::TDH3^{PR}- tTA-TET^{PR}-WOR1-myc- SAT1</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CAI4-2-Clp10- pNRIM1RXe (SU11-1)	[CAI4-2-Clp10] <i>ADH1/adh1::TDH3^{PR}- tTA-TET^{PR}-myc -SAT1</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CAI4-2-Clp10- pNRIM1RX-WOR1- myc (SU14-5)	[CAI4-2-Clp10] <i>ADH1/adh1::TDH3^{PR}- tTA-TET^{PR}-WOR1-myc- SAT1</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	<i>hap43</i> -pNRIM1RXe (SU12-1)	[<i>hap43</i>] <i>ADH1/adh1::TDH3^{PR}- tTA-TET^{PR}-myc -SAT1</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	<i>hap43</i> -pNRIM1RX- WOR1-myc (SU15-4)	[<i>hap43</i>] <i>ADH1/adh1:: TDH3^{PR}- tTA-TET^{PR}-WOR1-myc- SAT1</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CAI4-pNRUe GFP-PXP2M (SU6-1)	[CAI4-pNRUe] <i>ARD1/ard1::TDH3^{PR}-GFP-PXP2M-SAT1</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	CAI4-WOR1 ^{OE} GFP-PXP2M (SU7-1)	[CAI4-WOR1 ^{OE}] <i>ARD1/ard1::TDH3^{PR}-GFP-PXP2M-SAT1</i>	Este trabajo

<i>C. albicans</i>	<i>icl1</i> (MLC9)	[CAI4] <i>icl1::hisG/icl1::hisG</i>	(Lorenz & Fink, 2001)
<i>C. albicans</i>	<i>icl1</i> (MRC10)	[<i>icl1</i>] <i>icl1::hisG/icl1::hisG</i> <i>RPS10/rps10::URA3</i>	(Ramirez & Lorenz, 2007)
<i>C. albicans</i>	<i>icl1</i> pICL1 (MRC11)	[<i>icl1</i>] <i>RPS10/rps10::ICL1-URA3</i>	(Ramirez & Lorenz, 2007)
<i>C. albicans</i>	<i>icl1</i> -RFP (SHV2)	[<i>icl1</i>] <i>ADH1/adh1::tTA-TET^{PR}-dTOM2-SAT1</i>	(Hidalgo-Vico <i>et al.</i> , 2021)
<i>C. albicans</i>	<i>icl1</i> pICL1-GFP (SHV1)	[<i>icl1</i> pICL1] <i>ADH1/adh1::tTA-TET^{PR}-GFP-SAT1</i>	(Hidalgo-Vico <i>et al.</i> , 2021)
<i>C. albicans</i>	<i>icl1</i> -pNRUe (SHV3)	[<i>icl1</i>] <i>ADH1/adh1::tTA-TET^{PR}-myc-URA3</i>	(Hidalgo-Vico <i>et al.</i> , 2021)
<i>C. albicans</i>	<i>icl1</i> -WOR1 ^{OE} (SHV4)	[<i>icl1</i>] <i>ADH1/adh1::TDH3^{PR}-tTA-TET^{PR}-WOR1-myc-URA3</i>	(Hidalgo-Vico <i>et al.</i> , 2021)
<i>C. albicans</i>	<i>icl1</i> - <i>mtla1</i> (SHV5)	[<i>icl1</i>] <i>mtla1::SAT1/mtla1::SAT1</i>	(Hidalgo-Vico <i>et al.</i> , 2021)
<i>C. albicans</i>	<i>icl1</i> pICL1- <i>mtla1</i> (SHV6)	[<i>icl1</i> pICL1] <i>mtla1::SAT1/mtla1::SAT1</i>	(Hidalgo-Vico <i>et al.</i> , 2021)
<i>C. albicans</i>	μEv20	[CAF2-RFP]	D. Prieto, sin publicar
<i>C. albicans</i>	μEv93	[CAF2-RFP]	D. Prieto, sin publicar
<i>C. albicans</i>	μEv114	[CAF2-RFP]	D. Prieto, sin publicar
<i>C. albicans</i>	μEv156	[CAF2-RFP]	D. Prieto, sin publicar
<i>C. albicans</i>	μEv180	[CAF2-RFP]	D. Prieto, sin publicar
<i>C. albicans</i>	μEv257	[CAF2-RFP]	D. Prieto, sin publicar
<i>C. albicans</i>	μEv301	[CAF2-RFP]	D. Prieto, sin publicar
<i>C. albicans</i>	μEv366	[CAF2-RFP]	D. Prieto, sin publicar
<i>C. albicans</i>	μEv93 pFLO8 (SU38-1)	[μEv93] <i>NEUT5L/neut5l::FLO8^{PR}-FLO8-HPH</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	μEv180 pFLO8 (SU42-1)	[μEv180] <i>NEUT5L/neut5l::FLO8^{PR}-FLO8-HPH</i>	Este trabajo

<i>C. albicans</i>	μ Ev366 pFLO8 (SU46-1)	[μ Ev366] <i>NEUT5L/neut5l::FLO8^{PR}-FLO8-HPH</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	μ Ev93 <i>wor1</i> Δ	[μ Ev93] <i>wor1::SAT1/wor1::SAT1</i>	D. Prieto, sin publicar
<i>C. albicans</i>	μ Ev180 <i>wor1</i> Δ	[μ Ev180] <i>wor1::SAT1/wor1::SAT1</i>	D. Prieto, sin publicar
<i>C. albicans</i>	μ Ev366 <i>wor1</i> Δ [SU57-1]	[μ Ev366] <i>wor1::SAT1/wor1::SAT1</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	μ Ev93 <i>wor1</i> Δ pFLO8 (SU40-1)	[μ Ev93 <i>wor1</i> Δ] <i>NEUT5L/neut5l::FLO8^{PR}-FLO8-HPH</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	μ Ev180 <i>wor1</i> Δ pFLO8 (SU44-2)	[μ Ev180 <i>wor1</i> Δ] <i>NEUT5L/neut5l::FLO8^{PR}-FLO8-HPH</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	μ Ev366 <i>wor1</i> Δ pFLO8 (SU59-1)	[μ Ev366 <i>wor1</i> Δ] <i>NEUT5L/neut5l::FLO8^{PR}-FLO8-HPH</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	<i>flo8</i> Δ (CCF3)	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434 flo8::hisG/flo8::hisG-URA3-hisG</i>	(Cao <i>et al.</i> , 2006)
<i>C. albicans</i>	<i>flo8</i> Δ -GFP (SU47-1)	[<i>flo8</i> Δ] <i>ADH1/adh1::tTATe^{TPR}-GFP-SAT1</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	<i>flo8</i> Δ -GFP eHygB (SU49-1)	[<i>flo8</i> Δ -GFP] <i>NEUT5L/neut5l::HPH</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	<i>flo8</i> Δ -GFP pFLO8 (SU52-1)	[<i>flo8</i> Δ -GFP] <i>NEUT5L/neut5l::FLO8^{PR}-FLO8-HPH</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	<i>flo8</i> Δ -RFP (SU48-1)	[<i>flo8</i> Δ] <i>ADH1/adh1::tTATe^{TPR}-dTOM2-SAT1</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	<i>flo8</i> Δ -RFP eHygB (SU51-1)	[<i>flo8</i> Δ -RFP] <i>NEUT5L/neut5l::HPH</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	<i>flo8</i> Δ -RFP pFLO8 (SU50-1)	[<i>flo8</i> Δ -RFP] <i>NEUT5L/neut5l::FLO8^{PR}-FLO8-HPH</i>	Este trabajo
<i>C. albicans</i>	BWP17	<i>arg4::hisG/arg4::hisG his1::hisG/his1::hisG ura3Δ::limm434/ura3Δ::limm434</i>	(Wilson <i>et al.</i> , 1999)
<i>C. albicans</i>	<i>bmt2</i> Δ (AL94)	<i>bmt2::ARG4/bmt2::HIS1 RPS10::Clp10-BMT2-URA3</i>	(Mille <i>et al.</i> , 2008)
<i>C. albicans</i>	<i>bmt4</i> Δ (AL96)	<i>bmt4::ARG4/bmt4::HIS1 RPS10::Clp10-BMT4-URA3</i>	(Mille <i>et al.</i> , 2008)
<i>C. albicans</i>	<i>bmt6</i> Δ (AL97)	<i>bmt6::ARG4/bmt6::HIS1 RPS10::Clp10-BMT6-URA3</i>	(Mille <i>et al.</i> , 2012)

B. Medios de cultivo y compuestos

Los medios de cultivos usados para el crecimiento tanto de levaduras como de bacterias se detallan en la Tabla 7. Para su preparación, los componentes se disuelven en agua destilada (sistema de purificación Millipore) y se esterilizan en autoclave (20 minutos a 121°C) o mediante filtración cuando alguno de los componentes no permita este proceso. Los medios sólidos se han obtenido mediante la adición de un 2 % (p/v) agar antes del autoclavado.

Tabla 7. 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 -Se añade nirsotricina (200 µg/mL) para la selección de transformantes que contienen el gen <i>SAT1</i> , o higromicina B (400 µg/mL) para aquellos que contienen el gen <i>HPH</i> -Se añade floxina B (50-10 µg/mL) para la identificación de colonias opacas -La fuente de carbono puede sustituirse por glicerol (YPG) al 2 %	(Sherman, 1986)
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	(Hanahan, 1985)
SD o MM	2 % Glucosa 0,17 % Base nitrogenada de levadura (YNB) sin aminoácidos y sin $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 0,5 % Sulfato de amonio (SA), $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 0,2 % Mezcla aminoácidos	-Medio mínimo completo usado para el crecimiento de levaduras -En los ensayos in vivo de colonización en ratón, se añade cloranfenicol (20 µg/mL) para evitar el crecimiento bacteriano en muestras de heces	(Sherman, 1986)
MM ura-	2% Glucosa 0,17 % Base nitrogenada de levadura (YNB) sin aminoácidos y sin $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 0,5 % Sulfato de amonio (SA), $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 0,19 % Mezcla aminoácidos sin uracilo	-Medio mínimo sin uracilo para la selección de transformantes con el marcador de selección <i>URA3</i>	(Sherman, 1986)

YNB	0,17 % Base nitrogenada de levadura (YNB) sin aminoácidos y sin $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 0,5 % Sulfato de amonio (SA), $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	-Medio mínimo sin aminoácidos para determinar el uso de fuentes de carbono -Se suplementa con glucosa, acetato de sodio, citrato de sodio, etanol o glicerol	(Ramirez & Lorenz, 2007)
YNB Aceite de oliva/Tween 80	0,067 % Base nitrogenada de levadura (YNB) sin aminoácidos y sin $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 0,5 % Sulfato de amonio (SA), $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	-Medio para el estudio del uso de aceite de oliva como fuente de carbono -Añadir al medio previamente autoclavado una mezcla de 0,12 % de aceite de oliva con 0,2 % de Tween 80 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloranfenicol	(Stribis <i>et al.</i> , 2010)
YPD FBS	YPD + suero bovino fetal (FBS) estéril (inactivado por calor) (BioWhittaker)	-Medio YPD suplementado con suero para la inducción de la filamentación -Se esteriliza en autoclave y se añade FBS posteriormente	(Gow & Gooday, 1982)
RPMI	RPMI 1640 (BioWhittaker)	-Medio rico en aminoácidos, vitaminas y glucosa para los estudios de la adhesión <i>ex vivo</i> a mucosa intestinal	BioWhittaker
RPMI-MOPS pH=7	RPMI 1640 (BioWhittaker) MOPS 0,165 M	-Medio utilizado para los estudios de formación de biopelículas -Al medio RPMI 1640 comercial se le añaden 0,165 M MOPS y se esteriliza por filtración	Modificado de BioWhittaker
SEA	Saboraud cloranfenicol 0,65 % NaCl 1-0,5 M CaCl ₂ 0,0055 % Agar 2 %	-Medios de cultivos utilizados para el estudio de la actividad fosfolipasa -Añadir 900 mL de H ₂ O y esterilizar en autoclave -Preparar 250 mL de solución salina (0,2 % NaCl) y esterilizar en autoclave	Modificado de (Echevarría <i>et al.</i> , 2002)
MEA	Extracto malta 2 % NaCl 1-0,5 M Peptona 0,1 % Glucosa 2 % CaCl ₂ 0,055 % Agar 2 %	-Sumergir un huevo en EtOH al 70 % durante 3 horas para esterilizarlo; cuando la solución salina esté fría, añadir la yema de huevo y homogeneizar -Añadir 100 mL de solución salina con yema de huevo a los 900 mL de medio MEA o SEA -MEA: añadir 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloranfenicol	
BSA	Yeast carbon base 1,17 % YNB 0,01 % Agar 2 %	-Medio de cultivo para el estudio de actividad proteasa -Autoclavar y añadir posteriormente BSA al 0,2 % (solución esterilizada en filtro) -Añadir cloranfenicol (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Modificado de (Souza Mattei <i>et al.</i> , 2013)
LIM	Tabla 9	-Medio de cultivo utilizado para el análisis de almacenamiento y utilización de hierro	(Eide & Guarente, 1992)
YPD floxina B pH=6	2 % Glucosa 2 % Peptona 1 % Extracto de levadura	-Medio de cultivo utilizado durante la inducción del <i>switching</i> y que nos permite identificar colonias opacas y blancas -El medio se ajusta a pH=6, se esteriliza en autoclave y se añaden 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de floxina B	(Shapiro <i>et al.</i> , 2018)

Las sustancias empleadas para la suplementación de cualquiera de ellos, tanto líquidos como sólidos, se encuentran en la Tabla 8.

Tabla 8. Compuestos utilizados en este estudio.

Compuesto	Concentración	Utilidad en este trabajo
Doxiciclina	20-5 µg/mL	Antibiótico utilizado para regular el sistema TET-OFF para el control de la expresión génica
Nursotricina	200 µg/mL	Antibiótico utilizado para la selección de transformantes que portan el gen de resistencia a nursotricina (<i>SAT1</i>)
Higromicina B	400-200 µg/mL	Antibiótico utilizado para la selección de transformantes que portan el gen de resistencia a higromicina B (<i>HPH</i>)
Ampicilina	100 µg/mL	Antibiótico utilizado para la selección de transformantes en <i>E. coli</i> que portan el gen de resistencia a ampicilina (<i>bla</i>)
Cloranfenicol	20 µg/mL 4-2 mg/mL	Antibiótico. Utilizado para la selección de transformantes con el gen de resistencia a cloranfenicol (<i>CAT1</i>) y para la inhibición el crecimiento bacteriano en experimentos de colonización para cultivo de heces. Análisis de la función mitocondrial
Estreptomicina	2 mg/mL	Antibiótico utilizado para permitir la colonización de <i>C. albicans</i> en el tracto gastrointestinal de ratón
Bacitracina	1 mg/mL	Antibiótico utilizado para permitir la colonización de <i>C. albicans</i> en el tracto gastrointestinal de ratón
Gentamicina	0,1 mg/mL	Antibiótico utilizado para permitir la colonización de <i>C. albicans</i> en el tracto gastrointestinal de ratón
Floxina B	50-5 µg/mL	Colorante rojo fluorescente utilizado para detectar células con fenotipo opaco
Caspofungina	800-3,125 ng/mL	Antifúngico del grupo de las equinocandinas que inhibe la síntesis de β-(1,3)-glucanos e induce estrés oxidativo por incremento de ROS. Utilizado para generar estrés de pared celular y oxidativo
Fluconazol	6-2 µg/mL 0,25 mg/mL	Antifúngicos del grupo de los azoles que inhibe la síntesis de ergosterol. Utilizado en experimentos colonización del TGI para eliminar la posible microbiota murina previa a la inoculación intragástrica de <i>C. albicans</i>
Miconazol	2-0,5 µg/mL	Antifúngicos del grupo de los azoles que inhibe la síntesis de ergosterol.
Blanco de calcoflúor	25 µg/mL 5 µg/mL	Fluorocromo que tiene afinidad por las moléculas de quitina en la pared celular fúngica. Utilizado para teñir quitina e inducir estrés de pared
Rojo Congo	25 µg/mL	Colorante que se une a quitina e interfiere en la síntesis de β-(1,3)-glucanos. Utilizado para inducir estrés de pared celular
Sales biliares	0,3-0,075 %	Compuestos con efecto detergente. Utilizado para observar estrés de membrana celular
SDS	0,03 %	Detergente que altera la membrana celular desnaturalizando las proteínas. Utilizado para inducir estrés de membrana celular
NaCl	2-1 M	Utilizado para generar estrés osmótico
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	5-3 mM	Utilizado para la inducción de estrés oxidativo

Menadiona	0,2 mM	Utilizado para la inducción de estrés oxidativo mediante la generación de aniones superóxido
Diamida	2,5 mM	
Arsenito sódico (As (III) NaAsO ₂)	4 mM	Utilizado para inducir estrés oxidativo
Arseniato sódico (As (V) Na ₃ AsO ₄)	9 mM	Análogo estructural del fosfato utilizado para inducir estrés oxidativo
Rojo de Nilo	5 µg/mL	Colorante rojo fluorescente lipofílico utilizado para la tinción de contenido lipídico
FeCl ₃	15-0,07 µM	Utilizado en los estudios de adquisición de hierro
BPS	250-0,25 µM 34 mg/mL	Quelante de hierro extracelular utilizado en los estudios de adquisición de hierro
CuSO ₄	6 mM	Utilizado en los estudios de adquisición de hierro
EDTA	1 mM	Quelante extracelular utilizado en la cuantificación de hierro intracelular
Sulfato de amonio ferroso	10-1 nmol	Estándar utilizado para la cuantificación de hierro intracelular
Acetato de amonio	Solución saturada	Utilizado para el ajuste de pH a 5,4 durante la cuantificación de hierro
Ascorbato sódico	38 mg/mL	Utilizado para la reducción de hierro durante su cuantificación
Antimicina A	4 µg/mL	Inhibidor de la ruta clásica de la respiración mitocondrial (CIII) utilizado en los estudios de respiración mitocondrial
Azida sódica	0,02 ‰	Inhibidor de la ruta clásica de la respiración mitocondrial (CIV) utilizado en los estudios de respiración mitocondrial
Cianuro potásico	10 mM	Inhibidor de la ruta clásica (CIV) y paralela (citocromo c oxidasa) utilizado en los estudios de respiración mitocondrial
SHAM	2 mM	Inhibidor de la ruta alternativa utilizado en los estudios de respiración mitocondrial
JC-1	1,5 µM	Fluorocromo utilizado para detectar el potencial de membrana mitocondrial

B.1. Preparación del medio LIM

El medio LIM está basado en la receta de bases nitrogenadas de Wickerham (Wickerham, 1946) con dos modificaciones de Eide y Guarente (Eide & Guarente, 1992). Las soluciones numeradas del 1 al 10 (Tabla 9) se preparan en un volumen de 50 mL en tubos Falcon y se filtran individualmente. Para preparar 500 mL de medio LIM, se añaden los volúmenes indicados en la Tabla 9 y 438 mL de H₂O Milli-Q (sistema de purificación de agua Milli-Q, Merck).

Tabla 9. Componentes del medio LIM.

Solución	Compuestos	Concentración stock	Otros	Volumen
1	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,5 M	pH=8	1 mL
2	MgSO ₄ .7H ₂ O NaCl	0,5 M 0,1 M	-	5 mL
3	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1 M	-	5 mL
4	Uridina L- histidina L-leucina L-lisina	0,04 M 0,05 M 0,076 M 0,07 M	-	5 mL
5	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,8 M	-	5 mL
6	KH ₂ PO ₄	0,1 M	-	5 mL
7	Na ₃ citrato.2H ₂ O	1 M	pH=4,2	10 mL
8	D-glucosa	0,22 M	-	25 mL
9	D-biotina Ca-pantotenato Mio-inositol Piridoxina Tiamina.HCl	0,016 mM 1,7 mM 10 mM 2 mM 1 mM	-	0,5 mL
10	H ₃ BO ₃ Cu ₂ SO ₄ .5H ₂ O KI MnCl ₂ .4H ₂ O Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 M 2 mM 5 mM 0,25 M 0,01 M 0,33 M	-	0,05 mL

2. Condiciones y métodos para ensayos fenotípicos y bioquímicos

A. Ensayos de sensibilidad y crecimiento

Los ensayos de crecimiento se llevaron a cabo en medio sólido o líquido suplementado con diferentes compuestos. Para los estudios en medio sólido mediante ensayos en dilución en gota (o *spots*), se partió de cultivos en fase estacionaria incubados O/N (aproximadamente 16 horas durante la noche), se prepararon suspensiones celulares a densidad óptica de 0,8 (teniendo en cuenta que a una D.O.=1 se estiman aproximadamente $2,5 \times 10^7$ células/mL) y se realizaron diluciones decimales seriadas. Mediante el uso de un replicador se depositaron gotas sobre medio sólido suplementado o no con los

distintos compuestos. Para los experimentos en los que es necesario generar un ambiente de microaerofilia o anaerobiosis, la incubación se llevó a cabo en jarras de anaerobiosis usando las bolsas comerciales GenBox Microaer o GenBox Anaer (Biomerieux) respectivamente. Las placas fueron escaneadas a los tiempos indicados.

Para los ensayos en medio líquido en placa multipocillo, se partió de cultivos en fase estacionaria y se diluyeron adecuadamente para depositar 10^4 células por pocillo en medio suplementado o no con los diferentes compuestos. Las D.O. de los cultivos se midieron 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 en un Bio-Rad Microplate reader 680.

La observación de colonias blancas y opacas se realizó mediante la siembra de 150 células por placa de medio YPD o YPD floxina a 10 $\mu\text{g/mL}$. Para la toma de fotografías se utilizó una lupa Wild Heerbrugg M5-46860 acoplada a una cámara digital Panasonic Lumix DMC-G1K, o se tomaron fotografías a la placa utilizando un objetivo Lumix G macro 1:2.8/30.

B. Evaluación de la cinética de crecimiento microbiano: curva de crecimiento

Para estudiar el crecimiento de los microorganismos, se partió de cultivos líquidos en YPD incubados O/N y se inocularon 10^4 células por pocillo en 180 μl de YPD. Las placas se incubaron a 37°C y 180 rpm durante 24 horas en un lector de placas multipocillo BMG LABTECH Spectrostar Nano que registra la densidad óptica por pocillo a lo largo del tiempo.

C. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La determinación de la concentración mínima inhibitoria a caspofungina se llevó a cabo en placa multipocillo. Para ello, se inocularon 10^3 células en 180 μL de YPD suplementado con cantidades decrecientes de caspofungina (800-3,125 ng/mL). Las placas se incubaron a 37°C durante 72 horas. Cada 24 horas se realizó una lectura de la absorbancia a 600 nm en el espectrofotómetro. El valor de la CMI corresponde a la mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento de la levadura y se consideró sensible o resistente en base a los datos obtenidos en la cepa silvestre control.

D. Estudios de cinéticas de caída de viabilidad en medio líquido

El análisis de la viabilidad en cinética de tiempos se llevó a cabo a partir de células en fase estacionaria de crecimiento. Se prepararon suspensiones de 10^4 células/mL en medio YPD suplementado o no con 50 o 100 ng/mL de caspofungina y se incubaron a 37°C en un agitador Thermomixer (Eppendorf). Se tomaron muestras de 10 μ L a los tiempos indicados y se depositaron en forma de gota sobre agar YPD. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C y se escanearon.

E. Detección de la actividad fosfolipasa y proteasa

Para determinar la actividad fosfolipasa y proteasa se partió de células en fase estacionaria de crecimiento, se realizó una suspensión a D.O.=1 y se depositó una gota de 2,5 μ L sobre placas de agar MEA, SEA o BSA. Las placas se incubaron durante 96 horas (MEA, SEA) o 120 horas (BSA) a 37°C en condiciones de normoxia o microaerofilia y se midieron (en mm) los halos de hidrólisis producidos en la zona de crecimiento. Las placas fueron adicionalmente escaneadas.

F. Ensayos 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 YPD suplementado o no con 5 % o 100 % de suero bovino fetal (FBS). Los cultivos se incubaron a 37°C y 180 rpm y, a los tiempos indicados, se tomaron muestras para su observación al microscopio y toma de fotografías.

G. Formación de biopelículas

La formación de biopelículas se llevó a cabo en placas multipocillo con fondo plano (Nunc MicroWell flat-bottom microplate, Thermo Scientific). Para ello se recogieron 500 μ L de cultivo O/N, las células se lavaron 2 veces con PBS (*phosphate buffered saline*) y se resuspendieron en 1 mL de medio RPMI-MOPS a una D.O. final de 0,04. Se inocularon 100 μ L de dicha suspensión por pocillo y las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C en estático. Para la observación de las biopelículas se aspiró el sobrenadante, se lavaron los pocillos con 200 μ L de PBS y se añadieron 100 μ L de PBS para evitar la desecación. Las biopelículas se observaron en microscopio usando un aumento de 20x y se tomaron fotografías al microscopio (ver técnicas de microscopía y citometría de flujo).

H. Cuantificación de hierro intracelular

La cuantificación de hierro se realizó utilizando el método colorimétrico descrito previamente (Tamarit *et al.*, 2006). Para preparar las muestras, se partió de 5 mL de cultivos O/N que, tras 3 lavados con EDTA 1 mM, se resuspendieron en 5 mL de H₂O Milli-Q. Posteriormente se determinó la D.O. y se tomaron 7 unidades de D.O. que se depositaron en un tubo Eppendorf de rosca. La concentración celular se confirmó mediante recuento celular en cámara de Neubauer. A continuación, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 3 minutos, y las células se resuspendieron en 500 µL de ácido nítrico al 3 %. Para la preparación de las soluciones estándar con concentraciones conocidas de hierro, se preparó una solución de sulfato de amonio ferroso (FAS) al 0,1 M en 0,1 N HCl y se diluyó 100 veces en H₂O Milli-Q. La solución final de FAS se utilizó para preparar las soluciones con concentraciones de 1 a 10 nmol en ácido nítrico al 3 % en un volumen final de 500 µL, que se depositaron en los correspondientes tubos Eppendorf con rosca. El blanco se preparó con 500 µL de ácido nítrico al 3 %. Las muestras, las soluciones estándar y el blanco se incubaron durante 16 horas a 98°C en un termobloque (Accublock Labnet) con las tapas cerradas para evitar la evaporación de las muestras.

Al día siguiente las levaduras digeridas se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos, transfiriéndose 400 µL del sobrenadante a un tubo Eppendorf normal. Finalmente, se adicionó a todas las muestras 300 µL de H₂O Milli-Q, 160 µL de ascorbato sódico a 38 mg/mL y 126 µL de acetato de amonio de una solución diluida 1/3 a partir de una saturada en H₂O Milli-Q. Se midió la absorbancia a 535 y a 680 nm utilizando como blanco ácido nítrico al 3 %. Posteriormente se añadió a todos los tubos Eppendorf 15 µL del quelante de hierro BPS a 34 mg/mL, se mezcló el contenido y se volvió a medir absorbancia a las mismas longitudes de onda utilizando el blanco con BPS. El acetato de amonio y el ascorbato sódico se utilizan para obtener un pH de 5,4 y reducir el hierro respectivamente, donde la absorbancia a 535 nm de los complejos BPS-Fe es máxima. Para calcular la concentración de hierro se utilizó la siguiente fórmula donde se introducen las lecturas de absorbancia obtenidas:

X (absorbancia) =

$$[(OD_{535}-OD_{680})_{\text{muestra+BPS}} - (OD_{535}-OD_{680})_{\text{muestra}}] - [(OD_{535}-OD_{680})_{\text{blanco+BPS}} - (OD_{535}-OD_{680})_{\text{blanco}}]$$

Las lecturas del estándar se comparan con las de los sobrenadantes de las cepas para cuantificar el hierro intracelular y se expresa en pmol de hierro/10⁶ células. La preparación del material y el ensayo

se llevaron a cabo en material de plástico para evitar la contaminación con hierro presente en otros materiales.

I. Inducción de la transición célula blanca a célula opaca

Para inducir la transición, se prepararon suspensiones a partir de células en fase estacionaria (incubadas O/N) y se realizaron diluciones seriadas en PBS estéril para poder sembrar por extensión en superficie aproximadamente 250-300 células/placa en agar YPD a pH=6 suplementado con 5 µg/mL de floxina B. Las placas se incubaron en oscuridad tapadas con papel de aluminio a 28°C con 5 % CO₂ durante 3 días. Se realizó un recuento diferencial de colonias que presentaban color rosa intenso (opacas), blanco, rosa claro o con sectores rosas y blancos y se tomaron fotografías a la lupa.

3. Construcción de cepas genéticamente modificadas

A. Descripción del sistema de regulación por tetraciclina

Las construcciones genéticas empleadas para la expresión de *WOR1* y *RFP* se basan en un sistema de expresión regulado por tetraciclina en su versión reprimible (TET-OFF) (Eckert & Muhlschlegel, 2009). El sistema está formado por un transactivador reprimible por doxiciclina (*cartTA*) que está compuesto por el represor Tet (*TetR*), originario de *E. coli*, fusionado a la proteína VP16 del virus *Herpes simplex*. El promotor regulado por este sistema es un derivado del promotor *OP4* con siete repeticiones de la secuencia operador (*tetO*) (Park & Morschhauser, 2005). En ausencia de doxiciclina, el transactivador se une a *tetO* y se activa la expresión del gen de interés, mientras que en presencia de doxiciclina, esta se une al transactivador provocando que se disocie del promotor e inhibiendo la expresión de los genes que regula.

En este trabajo, las concentraciones de doxiciclina y los tiempos de incubación se han adaptado a cada experimento y varían entre 5-20 µg/mL, 37°C de temperatura e incubaciones de 24 o de 48 horas de manera rutinaria a menos que se indique lo contrario.

B. Obtención de cepas control

B.1. Marcaje fluorescente de cepas

Para construir cepas control que producen la proteína roja fluorescente RFP, se había generado con anterioridad el plásmido pNRUX-RFP (Figura 74A) (Prieto *et al.*, 2017). Dicho vector permite la expresión regulada de *RFP* mediante el sistema TET-OFF, pero permite alcanzar mayores niveles de expresión mediante la utilización del promotor *TDH3* para el control de la expresión del transactivador. Tiene como marcador de selección el gen *URA3*. La construcción se integró en el genoma de la cepa CAI4 y la selección de transformantes se llevó a cabo en MM sin uracilo. Para el marcaje fluorescente de los mutantes *icl1* y *flo8*, se utilizaron los vectores pNIM1R-RFP o pNIM1R-GFP (Prieto *et al.*, 2014) (Figura 74B y C respectivamente), que disponen de un marcador de selección dominante *SAT1* que confiere resistencia a nirsotricina, ya que estos mutantes no son auxótrofos para uracilo. La selección de transformantes, por lo tanto, se llevó a cabo en YPD suplementado con 200 µg/mL de nirsotricina. Ambos plásmidos poseen regiones homólogas al locus *ADH1* de *C. albicans* para su integración por recombinación homóloga tras su digestión con las enzimas *Kpn I* y *Sac II*. La elección del control dependerá de las necesidades del experimento a lo largo de este trabajo.

Tras 48 horas de incubación a 37°C, se reaislaron los clones que presentaban coloración rojiza y se verificó la producción de RFP mediante *western blot* utilizándose un anticuerpo anti dsRed (conejo), que reconoce la proteína RFP, con un tamaño teórico de ~24 kDa, y el anticuerpo secundario IRDye 800CW anti-conejo (datos no mostrados). La presencia de GFP en los transformantes se llevó a de la misma manera, pero utilizando el anticuerpo primario GFP-JL8 (ratón) y el correspondiente anticuerpo secundario IRDye 800CW anti-ratón, detectándose la banda de tamaño teórico de ~27 kDa. La detección de las proteínas se llevó a cabo por el sistema fluorescente Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR) (datos no mostrados). Asimismo, las células fueron observadas al microscopio de fluorescencia utilizando el filtro verde (RFP) o azul (GFP).

B.2. Cepas con la versión vacía de la construcción

Para la obtención de las otras cepas controles se utilizaron las versiones de los vectores mencionados pero sin *RFP*, los cuales se denominan pNRUe o pNIM1RXe (*e* de *empty*) (Figura 74D y E respectivamente). Dichos vectores, tras su digestión previa con *Kpn I* *Sac II*, fueron integrados en el genoma de las cepas CAI4 e *icl1* (pNRUe) y SN250, *sef1*, *sfu1*, CAI4-2-CIp10 y *hap43* (pNIM1RXe),

seleccionándose los transformantes MM sin uracilo, en caso de CAI4, o en medio YPD suplementado con 200 µg/mL de nirsotricina para el resto de las cepas.

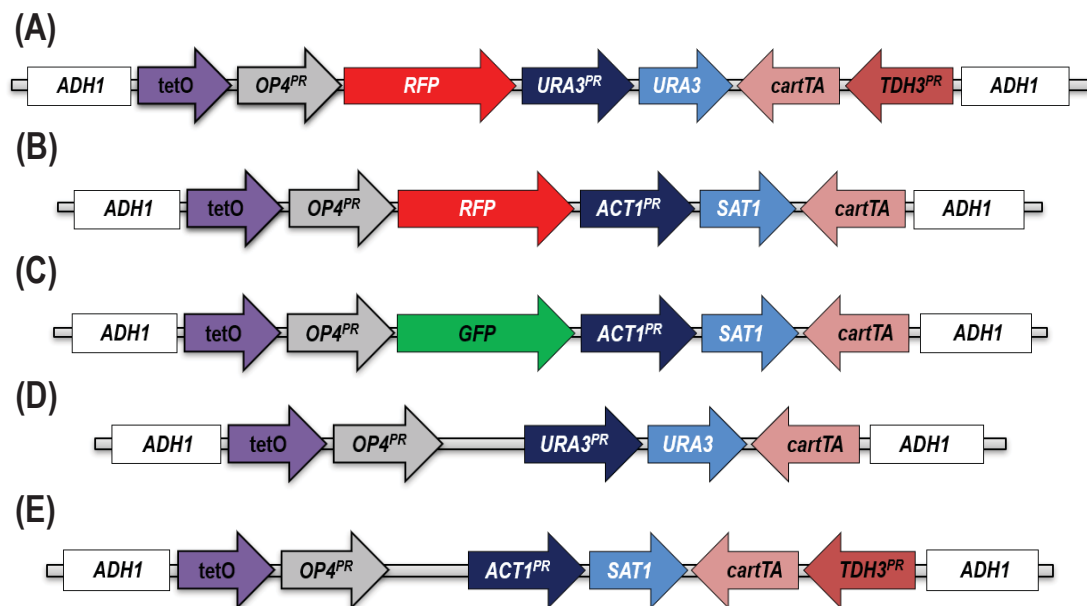


Figura 74. Fragmentos de integración para la obtención de cepas control.

Esquema de componentes que se integran en el locus *ADH1* de los plásmidos control. (A) pNRUX-RFP, (B) pNIM1R-RFP, (C) pNIM1R-GFP, (D) pNRUe y (E) pNIM1RXe.

C. Obtención de cepas que sobreexpresan *WOR1*

Para este trabajo se han utilizado dos tipos de construcciones para regular por el sistema reprimible por tetraciclina la expresión ectópica de *WOR1*. Los plásmidos difieren en el marcador de selección de transformantes, pero ambos se integran en la región *ADH1* del genoma las cepas que se mencionan a continuación.

Por un lado, se utilizó el plásmido pNRUX-WOR1-myc (Figura 75A) (Prieto *et al.*, 2017) que contiene el gen *WOR1* fusionado a la secuencia myc (Ca-myc en la figura), posee el marcador de auxotrofia *URA3* y la expresión del transactivador se encuentra regulada por el promotor constitutivo *TDH3*. La construcción se integró en el genoma de la cepa CAI4 y la selección de transformantes se llevó a cabo en MM sin uracilo.

Con el objetivo de obtener el mismo sistema reprimible por tetraciclina, pero en un vector con el marcador de resistencia *SAT1*, se procedió a la construcción del vector denominado

pNIM1RX-WOR1-myc (Figura 75B). Por un lado, el plásmido pNRUX-WOR1-myc fue digerido con las enzimas de restricción *Sal* I y *Not* I para obtener el fragmento *WOR1-myc*. Por otro lado, el plásmido pNIM1RX-RFP (Roman *et al.*, 2019) fue digerido con *Sal* I y *Not* I para liberar el fragmento *RFP*, y reemplazarlo por el fragmento *WOR1-myc*. La construcción pNIM1RX-WOR1-myc se integró en el genoma de las cepas SN250, *sef1*, *sfu1*, CAI4-2-Clp10 y *hap43* y la selección de transformantes se llevó a cabo en medio YPD suplementado con 200 µg/mL de nurosticina.

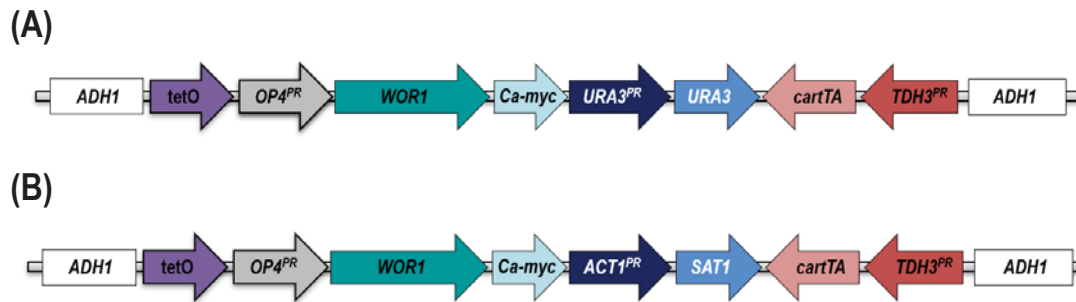


Figura 75. Fragmentos de integración para la sobreexpresión de *WOR1*.

Esquema de componentes de los plásmidos para la sobreexpresión de *WOR1*. (A) pNRUX-WOR1-myc y (B) pNIM1RX-WOR1-myc.

La comprobación de la producción de la proteína de fusión Wor1-myc (de tamaño teórico de ~89 kDa) se llevó a cabo por *western blot* en ambos casos. Para ello se utilizó el anticuerpo primario anti-myc (ratón) y el anticuerpo secundario IRDye 800CW anti-ratón, y se reveló por el sistema fluorescente Odyssey Infrared Imaging System. En primer lugar, se hizo un primer cribaje de clones mediante *dot blot* usando como control positivo una proteína que esté fusionada al epítipo myc (datos no mostrados). Después, estos clones se incubaron en YPD líquido suplementado o no con 20 µg/mL de doxiciclina para reprimir la expresión de *WOR1* y se realizó un *western blot* para comprobar la expresión/represión del sistema. La comprobación de la producción de Wor1-myc en las cepas con la construcción pNRUX-WOR1-myc se realizó con anterioridad en nuestro grupo, mientras que la comprobación de las cepas que poseen la construcción pNIM1RX-WOR1 se encuentra en la Figura 76.

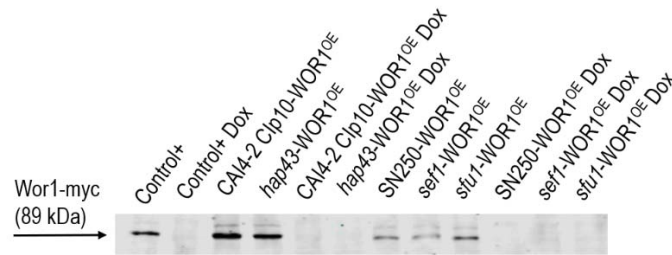


Figura 76. Análisis por western blot de la proteína Wor1-myc en los fondos genéticos CAI4-2 Clp10, *hap43*, SN250, *sef1* y *sfu1*.

A partir de cultivos O/N en YPD +/- Dox, se obtuvieron los extractos proteicos citoplasmáticos de las células y se realizó la inmunodetección de Wor1-myc utilizando el anticuerpo Anti-myc. El control positivo corresponde a la cepa CAI4-WOR1^{OE} +/- Dox.

4. Técnicas de biología molecular

A. Plásmidos y oligonucleótidos

Los plásmidos y los oligonucleótidos usados se recogen en la Tabla 10 y Tabla 11 respectivamente.

Tabla 10. Lista de plásmidos usados en este estudio.

Plásmido	Características	Referencia
pNRUe	<i>bla ADH1^{PR} ca-tTA-R URA3 tetO OP4^{PR} ADH1^{term}</i>	(Roman <i>et al.</i> , 2016)
pNRUX-RFP	<i>bla ^{PR}TDH3 ca-tTA-R URA3 tetO OP4^{PR} RFP ADH1^{term}</i>	(Prieto <i>et al.</i> , 2017)
pNRUX-WOR1-myc	<i>bla TDH3 ca-tTA-R URA3 tetO OP4^{PR} WOR1-myc ADH1^{term}</i>	(Prieto <i>et al.</i> , 2017)
pNIM1RXe	<i>bla TDH3^{PR} ca-tTA-R SAT1 tetO OP4^{PR} ADH1^{term}</i>	Este trabajo
pNIM1RX-WOR1-myc	<i>bla TDH3^{PR} ca-tTA-R SAT1 tetO OP4^{PR} WOR1-myc ADH1^{term}</i>	Este trabajo
pNIM1R-RFP	<i>bla ADH1^{PR} ca-rtTA URA3 tetO OP4^{PR} RFP ADH1^{term}</i>	(Prieto <i>et al.</i> , 2014)
pNIM1R-GFP	<i>bla ADH1^{PR} ca-rtTA URA3 tetO OP4^{PR} GFP ADH1^{term}</i>	(Prieto <i>et al.</i> , 2014)
pGEM-T	<i>bla T7^{PR} LacZ SP6^{PR}</i>	Promega
pGEM-T-PXP2M	<i>bla PXP2M</i>	Este trabajo
pDHM0-GFP-myc	<i>cat MoGFP-myc HIS1 ADH1^{term}</i>	E. Román, sin publicar
pAS0-RFP	<i>bla ADH1^{PR} ca-tTA-R SAT1 OP4^{PR} RFP ADH1^{term}</i>	E. Román, sin publicar
pAS0-GFP-myc	<i>bla ADH1^{PR} ca-tTA-R SAT1 OP4^{PR} GFPmyc ADH1^{term}</i>	Este trabajo
pAS0-GFP-PXP2M	<i>bla ADH1^{PR} ca-tTA-R SAT1 OP4^{PR} GFP-myc-PXP2M ACT1^{term}</i>	Este trabajo
pAS3-fRFP	<i>bla ADH1^{PR} ca-tTA-R SAT1 TDH3^{PR} RFP ACT1^{term}</i>	D. Prieto, sin publicar

pAS3-GFP-PXP2M	<i>bla ADH1^{PR} ca-tTA-R SAT1 TDH3^{PR} GFP-myc-PXP2M ACT1^{term}</i>	Este trabajo
pDARD1	<i>cat MAL2^{PR} FLP ACT1^{PR} SAT1</i>	(Arana <i>et al.</i> , 2007)
pDS3-GFP-PXP2M	<i>cat ACT1^{PR} SAT1 TDH3^{PR}-GFP-myc-PXP2M ACT1^{term}</i>	Este trabajo
pDUP3-HygB	<i>bla ca-TEF2^{PR} HPH</i>	E. Román, sin publicar
pNTHg-FLO8	<i>bla ca-TEF2^{PR} HPH FLO8^{PR} FLO8</i>	Este trabajo

Tabla 11. Lista de oligonucleótidos usados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Utilidad
o-ACTQTup	TGGTGGTTCTATCTTGGCTTCA	RT-qPCR <i>ACT1</i>
o-ACTQTlw	ATCCACATTTGTTGGAAAGTAGA	
Left Primer-WOR1	CAAATATGGCAGTGAATTCAAGTT	RT-qPCR <i>WOR1</i>
Right Primer-WOR1	TGGCATGGGTTTCATATTCG	
Left Primer-EFG1	ACAACCAACAACAACAGGCA	RT-qPCR <i>EFG1</i>
Right Primer-EFG1	GCAACAACACTGCAGCCAAT	
up-qPCR-ALS3	CTAATGCTGCTACGTATAATT	RT-qPCR <i>ALS3</i>
rev-qPCR-ALS3	CCTGAAATTGACATGTAGCA	
up-qPCR-HWP1	TGGTGCTATTACTATTCCGG	RT-qPCR <i>HWP1</i>
rev-qPCR-HWP1	CAATAATAGCAGCACC GAAG	
up-qPCR-ECE1	TCAGCTGAATCTGCTTTGAAAGA	RT-qPCR <i>ECE1</i>
rev-qPCR-ECE1	GTGCTACTGAGCCGGCATC	
up-qPCR-EAP1	CTGCTCACTCAACTTCAATTGTGC	RT-qPCR <i>EAP1</i>
rev-qPCR-EAP1	GAACACATCCACCTTCGGGA	
up-qPCR-ALS6	TTCGGATACCAGCATTAGCTCA	RT-qPCR <i>ALS6</i>
rev-qPCR-ALS6	CGACCCAGCATTAAATATTGCC	
o-ERG11up-QT	TTACCTCATTATTGGAGACGTGATG	RT-qPCR <i>ERG11</i>
o-ERG11lw-QT	CACCACGTTCTTCTCAGTTTAATT	
o1-PXP2	AATGCGGCCGCATGGCTATGCTTACTAA ATCTATACATGATG	Construcción <i>PXP2M</i>
o2-PXP2	CACCATCAATGGGACCAAATCCATGT	
o3-PXP2	CACCATCAATGGGACCAAATCCATGT	
o4-PXP2	GAAGCAGCTGCTAAATTATCAAGAT AATTAGATCTAAT	
M13Fw	TGTAACGACGGCCAGT	Secuenciación <i>GFP-PXP2M</i>
M13Rv	CAGGAAACAGCTATGACC	
Up-seq-fusion-GFP	GTCTTCTTGAGTTTGTACAGCTGC	
UP_FLO8Xmal	CTATCCCGGGCGCCACATAAGTAGCAACATCAGTG	Amplificación <i>FLO8</i>
LO_FLO8NotI	GTTAGCGGGCGCACCAGCAGACATGTCATATATGG	
lo_seq_FLO8	ACCAAACAAGTGTACCTTACTTGACC	Secuenciación del vector pNTHg-FLO8
UPCompNEUThyg	GCTGCAGGAATTCGATATCAAGC	Comprobación de integración en <i>NEUT</i>
o-int-NEU5L-rev	CAACTATAACCCACTGAATTCTACATCG	

B. Manipulación de DNA y RNA

B.1. DNA

El aislamiento de DNA de *E. coli*, comprobación en geles de agarosa, determinación de su concentración y pureza y las reacciones de PCR se llevaron a cabo siguiendo los protocolos estándar (Sambrook *et al.*, 1989). Las transformaciones en *E. coli* se llevaron a cabo según el procedimiento de Hanahan (Hanahan, 1985). Las integraciones de las construcciones genéticas en *C. albicans* se realizaron mediante un tratamiento químico de la pared celular seguido de un choque eléctrico en un electroporador siguiendo el protocolo desarrollado por Köhler y colaboradores (Köhler & Fink, 1996).

B.2. RNA, síntesis de cDNA y RT-qPCR

El aislamiento de RNA se realizó mediante el kit RNeasy kit (Qiagen) a partir de células en fase exponencial de crecimiento (D.O.=0,8) siguiendo las especificaciones de la casa comercial. La cuantificación y pureza del RNA obtenido se determinó en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). La síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de 1 µg de RNA y las reacciones de PCR se prepararon usando el kit PrimeScript RT (Takara). Las reacciones de RT-qPCR se prepararon usando SYBR-Green (PCR Master Mix, Roche) y se llevaron a cabo en el Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) de Genómica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UCM. Los resultados se muestran en expresión relativa respecto a la expresión de *ACT1* como gen de referencia. Se considera represión cuando el valor de la expresión relativa disminuye un mínimo de 0,5 o inducción cuando aumenta un mínimo de 2 respecto al control.

B.3. Preparación de muestras para secuenciación del genoma por el sistema NGS

Para la extracción de DNA genómico, las células fueron incubadas O/N en medio YPD hasta que alcanzaron una D.O.=10. Se recogieron 3 mL de cultivo, se centrifugó a 7500 rpm durante 10 minutos y se siguió el protocolo facilitado por el QIAamp DNA mini kit (Qiagen). Las muestras fueron analizadas mediante el sistema NGS (Illumina) en el Instituto Pasteur (París).

C. Delección génica mediante el sistema CRISPR-Cas9

Las delecciones de los genes *MTLA1* y *WOR1* se llevaron a cabo usando el sistema CRISPR transitorio (Min *et al.*, 2016, Roman *et al.*, 2019), que es una modificación del sistema descrito por Vyas (Vyas *et al.*, 2015). La ventaja de este sistema es que solo requiere que los elementos sean introducidos transitoriamente en la célula para que funcionen, mientras que el sistema de Vyas precisa de la integración en el genoma de estos elementos.

C.1. Delección de *MTLA1*

Para llevar a cabo la delección de *MTLA1* se procedió a obtener las distintas PCR para amplificar la guía de RNA sgRNA (*single guide RNA*), la endonucleasa CaCas9 y el fragmento de DNA molde reparador o RT (*Repair Template*) (Figura 77). El fragmento sgRNA, que contiene la secuencia de 20 pb específica para *MTLA1* bajo el control del promotor *SNR52* (crRNA, *CRISPR RNA*) y el tracrRNA (*trans-activating CRISPR RNA*) necesario en el sistema CRISPR-Cas9, se construyó mediante tres pasos de PCRs (Figura 77A). La PCR1 y PCR2 usan como molde el plásmido pV1093 e introducen la misma secuencia guía específica para *MTLA1* en ambos productos. La PCR1 usa los oligonucleótidos SNR52/F directo y SNR52/R_MTL1 reverso para amplificar el promotor *SNR52* e introduce la secuencia guía de 20 pb de *MTLA1*. La PCR2 usa los oligonucleótidos sgRNA/F_MTL1 directo sgRNA/R reverso para introducir los mismos 20 pb de secuencia de *MTLA1* y amplificar el sgRNA scaffold y el terminador *ENO1*. La PCR3 para construir el fragmento sgRNA utiliza los oligonucleótidos SNR52/N directo y sgRNA/N reverso y usa de moldes la PCR1 y PCR2 dado que poseen la misma secuencia guía, y, por tanto, los amplicones solapan. El fragmento CaCas9 se amplificó del plásmido pV1093 (Vyas *et al.*, 2015) usando los oligonucleótidos CaCas9/for directo y CaCas9/rev reverso (Figura 77B). Por último, el fragmento RT (Figura 77C) es utilizado para reparar el DNA tras el corte de ambas hebras realizado por la nucleasa en el lugar específico y se obtiene por amplificación usando como molde el plásmido pNIM1R-RFP. Para ello se usan los oligonucleótidos MATa1_del_F directo y MATa1_del_R reverso que amplifican el promotor *ACT1*, el marcador de resistencia *SAT1*, el terminador *URA3* y se incorporan 80 pares de bases a ambos lados del ORF de *MTLA1* para que tenga lugar la reparación por recombinación homóloga.

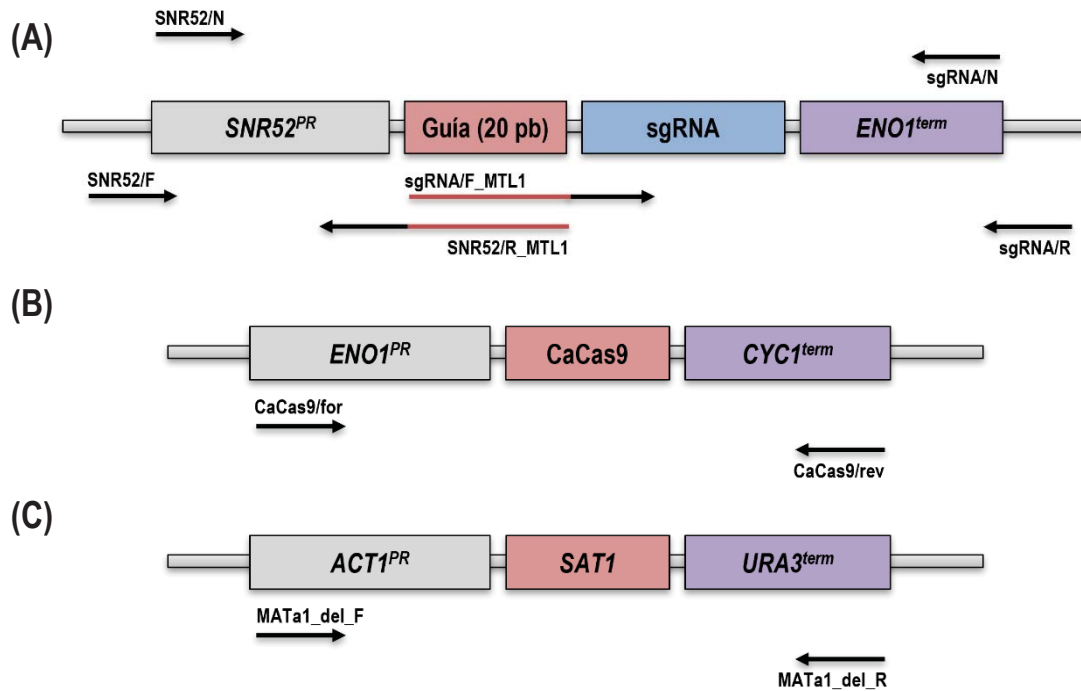


Figura 77. Esquema de los elementos del sistema CRISPR transitorio para la delección de *MTLA1*.

(A) Fragmento sgRNA. Se muestran con una flecha los oligonucleótidos correspondientes utilizados para ambas PCR (SNR52/F y SNR52/R_MTL1 y sgRNA/F_MTL1 y sgRNA/R respectivamente). En color rojo se muestra la secuencia solapante correspondiente a la secuencia guía en ambos oligonucleótidos. El fragmento final del sgRNA se obtiene mediante la PCR3 con los oligonucleótidos SNR52/N y sgRNA/N utilizando las PCR1 y PCR2 como molde. (B) Estructura del fragmento CaCas9 y (C) del molde de reparación (RT) y los correspondientes oligonucleótidos empleados para las amplificaciones.

Finalmente, los fragmentos sgRNA, CaCas9 y RT por PCR se introducen por electroporación en células de *C. albicans*. La expresión del sgRNA dirige a Cas9 a la región del genoma específica y se produce la ruptura de la doble cadena de DNA. La presencia del molde reparador (RT) con regiones homólogas a ambos lados del ORF de *MTLA1* permite la reparación del DNA por recombinación homóloga, delecionando el gen completo. Los transformantes fueron seleccionados en medio YPD suplementado con 200 µg/mL de nirsotricina. La comprobación de la delección de ambos alelos se llevó a cabo mediante PCR a partir de DNA genómico de los distintos transformantes y utilizando los oligonucleótidos oRS108 directo (hibrida dentro de la secuencia *MTLA1*), Comp_SSK1_del_F directo (dentro de la secuencia *SAT1*) y oRS109 reverso (fuera del sitio de recombinación) (datos no mostrados). La Tabla 12 recoge los oligonucleótidos utilizados.

C.2. Delección de *WOR1*

La delección de *WOR1* se llevó a cabo utilizando el mismo método, pero con los oligonucleótidos específicos para dirigir el sistema al gen *WOR1* para la obtención del sgRNA. Para la PCR1, que amplifica el promotor *SNR52* e introduce la secuencia guía de 20 pb de *WOR1*, se usaron los oligonucleótidos SNR52/F directo y SNR52/R_WOR1 reverso. La PCR2 que amplifica la secuencia guía de *WOR1* complementaria, el sgRNA scaffold y terminador *ENO1* se llevó a cabo usando los oligonucleótidos sgRNA/F_WOR1 directo y sgRNA/R reverso. Ambas PCR utilizan el plásmido PV1093 como molde. La PCR3 para la obtención del sgRNA utiliza los oligonucleótidos SNR52/N directo y sgRNA/N reverso y usa como moldes las PCR anteriores que contienen la misma secuencia guía solapante. El molde de reparación RT se amplificó usando como molde el plásmido pNIM1R-RFP y los oligonucleótidos WOR1_del_F directo y WOR1_del_R reverso. El fragmento CaCas9 se amplificó como se ha mencionado en el apartado anterior y la transformación con todos los productos de PCR se llevó a cabo en las mismas condiciones. Los transformantes se seleccionaron en medio YPD suplementado con nirsotricina. Para comprobar que la delección se había llevado a cabo, se extrajo DNA genómico de los transformantes y se llevó a cabo una PCR utilizando los oligonucleótidos Comp_WOR1_del_F directo (hibrida 80 pb por delante del extremo 5' de *WOR1*), Comp_WOR1_del_R (a 80 pb del extremo 3' de *WOR1*) y Comp_SSK1_del_F directo (dentro de la secuencia *SAT1*) (datos no mostrados). La Tabla 12 recoge los oligonucleótidos utilizados.

Tabla 12. Lista de oligonucleótidos usados para la delección de *MTLA1* y *WOR1*.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Utilidad
SNR52/F	AAGAAAGAAAGAAAACAGGAGTGAA	Amplificación del promotor <i>SNR52</i> PCR1
SNR52/R_MTL1	CTCACGCTTCAATTGTAAGACAAATTAATAAGTTTACGC AAGTC	Amplificación del promotor <i>SNR52</i> y de la secuencia <i>MTLA1</i> solapante PCR1
sgRNA/F_MTL1	TCTTACAATTGAAGCGTGAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCA AGTTAAA	Amplificación de la secuencia <i>MTLA1</i> solapante y sgRNA scaffold PCR2
SNR52/R_WOR1	CCACCAGTATAATCTGGTTCAATTAATAATAAGTTTAC GCAAGTC	Amplificación del promotor <i>SNR52</i> y de la secuencia <i>WOR1</i> solapante PCR1
sgRNA/F_WOR1	AATGAACCAGATTATACTGGTGGGTTTTAGAGCTAGAAATA GCAAGTTAAA	Amplificación de la secuencia <i>WOR1</i> solapante y del sgRNA PCR2
sgRNA/R	ACAAATATTTAACTCGGGACCTGG	Amplificación del sgRNA PCR2

SNR52/N	GCGGCCGCAAGTGATTAGACT	PCR3 solapante
sgRNA/N	GCAGCTCAGTGATTAAGAGTAAAGATGG	PCR3 solapante
CaCas9/for	ATCTCATTAGATTTGGAACCTGTGGGTT	Amplificación del fragmento CaCas9
CaCas9/rev	TTCGAGCGTCCCAAAACCTTCT	Amplificación del fragmento CaCas9
MATa1_del_F	TTTCTGCGTATTGTGATAAATAACTTTTTCCCTCTAAAA TATTGATTAGAGGCACAAAATAAAAATCACCTTCAACCCGT CAAAACAGAGAATAATAAAGAAAACG	Amplificación del fragmento RT para delección de <i>MTLA1</i>
MATa1_del_R	CCCACCAAGACATGTTACGAATAGATCTATTAGTTAGCAAT ATTCTGTTTGATAATACATACCCAAACTCTATTTGGGAGCA GGACACCTTTGATTGTAATAG	Amplificación del fragmento RT para delección de <i>MTLA1</i>
WOR1_del_F	ATCTGTCTTATATATATTTAAGGGGGTTGAAAATTTAACT GAAAACAACAATTAGTATAATTCAATTCAATATTAAGCCGTC AAAACCTAGAGAATAATAAAGAAAACG	Amplificación del fragmento RT para delección de <i>WOR1</i>
WOR1_del_R	ACACAGACCCACATATATAAGATATACCAATGTAAAAAA AACACCTGAATGAGCCCCAAAATAAACAGAATCACCGG CAGGACCACCTTTGATTGTAATAG	Amplificación del fragmento RT para delección de <i>WOR1</i>
oRS108	ATGAACTCAGAAATAGAAAGTAGC	Comprobación de la delección de <i>ICL1</i> (dentro de <i>ICL1</i>)
oRS109	CTAGGTTGAATTTGAACTTGATT	Comprobación de la delección de <i>ICL1</i> e integración de <i>SAT1</i> (fuera del sitio de recombinación)
Comp_WOR1_del_F	CCATTTACGCCGCACAAACG	Comprobación de la delección de <i>WOR1</i> (80 pb por delante del extremo 5' de <i>WOR1</i>)
Comp_WOR1_del_R	CCCAAATTTTGATTTTTTTTCAGC	Comprobación de la delección de <i>WOR1</i> (80 pb por delante del extremo 5' de <i>WOR1</i>)
Comp_SSK1_del_F	CACGTATAAACTAGACCTCAAGTCTCG	Comprobación de la integración de <i>SAT1</i> (dentro de <i>SAT1</i>)

D. Construcción de la proteína de fusión GFP-Pxp2M

Con el objetivo de obtener un marcador de peroxisomas, se procedió al marcaje fluorescente con GFP de la proteína Pxp2 que se localiza en estos orgánulos de forma específica. En primer lugar, fue necesario eliminar un punto de corte *Kpn I* en la secuencia de *PXP2*, ya que dicha enzima sería utilizada para la integración de la construcción en el locus *ADH1*. Para ello, se llevaron a cabo dos PCRs que eliminaban el sitio de restricción y una PCR solapante que utiliza como molde los fragmentos amplificados en aquellas. La PCR1 amplifica un fragmento de 1274 pb desde el inicio del ORF (sin el ATG) hasta el sitio de restricción *Kpn I* y utiliza los oligonucleótidos o1-PXP2, que incorpora un sitio de restricción *Not I*, y o2-PXP2. La PCR2 utiliza los oligonucleótidos o3-PXP2 y o4-PXP2, que incorpora un sitio de restricción *Bgl II*, y amplifica el fragmento de 948 pb a partir del punto *Kpn I* y hasta final de la secuencia, incluyendo el codón de terminación. Una vez amplificados y purificados, ambos fragmentos se utilizaron como molde para una PCR solapante (PCR3) utilizando los oligonucleótidos o1 y o4 para obtener el producto final de 2197 pb correspondiente al gen *PXP2*

sin el punto de corte *Kpn* I, que denominamos *PXP2M* (M, modificado). El producto *PXP2M* se clonó en el vector intermedio pGEM-T, obteniendo el vector pGEM-T-*PXP2M*, y la correcta secuencia *PXP2M* se analizó mediante secuenciación usando los oligonucleótidos M13Fw y M13Rv.

En segundo lugar, se procedió a obtener un vector que nos permitiera producir la proteína Pxp2M de fusión a GFP en extremo N-terminal (GFP-Pxp2M). Para la obtención de esta construcción se realizaron varios pasos. 1) El fragmento GFP-myc (1601 pb) fue obtenido del plásmido pDHM0-GFP-myc mediante la digestión con *Sal* I y *Not* I; 2) a continuación fue insertado en el vector pAS0-RFP digerido con las mismas enzimas, generándose el vector pAS0-GFP-myc; 3) el fragmento *PXP2M* (2184 pb) se obtuvo mediante la digestión del vector pGEM-T-*PXP2M* con *Bgl* II y *Not* I; 4) este fragmento se acomodó en el vector pAS0-GFP digerido con las mismas enzimas para obtener el plásmido pAS0-GFP-*PXP2M*. Para comprobar que la *GFP* entraba en fase con *PXP2*, se secuenció el plásmido utilizando el oligonucleótido up-seq-fusion-GFP; 5) a continuación, se sustituyó el promotor *OP4* del plásmido pAS0-GFP-*PXP2M* por el promotor fuerte constitutivo *TDH3*. Para ello, el fragmento *TDH3* de 1489 pb se escindió del plásmido pAS3-rRFP mediante su digestión con *Spe* I y *Xho* I y se insertó en el vector pAS0-GFP-*PXP2M*, previamente digerido con el mismo par de enzimas, generando el plásmido pAS3-GFP-*PXP2M*.

Finalmente, y dado que la construcción del sistema de expresión regulado por tetraciclina (versión *empty* o *WOR1^{OE}*) se encuentra integrado en *ADH1*, se procedió a cambiar las regiones de integración *ADH1* presentes en el vector pAS3-GFP-*PXP2M* por las del locus *ARD1*. Para ello, se digirió el plásmido pAS3-GFP-*PXP2M* con *Nsi* I y *Spe* I para obtener el fragmento TDH3-GFP-*PXP2M* (7707 pb) y clonarlo posteriormente en el plásmido pDARD1 cortado con las mismas enzimas, generando el vector final pDS3-GFP-*PXP2M* (Figura 78). Dicho vector fue digerido con las enzimas *Kpn* I y *Sac* I para dirigir su integración por recombinación homóloga en el locus *ARD1* en las cepas CAI4-pNRUe y CAI4-*WOR1^{OE}*. La selección de transformantes se llevó a cabo en medio YPD suplementado con 200 µg/mL de nirsotricina.



Figura 78. Fragmento de integración para la expresión de GFP-PXP2M.

Esquema de componentes del plásmido pDS3-GFP-*PXP2M*. En blanco se muestran las zonas homólogas a *ARD1* por donde tiene lugar la integración en el genoma. La expresión de la proteína de fusión GFP-Pxp2M se encuentra regulada por el promotor *TDH3*. En azul se muestra el marcador de selección dominante *SAT1* que confiere resistencia a nirsotricina.

La producción de la proteína de fusión GFP-Pxp2M en los transformantes se llevó a cabo y se comprobó mediante *western blot*, detectándose la banda correspondiente a la proteína quimera de tamaño teórico de ~107 kDa. Para ello se utilizó el anticuerpo primario anti-GFP-JL8 (ratón) y el correspondiente anticuerpo secundario IRDye 800CW anti-ratón para su posterior detección por el sistema fluorescente Odyssey Infrared Imaging System (Figura 79). Asimismo, las células se observaron en el microscopio de fluorescencia utilizando el filtro azul.

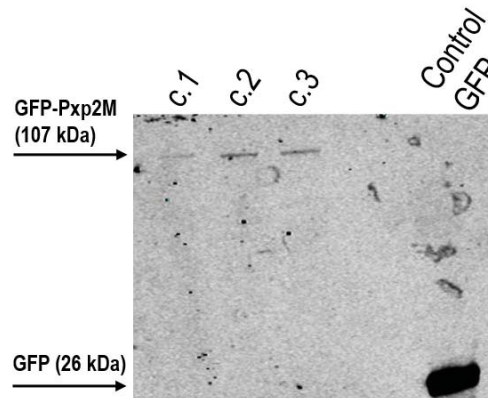


Figura 79. Patrón de expresión de GFP-Pxp2M mediante *western blot*.

A partir de cultivos crecidos O/N en YPD, se obtuvieron los extractos proteicos y se realizó una inmunodetección utilizando el anticuerpo anti-GFP-JL8. La figura muestra las bandas correspondientes a la proteína de fusión GFP-Pxp2M en tres clones (c.1, c.2 y c.3) obtenidos en la cepa CAI4-pNRUe. El extracto proteico de una cepa que expresa GFP se utilizó como control.

E. Reintegración de un alelo silvestre *FLO8*

Para llevar a cabo el estudio de fenotipos asociados a modificaciones en el gen *FLO8* se procedió a construir un plásmido para reintegrar una copia silvestre de este gen. En primer lugar, se amplificó mediante PCR el ORF de *FLO8* y 2296 pb por delante del extremo 5' (que incluye el promotor nativo de *FLO8*). Para ello se utilizaron los oligonucleótidos UP_ *FLO8*XmaI directo y LO_ *FLO8*NotI reverso, que introducen secuencias de corte *Xma* I y *Not* I en ambos extremos respectivamente, y se usó DNA genómico de la cepa SC5314 como molde. El fragmento de 5363 pb fue digerido con las enzimas de restricción *Xma* I y *Not* I y se clonó en el vector pDUP3-HygB (E. Román, sin publicar) previamente digerido con las mismas enzimas, generando el plásmido pNTHg-*FLO8* (Figura 80A). Dado que existe polimorfismo alélico en el gen *FLO8*, la secuencia del alelo amplificado se comprobó mediante

secuenciación utilizando el oligonucleótido lo_seq_FLO8, comprobando que se trataba del alelo B. Los plásmidos pNTHg-FLO8 y pDUP3-HygB (para la generación de cepas control, Figura 80B) que poseen el marcador *HPH* de resistencia a higromicina B se digirieron con *Sfi* I y las construcciones se integraron en la región genómica neutral *NEUT5L* de las cepas μ Ev y mutantes μ Ev *wor1* Δ y *flo8* Δ . La selección de clones se llevó a cabo en YPD suplementado con 400 μ g/mL de higromicina B. Para comprobar que el fragmento se había integrado correctamente, se realizó una PCR usando los oligonucleótidos UPCompNEUThyg (que hibrida en el gen *HPH*) y o-int-NEU5L-rev. Las cepas *FLO8* reintegrantes se denominaron pFLO8 y los controles eHygB (e de *empty*).

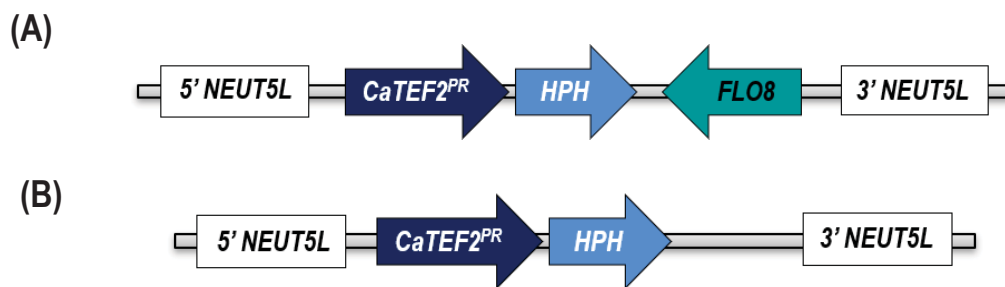


Figura 80. Fragmentos de integración para la generación de cepas *FLO8* reintegrantes y control.

Esquema de los componentes del plásmido (A) pNTHg-FLO8 y (B) pDUP3-HygB.

5. Obtención y manipulación de proteínas

A. Obtención de extractos proteicos

Los extractos proteicos para la detección de la activación de MAPK se obtuvieron a partir de cultivos O/N, que se diluyeron a D.O.=0,05 y se incubaron a 37°C en agitación hasta alcanzar la fase exponencial. A D.O.=1 se tomó una muestra inicial, y los tiempos indicados, se recogieron muestras para su posterior procesamiento. Las células se recogieron en un tubo Falcon en hielo, se centrifugaron a 2.500 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante por decantación. El pellet celular se transfirió a tubos Eppendorf y se sometieron a una segunda centrifugación a 13.000 rpm durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante con bomba de vacío, se sumergieron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su uso. Los extractos proteicos para la comprobación de la producción de

proteínas se obtuvieron a partir de cultivos O/N, se centrifugaron las células, se eliminó el sobrenadante y se conservaron de la misma manera.

Para la obtención de los extractos proteicos citoplasmáticos, las células se resuspendieron en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH=8, glicerol 10 %, Tritón-X100 1 %, SDS 0,1 %, NaCl 150 mM, NaF 50 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, β -glicerofosfato 50 mM, pirofosfato de sodio 5 mM, EDTA 5 mM pH=8, PMSF e inhibidores de proteasas) manteniéndolas en hielo durante todo el proceso. Se procedió a la rotura celular mediante perlas de vidrio (Martín *et al.*, 2000) en 5 pulsos de 30 segundos a velocidad 5,5 en una Fastprep (MP Biomedicals). Los lisados se centrifugaron a 13.000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se recogieron los sobrenadantes.

Las concentraciones de los extractos proteicos se midieron a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640. Los extractos se igualaron en concentración (aproximadamente a 100 μ g/ μ L) con buffer de carga (Tris-HCl 0,1 M pH=6,8, glicerol 20 %, SDS 4 %, 10 % DTT 1 M, azul de bromofenol), se hirvieron a 99°C durante 10 minutos para desnaturalizar las proteínas y se conservaron en hielo hasta su carga.

B. Electroforesis y transferencia

Las proteínas se separaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 % en cubetas Miniprotean (Bio-rad) con tampón Tris-glicina-SDS y a un voltaje constante de 150 V. Se utilizó el marcador de peso molecular Protein Marker VI (Panreac AppliChem). Tras su separación, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL. Amersham) en una cubeta Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-rad) con tampón Tris-glicina-SDS-metanol a un voltaje de 100 V durante 1 hora.

C. Inmunodetección

Las membranas de nitrocelulosa se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en leche desnatada al 5 % en TPBS (PBS Tween-20) para la detección por el sistema fluorescente Odyssey. Las membranas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C en agitación con el anticuerpo primario en leche desnatada al 1% en TPBS, se lavaron 3 veces con TPBS para eliminar el anticuerpo no unido y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario (diluido del mismo modo que el primario) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Los anticuerpos utilizados en este trabajo se encuentran recogidos en la Tabla 13.

Tabla 13. Lista de anticuerpos usados en este estudio.

Anticuerpo	Tipo	Utilidad y casa comercial
Anti-myc (clon 4A6)	mAc Ratón	Detección de Wor1-myc. Millipore.
dsRed	mAc Conejo	Detección de RFP. Clontech.
GFP-JL8	mAc Ratón	Detección de GFP. Clontech.
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	pAc Conejo	Detección de P-Hog1. Cell signalling Technology.
Anti-actin clone C4	mAc Ratón	Detección de actina. MP Biomedicals.
mAc (1→3)- β -glucan	mAc Ratón	Detección de β -(1,3)-glucanos. Biosupplies, Australia Pty Ltd.
IRDye 680LT anti-conejo	mAc Cabra	Anticuerpo secundario para la detección de P-Hog1. LI-COR Biosciences.
IRDye 800CW anti-ratón	Cabra	Anticuerpo secundario para la detección de Wor1-myc, actina y GFP-PXP2M. LI-COR Biosciences.
IRDye 800CW anti-conejo	Cabra	Anticuerpo secundario para la detección de RFP. LI-COR Biosciences.
Alexa 488 Anti-ratón	Ratón	Anticuerpo secundario para la detección de β -(1,3)-glucanos. Molecular Probes.

D. Identificación de proteínas por LC-MS/MS

La preparación, análisis, cuantificación e identificación de proteínas fue llevado a cabo por la Unidad de Proteómica en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

D.1. Preparación y digestión de las proteínas

Las muestras fueron extraídas siguiendo el protocolo mencionado anteriormente. Las proteínas se precipitaron con metanol/cloroformo y se resuspendieron en Urea a 8 M. Las concentraciones se cuantificaron por Bradford. Seguidamente se tomaron 100 μ g de cada muestra, se redujeron con DTT 10 mM durante 1 hora a 37°C y se llevó a cabo la reacción de alquilación con iodoacetamida a 55 mM durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. Se añadió 1/50 (p/p) de tripsina recombinante (Roche Molecular Biochemicals) en bicarbonato amónico 25 mM (pH=8,5) y se incubaron toda la noche a 37°C. Los péptidos obtenidos en cada digestión se desalaron y se concentraron mediante cromatografía de fase reversa C18 en punta (OMIX Agilent) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los péptidos eluidos se secaron por centrifugación a vacío (SpeedVac, Savant) y se reconstituyeron en 10 μ L de 2 % ACN y 0,1 % ácido fórmico respectivamente. Los péptidos fueron conservados a -20°C hasta el momento de su análisis.

D.2. Análisis e identificación de proteínas

Los péptidos se analizaron por nano-cromatografía líquida (nano Easy-nLC 1000, Thermo Scientific) acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive HF (Thermo Scientific). Los péptidos fueron concentrados por cromatografía de fase reversa usando una precolumna Acclaim PepMap 100 (Thermo Scientific, 20 mm x 75 μ m ID, C18 de 3 μ m diámetro de partícula y 100 Å de tamaño de poro) y separados en una columna analítica de fase reversa C18 Picofrit (Thermo Scientific Easy Spray Column, PepMap RSLC C18 de 500 mm x 75 μ m ID, 2 μ m de diámetro de partícula, 100 Å de tamaño de poro) con punta integrada para *spray*, operando a un flujo de 250 nl/min. Los péptidos fueron eluidos usando un gradiente desde el 2 % de Buffer A hasta el 40 % de Buffer B en 240 min. Se utilizó como Buffer A una solución al 0,1 % de ácido fórmico en agua y como Buffer B una solución al 0,1% de ácido fórmico en ACN. El nano-HPLC está acoplado a la fuente *nanoelectrospray* del espectrómetro de masas Q-exactive HF con el que se analizaron los péptidos. La entrada de los péptidos se realizó por ionización con *electrospray* utilizando la punta integrada en la columna analítica. La adquisición de datos se realizó con un voltaje de 1.8 Kv para el *electrospray* y el *ion transfer tube* que guía los iones desde el *spray* hasta el interior del espectrómetro de masas, el cual tenía una temperatura de 270°C.

Los péptidos fueron detectados con una resolución de 60.000 en modo Full scan MS en un rango de masas m/z de 350-2000 Da. Los datos MS/MS fueron adquiridos en modo de adquisición dependiente de la información (*Data-dependent acquisition* (DDA) del MS. Así, en cada *microscan*, se seleccionaron hasta 15 precursores con carga de 2+ a 6+, en función de su intensidad (*threshold*: 8×10^3), con exclusión dinámica de 27 segundos, seguidos de su aislamiento con un ancho de ventana de +/- 2 unidades de m/z , en un tiempo máximo de 120 ms para su fragmentación por HCD (*High Collision Dissociation*) con una energía de colisión normalizada del 27 %. Los espectros MS/MS se adquirieron en modo positivo. Los espectros MS/MS adquiridos en las muestras se analizaron a través del *software* Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Scientific) utilizando MASCOT como motor de búsqueda sobre la base de datos de CGD21 de <http://www.candidagenome.org/> (6213 secuencias). Los parámetros empleados en las búsquedas fueron: tolerancia del péptido precursor de 10 ppm, tolerancia del fragmento de 0,02 Da, hasta 2 puntos de corte perdidos para la tripsina permitidos, carbamidometil cisteína como modificación fija y como modificaciones variables: oxidación de metionina. Se utilizó el algoritmo Percolator para estimar el FDR (tasa de falsos positivos) y se filtró por un valor $q < 0.01$ para las proteínas identificadas con alta confianza.

D.3. Cuantificación relativa de las proteínas mediante el *software Proteome discoverer 2.2*

Para determinar las abundancias de los péptidos y las proteínas identificadas, se realiza un procesamiento que se inicia con la recalibración de las masas mediante una búsqueda rápida con Sequest HT contra la base de datos y, en base a las identificaciones obtenidas, un alineamiento de los cromatogramas de todas las muestras con una tolerancia de hasta 10 min. Posteriormente se produce el alineamiento de los tiempos de retención entre las distintas muestras analizadas para la cuantificación de los iones precursores, teniendo en cuenta los péptidos únicos y los péptidos *razor* (péptidos compartidos entre un grupo de proteínas) que estén presentes en al menos un 50% de las réplicas, sin tener en cuenta los péptidos modificados. Finalmente se normalizó la cantidad total de proteína entre las diferentes muestras utilizando la abundancia total de todos los péptidos.

D.4. Cuantificación y representación de datos

Tal y como se ha comentado anteriormente, para poder comparar la abundancia de una proteína entre muestras los datos se deben de normalizar, consiguiendo el factor de corrección adecuado para cada una de las muestras, de manera que la cantidad total de proteína sea la misma en todas. Para el análisis de las muestras de las cepas CAI4-pNRUe y CAI4-WOR1^{OE}, se realizó una comparación entre ambas cepas (acceso a la base de datos en abril del 2018), mientras que el análisis para las cepas microevolucionadas se realizó una comparación del control a tiempo 0 respecto de los distintos tiempos analizados: 90 min, 180 min y 360 min (acceso a la base de datos abril del 2019). El diseño de cuantificación fue agrupado (*non-nested*) para el primer caso, y pareado (*nested*) para el segundo caso entre cada réplica. La *ratio* de los péptidos se calculó como la mediana geométrica de la *ratio* de estos en las diferentes réplicas biológicas. Finalmente, la *ratio* de proteínas se calculó como la mediana geométrica de la *ratio* del grupo de péptidos. Para determinar si la abundancia de una proteína varía entre condiciones se aplicó la prueba estadística de Análisis de la Varianza (ANOVA) que estima la probabilidad de que estas medidas sean diferentes entre las condiciones de ensayo.

6. Obtención y detección de lípidos

A. Contenido total de lípidos por LC-HRMS

El análisis cuantitativo de lípidos fue llevado a cabo por el servicio de lipidómica del grupo de investigación de Moléculas BioActivas de Barcelona (RUBAM) del instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC/CSIC). La extracción se llevó a cabo usando un protocolo previamente descrito (Sharma *et al.*, 2012) con pequeñas modificaciones. Para la extracción de muestras se partió de células crecidas O/N en 30 mL de YPD. Se tomaron muestras de 10 mL y las células se lavaron 2 veces con H₂O Milli-Q a 2.500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se resuspendieron en 10 mL de H₂O, se midió la D.O. y se recogieron 25 unidades de densidad óptica por cepa (5 u.d.o./ tubo Eppendorf). Las células se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante por completo, y se resuspendieron en 500 µL de MeOH/0,01 % BHT que se transfirieron a un tubo Eppendorf. Se añadieron bolitas de vidrio hasta la mitad del volumen y los tubos eppendorf se sellaron con Parafilm. Las células se rompieron en FastPrep durante 8 ciclos a 5,5 durante 30 segundos con 30 segundos en hielo entre roturas. Los tubos Eppendorf se agujerearon en la base con una aguja calentada a la llama y se montaron sobre otros fríos. Se centrifugaron durante 30 segundos a 2.500 rpm para obtener los sobrenadantes, se añadieron 150 µL más y se repitió el proceso. El contenido final se fue pasando a viales de cristal para su evaporación en frío en flujo de N₂. Los viales se conservaron a temperatura ambiente hasta y durante su envío.

En la Tabla 14 se muestra la lista de patrones internos utilizados para la identificación de las especies lipídicas, concentración utilizada, relación masa/carga y tipo de iones para su detección. Además, se detalla si han sido encontrados en las muestras, el tiempo de retención (RT) durante su análisis y la concentración encontrada en cada extracto de cada cepa. Dado que no se dispone de todos los patrones internos específicos para cada lípido identificado, las concentraciones se dan en pmol equivalentes relativos al patrón más similar en cada caso. Los lípidos fueron analizados por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS) utilizando un Acquity Ultra High-performance Liquid Chromatography (UHPLC) System conectado a un detector TOF LCT Premier XE siguiendo dos protocolos previos (Simbari *et al.*, 2016, Barbacini *et al.*, 2019) mínimamente modificados. Los extractos se inyectaron en una columna Acquity UHPLC BEH C8 (1.7 µm particle size, 100 mm x 2.1 mm, Waters) a flujo de 0,3 mL/min. Las fases móviles que se utilizaron fueron (A) 2 mM formato de amonio en H₂O y (B) 0,2 % ácido fórmico dependiendo del gradiente. El

gradiente programado fue: 0.0 min: 20% (B); 3 min: 10% (B); 6 min: 10% (B); 15 min: 1% (B); 18 min: 1% (B); 20 min: 20% (B); 22 min: 20% (B).

A.1. Preparación de muestras para el análisis de fosfolípidos y lípidos no polares

El residuo seco se resuspendió en 100 μL de H_2O destilada y 750 μL de 2:1 MeOH/cloroformo junto con los patrones internos (Avanti Polar Lipids) y se pasó a un nuevo vial. Para evitar la pérdida de muestra, se vuelven a añadir 750 μL de una solución 2:1 MeOH/cloroformo al tubo, se somete a sonicación y se transfieren al nuevo vial. La muestra se incubó O/N a 48°C en agitación en baño termoestático. Al día siguiente, se evaporó el contenido en un concentrador SpeedVac y las muestras se guardaron a -80°C hasta su análisis. La muestra se resuspendió en 200 μL de MeOH, se centrifugó a 9.300 rcf durante 3 minutos y se transfirieron 130 μL del sobrenadante a un vial de UPLC para la inyección y su posterior análisis.

A.2. Preparación de muestras para el análisis de esfingolípidos

A los residuos secos se les añadió 750 μL de una solución 2:1 MeOH/cloroformo, los patrones internos y se incubaron O/N a 48°C. Las muestras se atemperaron, se añadieron 75 μL de KOH 1 M en metanol y se incubaron a 37°C durante 2 horas. Se añadieron 75 μL de ácido acético 1 M, se evaporaron las muestras hasta conseguir un residuo seco y se guardaron a -80°C hasta su análisis. La muestra se resuspendió en 200 μL de MeOH, se centrifugó a 9.300 rcf durante 3 minutos y se pasaron 130 μL del sobrenadante a un vial de UPLC para la inyección análisis.

Tabla 14. Lista de patrones internos usados e identificación de estos en el análisis de las muestras. En verde destacan los IS encontrados en las muestras CAI4-pNRUe y CAI4-WOR1^{OE} con sus respectivas cuantificaciones. IS: internal standard; SP: esfingolípido; GP: glicerofosfolípido; GL: glicerolípido; ST: estero; FA: ácido graso; Cer: ceramida; SM: esfingomielina; GlcCer: glucosilceramida; CTH: Ceramide Trihexoside; PC: fosfatidilcolina; LPC: lisofosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; LPE: lisofosfatidiletanolamina; PS: fosfatidilserina; LPS: liso fosfatidilserina; PG: fosfatidilglicerol; LPG: lisofosfatidilglicerol; MAG: monoacilglicerol; DAG: diacilglicerol; TAG: diacilglicerol; CE: colesterol esterificado; m/z: masa/carga; RT: tiempo de retención.

Subclase	Especie	pmol	m/z	Ion	RT (min)	CAI4-pNRUe	CAI4-WOR1 ^{OE}
[SP] Sphingoid Bases	C17:0 Sphinganine IS	200	288,29	[M+H] ⁺	1,82	399,9	315,1
[SP] Sphingoid Bases	C17 Sphinganine-1-phosphate	200	368,26	[M+H] ⁺			
[SP] Ceramide	C12 Cer IS	200	482,46	[M+H] ⁺	5,29	4443,4	4877,2
[SP] Ceramide	Cer (d18:1/12:0) IS	200	526,45	[M-HOO] ⁻			
[SP] Sphingomyelin	SM (d18:1/12:0) IS	200	647,51	[M+H] ⁺			
[SP] Hexosylceramide	GlcCer (d18:1/12:0) IS	200	644,51	[M+H] ⁺			
[SP] Ceramide Trihexoside	CTH (d18:1/17:0) IS	500	1038,7	[M+H] ⁺			
[GP] Phosphatidylcholine	D31-PC(16:0/18:1) IS	200	791,78	[M+H] ⁺	8,85	7301,7	7922,6
[GP] Lyso-phosphatidylcholine	LPC (17:0) IS	100	510,36	[M+H] ⁺	2,88	1487,5	1404,3
[GP] Phosphatidylethanolamine	D31-PE (16:0/18:1) IS	133	749,73	[M+H] ⁺	8,85	4959,9	5288,5
[GP] Lyso-phosphatidylethanolamine	LPE (17:1) IS	200	466,29	[M+H] ⁺	2,44	1284,5	1207,8
[GP] Phosphatidylserine	D31-PS (16:0/18:1) IS	123	793,73	[M+H] ⁺	8,20	2257,2	2548,0
[GP] Lyso-phosphatidylserine	LPS (17:1) IS	200	510,28	[M+H] ⁺			
[GP] Phosphatidylethanolamine	D31-PE (16:0/18:1) IS	133	749,73	[M+H] ⁺	8,85	5238,7	5604,6
[GP] Lyso-phosphatidylethanolamine	LPE (17:1) IS	200	464,28	[M-H] ⁻			
[GP] Glycerophosphoglycerol	D31-PG (16:0/18:1) IS	200	778,71	[M-H] ⁻			
[GP] Lyso-Glycerophosphoglycerol	LPG (17:1)	200	495,27	[M-H] ⁻			
[GL] Monoacylglycerol	MAG(17:0) IS	145	345,30	[M+H] ⁺			
[GL] Diacylglycerol	D5-DAG (17:0/0:0/17:0) IS	166	619,60	[M+NH ₄] ⁺	11,19	6472,3	6247,5

[GL] Triacylglycerol	TAG (17:0/17:0/17:0) IS	200	866,79	[M+NH ₄] ⁺	18,01	4520,6	4260,7
[ST] Cholesteryl ester	CE (17:0) IS	156	656,60	[M+NH ₄] ⁺			
[ST] Cholesterol	Estigmasterol IS	4000	395,37	[M+H- H ₂ O] ⁺			
[FA] Fatty Acyls Carnitine	C16 D3 Carnitine	200	403,35	[M+H] ⁺			

7. Técnicas de microscopía y citometría de flujo

Los análisis por citometría de flujo se llevaron a cabo en un citómetro Guava EasyCyte usando el *software* InCyte de Millipore o en un FACScan de Becton Dickinson en el CAI de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Facultad de Ciencias Químicas de la UCM. El análisis de datos se llevó a cabo en ambos casos con el *software* FlowJo.

Para observación de células en fresco se empleó un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U con un objetivo 100X conectado a una cámara de alta resolución Hamamatsu ORCA-ER usando el *software* HCLmage. Los filtros utilizados para la observación de fluorescencia fueron Nikon UV-2A (blanco de calcoflúor y floxina B), Nikon B-2E/C (rojo de Nilo, GFP) y Nikon G-2A (RFP).

A. Tinción con floxina B

La tinción con floxina B se llevó a cabo a partir de células en fase estacionaria incubadas O/N en YPD a 37°C. Se preparó una suspensión con 10⁶ células en 1 mL de PBS y se añadieron 250 µg/mL de floxina B. Las células se incubaron durante 20 minutos en hielo y oscuridad, se lavaron 2 veces con PBS y se observaron al microscopio de fluorescencia con luz ultravioleta.

B. Tinción con rojo de Nilo

Para llevar a cabo la tinción con rojo de Nilo, se partió de cultivos incubados en YPD a 37°C O/N. Para los ensayos ± doxiciclina, las células se incubaron durante 48 horas con un pase a las 24 horas en YPD en presencia o ausencia de 10 µg/mL de doxiciclina. En ambos casos se recogieron 2,5x10⁶ células, se lavaron 2 veces con PBS, se resuspendieron en 1 mL de PBS y se incubaron con 5 µg/mL de rojo de Nilo durante 10 minutos en hielo y oscuridad. Las células se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con formaldehído al 4 %. Las células se observaron al microscopio de fluorescencia,

usando el filtro azul, o por citometría de flujo utilizando el láser azul y detectando la señal en el canal amarillo FL-2.

C. Tinción con blanco de calcoflúor

Para la tinción de quitina de la pared celular con blanco de calcoflúor se utilizaron células incubadas en YPD a 37°C O/N. 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 minutos en hielo y oscuridad. Se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con formaldehído al 4%. Las células se observaron al microscopio de fluorescencia usando el filtro ultravioleta.

D. Exposición de β -glucanos

La determinación de la exposición de β -(1,3)-glucanos en la pared celular fúngica se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia indirecta. Para ello se recogieron $1,2 \times 10^6$ células incubadas en YPD a 37°C O/N, se lavaron con 1 mL de PBS y se bloquearon con 500 µl de BSA al 1 % en PBS durante 15 minutos. Después se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal anti- β -(1,3)-glucanos diluido 1:200 en PBS BSA al 1 % durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa 488 durante 30 minutos en hielo y oscuridad. Como control positivo se utilizaron células hervidas (HK) durante 10 minutos a 99°C y se trataron de la misma manera. Las células se analizaron por citometría de flujo en el canal FL-1.

E. Determinación del potencial de membrana con JC-1

A partir de cultivos crecidos en medio YPG, se recogieron 10^6 células y se transfirieron a 1 mL de YPG atemperado a 37°C. Se añadió 1,5 µM de JC-1 y las células se resuspendieron y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en oscuridad y agitación. Las células se lavaron 2 veces con PBS y se analizaron en el citómetro de flujo en el canal FL-1 y FL-2. Las células con mitocondrias polarizadas se detectan en los canales verde y rojo, mientras que las que tienen mitocondrias con membranas despolarizadas se detectan en el verde, por lo tanto, la *ratio* en la fluorescencia roja/verde depende del potencial de membrana de las mitocondrias.

8. Ensayos con animales de experimentación

A. Modelo de colonización y procedimiento de inoculación de ratones

El modelo de colonización utilizado para este ensayo ha sido puesto a punto por nuestro grupo de investigación (Prieto *et al.*, 2014). Los ensayos de colonización se realizan sobre grupos de tres hembras de ratones C57BL/6 (Charles River Laboratories España S.A.U). Desde su llegada al animalario, pasan varios días para aclimatarse en una jaula con comida y agua. Para permitir la colonización del tracto gastrointestinal de *C. albicans*, es necesario suplementar el agua con un tratamiento antibiótico (2 mg/mL de estreptomina, 1 mg/mL de bacitracina y 0,1 mg/mL de gentamicina (Sigma)) que ha de mantenerse durante todo el experimento. 4 días antes de la inoculación, además, se incorpora en el agua un antifúngico (0,25 mg/mL fluconazol (Sigma)) para eliminar la microbiota del TGI murino, y se retira un día antes de la inoculación.

Al cuarto día (día 0) se procede a la inoculación intragástrica de las células fúngicas en los ratones de forma individual. Para ello se parte de cultivos en fase estacionaria crecidos en YPD a 37°C, se lavan 3 veces con PBS y se realiza una suspensión mixta en proporción 1:1 de las dos cepas a analizar, una de las cuales está marcada con una proteína fluorescente (GFP o RFP). La inoculación intragástrica se realiza utilizando una cánula intragástrica mediante la cual se inoculan 10^7 células de la mezcla de las dos cepas de estudio en un volumen total de 100 μ L. En días seleccionados, se toman heces de cada uno de los ratones de cada grupo, se procesan y se siembra el contenido fecal de las diluciones adecuadas permitiendo hacer un seguimiento de los niveles de colonización de las cepas mediante el recuento diferencial de colonias blancas y rojas (Figura 81).

El procesamiento de muestras y el análisis *ex vivo* se llevó a cabo en los laboratorios del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia. La experimentación animal en ratones se llevó a cabo en el CAI animalario de la Facultad de Medicina de acuerdo con el Real Decreto 1201/2005, BOE 252 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos del departamento Ministerio de la Presidencia. El modelo de comensalismo usado en estos experimentos fue aprobado por el comité de experimentación animal de la Universidad Complutense de Madrid (CEA 33-2015) y la Comunidad de Madrid de acuerdo con el Artículo 34 del RD 53/2013 (PROEX 226/15). Los tratamientos utilizados no provocan enfermedad y los procedimientos minimizaron al máximo el sufrimiento de los animales. El número de animales utilizados en cada experimento fue ajustado al mínimo por motivos éticos.

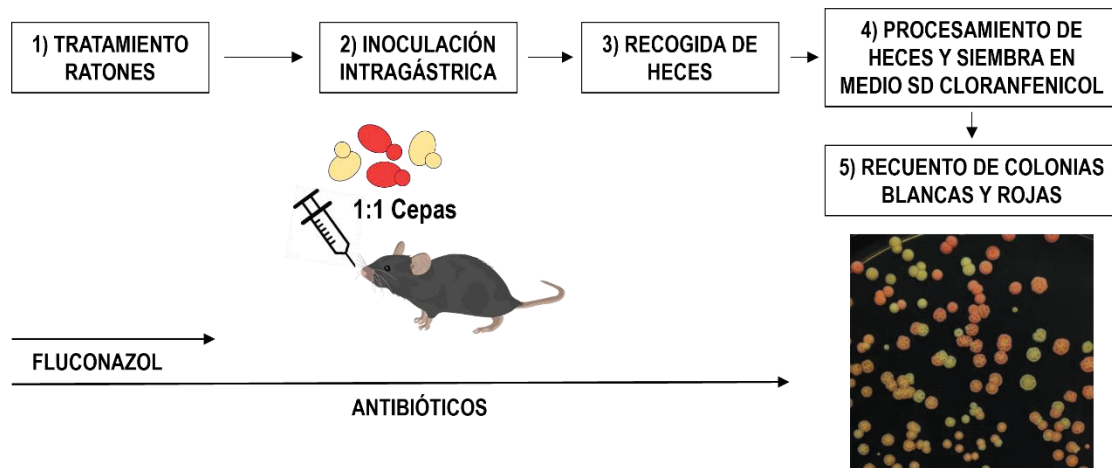


Figura 81. Esquema del modelo murino de colonización.

1) El tratamiento antibiótico comienza 4 días antes y se mantiene para permitir la colonización, mientras que el fluconazol se retira un día antes de la inoculación intragástrica. 2) Se inoculan 10^7 células (suspensión en proporción 1:1 de las cepas de *C. albicans*) con cánula intragástrica. 3) Periódicamente se recogen las heces directamente del ratón. 4) Las heces se procesan, se preparan diluciones decimales y se siembran sobre medio SD cloranfenicol ($20 \mu\text{g}/\text{mL}$). 5) Se realiza un recuento de colonias rojas y blancas y se calculan las UFCs (unidades formadoras de colonias) por gramo de heces.

B. Procesamiento de heces y cuantificación de colonias

Cada 2 o 4 días se toman muestras de heces frescas directamente desde el ratón en tubos Eppendorf estériles que han sido previamente tarados, se pesan y se ajustan con PBS estéril para obtener una concentración de muestra fecal a $40 \text{ mg}/\text{mL}$. Las heces recogidas en PBS son disgregadas mecánicamente en Fastprep durante 10 segundos a velocidad 4 (tapados con Parafilm) y se incuban durante 30 minutos a 20°C en un agitador. Para la cuantificación de colonias se realizan diluciones seriadas 1/10 en 1 mL PBS estéril de las muestras disgregadas y se siembran en el medio de cultivo adecuado según las cepas utilizadas. Para poder distinguir entre colonias rojas (que expresan *RFP*) o blancas (que expresan *GFP* o sin marcar) se utilizará el medio SD suplementado con $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ de cloranfenicol, y para seleccionar cepas en base a su resistencia a higromicina B se utilizará medio YPD suplementado con cloranfenicol a la misma concentración y suplementado o no con higromicina B a $200 \mu\text{g}/\text{mL}$. Las placas se incuban durante 2 días a 37°C y posteriormente se realiza el recuento de UFCs, permitiéndonos calcular la tasa de colonización en cada día de recogida de heces. Esta tasa se expresa como logaritmo de UFCs por gramo de heces. Tras la finalización del experimento de colonización a los ratones se les practica la eutanasia con CO_2 .

C. Obtención de muestras de contenido intestinal

Tras la finalización del experimento de colonización y posterior eutanasia, se obtiene el tracto gastrointestinal (porciones de estómago, intestino delgado proximal a distal, ciego e intestino grueso) y los contenidos son disgregados mecánicamente. Las muestras son tratadas de la misma manera para el recuento de UFCs en las distintas porciones del TGI por gramo de heces.

D. Adhesión *ex vivo* a mucosa intestinal

Para estudiar la capacidad de adhesión a mucosa intestinal se llevó a cabo el protocolo puesto a punto por nuestro grupo de investigación en el cual dos cepas compiten por adherirse (Prieto *et al.*, 2014). Las cepas a analizar se incuban O/N en medio YPD, y al día siguiente, se prepara una suspensión en proporción 1:1 de cada una de las cepas a una D.O.=1 final en medio RPMI. Se obtiene una porción de 1 cm del intestino grueso, la cual se vacía de contenido fecal y se lava con PBS para posteriormente situarla entre dos placas de metacrilato, creando un pocillo que se rellena con medio RPMI atemperado a 37°C sobre el lado que expone el lumen del intestino. Posteriormente, se retira el medio de cultivo, se añaden 10^6 células suspendidas de la mezcla en RPMI sobre la porción de intestino y se incuba durante 150 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo, el intestino se retira del metacrilato, se lava para eliminar células no adheridas y se disgrega mecánicamente. Se realizan diluciones seriadas que se plaquean sobre agar SD suplementado con 20 µg/mL de cloranfenicol y se incuban a 37°C durante 48 horas para realizar un recuento de UFCs/mL. La adhesión se expresa como un índice de adhesión relativa (IAR), que se calcula dividiendo el valor de UFCs/mL entre el porcentaje de las células adheridas y el valor del inóculo inicial.

E. Obtención de las cepas microevolucionadas

Para la obtención de estas cepas se utilizó el mismo modelo de comensalismo descrito en los ensayos de competición. El experimento comenzó 4 días antes de la inoculación mediante la administración en el agua de los ratones del tratamiento antibiótico (que se mantiene de igual manera durante el experimento) y de fluconazol (que se retira un día antes de la inoculación). A día 4 (día 0), los ratones son inoculados mediante cánula intragástrica con una cepa silvestre CAF2-RFP marcada en rojo para favorecer su identificación a lo largo del experimento y asegurarnos de que no se produzca contaminación con otra cepa fúngica. A los 20 días aproximadamente se recogen las heces de los ratones, se disgregan y se siembran sobre agar SD suplementado con 20 µg/mL de cloranfenicol.

Tras 24 horas de incubación, las colonias recogidas procedentes de todos los ratones se juntan y se guardan en glicerol al 50 % a -80°C . Estas cepas se denominaron microevolucionadas (μEv). La primera cepa μEv obtenida es inoculada en tres ratones nuevos de la misma manera, y las colonias recogidas constituyen la siguiente cepa μEv que se procesa y se guarda de la misma forma, cuyo proceso se repite varias veces tal y como se esquematiza en la Figura 82. El número que sigue al nombre μEv indica el número de días que ha pasado en el TGI del ratón, sumando los anteriores y los que ha pasado desde su nueva inoculación, hasta llegar a 366 días en total.

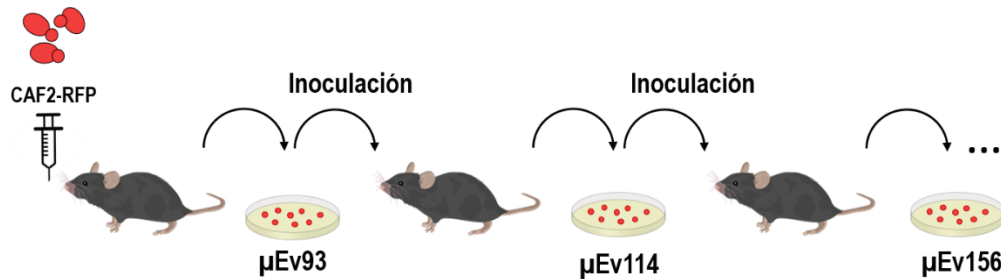


Figura 82. Esquema de la generación de cepas microevolucionadas.

La cepa CAF2-RFP es inoculada en ratones tratados con antibióticos y se recogen las heces 20 días después. La cepa $\mu\text{Ev}20$ es inoculada en un nuevo ratón pasando aproximadamente entre 20-30 días hasta que se recogen heces y se vuelve a inocular en nuevos ratones.

9. Análisis estadístico y bioinformática

El análisis estadístico y la representación en gráficos se ha realizado mediante el *software* GraphPad Prism 8. En los gráficos se representan las medias de los valores \pm el error estándar de la media (SEM) o la desviación estándar (SD) según se indique

La prueba estadística de Análisis de la Varianza (ANOVA) se utilizó para analizar la variación de la abundancia entre réplicas durante los estudios de proteómica.

Para este trabajo se han usado las siguientes bases de datos y herramientas bioinformáticas:

- *Pubmed*: base de datos con literatura científica de la Librería Nacional de medicina de Estados Unidos (NLM). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
- *Candida Genome Database (CGD)*: base de datos de secuencias genómicas, genes y proteínas de *C. albicans* y especies relacionadas. <http://www.candidagenome.org/>

- *PathoYeasttract* (*Pathogenic Yeast Search for Transcriptional Regulators and Consensus Tracking*): herramienta para la identificación y asociación entre reguladores de la transcripción y genes en especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*) utilizando la base de datos CGD. <http://pathoyeasttract.org/>
- Vector NTI: software utilizado para el diseño y análisis de plásmidos y secuencias.
- FlowJo: software para el análisis de datos de citometría de flujo. <https://www.flowjo.com/>
- Biorender: herramienta online para la creación de figuras en ciencias. <https://biorender.com/>

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Esquema de la estructura de la pared celular de <i>C. albicans</i>	33
Figura 2. Cambios morfológicos y localización en el hospedador.	35
Figura 3. Señalización y regulación de la morfogénesis en <i>C. albicans</i>	37
Figura 4. Transición wo: regulación del cambio morfológico de célula blanca a opaca.	40
Figura 5. Rutas metabólicas para la asimilación de fuentes de carbono en <i>C. albicans</i>	50
Figura 6. Expresión de mRNA de <i>WOR1</i> y <i>EFG1</i> en las cepas CAI4- <i>WOR1</i> ^{OE} y CAI4-pNRUe.	64
Figura 7. Caracterización morfológica de las cepas CAI4- <i>WOR1</i> ^{OE} y CAI4-pNRUe.	65
Figura 8. Tinción con floxina B de las cepas CAI4- <i>WOR1</i> ^{OE} y CAI4-pNRUe.	66
Figura 9. Efecto de la temperatura sobre la tinción con floxina B en las cepas CAI4-pNRUe y CAI4- <i>WOR1</i> ^{OE}	67
Figura 10. Crecimiento en YPD ± doxiciclina de las cepas CAI4- <i>WOR1</i> ^{OE} y CAI4-pNRUe.	68
Figura 11. Cambios proteómicos en <i>C. albicans</i> tras la sobreexpresión de <i>WOR1</i> en fondo silvestre.	69
Figura 12. Crecimiento en condiciones de diferente disponibilidad de oxígeno de las células <i>WOR1</i> ^{OE} y silvestres.	74
Figura 13. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de caspofungina en las cepas CAI4- <i>WOR1</i> ^{OE} y CAI4-pNRUe.	75
Figura 14. Caída de viabilidad en medio líquido en presencia de caspofungina de las cepas CAI4- <i>WOR1</i> ^{OE} y CAI4-RFP.	76
Figura 15. Sensibilidad a caspofungina en medio sólido en las cepas CAI4- <i>WOR1</i> ^{OE} y CAI4-RFP.	77
Figura 16. Exposición de β -(1,3)-glucanos en las cepas CAI4- <i>WOR1</i> ^{OE} y CAI4-pNRUe.	78
Figura 17. Efecto de la sobreexpresión de <i>WOR1</i> en la sensibilidad a fluconazol/miconazol y la expresión de <i>ERG11</i>	79
Figura 18. Sensibilidad a blanco de calcoflúor y rojo Congo y distribución de quitina en células <i>WOR1</i> ^{OE} y silvestres.	80
Figura 19. Sensibilidad a compuestos que provocan estrés de membrana en células <i>WOR1</i> ^{OE} y silvestres.	81

Figura 20. Respuesta a agentes oxidantes en las cepas CAI4-WOR1 ^{OE} y CAI4-RFP.....	82
Figura 21. Activación de Hog1 en respuesta a H ₂ O ₂ en las cepas CAI4-WOR1 ^{OE} y CAI4-pNRUe...	83
Figura 22. Crecimiento en As (III) y As (V) en células WOR1 ^{OE} y silvestres.....	84
Figura 23. Sensibilidad a estrés osmótico en las cepas CAI4-WOR1 ^{OE} y CAI4-pNRUe.....	84
Figura 24. Análisis de la filamentación en presencia de suero en las cepas CAI4-WOR1 ^{OE} y CAI4-pNRUe.....	86
Figura 25. Análisis de la estructura de biopelículas y de la morfología de células WOR1 ^{OE} y silvestres.....	88
Figura 26. Expresión de mRNA de <i>ALS3</i> , <i>HWP1</i> , <i>EAP1</i> , <i>ALS6</i> y <i>ECE1</i> en células WOR1 ^{OE} y silvestres.....	90
Figura 27. Análisis de adhesión <i>ex vivo</i> a mucosa intestinal en un mutante <i>als3</i> y la cepa silvestre CAI4-RFP.....	91
Figura 28. Co-colonización del TGI del ratón del mutante <i>als3</i> y de la cepa silvestre CAF2-RFP...	92
Figura 29. Actividad fosfolipasa en las cepas CAI4-WOR1 ^{OE} y CAI4-pNRUe.....	94
Figura 30. Actividad proteasa en las células que sobreproducen Wor1 y silvestres.....	95
Figura 31. Caracterización del crecimiento en medio con disponibilidad variable de hierro en las cepas CAI4-WOR1 ^{OE} y CAI4-pNRUe.....	97
Figura 32. Regulación de la homeostasis del hierro en <i>C. albicans</i>	98
Figura 33. Caracterización de los mutantes con defectos en la regulación de hierro que sobreproducen Wor1.....	99
Figura 34. Crecimiento en BPS y alta concentración de Fe de los mutantes en la regulación de hierro que sobreproducen Wor1.....	100
Figura 35. Crecimiento de los mutantes en la regulación del hierro y que sobreproducen Wor1 en medio con alta concentración de cobre.....	101
Figura 36. Cuantificación de hierro intracelular en una cepa silvestre, CAI4-WOR1 ^{OE} y mutantes <i>sef1</i> y <i>sfu1</i>	103

Figura 37. Esquema de las rutas respiratorias clásica, alternativa y paralela en mitocondria y los inhibidores utilizados en este trabajo.	104
Figura 38. Crecimiento en diferentes fuentes de carbono de las cepas CAI4-WOR1 ^{OE} y CAI4-pNRUe en condiciones de normoxia y microaerofilia.	105
Figura 39. Inhibición de la ruta respiratoria clásica en las cepas CAI4-WOR1 ^{OE} y CAI4-pNRUe. ...	105
Figura 40. Inhibición combinada de las rutas clásica, paralela y/o alternativa en las cepas CAI4-WOR1 ^{OE} y CAI4-pNRUe.	106
Figura 41. Crecimiento en presencia de cloranfenicol de células WOR1 ^{OE} y silvestres.	107
Figura 42. Potencial de membrana en las cepas CAI4-WOR1 ^{OE} y CAI4-pNRUe.	108
Figura 43. Tinción con rojo de Nilo de células WOR1 ^{OE} y silvestres.	110
Figura 44. Cuantificación de lípidos totales mediante LC-HRMS en las cepas CAI4-WOR1 ^{OE} y CAI4-pNRUe.	112
Figura 45. Contenido de TAG y DAG por especies moleculares.	113
Figura 46. Contenido de fosfolípidos por especies moleculares.	114
Figura 47. Observación de peroxisomas en las cepas CAI4-WOR1 ^{OE} y CAI4-pNRUe a través de la proteína GFP-Pxp2 en medio YPD y YNB aceite de oliva/Tween 80.	117
Figura 48. Crecimiento de en las cepas CAI4-WOR1 ^{OE} y CAI4-pNRUe en diferentes fuentes de carbono.	118
Figura 49. Crecimiento en fuentes de carbono fermentables y no fermentables de células mutantes <i>icl1</i> -WOR1 ^{OE} , <i>icl1</i> y reintegrante <i>ICL1</i>	119
Figura 50. Crecimiento en condiciones variables de oxígeno en los mutantes <i>icl1</i> -WOR1 ^{OE} , <i>icl1</i> y reintegrante.	120
Figura 51. Crecimiento en presencia de peróxido de hidrógeno y cloruro sódico en mutantes <i>icl1</i> -WOR1 ^{OE} , <i>icl1</i> y reintegrante.	121
Figura 52. Ensayos de co-colonización en mutantes <i>icl1</i>	122
Figura 53. Crecimiento de las cepas WOR1 ^{OE} en fondo silvestre e <i>icl1</i> sobre floxina B.	123
Figura 54. Recuento de colonias teñidas encontradas en condiciones de inducción de <i>switching</i> en el mutante <i>ilc1-mtla1</i> y cepa <i>icl1</i> pCL1- <i>mtla1</i>	125
Figura 55. Expresión de <i>WOR1</i> en las cepas microevolucionadas.	127

Figura 56. Determinación del fenotipo opaco en las cepas μ Ev mediante microscopía y tinción con floxina B.	128
Figura 57. Cambios proteómicos en las cepas μ Ev tras su paso por el TGI del ratón.	130
Figura 58. Representaciones de los análisis de ploidía y heterocigosidad en las cepas microevolucionadas.	138
Figura 59. Crecimiento en condiciones de normoxia, microaerofilia y anaerobiosis de las cepas microevolucionadas.	139
Figura 60. Crecimiento de las cepas microevolucionadas en presencia de fluconazol y miconazol.	139
Figura 61. Sensibilidad a estrés oxidativo y osmótico en las cepas microevolucionadas.	140
Figura 62. Sensibilidad a sales biliares de las cepas μ Ev.	141
Figura 63. Filamentación en presencia de suero en las cepas microevolucionadas.	142
Figura 64. Producción de fosfolipasas en las cepas μ Ev.	143
Figura 65. Producción de proteasas en las cepas microevolucionadas.	144
Figura 66. Tinción con Rojo de Nilo en las cepas microevolucionadas.	145
Figura 67. Crecimiento de las cepas μ Ev sobre diferentes fuentes de carbono.	146
Figura 68. Ensayo de competición en el TGI de ratón en cepas silvestre CAF2-GFP, μ Ev93 y μ Ev93 pFLO8.	148
Figura 69. Ensayo de filamentación en presencia de FBS en cepas CAF2-RFP, μ Ev, μ Ev <i>wor1</i> Δ y μ Ev pFLO8.	149
Figura 70. Sensibilidad a sales biliares en cepas CAF2-RFP, μ Ev <i>wor1</i> Δ y <i>FLO8</i> reintegrantes. ...	150
Figura 71. Ensayo de co-colonización en el TGI de ratón en mutantes <i>flo8</i> Δ y <i>FLO8</i> reintegrante frente a una cepa silvestre CAF2-RFP.	152
Figura 72. Ensayo de co-colonización en el TGI de ratón en mutantes <i>flo8</i> Δ y <i>flo8</i> Δ <i>FLO8</i> reintegrante.	153
Figura 73. Crecimiento en presencia de sales biliares en mutantes <i>flo8</i> Δ , <i>FLO8</i> reintegrantes y mutantes en manosiltransferasas.	154
Figura 74. Fragmentos de integración para la obtención de cepas control.	197

Figura 75. Fragmentos de integración para la sobreexpresión de <i>WOR1</i>	198
Figura 76. Análisis por <i>western blot</i> de la proteína Wor1-myc en los fondos genéticos CAI4-2 Clp10, <i>hap43</i> , SN250, <i>sef1</i> y <i>sfu1</i>	199
Figura 77. Esquema de los elementos del sistema CRISPR transitorio para la delección de <i>MTLA1</i>	203
Figura 78. Fragmento de integración para la expresión de <i>GFP-PXP2M</i>	206
Figura 79. Patrón de expresión de GFP-Pxp2M mediante <i>western blot</i>	207
Figura 80. Fragmentos de integración para la generación de cepas <i>FLO8</i> reintegrantes y control.	208
Figura 81. Esquema del modelo murino de colonización.	219
Figura 82. Esquema de la generación de cepas microevolucionadas.	221

Tabla 1. Proteínas que disminuyen en la cepa CAI4-WOR1 ^{OE} en comparación con la cepa CAI4-pNRUe.	71
Tabla 2. Proteínas que se identificaron de manera única en la cepa CAI4-WOR1 ^{OE} en comparación con la cepa CAI4-pNRUe.	72
Tabla 3. Proteínas que disminuyen en las cepas microevolucionadas en comparación con la cepa CAF2-RFP inicial.	132
Tabla 4. Proteínas que aumentaron en las cepas microevolucionadas en comparación con la cepa CAF2-RFP inicial.	134
Tabla 5. Proteínas que se encontraron de manera única y repetida en las cepas μ Ev93, μ 180 y μ Ev366 en comparación con la CAF2-RFP inicial.	136
Tabla 6. Microorganismos utilizados en este trabajo.	183
Tabla 7. Medios de cultivo usados en este estudio.	187
Tabla 8. Compuestos utilizados en este estudio.	189
Tabla 9. Componentes del medio LIM.	191
Tabla 10. Lista de plásmidos usados en este estudio.	199
Tabla 11. Lista de oligonucleótidos usados en este trabajo.	200
Tabla 12. Lista de oligonucleótidos usados para la delección de <i>MTLA1</i> y <i>WOR1</i>	204
Tabla 13. Lista de anticuerpos usados en este estudio.	210
Tabla 14. Lista de patrones internos usados e identificación de estos en el análisis de las muestras.	215

BIBLIOGRAFÍA

- A.Sorarrain (Trabajo de Fin de Máster) (2019) Relación entre la ruta del glioxilato y la adaptación al comensalismo mediada por *WOR1* en *Candida albicans*. *Máster en Microbiología y Parasitología: I+D Universidad Complutense de Madrid*.
- Albac S, Schmitz A, Lopez-Alayon C, *et al.* (2016) *Candida albicans* is able to use M cells as a portal of entry across the intestinal barrier in vitro. *Cellular Microbiology* **18**: 195–210.
- Alkafeef SS, Yu C, Huang L & Liu H (2018) *Wor1* establishes opaque cell fate through inhibition of the general co-repressor *Tup1* in *Candida albicans*. *PLoS Genet* **14**: e1007176.
- Allert S, Förster TM, Svensson C, *et al.* (2018) *Candida albicans*-induced epithelial damage mediates translocation through intestinal barriers. *mBio* **9**.
- Almeida RS, Brunke S, Albrecht A, Thewes S, Laue M, Edwards JE, Filler SG & Hube B (2008) The hyphal-associated adhesin and invasin *Als3* of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS Pathog* **4**.
- Alonso-Monge R, Navarro-Garcia F, Román E, Negredo AI, Eisman B, Nombela C & Pla J (2003) The *Hog1* mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **2**: 351-361.
- Alonso-Monge R, Navarro-Garcia F, Roman E, Negredo AI, Eisman B, Nombela C & Pla J (2003) The *Hog1* mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **2**: 351-361.
- Alonso-Monge R, Roman E, Arana DM, Prieto D, Urrialde V, Nombela C & Pla J (2010) The *Sko1* protein represses the yeast-to-hypha transition and regulates the oxidative stress response in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* **47**: 587-601.
- Alonso-Monge R, Navarro-Garcia F, Molero G, Diez-Orejas R, Gustin M, Pla J, Sanchez M & Nombela C (1999) Role of the mitogen-activated protein kinase *Hog1p* in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**: 3058-3068.
- Anderson JM & Soll DR (1987) Unique phenotype of opaque cells in the white-opaque transition of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **169**: 5579-5588.
- Arana DM, Alonso-Monge R, Du C, Calderone R & Pla J (2007) Differential susceptibility of mitogen-activated protein kinase pathway mutants to oxidative-mediated killing by phagocytes in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Microbiol* **9**: 1647-1659.
- Arevalo AV & Nobile CJ (2020) Interactions of microorganisms with host mucins: a focus on *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Rev* **44**: 645-654.
- Arvanitis M, Glavis-Bloom J & Mylonakis E (2013) Invertebrate models of fungal infection. *Biochim Biophys Acta* **1832**: 1378-1383.
- Bajpai VK, Khan I, Shukla S, Kumar P, Rather IA, Park YA, Huh I, S. & Han YS (2019) Invasive fungal infections and their epidemiology: measures in the clinical scenario. *Biotechnol Bioprocess Eng* **24**: 436-444.
- Bakshani CR, Morales-Garcia AL, Althaus M, Wilcox MD, Pearson JP, Bythell JC & Burgess JG (2018) Evolutionary conservation of the antimicrobial function of mucus: a first defence against infection. *NPJ Biofilms Microbiomes* **4**: 14.
- Balish E, Filutowicz H & Oberley TD (1990) Correlates of cell-mediated immunity in *Candida albicans*-colonized gnotobiotic mice. *Infect Immun* **58**: 107-113.
- Ballou ER, Avelar GM, Childers DS, *et al.* (2017) Lactate signalling regulates fungal β -glucan masking and immune evasion. *Nat Microbiol* **2**.
- Bambach A, Fernandes MP, Ghosh A, *et al.* (2009) *Goa1p* of *Candida albicans* localizes to the mitochondria during stress and is required for mitochondrial function and virulence. *Eukaryot Cell* **8**: 1706–1720.
- Barbacini P, Casas J, Torretta E, Capitano D, Maccallini G, Hirschler V & Gelfi C (2019) Regulation of Serum Sphingolipids in Andean Children Born and Living at High Altitude (3775 m). *Int J Mol Sci* **20**.

- Barelle CJ, Priest CL, Maccallum DM, Gow NA, Odds FC & Brown AJ (2006) Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. *Cell Microbiol* **8**: 961-971.
- Basmaciyan L, Bon F, Paradis T, Lapaquette P & Dalle F (2019) *Candida albicans* interactions with the host: crossing the intestinal epithelial barrier. *Tissue Barriers* **7**: 1612661.
- Bennett RJ & Johnson AD (2005) Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu Rev Microbiol* **59**: 233-255.
- Beopoulos A, Nicaud J & Gaillardin C (2011) An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* **90**: 1193-1206.
- Bhattacharya S, Sae-Tia S & Fries BC (2020) Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. *Antibiotics (Basel)* **9**.
- Bishop AC, Sun T, Johnson ME, Bruno VM & Patton-Vogt J (2011) Robust utilization of phospholipase-generated metabolites, glycerophosphodiester, by *Candida albicans*: role of the CaGit1 permease. *Eukaryot Cell* **10**: 1618-1627.
- Bohm L, Torsin S, Tint SH, Eckstein MT, Ludwig T & Perez JC (2017) The yeast form of the fungus *Candida albicans* promotes persistence in the gut of gnotobiotic mice. *PLoS Pathog* **13**: e1006699.
- Bongomin F, Gago S, Oladele RO & Denning DW (2017) Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *J Fungi (Basel)* **3**.
- Bradford LL & Ravel J (2017) The vaginal mycobiome: A contemporary perspective on fungi in women's health and diseases. *Virulence* **8**: 342-351.
- Braun BR (1997) Control of Filament Formation in *Candida albicans* by the Transcriptional Repressor *TUP*. *Science* **277**.
- Braun BR & Johnson AD (2000) *TUP1*, *CPH1* and *EFG1* Make Independent Contributions to Filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* **155**: 57-67.
- Braun BR, Kadosh D & Johnson AD (2001) *NRG1*, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. *The EMBO Journal* **20**: 4753-4761.
- Braun BR, Head WS, Wang MX & Johnson AD (2000) Identification and characterization of *TUP1*-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* **156**: 31-44.
- Breger J, Fuchs BB, Aperis G, Moy TI, Ausubel FM & Mylonakis E (2007) Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. *Plos Pathogens* **3**: 168-178.
- Brown DH, Jr., Giusani AD, Chen X & Kumamoto CA (1999) Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene. *Mol Microbiol* **34**: 651-662.
- Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG & White TC (2012) Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci Transl Med* **4**.
- Calderone R, Li D & Traven A (2015) System-level impact of mitochondria on fungal virulence: to metabolism and beyond. *FEMS Yeast Res* **15**: fov027.
- Canela HM, Cardoso B, Vitali LH, Colares Coelho H, Martinez R & da Silva Ferreira ME (2017) Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. *Mycoses* **61**:1-11.
- Cao F, Lane S, Raniga PP, Lu Y, Zhou Z, Ramon K, Chen J & Liu H (2006) The Flo8 transcription factor is essential for hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell* **17**: 295-307.
- Cassilly CD & Reynolds TB (2018) PS, It's complicated: the roles of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in the pathogenesis of *candida albicans* and other microbial pathogens. *J Fungi (Basel)* **4**.

- Cassilly CD, Farmer AT, Montedonico AE, Smith TK, Campagna SR & Reynolds TB (2017) Role of phosphatidylserine synthase in shaping the phospholipidome of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **17**.
- Cassone A & Sobel JD (2016) Experimental models of vaginal candidiasis and their relevance to human candidiasis. *Infection and Immunity* **84**.
- Chaffin WL (2008) *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 495-544.
- Chang WH, Liang SH, Deng FS & Lin CH (2016) The conserved dual phosphorylation sites of the *Candida albicans* Hog1 protein are crucial for white-opaque switching, mating, and pheromone-stimulated cell adhesion. *Med Mycol* **54**: 628-640.
- Chen C, Pande K, French SD, Tuch BB & Noble SM (2011) An iron homeostasis regulatory circuit with reciprocal roles in *Candida albicans* commensalism and pathogenesis. *Cell Host Microbe* **10**: 118-135.
- Chen H, Zhou X, Ren B & Cheng L (2020) The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence* **11**: 337-348.
- Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J & Fink GR (2004) Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *PNAS* **101**: 5048-5052.
- Chen YL, Montedonico AE, Kauffman S, Dunlap JR, Menn FM & Reynolds TB (2010) Phosphatidylserine synthase and phosphatidylserine decarboxylase are essential for cell wall integrity and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **75**: 1112-1132.
- Childers DS, Avelar GM, Bain JM, Larcombe DE, Pradhan A, Budge S, Heaney S & Brown AJP (2019) Impact of the environment upon the *candida albicans* cell wall and resultant effects upon immune surveillance. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **425**: 297-330.
- Ciurea CN, Kosovski IB, Mare AD, Toma F, Pinteá-Simon IA & Man A (2020) *Candida* and candidiasis-opportunism versus pathogenicity: a review of the virulence traits. *Microorganisms* **8**.
- Clemens DL, Duryee MJ, Sarmiento C, *et al.* (2018) Novel antioxidant properties of doxycycline. *Int J Mol Sci* **19**.
- Colina AR, Aumont F, Deslauriers N, Belhumeur P & de Repentigny L (1996) Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect Immun* **64**: 4514-4519.
- Conti HR, Huppler AR, Whibley N & Gaffen SL (2014) Animal models for candidiasis. *Curr Protoc Immunol* **105**: 19.6.1-19.6.17.
- Cornfield AP (2015) Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochimica et Biophysica Acta* **1850**: 236-252.
- Correia I, Wilson D, Hube B & Pla J (2020) Characterization of a *Candida albicans* mutant defective in all MAPKs highlights the major role of Hog1 in the mapk signaling network. *Journal of Fungi* **6**.
- Csank C, Schroppel K, Leberer E, Harcus D, Mohamed O, Meloche S, Thomas DY & Whiteway M (1998) Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun* **66**: 2713-2721.
- da Silva Dantas A & Day A (2015) Oxidative Stress Responses in the Human Fungal Pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules* **25**:142-65.
- Dai B, Xu Y, Gao N & Chen J (2020) Wor1-regulated ferroxidases contribute to pigment formation in opaque cells of *Candida albicans*. *FEBS Open Bio* **11**: 598-621.
- Dalle F, Wachtler B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, Labruere C, Bonnin A & Hube B (2010) Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol* **12**: 248-271.
- Davis D (2003) Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr Genet* **44**: 1-7.

- de Groot PW, Bader O, de Boer AD, Weig M & Chauhan N (2013) Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. *Eukaryot Cell* **12**: 470-481.
- de Repentigny L (2004) Animal models in the analysis of *Candida* host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* **7**: 324-329.
- Desai PR, van Wijlick L, Kurtz D, Juchimiuk M & Ernst JF (2015) Hypoxia and temperature regulated morphogenesis in *Candida albicans*. *PLoS Genet* **11**: e1005447.
- Donaldson GP, Lee SM & Mazmanian SK (2016) Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* **14**: 20-32.
- Douglas CM, D'ippolito JA, Shey GJ, *et al.* (1997) Identification of the *FKS1* gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3- β -D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 2471-2479.
- Du H, Guan G, Xie J, Cottier F, Sun Y, Jia W, Mühlischlegel FA & Huang G (2012) The transcription factor Flo8 mediates CO₂ sensing in the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Bio Cell* **23**.
- Duvenage L, Walker LA, Bojarczuk A, Johnston SA, MacCallum DM, Munro CA & Gourlay CW (2019) Inhibition of classical and alternative modes of respiration in *Candida albicans* leads to cell wall remodeling and increased macrophage recognition. *mBio* **10**.
- Echevarría A, Durante AG, Arechavala A & Negroni R (2002) Estudio comparativo de dos medios de cultivo para la detección de la actividad fosfolipasa en cepas de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol* **19**: 95-98.
- Eckert SE & Mühlischlegel FA (2009) Promoter regulation in *Candida albicans* and related species. *FEMS Yeast Res* **9**: 2-15.
- Eide D & Guarente L (1992) Increased dosage of a transcriptional activator gene enhances iron-limited growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **138**: 347-354.
- Eisman B, Alonso-Monge R, Roman E, Arana D, Nombela C & Pla J (2006) The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamyospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **5**: 347-358.
- Elorza MV, Rico H & Sentandreu R (1983) Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J Gen Microbiol* **129**: 1577-1582.
- Ene IV & Bennett RJ (2009) Hwp1 and related adhesins contribute to both mating and biofilm formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **8**: 1909-1913.
- Ene IV, Bennett RJ & Anderson MZ (2018) Mechanisms of genome evolution in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **52**: 47-54.
- Ene IV, Heilmann CJ, Sorgo AG, Walker LA, de Koster CG, Munro CA, Klis FM & Brown AJ (2012) Carbon source-induced reprogramming of the cell wall proteome and secretome modulates the adherence and drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Proteomics* **12**: 3164-3179.
- Enjalbert B, Smith DA, Cornell MJ, Alam I, Nicholls S, Brown AJ & Quinn J (2006) Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **17**: 1018-1032.
- Fan D, Coughlin LA, Neubauer MM, Kim J, Kim MS, Zhan X, Simms-Waldrup TR, Xie Y, Hooper LV & Koh AY (2015) Activation of HIF-1 α and LL-37 by commensal bacteria inhibits *Candida albicans* colonization. *Nat Med* **21**: 808-814.
- Fan Y, He H, Dong Y & Pan H (2013) Hyphae-specific genes *HGC1*, *ALS3*, *HWP1*, and *ECE1* and relevant signaling pathways in *Candida albicans*. *Mycopathologia* **176**: 329-335.
- Ferraris RP, Yasharpour S, Lloyd KC, Mirzayan R & Diamond JM (1990) Luminal glucose concentrations in the gut under normal conditions. *Am J Physiol* **259**: G822-837.

- Fidel Jr. PL, Lynch ME, Conaway DH, Tait L & Sobel JD (1995) Mice immunized by primary vaginal *Candida albicans* infection develop acquired vaginal mucosal immunity. *Infect Immun* **63**: 547-553.
- Fidel PL, Jr., Cutright J & Steele C (2000) Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun* **68**: 651-657.
- Filler SG & Sheppard DC (2006) Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Pathog* **2**: e129.
- Fonzi WA & Irwin MY (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717-728.
- Forche A, Magee PT, Selmecki A, Berman J & May G (2009) Evolution in *Candida albicans* populations during a single passage through a mouse host. *Genetics* **182**.
- Forche A, Abbey D, Pisithkul T, Weinzierl MA, Ringstrom T, Bruck D, Petersen K & Berman J (2011) Stress alters rates and types of loss of heterozygosity in *Candida albicans*. *mBio* **2**.
- Forche A, Cromie G, Gerstein AC, et al. (2018) Rapid phenotypic and genotypic diversification after exposure to the oral host niche in *Candida albicans*. *Genetics* **209**: 725-741.
- Forche A, Solis NV, Swidergall M, et al. (2019) Selection of *Candida albicans* trisomy during oropharyngeal infection results in a commensal-like phenotype. *PLoS Genet* **15**: e1008137.
- Ford CB, Funt JM, Abbey D, et al. (2015) The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *Elife* **4**: e00662.
- Fourie R, Kuloyo OO, Mochochoko BM, Albertyn J & Pohl CH (2018) Iron at the centre of *Candida albicans* interactions. *Front Cell Infect Microbiol* **8**: 185.
- Frazer C, Staples MI, Kim Y, et al. (2020) Epigenetic cell fate in *Candida albicans* is controlled by transcription factor condensates acting at super-enhancer-like elements. *Nature Microbiology*.
- Fu E, Ibrahim AS, Sheppard DC, Chen Y, French SW, Cutler JE, Filler SG & Edwards JE (2002) *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the *EFG1* filamentation pathway. *Mol Microbiol* **44**: 61-72.
- Fuchs BB, O'Brien E, El Khoury JB & Mylonakis E (2010) Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* **1**: 475-482.
- Gantner BN, Simmons RN & Underhill DM (2005) Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *The EMBO Journal* **24**: 1277-1286.
- Garbarino J & Sturley SL (2005) Homeostatic systems for sterols and other lipids. *Biochem Soc Trans* **33**: 1182-1185.
- Garcia-Sanchez S, Aubert S, Iraqui I, Janbon G, Ghigo JM & d'Enfert C (2004) *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell* **3**: 536-545.
- García MG, O'Connor JE, Latorre García L, Irar Martínez S, Herrero E & del Castillo Agudo L (2001) Isolation of a *Candida albicans* gene, tightly linked to *URA3*, coding for a putative transcription factor that suppresses a *Saccharomyces cerevisiae* aft1 mutation. *Yeast* **18**: 301-311.
- Gerwien F, Skrahina V, Kasper L, Hube B & Brunke S (2018) Metals in fungal virulence. *FEMS Microbiol Rev* **42**.
- Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A & Gillevet PM (2010) Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog* **6**: e1000713.
- 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.
- Gow NA & Gooday GW (1982) Growth kinetics and morphology of colonies of the filamentous form of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **128**: 2187-2188 2194.

- Gow NA, Brown AJ & Odds FC (2002) Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol* **5**: 366-371.
- Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ & Netea MG (2012) *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* **10**: 112-122.
- Gow NA, Netea MG, Munro CA, *et al.* (2007) Immune recognition of *Candida albicans* β -glucan by dectin-1. *J Infect Dis* **196**: 1565-1571.
- Graf K, Last A, Gratz R, Allert S, Linde S, Westermann M, Groger M, Mosig AS, Gresnigt MS & Hube B (2019) Keeping *Candida* commensal: how *Lactobacilli* antagonize pathogenicity of *Candida albicans* in an in vitro gut model. *Dis Model Mech* **12**.
- Graham CE, Cruz MR, Garsin DA & Lorenz MC (2017) Enterococcus faecalis bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: 4507-4512.
- Greenspan P, Mayer EP & Fowler SD (1985) Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* **100**: 965-973.
- Gregori C, Glaser W, Frohner IE, Reinoso-Martin C, Rupp S, Schuller C & Kuchler K (2011) Efg1 Controls caspofungin-induced cell aggregation of *Candida albicans* through the adhesin Als1. *Eukaryot Cell* **10**: 1694-1704.
- Gropp K, Schild L, Schindler S, Hube B, Zipfel PF & Skerka C (2009) The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. *Mol Immunol* **47**: 465-475.
- Guan Z & Haoping L (2015) Overlapping functions between *SWR1* deletion and H3K56 acetylation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **14**.
- Gulati M & Nobile CJ (2016) *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect* **18**: 310-321.
- Hall RA (2017) Adapting to change: interactions of *Candida albicans* with its environment. *Future Microbiol* **12**: 931-934.
- Hallen-Adams HE & Suhr MJ (2017) Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. *Virulence* **8**: 352-358.
- 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.
- Hao B, Cheng S, Clancy CJ & Nguyen MH (2013) Caspofungin kills *Candida albicans* by causing both cellular apoptosis and necrosis. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 326-332.
- Harriott MM, Lilly EA, Rodriguez TE, Fidel PL & Noverr MC (2010) *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microbiology (Reading)* **156**: 3635-3644.
- Hasim S, Allison DP, Retterer ST, Hopke A, Wheeler RT, Doktycz MJ & Reynolds TB (2017) β -(1,3)-glucan unmasking in some *Candida albicans* mutants correlates with increases in cell wall surface roughness and decreases in cell wall elasticity. *Infect Immun* **85**.
- He G, Shankar RA, Chzhan M, Samouilov A, Kuppusamy P & Zweier JL (1999) Noninvasive measurement of anatomic structure and intraluminal oxygenation in the gastrointestinal tract of living mice with spatial and spectral EPR imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4586-4591.
- Helmerhorst EJ, Murphy MP, Troxler RF & Oppenheim FG (2002) Characterization of the mitochondrial respiratory pathways in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1556**: 73-80.
- Hernday AD, Lohse MB, Nobile CJ, Noiman L, Laksana CN & Johnson AD (2016) Ssn6 defines a new level of regulation of white-opaque switching in *Candida albicans* and is required for the stochasticity of the switch. *mBio* **7**.
- Herrero de Dios C, Roman E, Pla J & Alonso Monge RA (2020) Hog1 controls lipids homeostasis upon osmotic stress in *Candida albicans*. *Journal of Fungi* **6**.

- Hidalgo-Vico S, Prieto D, Alonso-Monge R, Roman E & Pla J (2021) The glyoxylate cycle is involved in white-opaque switching in *Candida albicans*. *Journal of Fungi* **7**.
- Hirakawa MP, Chyou DE, Huang D, Slan AR & Bennett RJ (2017) Parasex generates phenotypic diversity de novo and impacts drug resistance and virulence in *Candida albicans*. *Genetics* **207**: 1195-1211.
- Hirakawa MP, Martinez DA, Sakthikumar S, *et al.* (2015) Genetic and phenotypic intra-species variation in *Candida albicans*. *Genome Res* **25**: 413-425.
- Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, Dussault P & Nickerson KW (2001) Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *App Environ Microbiol* **67**: 2982-2992.
- Hoyer LL & Cota E (2016) *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence (Als) Family vignettes: a review of Als protein structure and function. *Front Microbiol* **7**.
- Hoyer LL, Green CB, Oh SH & Zhao X (2008) Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit. *Med Mycol* **46**: 1-15.
- Huang G, Srikantha T, Sahni N, Yi S & Soll DR (2009) CO₂ regulates white-to-opaque switching in *Candida albicans*. *Curr Biol* **19**: 330-334.
- Huang G, Wang H, Chou S, Nie X, Chen J & Liu H (2006) Bistable expression of *WOR1*, a master regulator of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12813-12818.
- Huang G, Yi S, Sahni N, Daniels KJ, Srikantha T & Soll DR (2010) N-acetylglucosamine induces white to opaque switching, a mating prerequisite in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **6**: e1000806.
- Huang X, Chen X, He Y, *et al.* (2017) Mitochondrial complex I bridges a connection between regulation of carbon flexibility and gastrointestinal commensalism in the human fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **13**: e1006414.
- Hull CM & Johnson AD (1999) Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* **285**: 1271-1275.
- Hull CM, Raisner RM & Johnson AD (2000) Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* **289**: 307-310.
- I.Correia (Tesis Doctoral) (2014) Papel de las quinasas Cek1 y Cek2 en las rutas de transducción de señales mediadas por quinasas de tipo MAP de la levadura patógena *Candida albicans*.
- Ibrahim AS, Spellberg BJ, Avenissian V, Fu Y, Filler SG & Edwards Jr JE (2003) vaccination with recombinant N-terminal domain of *als1p* improves survival during murine disseminated candidiasis by enhancing cell-mediated, not humoral, immunity. *Infection and Immunity* **73**: 999-1005.
- Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR & Hube B (2012) *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther* **10**: 85-93.
- Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR & Hube B (2012) *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther* **10**: 85-93.
- Janbon G, Sherman F & Rustchenko E (1999) Appearance and properties of l-sorbose-utilizing mutants of *Candida albicans* obtained on a selective plate. *Genetics* **153**: 653-664.
- Javed J & Zahir E (2017) Thermodynamic studies of iron chelation with doxycycline in acidic medium. *Russian Journal of Physical Chemistry* **91**: 1045-1105.
- Kamai Y, Kubota M, Kamai Y, Hosokawa T, Fukuoka T & Filler SG (2001) New model of oropharyngeal candidiasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 3195-3197.
- Kapteyn JC, Hoyer LL, Hecht JE, Muller WH, Andel A, Verkleij AJ, Makarow M, Van Den Ende H & Klis FM (2000) The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* **35**: 601-611.

- Kasper L, König A, Koenig PA, *et al.* (2018) The fungal peptide toxin candidalysin activates the NLRP3 inflammasome and causes cytolysis in mononuclear phagocytes. *Nat Commun* **9**: 4260.
- Kavanaugh NL, Zhang AQ, Nobile CJ, Johnson AD & Ribbeck K (2014) Mucins suppress virulence traits of *Candida albicans*. *mBio* **5**: e01911.
- Kernien JF, Snarr BD, Sheppard DC & Nett JE (2018) The interface between fungal biofilms and innate immunity. *front immunol* **8**.
- Klis FM, de Groot P & Hellingwerf K (2001) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* **39 Suppl 1**: 1-8.
- Klug L & Daum G (2013) Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS Yeast Res* **14**: 369–388.
- Koh AY (2013) Murine models of *Candida* gastrointestinal colonization and dissemination. *Eukaryot Cell* **12**: 1416-1422.
- Köhler JR & Fink GR (1996) *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Microbiology* **93**: 13223–13228.
- Kolotila MP & Diamond RD (1990) Effects of neutrophils and in vitro oxidants on survival and phenotypic switching of *Candida albicans* WO-1. *Infect Immun* **58**: 1174-1179.
- Kondori N, Nowrouzian F, Ajdari M, Hesselmar B, Saalman R, Wold AE & Adlerberth I (2019) *Candida* species as commensal gut colonizers: A study of 133 longitudinally followed Swedish infants. *Medical Mycology*, **0**: 1-8.
- Konstantinidou N & Morrissey JP (2015) Co-occurrence of filamentation defects and impaired biofilms in *Candida albicans* protein kinase mutants. *FEMS Yeast Res* **15**.
- Kopecka M & Gabriel M (1992) The influence of congo red on the cell wall and (1-3)- β -D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **158**: 115-126.
- Kullberg BJ & Arendrup MC (2013) Invasive Candidiasis. *The New England Journal of Medicine* **373**.
- Kumamoto CA (2008) Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing. *Nat Rev Microbiol* **6**: 667–673.
- Kumamoto CA, Gresnigt MS & Hube B (2020) The gut, the bad and the harmless: *Candida albicans* as a commensal and opportunistic pathogen in the intestine. *Curr Opin Microbiol* **56**: 7-15.
- Kunyeit L, K AA & Rao RP (2020) Application of Probiotic Yeasts on *Candida* Species Associated Infection. *J Fungi (Basel)* **6**.
- Kvaal C, Lachke SA, Srikantha T, Daniels K, McCoy J & Soll DR (1999) Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1* (*SAP1*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun* **67**: 6652-6662.
- Kvaal CA, Srikantha T & Soll DR (1997) Misexpression of the white-phase-specific gene *WH11* in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. *Infect Immun* **65**: 4468-4475.
- Lamoth F & Kontoyiannis DP (2018) The *Candida auris* Alert: Facts and Perspectives. *J Infect Dis* **217**: 516-520.
- Lan C, Newport G, A. ML, Jones T, Scherer S, Davis RW & Agabian N (2002) Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *PNAS* **99**: 14907–14912.
- Lan CY, Rodarte G, Murillo LA, Jones T, Davis RW, Dungan J, Newport G & Agabian N (2004) Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **53**: 1451-1469.
- Lassak T, Schneider E, Bussmann M, Kurtz D, Manak JR, Srikantha T, Soll DR & Ernst JF (2011) Target specificity of the *Candida albicans* Efg1 regulator. *Mol Microbiol* **82**: 602-618.
- Lawley TD & Walker AW (2012) Intestinal colonization resistance. *Immunology* **138**: 1-11.
- Leng P, Lee PR, Wu H & Brown AJ (2001) Efg1, a morphogenetic regulator in *Candida albicans*, is a sequence-specific DNA binding protein. *J Bacteriol* **183**: 4090-4093.

- Levy R, Segal E & Eylan E (1981) Protective immunity against murine candidiasis elicited by *Candida albicans* ribosomal fractions. *Infect Immun* **31**: 874-878.
- Lewis LE, Bain JM, Lowes C, Gillespie C, Rudkin FM, Gow NA & Erwig LP (2012) Stage Specific Assessment of *Candida albicans* Phagocytosis by Macrophages Identifies Cell Wall Composition and Morphogenesis as Key Determinants. *PLoS Pathogens* **8**.
- Li F & Palecek SP (2003) *EAP1*, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryot Cell* **2**: 1266-1273.
- Liang SH, Anderson MZ, Hirakawa MP, Wang JM, Frazer C, Alaalm LM, Thomson GJ, Ene IV & Bennett RJ (2019) Hemizygoty enables a mutational transition governing fungal virulence and commensalism. *Cell Host Microbe* **25**: 418-431 e416.
- Lill R (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**: 831-838.
- Lionakis MS, Lim JK, Lee CC & Murphy PM (2011) Organ-specific innate immune responses in a mouse model of invasive candidiasis. *J Innate Immun* **3**: 180-199.
- Liu JY, Li WJ, Shi C, Wang Y, Zhao Y & Xiang MJ (2015) Mutations in the Flo8 transcription factor contribute to virulence and phenotypic traits in *Candida albicans* strains. *Microbiol Res* **178**: 1-8.
- Liu Y & Filler SG (2011) *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot Cell* **10**: 168-173.
- Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A & Fink GR (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**: 939-949.
- Lockhart SR, Pujol C, Daniels KJ, Miller MG, Johnson AD, Pfaller MA & Soll DR (2002) In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics* **162**: 737-745.
- Lohse MB & Johnson AD (2008) Differential phagocytosis of white versus opaque *Candida albicans* by *Drosophila* and mouse phagocytes. *PLoS One* **3**: e1473.
- Lohse MB & Johnson AD (2016) Identification and characterization of wor4, a new transcriptional regulator of white-opaque switching. *G3 (Bethesda)* **6**: 721-729.
- Lohse MB, Gulati M, Johnson AD & Nobile CJ (2018) Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol* **16**: 19-31.
- Lohse MB, Hernday AD, Fordyce PM, Noiman L, Sorrells TR, Hanson-Smith V, Nobile CJ, DeRisi JL & Johnson AD (2013) Identification and characterization of a previously undescribed family of sequence-specific DNA-binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 7660-7665.
- Lok B, Adam MAA, Kamal LZM, Chukwudi NA, Sandai R & Sandai D (2020) The assimilation of different carbon sources in *Candida albicans*: Fitness and pathogenicity. *Med Mycol*.
- Lopes JP, Stylianou M, Backman E, Holmberg S, Jass J, Claesson R & Urban CF (2018) Evasion of immune surveillance in low oxygen environments enhances *Candida albicans* virulence. *MBio* **9**.
- Lorenz MC & Fink GR (2001) The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Letters to Nature* **412**.
- Lorenz MC, Bender JA & Fink GR (2004) Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell* **3**: 1076-1087.
- Luo G (2010) *Candida albicans* Hyr1p Confers Resistance to Neutrophil Killing and Is a Potential Vaccine Target.
- Luo S, Hoffmann R, Skerka C & Zipfel PF (2013) Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 2 is a Novel Factor H-, Factor H-like Protein 1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. *The Journal of Infectious Diseases* **207**: 594-603.
- Luo S, Poltermann S, Kunert A, Rupp S & Zipfel PF (2009) Immune evasion of the human pathogenic yeast: Pra1 is a Factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein. *Mol Immunol* **47**: 541-50.

- Lv QZ, Yan L & Jiang YY (2016) The synthesis, regulation, and functions of sterols in *Candida albicans*: well-known but still lots to learn. *Virulence* **7**: 649-659.
- Lv QZ, Li DD, Han H, Yang YH, Duan JL, Ma HH, Yu Y, Chen J-Y, Jiang YY & Jia XM (2020) Priming with *FLO8*-deficient *Candida albicans* induces Th1-biased protective immunity against lethal polymicrobial sepsis. *Cell Mol Immunol* **5**.
- MacCallum DM & Odds FC (2005) Temporal events in the intravenous challenge model for experimental *Candida albicans* infections in female mice. *Mycoses* **48**: 151-161.
- MacCallum DM, Castillo L, Brown AJ, Gow NA & Odds FC (2009) Early-expressed chemokines predict kidney immunopathology in experimental disseminated *Candida albicans* infections. *PLoS One* **4**: e6420.
- Magee BB & Magee PT (2000) Induction of mating in *Candida albicans* by construction of *MTLa* and *MTL α* strains. *Science* **289**: 310-313.
- Mamouei Z, Singh S, Lemire B, Gu Y, Alqarihi A, Nabeela S, Li D, Ibrahim A & Uppuluri P (2021) An evolutionarily diverged mitochondrial protein controls biofilm growth and virulence in *Candida albicans*. *PLoS Biol* **19**: e3000957.
- Manzoni P, Mostert M, Leonessa ML, Priolo C, Farina D, Monetti C, Latino MA & Gomirato G (2006) Oral supplementation with *Lactobacillus casei* subspecies *ramnosus* prevents enteric colonization by *Candida* species in preterm neonates: a randomized study. *Clin Infect Dis* **42**: 1735-1742.
- Marcilla A, Valentin E & Sentandreu R (1998) The cell wall structure: developments in diagnosis and treatment of candidiasis. *Int Microbiol* **1**: 107-116.
- Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, Borgers M, Ramaekers FCS, Odds FC & Vanden Bossche H (1999) Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading)* **145** (Pt 10): 2701-2713.
- Martel CM, Parker JE, Bader O, Weig M, Gross U, Warrillow AG, Rolley N, Kelly DE & Kelly SL (2010) Identification and characterization of four azole-resistant *erg3* mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 4527-4533.
- Martín H, Rodríguez-Pachón JM, Ruiz C, Nombela C & Molina M (2000) Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Sit2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 1511-1519.
- Matsubara VH, Wang Y, Bandara HMHN, Mayer MPA & Samaranayake LP (2016) Probiotic lactobacilli inhibit early stages of *Candida albicans* biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**: 6415-6426.
- McDonough JA, Bhattacharjee V, Sadlon T & Hostetter MK (2002) Involvement of *Candida albicans* NADH dehydrogenase complex I in filamentation. *Fungal Genet Biol* **36**: 117-127.
- McKenzie CG, Koser U, Lewis LE, Bain JM, Mora-Montes HM, Barker RN, Gow NA & Erwig LP (2010) Contribution of *Candida albicans* cell wall components to recognition by and escape from murine macrophages. *Infect Immun* **78**: 1650-1658.
- Merritt ME & Donaldson JR (2009) Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. *J Med Microbiol* **58**: 1533-1541.
- Mestas J & Hughes CCW (2004) Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and human immunology. *J Immunol* **172**: 2731-2738.
- Mille C, Bobrowicz P, Trinel PA, et al. (2008) Identification of a new family of genes involved in beta-1,2-mannosylation of glycans in *Pichia pastoris* and *Candida albicans*. *J Biol Chem* **283**: 9724-9736.
- Mille C, Fradin C, Delplace F, et al. (2012) Members 5 and 6 of the *Candida albicans* BMT family encode enzymes acting specifically on β -mannosylation of the phospholipomannan cell-wall glycosphingolipid. *Glycobiology* **22**: 1332-1342.

- Miller MG & Johnson AD (2002) White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* **110**: 293-302.
- Min K, Ichikawa Y, Woolford CA & Mitchell AP (2016) *Candida albicans* gene deletion with a transient CRISPR-Cas9 System. *mSphere* **1**.
- Miramon P & Lorenz MC (2017) A feast for *Candida*: Metabolic plasticity confers an edge for virulence. *PLoS Pathog* **13**: e1006144.
- Miranda LN, van der Heijden IM, Costa SF, Sousa API, Sienra RA, Gobara S, Santos CR, Lobo RD, Pessoa Jr RP & Levin AS (2009) *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J Hosp Infect* **72**: 9-16.
- Mollinedo F (2012) Lipid raft involvement in yeast cell growth and death. *Front Oncol* **2**: 140.
- Moreno-Ruiz E, Galan-Diez M, Zhu W, D'Enfert C, Filler SG, Cossart P & Veiga E (2009) *Candida albicans* internalization by host cells is mediated by a clathrin-dependent mechanism. *Cell Microbiol* **11**: 1179-1189.
- Morschhauser J (2002) The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1587**: 240-248.
- Morschhauser J (2010) Regulation of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Med Microbiol Immunol* **199**: 165-172.
- Moyes DL, Richardson JP & Naglik JR (2015) *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence* **6**: 338-346.
- Moyes DL, Wilson D, Richardson JP, et al. (2016) Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature* **532**: 64-68.
- Mukaremera L, Lee KK, Mora-Montes HM & Gow NAR (2017) *Candida albicans* yeast, pseudohyphal, and hyphal morphogenesis differentially affects immune recognition. *Front Immunol* **8**: 629.
- Mukherjee PK, Seshan KR, Leidich SD, Chandra J, Cole JT & Ghannoum MA (2001) Reintroduction of the *PLB1* gene into *Candida albicans* restores virulence in vivo. *Microbiology* **147**: 585-2597.
- Mukhopadhyay R & Rosen BP (2002) Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environ Health Perspect* **110 Suppl 5**: 745-748.
- Muller U, Vogel P, Alber G & Schaub GA (2008) The innate immune system of mammals and insects. *Contrib Microbiol* **15**: 21-44.
- Murad AM, Leng P, Straffon M, et al. (2001) *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J* **20**: 4742-4752.
- Naglik J, Albrecht A, Bader O & Hube B (2004) *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol* **6**: 915-926.
- Naglik JR, Gaffen SR & Hube B (2019) Candidalysin: discovery and function in *Candida albicans* infections. *Current Opinion in Microbiology* **52**: 100-109.
- Nash AK, Auchtung TA, Wong MC, et al. (2017) The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome* **5**: 153.
- Navarro-Garcia F, Alonso-Monge R, Rico H, Pla J, Sentandreu R & Nombela C (1998) A role for the MAP kinase gene *MKC7* in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology* **144**: 414-424.
- Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ & Gow NA (2008) An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* **6**: 67-78.
- Nett J & Andes D (2006) *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol* **9**: 340-345.
- Nett JE, Lepak AJ, Marchillo K & Andes DR (2009) Time course global gene expression analysis of an *in vivo* *Candida* biofilm. *J Infect Dis* **200**: 307-313.
- Nobile CJ & Johnson AD (2015) *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol* **69**: 71-92.

- Noble SM (2013) *Candida albicans* specializations for iron homeostasis: from commensalism to virulence. *Curr Opin Microbiol* **16**: 708-715.
- Noble SM, Gianetti BA & Witchley JN (2017) *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol* **15**: 96-108.
- Noble SM, French S, Kohn LA, Chen V & Johnson AD (2010) Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nat Genet* **42**: 590-598.
- O'Meara TR, Veri AO, Ketela T, Jiang B, Roemer T & Cowen LE (2015) Global analysis of fungal morphology exposes mechanisms of host cell escape. *Nat Commun* **6**: 6741.
- Odds FC, Brown AJ & Gow NA (2003) Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* **11**: 272-279.
- Ost KS, O'Meara TR, Stephens WZ, *et al.* (2021) Adaptive immunity induces mutualism between commensal eukaryotes. *Nature* **596**: 114-118.
- Pais P, Almeida V, Yilmaz M & Teixeira MC (2020) *Saccharomyces boulardii*: what makes it tick as successful probiotic? *Journal of Fungi* **6**.
- Pan J, Hu C & Yu JH (2018) Lipid biosynthesis as an antifungal target. *J Fungi (Basel)* **4**.
- Pande K, Chen C & Noble SM (2013) Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism. *Nat Genet* **45**: 1088-1091.
- Papon N, Bougnoux ME & d'Enfert C (2020) Tracing the origin of invasive fungal infections. *Trends Microbiol* **28**: 240-242.
- Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L & Kullberg BJ (2018) Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers* **4**: 18026.
- Park YN & Morschhauser J (2005) Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **4**: 1328-1342.
- Parm U, Metsvaht T, Sepp E, Ilmoja ML, Pisarev H, Pauskar M & Lutsar I (2011) Risk factors associated with gut and nasopharyngeal colonization by common Gram-negative species and yeasts in neonatal intensive care units patients. *Early Hum Dev* **87**: 391-399.
- Perez JC, Kumamoto CA & Johnson AD (2013) *Candida albicans* commensalism and pathogenicity are intertwined traits directed by a tightly knit transcriptional regulatory circuit. *PLoS Biol* **11**: e1001510.
- Perlroth J, Choi B & Spellberg B (2007) Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol* **45**: 321-346.
- Phan QT, Myers CL, Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Ibrahim AS, Edwards Jr JE & Filler SG (2007) Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *Plos Biology* **5**.
- Piekarska K, Hardy G, Mol E, van den Burg J, Strijbis K, van Roermund C, van den Berg M & Distel B (2008) The activity of the glyoxylate cycle in peroxisomes of *Candida albicans* depends on a functional beta-oxidation pathway: evidence for reduced metabolite transport across the peroxisomal membrane. *Microbiology* **154**: 3061-3072.
- Piekarska K, Mol E, van den Berg M, Hardy G, van den Burg J, van Roermund C, MacCallum D, Odds F & Distel B (2006) Peroxisomal fatty acid β -oxidation is not essential for virulence of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **5**: 1847-1856.
- Pierce JV & Kumamoto CA (2012) Variation in *Candida albicans* *EFG1* expression enables hostdependent changes in colonizing fungal populations. *MBio* **3**.
- Pierre JL, Fontecave M & Crichton RR (2002) Chemistry for an essential biological process: the reduction of ferric iron. *Biometals* **15**: 341-346.
- Polvi EJ, Veri AO, Liu Z, *et al.* (2019) Functional divergence of a global regulatory complex governing fungal filamentation. *PLoS Genet* **15**: e1007901.

- Potrykus J, MacCallum DM, Urgast DS, Raab A, van Rooijen N, Feldmann J & Brown AJP (2013) Fungal iron availability during deep seated candidiasis is defined by a complex interplay involving systemic and local events. *PLoS Pathogens* **9**.
- Prasad R & Kapoor K (2005) Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int Rev Cytol* **242**: 215-248.
- Prasad R, De Wergifosse P, Goffeau A & Balzi E (1995) Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet* **27**: 320-329.
- Prasad T, Hameed S, Manoharlal R, Biswas S, Mukhopadhyay CK, Goswami SK & Prasad R (2010) Morphogenic regulator *EFG1* affects the drug susceptibilities of pathogenic *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **10**: 587-596.
- Priegneau O, Porta A & Maresca B (2003) *Candida albicans* *CTN* gene family is induced during macrophage infection: homology, disruption and phenotypic analysis of *CTN3* gene. *Fungal Genet Biol* **41**: 783-793.
- Prieto D, Roman 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**: e87128.
- Prieto D, Correia I, Pla J & Roman E (2016) Adaptation of *Candida albicans* to commensalism in the gut. *Future Microbiol* **11**: 567-583.
- Prieto D, Roman E, Alonso-Monge R & Pla J (2017) Overexpression of the Transcriptional Regulator *WOR1* Increases Susceptibility to Bile Salts and Adhesion to the Mouse Gut Mucosa in *Candida albicans*. *Front Cell Infect Microbiol* **7**: 389.
- Pristov KE & Ghannoum MA (2019) Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect* **25**: 792-798.
- Pukkila-Worley R, Peleg AY, Tampakakis E & Mylonakis E (2009) *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Eukaryotic Cell* **8**: 1750-1758.
- Puri S, Lai WKM, Rizzo JM, Buck MJ & Edgerton M (2014) Iron-responsive chromatin remodeling and MAPK signaling enhance adhesion in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **93**: 291-305.
- Qasim MN, Valle Arevalo A, Nobile CJ & Hernday AD (2021) The roles of chromatin accessibility in regulating the *candida albicans* white-opaque phenotypic switch. *J Fungi (Basel)* **7**.
- Qin J, Li R, Raes J, et al. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**: 59-65.
- Rahman D, Mistry M, Thavaraj S, Challacombe SJ & Naglik JR (2007) Murine model of concurrent oral and vaginal *Candida albicans* colonization to study epithelial host-pathogen interactions. *Microbes Infect* **9**: 615-622.
- Ramage G, Martinez JP & Lopez-Ribot JL (2006) *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* **6**: 979-986.
- Ramage G, VandeWalle K, López-Ribot JL & Wickes BL (2002) The filamentation pathway controlled by the *Efg1* regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters* **214**: 95-100.
- Ramirez-Zavala B, Reuss O, Park YN, Ohlsen K & Morschhauser J (2008) Environmental induction of white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **4**: e1000089.
- Ramirez MA & Lorenz MC (2007) Mutations in alternative carbon utilization pathways in *Candida albicans* attenuate virulence and confer pleiotropic phenotypes. *Eukaryot Cell* **6**: 280-290.
- Rikkerink EH, Magee BB & Magee PT (1988) Opaque-white phenotype transition: a programmed morphological transition in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **170**: 895-899.
- Roman E, Nombela C & Pla J (2005) The Sho1 adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **25**: 10611-10627.

- Roman E, Huertas B, Prieto D, Diez-Orejas R & Pla J (2018) *TUP1*-mediated filamentation in *Candida albicans* leads to inability to colonize the mouse gut. *Future Microbiol* **13**: 857-867.
- Roman E, Coman I, Prieto D, Alonso-Monge R & Pla J (2019) Implementation of a CRISPR-based system for gene regulation in *Candida albicans*. *mSphere* **4**.
- 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.
- 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.
- Ror S & Panwar SL (2019) Sef1-regulated iron regulon responds to mitochondria-dependent iron-sulfur cluster biosynthesis in *Candida albicans*. *Front Microbiol* **10**: 1528.
- Rutherford JC, Bahn YS, van den Berg B, Heitman J & Xue C (2019) Nutrient and stress sensing in pathogenic yeasts. *Front Microbiol* **10**: 442.
- Ruy F, Vercesi AE & Kowaltowski AJ (2006) Inhibition of specific electron transport pathways leads to oxidative stress and decreased *Candida albicans* proliferation. *J Bioenerg Biomembr* **38**: 129-135.
- Samaranayake YH & Samaranayake LP (2001) Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev* **14**: 398-429.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sandai D, Yin Z, Selway L, et al. (2013) The evolutionary rewiring of ubiquitination targets has reprogrammed the regulation of carbon assimilation in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *MBio* **3**.
- Sandovsky-Losica H, Barr-Nea L & Segal E (1992) Fatal systemic candidiasis of gastrointestinal origin: an experimental model in mice compromised by anti-cancer treatment. *J Med Vet Mycol* **30**: 219-231.
- Sanglard D (2002) Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enferm Infec Microbiol Clin* **20**: 462-469; quiz 470, 479.
- Sanglard D, Coste A & Ferrari S (2009) Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res* **9**: 1029-1050.
- Sanglard D, Ischer F, Monod M & Bille J (1997) Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology (Reading)* **143 (Pt 2)**: 405-416.
- Sasse C, Hasenberg M, Weyler M, Gunzer M & Morschhäuser J (2013) White-opaque switching of *Candida albicans* allows immune evasion in an environment-dependent fashion. *Eukaryot Cell* **12**: 50-58.
- Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C & Lopez-Ribot JL (2003) Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell* **2**: 1053-1060.
- Scaduto CM, Kabrawala S, Thomson GJ, Scheving W, Ly A, Anderson MZ, Whiteway M & Bennett RJ (2017) Epigenetic control of pheromone MAPK signaling determines sexual fecundity in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: 13780-13785.
- Schaller M, Borelli C, Korting HC & Hube B (2005) Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* **48**: 365-377.
- Scholfield DA, Westwater C, Warner T & Balish E (2005) Differential *Candida albicans* lipase gene expression during alimentary tract colonization and infection. *FEMS Microbiology Letters* **244**: 359-365.
- Schroeder OB (2019) Fight them or feed them: how the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. *Gastroenterology Report* **7**: 3-12.
- Segal E & Frenkel M (2018) Experimental *in vivo* models of candidiasis. *J Fungi (Basel)* **4**.

- Selmecki A, Forche A & Berman J (2006) Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science* **313**: 367-370.
- Setiadi ER, Doedt T, Cottier F, Noffz C & Ernst JF (2006) Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. *J Mol Biol* **361**: 399-411.
- Shapiro RS, Chavez A, Porter CBM, *et al.* (2018) A CRISPR-Cas9-based gene drive platform for genetic interaction analysis in *Candida albicans*. *Nat Microbiol* **3**: 73-82.
- Sharkey LL, McNemar MD, Saporito-Irwin SM, Sypherd PS & Fonzi WA (1999) *HWP1* functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of *EFG1*, *TUP1*, and *RBF1*. *J Bacteriol* **181**: 5273-5279.
- Sharma M, Dhamgaye S, Singh A & Prasad R (2012) Lipidome analysis reveals antifungal polyphenol curcumin affects membrane lipid homeostasis. *Front Biosci (Elite Ed)* **4**: 1195-1209.
- She X, Khamooshi K, Gao Y, Shen Y, Lv Y, Calderone R, Fonzi W, Liu W & Li D (2015) Fungal-specific subunits of the *Candida albicans* mitochondrial complex I drive diverse cell functions including cell wall synthesis. *Cell Microbiol* **17**: 1350-1364.
- Sherman FmF, G. R., Hicks, J. B (1986) *Methods in Yeast Genetics* Cold Spring Harbor *Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
- Shingu-Vazquez M & Traven A (2011) Mitochondria and fungal pathogenesis: drug tolerance, virulence, and potential for antifungal therapy. *Eukaryot Cell* **10**: 1376-1383.
- Sibirny AA (2016) Yeast peroxisomes: structure, functions and biotechnological opportunities. *FEMS Yeast Res* **16**.
- Simbari F, McCaskill J, Coakley G, Millar M, Maizels RM, Fabriás G, Casas J & Buck AH (2016) Plasmalogen enrichment in exosomes secreted by a nematode parasite versus those derived from its mouse host: implications for exosome stability and biology. *J Extracell Vesicles* **5**.
- Slutsky B, Buffo J & Soll DR (1985) High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* **230**: 666-669.
- Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M & Soll DR (1987) White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **169**: 189-197.
- Sohn K, Urban C, Brunner H & Rupp S (2003) *EFG1* is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays. *Molecular Microbiology* **47**: 89-102.
- Solis NV, Park YN, Swidergall M, Daniels KJ, Filler SG & Soll DR (2018) *Candida albicans* white-opaque switching influences virulence but not mating during oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun* **86**.
- Soll DR (2014) The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of *Candida albicans*. *J Oral Microbiol* **6**.
- Souza Mattei A, Hartz Alves S, Bittencourt Severo C, da Silva Guazzelli L, de Mattos Oliveira F & Severo LC (2013) Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*. *Rev Soc Bras Med Trop* **46**: 340-342.
- Spellberg BJ, Ibrahim AS, Avenissian V, Filler SG, Myers CL, Fu Y & Edwards Jr JE (2005) The Anti-*Candida albicans* vaccine composed of the recombinant n terminus of Als1p reduces fungal burden and improves survival in both immunocompetent and immunocompromised mice. *Infect Immun* **73**.
- Spellberg BJ, Ibrahim AS, Avanesian V, Fu Y, Myers C, Phan QT, Filler SG, Yeaman MR & Edwards JE, Jr. (2006) Efficacy of the anti-*Candida* rAls3p-N or rAls1p-N vaccines against disseminated and mucosal candidiasis. *J Infect Dis* **194**: 256-260.
- Srikantha T & Soll DR (1993) A white-specific gene in the white-opaque switching system of *Candida albicans*. *Gene* **131**: 53-60.
- Sriram K, Soliman S & Fages F (2009) Dynamics of the interlocked positive feedback loops explaining the robust epigenetic switching in *Candida albicans*. *J Theor Biol* **258**: 71-88.

- Staab JF, Bradway SD, Fidel PL & Sundstrom P (1999) Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* **283**: 1535-1538.
- Staib P & Morschhauser J (2007) Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*--an enigmatic developmental programme. *Mycoses* **50**: 1-12.
- Strijbis K, van Roermund CW, van den Burg J, van den Berg M, Hardy GP, Wanders RJ & Distel B (2010) Contributions of carnitine acetyltransferases to intracellular acetyl unit transport in *Candida albicans*. *J Biol Chem* **285**: 24335-24346.
- Sudbery P, Gow N & Berman J (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12**: 317-324.
- Sudbery PE (2011) Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol* **9**: 737-748.
- Sun JN, Solis NV, Phan QT, Bajwa JS, Kashleva H, Thompson A, Liu Y, Dongari-Bagtzoglou A, Edgerton M & Filler SG (2010) Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLoS Pathog* **6**: e1001181.
- Swidergall M, Ernst AM & Ernst JF (2013) *Candida albicans* mucin Msb2 is a broad-range protectant against antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 3917-3922.
- Tamarit J, Irazusta V, Moreno-Cermeno A & Ros J (2006) Colorimetric assay for the quantitation of iron in yeast. *Anal Biochem* **351**: 149-151.
- Tams RN (2020) Pathways That Synthesize Phosphatidylethanolamine Impact *Candida albicans* Hyphal Length and Cell Wall Composition through Transcriptional and Posttranscriptional Mechanisms. *Infect Immun* **88**.
- Tansho S, Abe S, Ishibashi H, Mitsuya M, Wada K, Ikeda T, Suegara N, Koshio O, Ono Y & Yamaguchi H (2004) Production of anti-*Candida* antibodies in mice with gut colonization of *Candida albicans*. *Mediators Inflamm* **13**: 189-193.
- Tao L, Du H, Guan G, Dai Y, Nobile CJ, Liang W, Cao C, Zhang Q, Zhong J & Huang G (2014) Discovery of a "white-gray-opaque" tristable phenotypic switching system in *Candida albicans*: Roles of non-genetic diversity in host adaptation. *PLOS Biology* **12**.
- Thomas E, Roman E, Claypool S, Manzoor N, Pla J & Panwar SL (2013) Mitochondria influence *CDR1* efflux pump activity, Hog1-mediated oxidative stress pathway, iron homeostasis, and ergosterol levels in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 5580-5599.
- Totti MAG, dos Santos EB, de Almeida OP & Jorge AOG (2002) Oral candidosis by *Candida albicans* in normal and xerostomic mice. *Braz Oral Res* **18**: 202-207.
- Tripathi A, Liverani E, Tsygankov AY & Puri S (2020) Iron alters the cell wall composition and intracellular lactate to affect *Candida albicans* susceptibility to antifungals and host immune response. *J Biol Chem* **295**: 10032-10044.
- Tso GHW, Reales-Calderon JA, Tan ASM, *et al.* (2018) Experimental evolution of a fungal pathogen into a gut symbiont. *Science* **362**: 589-595.
- Tsong AE, Miller MG, Raisner RM & Johnson AD (2003) Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: a case study in yeasts. *Cell* **115**: 389-399.
- Tsui C, Kong EF & Jabra-Rizk MA (2016) Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog Dis* **74**: ftw018.
- Tucey TM, Verma J, Harrison PF, *et al.* (2018) Glucose homeostasis is important for immune cell viability during *Candida* challenge and host survival of systemic fungal infection. *Cell Metab* **27**: 988-1006.
- Tuch BB, Mitrovich QM, Homann OR, Hernday AD, Monighetti CK, De la Vega FM & Johnson AD (2010) The transcriptomes of two heritable cell types illuminate the circuit governing their differentiation. *PLoS Genetics* **6**.
- Umawahoro N, Verma-Gaur J, Shen HH, *et al.* (2014) The pathogen *Candida albicans* hijacks pyroptosis for escape from macrophages. *MBio* **5**.

- Underhill DM & Iliev IL (2014) The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat Rev Immunol* **14**: 405-416.
- Uppuluri P, Chaturvedi AK, Srinivasan A, Banerjee M, Ramasubramaniam AK, Köhler JR, Kadosh D & Lopez-Ribot JL (2010) Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog* **6**.
- Urban CF, Reichard U, Brinkmann V & Zychlinsky A (2006) Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* **8**: 668-676.
- Urrialde V, Prieto D, Pla J & Alonso-Monge R (2015) The Pho4 transcription factor mediates the response to arsenate and arsenite in *Candida albicans*. *Front Microbiol* **6**: 118.
- Urrialde V, Albuquerque B, Guirao-Abad JP, Pla J, Arguelles JC & Alonso-Monge R (2017) Arsenic inorganic compounds cause oxidative stress mediated by the transcription factor *PHO4* in *Candida albicans*. *Microbiol Res* **203**: 10-18.
- Vandeputte P, Pradervand S, Ischer F, Coste AT, Ferrari S, Harshman K & Sanglard D (2012) Identification and functional characterization of Rca1, a transcription factor involved in both antifungal susceptibility and host response in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **11**: 916-931.
- Vandeputte P, Pradervand S, Ischer F, Coste AT, Ferrari S, Harshman K & Sanglard D (2012) Susceptibility and host response in factor involved in both antifungal characterization of Rca1, a transcription identification and functional *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **11**: 916-931.
- Vautier S, Drummond RA, Chen K, Murray GI, Kadosh D, Brown AJ, Gow NA, MacCallum DM, Kolls JK & Brown GD (2015) *Candida albicans* colonization and dissemination from the murine gastrointestinal tract: the influence of morphology and Th17 immunity. *Cell Microbiol* **17**: 445-450.
- Vinces MD & Kumamoto CA (2007) The morphogenetic regulator Czf1p is a DNA binding protein that regulates white-opaque switching in *Candida albicans*. *Microbiology* **153**: 2877-2884.
- Vyas VK, Barrasa MI & Fink GR (2015) A *Candida albicans* CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families. *Sci Adv* **1**: e1500248.
- Vylkova S & Lorenz MC (2017) Phagosomal neutralization by the fungal pathogen *Candida albicans* induces macrophage pyroptosis. *Infect Immun* **85**.
- Vylkova S, Carman AJ, Danhof HA, Collette JR, Zhou H & Lorenz MC (2011) The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. *mBio* **2**: e00055-00011.
- Wachtler B, Citiulo F, Jablonowski N, Forster S, Dalle F, Schaller M, Wilson D & Hube B (2012) *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS One* **7**: e36952.
- Wagner CE, Wheeler KM & Ribbeck K (2018) Mucins and their role in shaping the functions of mucus barriers. *Annu Rev Cell Dev Biol* **34**: 189-215.
- Wang H, Song W, Huang G, Zhou Z, Ding Y & Chen J (2011) *Candida albicans* Zcf37, a zinc finger protein, is required for stabilization of the white state. *FEBS Letters* **585**: 797-802.
- Wartenberg A, Linde J, Martin R, *et al.* (2014) Microevolution of *Candida albicans* in macrophages restores filamentation in a nonfilamentous mutant. *PLoS Genet* **10**: e1004824.
- Westman J, Moran G, Mogavero S, Hube B & Grinstein S (2018) *Candida albicans* hyphal expansion causes phagosomal membrane damage and luminal alkalization. *mBio* **9**.
- Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS & Rogers PD (2016) Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. *Front Microbiol* **7**: 2173.
- Wheeler RT & Fink GR (2006) A drug-sensitive genetic network masks fungi from the immune system. *PLoS Pathog* **2**: e35.
- White SJ, Rosenbach A, Lephart P, Nguyen D, Benjamin A, Tzipori S, Whiteway M, Meccas J & Kumamoto CA (2007) Self-regulation of *Candida albicans* population size during GI colonization. *PLoS Pathog* **3**: e184.

- White TC (1997) Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 1482-1487.
- Wickerham LJ (1946) A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeast. *J Bacteriol* **53**: 293-301.
- Williams RB & Lorenz MC (2019) multiple alternative carbon pathways combine to promote *Candida albicans* stress resistance, immune interactions, and virulence. *mBio* **11**.
- Wilson RB, Davis D & Mitchell AP (1999) Rapid hypothesis testing with *candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* **181**: 1868-1874.
- Winterbourn CC (1995) Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett* **82-83**: 969-974.
- Witchley JN, Penumetcha PM & Noble SM (2019) Visualization of *Candida albicans* in the murine gastrointestinal tract using fluorescent in situ hybridization. *J Vis Exp*.
- Witchley JN, Penumetcha P, Abon NV, Woolford CA, Mitchell AP & Noble SM (2019) *Candida albicans* morphogenesis programs control the balance between gut commensalism and invasive infection. *Cell Host Microbe* **25**: 432-443 e436.
- Wong D, Plumb J, Talab H, Kurdi M, Pokhrel K & Oelkers P (2019) Genetically compromising phospholipid metabolism limits *Candida albicans* virulence. *Mycopathologia* **184**: 213-226.
- Wu W, Pujol C, Lockhart SR & Soll DR (2005) Chromosome loss followed by duplication is the major mechanism of spontaneous mating-type locus homozygosity in *Candida albicans*. *Genetics* **169**: 311-1327.
- Wysocki R & Tamas MJ (2010) How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *Fems Microbiol Rev* **34**: 925-951.
- Xiang MJ, Liu JY, Ni PH, Wang S, Shi C, Wei B, Ni YX & Ge HL (2013) Erg11 mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **13**: 386-393.
- Xie J, Nobile CJ, Tong Y, *et al.* (2013) White-opaque switching in natural *mtla/a* isolates of *Candida albicans*: evolutionary implications for roles in host adaptation, pathogenesis, and sex. *PLOS Biology* **11**.
- Xie JL, Qin L, Miao Z, *et al.* (2017) The *Candida albicans* transcription factor Cas5 couples stress responses, drug resistance and cell cycle regulation. *Nat Commun* **8**: 499.
- Xiong K, Su C, Sun Q & Lu Y (2021) Efg1 and Cas5 orchestrate cell wall damage response to caspofungin in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **65**.
- Xu N, Dong Y, Cheng X, *et al.* (2014) Cellular iron homeostasis mediated by the Mrs4-Ccc1-Smf3 pathway is essential for mitochondrial function, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1843** 629-639.
- Yamaguchi N, Sonoyama K, Kikuchi H, Nagura T, Aritsuka T & Kawabata J (2005) Gastric colonization of *Candida albicans* differs in mice fed commercial and purified diets. *J Nutr* **135**: 109-115.
- Yan L, Yang C & Tang J (2013) Disruption of the intestinal mucosal barrier in *Candida albicans* infections. *Microbiol Res* **168**: 389-395.
- Zaborin A, Smith D, Garfield K, *et al.* (2014) Membership and behavior of ultra-low-diversity pathogen communities present in the gut of humans during prolonged critical illness. *mBio* **5**: e01361-01314.
- Zakikhany K, Naglik JR, Schmidt-Westhausen A, Holland G, Schaller M & Hube B (2007) *In vivo* transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. *Cell Microbiol* **9**: 2938-2954.
- Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, *et al.* (2014) Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *mBio* **5**: e01333-01314.

- Zhao X, Oh SH & Hoyer LL (2007) Deletion of *ALS5*, *ALS6* or *ALS7* increases adhesion of *Candida albicans* to human vascular endothelial and buccal epithelial cells. *Med Mycol* **45**: 429-434.
- Zhao X, Daniels KJ, Oh SH, B. GC, Yeater KM, Soll DR & Hoyer LL (2006) *Candida albicans* Als3p is required for wild-type biofilm formation on silicone elastomer surfaces. *Microbiology* **152**.
- Zhao X, Oh SH, Cheng G, Green CB, Nuessen JA, Yeater K, Leng RP, Brown AJ & Hoyer LL (2004) *ALS3* and *ALS8* represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology* **150**: 2415-2428.
- Zhou H & Lorenz MC (2008) Carnitine acetyltransferases are required for growth on non-fermentable carbon sources but not for pathogenesis in *Candida albicans*. *Microbiology* **154**: 500–509.
- Zhou X (2001) The glyoxylate cycle in *Candida albicans* infection. *TRENDS in Biotechnology* **19**.
- Zipfel PF & Skerka C (2009) Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* **9**: 729-740.
- Zoetendal EG, Raes J, van den Bogert B, Arumugam M, Boonjink CCGM, Troost FJ, Bork P, Wels M, de Vos WM & Kleerebezem M (2012) The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. *Isme J* **6**: 1415-1426.
- Zordan RE, Galgoczy DJ & Johnson AD (2006) Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12807-12812.
- Zordan RE, Miller MG, Galgoczy DJ, Tuch BB & Johnson AD (2007) Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Biol* **5**: e256.

Anexo 1. Proteínas identificadas en las cepas CAI4-pNRUe y CAI4-WOR1OE con un valor $p < 0,05$. La *ratio* de abundancia CAI4-WOR1OE/CAI4-pNRUe se expresa en \log_2 y la *ratio* del valor p en $-\log_{10}$

Anexo 2. Proteínas identificadas en las cepas CAF2-RFP y μ Ev93 con un valor $p < 0,05$. La *ratio* de abundancia CAF2-RFP/ μ Ev93 se expresa en \log_2 y la *ratio* del valor p en $-\log_{10}$.

Anexo 3. Proteínas identificadas en las cepas CAF2-RFP y μ Ev180 con un valor $p < 0,05$. La *ratio* de abundancia CAF2-RFP/ μ Ev180 se expresa en \log_2 y la *ratio* del valor p en $-\log_{10}$.

Anexo 4. Proteínas identificadas en las cepas CAF2-RFP y μ Ev366 con un valor $p < 0,05$. La *ratio* de abundancia CAF2-RFP/ μ Ev366 se expresa en \log_2 y la *ratio* del valor p en $-\log_{10}$.

Anexo 5. Publicaciones relacionadas con esta tesis doctoral y otras publicadas durante el periodo de doctorado.

Anexo 1. Proteínas identificadas en las cepas CAI4-pNRUe y CAI4-WOR1^{OE} con un valor $<0,05$. La *ratio* de abundancia CAI4-WOR1^{OE}/CAI4-pNRUe se expresa en \log_2 y la *ratio* del valor p en $-\log_{10}$

Nombre sistemático	Nombre estándar	Identificador (assembly 19/21)	Ratio abundancia	Ratio Valor p
CR_04020C_A		orf19.485	-6,64	17
C1_05500W_A	RSM22	orf19.414	-6,64	17
CR_07450C_A	MNL1	orf19.6121	-6,64	17
C1_02890C_A		orf19.2978	-6,64	17
C6_03330C_A		orf19.5621	-6,64	17
C6_02680W_A		orf19.5539	-6,64	17
C3_02760C_A		orf19.267	-6,64	17
C3_04330C_A		orf19.5876	-6,64	17
C5_02990W_A		orf19.4324	-6,64	17
C2_02620W_A		orf19.1588	-6,64	17
CR_04730W_A		orf19.6318	-6,64	17
C1_10350C_A		orf19.4906	-6,64	17
C4_04030W_A	JEN2	orf19.5307	-6,64	17
C3_02290W_A		orf19.1617	-6,64	17
C5_03560W_A		orf19.6667	-6,64	17
C2_05480C_A		orf19.3577.1	-6,64	17
C4_06460C_A		orf19.2888	-6,64	17
C2_01680C_A		orf19.1479	-6,64	17
C1_09790C_A		orf19.4844	-6,64	17
C1_08650C_A	FAD1	orf19.4723	-6,64	17
C4_04050C_A	RHD3	orf19.5305	-6,64	17
CR_04820W_A		orf19.6311	-6,64	17
CR_06780W_A		orf19.1856	-6,64	17
C2_05780C_A	MKK2	orf19.6889	-6,64	17
C7_00830C_A		orf19.7034	-6,64	17
C4_02860W_A		orf19.2710	-6,64	17
C6_03370W_A		orf19.5626	-6,64	17
C1_01280C_A	MED22	orf19.3317	-6,64	17
C1_11320C_A		orf19.670.2	-6,64	17
C6_02310W_A		orf19.3473	-6,64	17
C5_03870C_A		orf19.1107	-6,64	17
C1_06070W_A		orf19.2438	-6,64	17
C6_03240W_A		orf19.5611	-6,64	17
C1_01740W_A	CTN1	orf19.4551	-6,64	17
C2_08850C_A		orf19.225	-6,64	17
C3_04080W_A		orf19.913.2	-6,64	17
C5_02110W_A		orf19.4216	-6,64	17
C5_03290C_A		orf19.2650.1	-6,43	9,547141077
C2_00250W_A	STF2	orf19.2107.1	-6,37	9,390839648
C1_10740C_A	ASR1	orf19.2344	-6,23	7,769950679
C2_04010C_A	HSP21	orf19.822	-5,83	8,040698186
CR_05340C_A	IFE2	orf19.5288	-5,29	6,800121307
C2_08290C_A	UCF1	orf19.1354	-5,01	6,207308499
C7_00700W_A	CYB5	orf19.7049	-4,91	5,991268315
C4_01270W_A	RPS6A	orf19.4660	-4,72	5,612592817
C5_02080C_A	HSP12	orf19.3160	-4,69	5,552610158
C1_00460W_A		orf19.6062	-4,64	5,441266543
CR_08890C_A	ASR2	orf19.7284	-4,6	5,375273125
C1_12850W_A	BLP1	orf19.4914.1	-4,57	5,317166935
C6_01700W_A	RPL32	orf19.3415.1	-4,32	4,840366885
CR_00200W_A	PCK1	orf19.7514	-4,33	4,859528267

C1_11200W_A		orf19.2296	-4,23	4,680279358
C7_02680W_A	TOM22	orf19.3696	-4,22	4,654495209
C3_04680W_A	RPP2B	orf19.5928	-4,16	4,542821063
C7_02170C_A		orf19.6498	-4,12	4,24437353
C2_08450W_A		orf19.3635	-4,12	4,486505945
C2_08640C_A	PST2	orf19.3612	-4,09	3,860292353
C5_02190C_A		orf19.4225.1	-3,87	4,040331963
C2_00760C_A		orf19.2048	-3,83	3,537096708
C2_02260W_A		orf19.1544	-3,76	3,80566306
C1_04500W_A	ICL1	orf19.6844	-3,76	3,867465087
C5_01910W_A	GIS2	orf19.3182	-3,61	3,626116449
C4_01150W_A	ASK1	orf19.4675	-3,39	2,954310886
C2_05610C_A	RPS8A	orf19.6873	-3,39	3,274929608
C7_03380W_A		orf19.1336.2	-3,37	3,170990101
C3_00480C_A	DOT5	orf19.5417	-3,34	3,212406609
C2_03090C_A	ADE8	orf19.5789	-3,34	3,205835187
C2_03790C_A	ASR3	orf19.842	-3,32	3,173349469
C7_01610W_A		orf19.6563.1	-3,3	2,886374403
C3_06830C_A		orf19.6818	-3,3	3,058780402
C1_06470W_A		orf19.6264.4	-3,25	3,070303744
C1_03640C_A	HFL1	orf19.3063	-3,23	2,722610126
C7_00860W_A	SSR1	orf19.7030	-3,22	2,931933459
C5_02700W_A	CTA7	orf19.4288	-3,21	2,743053859
C4_00170W_A		orf19.5642	-3,16	2,941920465
C2_07630C_A		orf19.1862	-3,13	2,903824863
C6_02740W_A		orf19.5547	-3,1	2,852881194
C4_03390W_A	CSH3	orf19.3366	-3,08	2,675686939
C2_03590C_A	CAP4	orf19.861	-3,02	2,747471569
C1_01980W_A	HGT1	orf19.4527	-2,95	2,647725931
CR_07230W_A		orf19.6147	-2,95	2,649492762
C1_02130C_A	GAL1	orf19.3670	-2,86	2,52718008
CR_09140C_A		orf19.7310	-2,83	2,489434101
C1_02510W_A		orf19.2940	-2,82	2,319349442
C6_01070C_A	CIP1	orf19.113	-2,8	2,455730095
C5_03360W_A	RPO26	orf19.2643	-2,79	2,435895746
C6_03770C_A	ORM1	orf19.5751	-2,78	2,32486792
C1_00650C_A	SNF7	orf19.6040	-2,77	2,408788773
C3_00220W_A	HGT19	orf19.5447	-2,74	2,296367014
C4_02290W_A	LAB5	orf19.2774	-2,67	2,104306503
C7_00160C_A		orf19.7107	-2,61	2,172652513
CR_02690W_A		orf19.2828	-2,56	2,150077368
C1_14110C_A	RPL4B	orf19.7217	-2,56	2,149893897
C2_00210W_A	RPL38	orf19.2111.2	-2,53	2,117089787
C3_01550C_A	TOS1	orf19.1690	-2,49	1,992396914
C7_03630C_A	TIM9	orf19.6696	-2,48	2,060083116
C3_07310C_A	SLK19	orf19.6763	-2,46	2,03308778
C4_02480C_A	TIM13	orf19.2754	-2,44	2,005382529
C5_04880C_A	PUT2	orf19.3974	-2,45	2,01316464
C2_01740C_A		orf19.1485	-2,41	1,977212614
C1_09860C_A	TFA1	orf19.4851	-2,4	1,859158194
C6_03820C_A		orf19.5757	-2,4	1,889364503
CR_05170C_A	FDH1	orf19.638	-2,41	1,966578543
C4_00770C_A		orf19.4164	-2,39	1,953489515
C3_05710W_A	RCT1	orf19.7350	-2,39	1,951689522
C6_00930C_A		orf19.94	-2,38	1,941176122
C1_07680W_A	HAP2	orf19.1228	-2,37	1,846368636
C3_02920W_A		orf19.285	-2,38	1,932464838
C2_04600C_A	RPL17B	orf19.4490	-2,36	1,918758858
C5_00310C_A		orf19.962	-2,34	1,89577012
C4_06030W_A	CMD1	orf19.4413	-2,34	1,896775553
C2_04540C_A	GDT1	orf19.4496	-2,33	1,77343337
C3_02610C_A	GLX3	orf19.251	-2,33	1,877156253
C3_04920C_A		orf19.5961	-2,32	1,868767174
CR_04580W_A		orf19.549	-2,3	1,830595384

CR_01390W_A	MGE1	orf19.2524	-2,31	1,856368651
C1_01040W_A		orf19.3292	-2,3	1,788618641
C3_03340C_A		orf19.332.1	-2,3	1,842083302
C1_11670W_A		orf19.1152	-2,29	1,785822699
C7_03860W_A		orf19.7196	-2,3	1,842597952
C1_09710C_A		orf19.4835	-2,29	1,774046372
C1_12250C_A		orf19.5238	-2,26	1,780349808
CR_03030C_A	RPL28	orf19.2864.1	-2,27	1,807529654
C6_03880W_A		orf19.5763	-2,26	1,795857597
CR_09650W_A	WAL1	orf19.6598	-2,23	1,66085678
C2_01550W_A	SMP2	orf19.1462	-2,22	1,75746209
C1_03150C_A		orf19.3007.2	-2,22	1,682680538
CR_09190C_A		orf19.7316	-2,22	1,653529647
C1_07510W_A		orf19.2794	-2,22	1,757529711
C1_06060C_A	ACP1	orf19.2439	-2,21	1,751202856
C2_04820W_A		orf19.182	-2,21	1,671655315
C2_05710C_A		orf19.6882.1	-2,21	1,748637569
C4_04890C_A	RPL24A	orf19.3789	-2,21	1,741646266
C4_02940W_A	ABP1	orf19.2699	-2,17	1,707748246
C4_06470W_A		orf19.2887	-2,16	1,69600006
CR_00350W_A		orf19.7499	-2,16	1,68980897
CR_02070C_A	ADH5	orf19.2608	-2,16	1,690724831
C3_04670C_A	RPS15	orf19.5927	-2,16	1,690454341
C3_05780C_A	CRZ1	orf19.7359	-2,15	1,63513503
C5_03830C_A		orf19.1111	-2,15	1,655253109
C2_07200W_A		orf19.2276	-2,15	1,657410478
C3_04490W_A	RAX1	orf19.5903	-2,15	1,580754215
C3_05420W_A		orf19.6980	-2,14	1,623652522
C4_05610C_A		orf19.1246	-2,12	1,644507835
C1_10090C_A		orf19.4878	-2,11	1,612924201
C1_09350W_A		orf19.4796	-2,11	1,633514049
C3_01890C_A		orf19.1658	-2,1	1,626877638
C7_00800C_A	YAE1	orf19.7037	-2,09	1,601254884
C1_02060W_A		orf19.3663.1	-2,08	1,573935186
CR_04360C_A	NHP2	orf19.526	-2,08	1,581609114
C3_04500C_A	RPL19A	orf19.5904	-2,08	1,611621379
C7_00330C_A		orf19.7088	-2,07	1,511141987
C2_08180C_A		orf19.2167	-2,06	1,543365786
C7_03180C_A	HHO1	orf19.5137.1	-2,07	1,593343615
C4_00600C_A	MUC1	orf19.4183	-2,05	1,561081114
C3_04910C_A	NCE102	orf19.5960	-2,05	1,576287432
C4_03960W_A		orf19.787.1	-2,04	1,491472293
C5_04870W_A		orf19.3973	-2,03	1,527615737
C5_03540C_A	RPS25B	orf19.6663	-2,04	1,561625222
C2_02770W_A		orf19.5828	-2,03	1,529404271
C1_06810W_A	CAT1	orf19.6229	-2,03	1,553723788
C2_04960C_A		orf19.3528	-2,02	1,546723896
C2_01720C_A		orf19.1483	-2,02	1,539483948
C2_08310W_A	TIM22	orf19.1352	-2,01	1,502579909
CR_02650C_A	DRE2	orf19.2825	-2	1,501308421
C4_01700C_A	NHP6A	orf19.4623.3	-2	1,525147713
C1_05160C_A		orf19.449	-2	1,526025964
C1_06840C_A		orf19.6225.1	-1,99	1,485298867
C2_05180W_A	WH11	orf19.3548.1	-1,99	1,448180195
C1_06450C_A	RPS14B	orf19.6265.1	-1,98	1,500192482
C1_02310C_A		orf19.3688	-1,97	1,488064041
C2_01620W_A	COX4	orf19.1471	-1,97	1,495980911
C3_07340W_A	GCY1	orf19.6757	-1,97	1,496673453
C4_06580W_A	CBF1	orf19.2876	-1,96	1,480680699
C7_00720W_A	RTF1	orf19.7047	-1,94	1,436003563
C2_09830C_A		orf19.1367.1	-1,93	1,427159162
C2_02740C_A	HPT1	orf19.5832	-1,92	1,439321347
C2_01610C_A	RPS26A	orf19.1470	-1,91	1,436678101
C1_10970W_A		orf19.2319	-1,91	1,36940402

CR_08460W_A	TPM2	orf19.6414.3	-1,89	1,412267356
C1_06640C_A		orf19.6247.1	-1,88	1,349402786
C1_12590W_A	ATP20	orf19.3757	-1,88	1,403007962
C3_00090W_A	RPS24	orf19.5466	-1,88	1,402469952
C1_07080W_A		orf19.6196	-1,87	1,370234344
C2_06890C_A		orf19.2244	-1,86	1,382228557
C2_04190C_A	UGA1	orf19.802	-1,86	1,379758225
C1_00270W_A		orf19.6079	-1,85	1,370519989
C3_05440C_A		orf19.6982	-1,84	1,33752938
CR_01060W_A	LAG1	orf19.3249	-1,83	1,334773736
C2_09260C_A	GLO2	orf19.4088	-1,83	1,357100935
C4_06350C_A	NUP60	orf19.2901	-1,82	1,34254479
C2_08120W_A	MAF1	orf19.2173	-1,81	1,308772005
C2_03260W_A		orf19.904	-1,81	1,312559174
C7_01070C_A		orf19.7006	-1,8	1,326063523
CR_09640C_A		orf19.6599.1	-1,79	1,302151874
C2_03380W_A	PAN1	orf19.886	-1,79	1,314246315
C1_12390C_A	RPL27A	orf19.5225.2	-1,78	1,311237103
CR_01470W_A	CSP37	orf19.2531	-1,79	1,313153856
C4_01840C_A		orf19.4609	-1,78	1,304582402
C1_03090W_A	RPS1	orf19.3002	-1,78	1,303466835
C4_03800C_A	NUP84	orf19.1298	2,49	1,304031674
C4_06600W_A	TOP2	orf19.2873	2,81	1,303092455
CR_04910W_A	CDC43	orf19.1803	3,13	1,97546115
CR_07810W_A	YHB5	orf19.3710	3,18	1,878741522
C4_05060W_A	CDL1	orf19.3773	3,18	1,564428745
CR_00920W_A	CCE1	orf19.3264	3,39	1,60327555
C2_04330C_A		orf19.4521	3,5	1,981598661
CR_01380W_A		orf19.2521	3,8	2,15878153
C4_06670W_A		orf19.3142	4,07	2,801440438
CR_07220C_A		orf19.6148	4,82	4,564387797
C7_02670W_A		orf19.3697	6,64	17
CR_03410W_A		orf19.2381	6,64	17
CR_06450W_A		orf19.721	6,64	17
CR_01420W_A		orf19.2528	6,64	17
C2_07470W_A	YCS4	orf19.1883	6,64	17
C4_02930W_A		orf19.2701	6,64	17
CR_08070W_A	PTP1	orf19.6365	6,64	17
C5_02670W_A	BUR2	orf19.4284	6,64	17
C2_01920C_A		orf19.1504	6,64	17
C2_09920W_A		orf19.1360	6,64	17
C2_05840W_A		orf19.5207	6,64	17
C2_06320W_A		orf19.5495	6,64	17
C7_01500W_A		orf19.6579	6,64	17
C2_07090C_A	OLE2	orf19.2264	6,64	17
C2_10720C_A		orf19.5352	6,64	17
C1_00130C_A	VPS53	orf19.6094	6,64	17
C1_12070C_A		orf19.5258	6,64	17
C4_07220C_A		orf19.3080	6,64	17
C2_07160W_A	SMF12	orf19.2270	6,64	17
C2_06030W_A		orf19.4117	6,64	17
C1_10660W_A	TBP1	orf19.1837	6,64	17
C6_03640W_A	NOG2	orf19.5732	6,64	17
C1_09280W_A		orf19.4787	6,64	17
C3_02560W_A	DDC1	orf19.245	6,64	17
C3_05010C_A		orf19.5970	6,64	17
C2_09560C_A		orf19.1400	6,64	17
C1_09390W_A		orf19.4801	6,64	17
C5_04840C_A		orf19.3970	6,64	17
CR_06910W_A	BUD5	orf19.1842	6,64	17
C1_06440C_A		orf19.6266	6,64	17
C5_02320C_A		orf19.4240	6,64	17
C1_01560W_A	SIZ1	orf19.3345	6,64	17
C1_14330W_A		orf19.7245	6,64	17

C5_05210W_A		orf19.4014	6,64	17
CR_10500C_A		orf19.7627	6,64	17
CR_08190W_A		orf19.6379	6,64	17
C7_00410C_A		orf19.7079	6,64	17
CR_01020C_A		orf19.3254	6,64	17
CR_10190C_A		orf19.7595	6,64	17
CR_00210W_A	ALK2	orf19.7513	6,64	17
C4_05790W_A		orf19.1265	6,64	17
C7_02350C_A		orf19.6476	6,64	17
C3_05410W_A		orf19.6979	6,64	17
CR_08650C_A		orf19.6440	6,64	17
C2_09500W_A		orf19.1404	6,64	17
C3_05810C_A	SKN1	orf19.7362	6,64	17
C1_11090C_A		orf19.2307	6,64	17
C7_02850W_A		orf19.5177	6,64	17
C6_00320C_A	DNA2	orf19.1192	6,64	17
C1_02610W_A	IML1	orf19.2949	6,64	17
C4_00590C_A		orf19.4184	6,64	17
CR_06640C_A		orf19.698	6,64	17
C5_01840C_A	TAC1	orf19.3188	6,64	17
C5_04600C_A	GRR1	orf19.3944	6,64	17
C5_04680W_A	PSD2	orf19.3954	6,64	17
C1_10560C_A		orf19.1002	6,64	17
C6_02420W_A		orf19.3483	6,64	17
C5_00570W_A		orf19.932	6,64	17
C6_04610C_A	NAG3	orf19.2158	6,64	17
C1_02910C_A		orf19.2982	6,64	17
C5_00980W_A	TRY3	orf19.1971	6,64	17
C6_04500C_A	TSM1	orf19.2135	6,64	17
C6_00310W_A		orf19.1191	6,64	17
CR_03900W_A	HST7	orf19.469	6,64	17
C2_08860W_A		orf19.223	6,64	17
C1_01550W_A	VPS17	orf19.3344	6,64	17
C1_14250C_A		orf19.7235	6,64	17
C5_02900W_A		orf19.4312	6,64	17
C1_04540C_A	VPS16	orf19.6848	6,64	17
C2_10140W_A		orf19.1767	6,64	17
C1_00360W_A	CDC13	orf19.6072	6,64	17
C4_02300W_A	HOS3	orf19.2772	6,64	17
C5_02180C_A	LEU3	orf19.4225	6,64	17
C2_07810W_A		orf19.2200	6,64	17
C7_03890C_A		orf19.7193	6,64	17
CR_06090W_A		orf19.3862	6,64	17
C1_05800C_A		orf19.2472	6,64	17
C3_05460W_A		orf19.6984	6,64	17
C1_04980C_A		orf19.52	6,64	17
C1_13080W_A	OP4	orf19.4934	6,64	17
C1_05750C_A		orf19.2476	6,64	17
C2_03120W_A	AMO1	orf19.5784	6,64	17
C2_00730C_A		orf19.2051	6,64	17
C1_00690W_A	RIC1	orf19.6036	6,64	17
C6_00430C_A		orf19.1204	6,64	17
C4_06340W_A	ago-01	orf19.2903	6,64	17
CR_00330C_A	PXA1	orf19.7500	6,64	17
CM_00240W CM_00240W		CaalfMp08.3	6,64	17
C5_04940W_A		orf19.3982	6,64	17
CR_03200C_A		orf19.2404	6,64	17
C6_03780C_A		orf19.5752	6,64	17
C2_09710C_A		orf19.1381	6,64	17
C5_04520W_A	TIP41	orf19.3937	6,64	17
CR_07680C_A		orf19.6282	6,64	17
C1_04530C_A		orf19.6847	6,64	17
C7_02010C_A		orf19.6518	6,64	17
C5_00780C_A		orf19.580	6,64	17

CR_07310W_A		orf19.6137	6,64	17
C3_01540W_A		orf19.1691	6,64	17
C2_01400C_A	ESC4	orf19.1445	6,64	17
C3_07710W_A	ABD1	orf19.6716	6,64	17
CR_00630W_A		orf19.7468	6,64	17
C1_04900W_A	MNN15	orf19.753	6,64	17
C4_01940W_A	PHO89	orf19.4599	6,64	17
#N/D	NAD4	CaalfMp14	6,64	17
C1_04630C_A		orf19.783	6,64	17
CR_01700C_A		orf19.2563	6,64	17
C3_05850W_A		orf19.7365	6,64	17
CR_02560C_A	ASG1	orf19.166	6,64	17
CR_03920C_A	TPO4	orf19.473	6,64	17
C2_07660W_A	PDS5	orf19.2216	6,64	17
CR_10290C_A		orf19.7604	6,64	17
C4_03720C_A		orf19.1306	6,64	17
C2_09630C_A		orf19.1391	6,64	17
CR_08660W_A	PRP8	orf19.6442	6,64	17
C3_07680W_A		orf19.6719	6,64	17
C5_02120C_A	RIX7	orf19.4219	6,64	17
C1_14230C_A	IRR1	orf19.7232	6,64	17
CR_03260W_A		orf19.2397.3	6,64	17
C1_03930W_A		orf19.4467	6,64	17
C7_02560W_A		orf19.6453	6,64	17
C5_05170W_A	PAN3	orf19.4010	6,64	17
CR_01230C_A	CDC27	orf19.3231	6,64	17
C6_02960W_A		orf19.5574	6,64	17
C1_02110C_A	HGT2	orf19.3668	6,64	17
C3_00780W_A	HOS2	orf19.5377	6,64	17
C5_01280C_A	NUF2	orf19.1941	6,64	17
C5_03300C_A		orf19.2650	6,64	17
C4_02770C_A		orf19.2721	6,64	17
C5_02630C_A	MNN1	orf19.4279	6,64	17
CR_02790C_A	ALG5	orf19.2837	6,64	17
C5_05470W_A	EST1	orf19.4045	6,64	17
C2_07560W_A	SWR1	orf19.1871	6,64	17
C4_04780W_A	PMT6	orf19.3802	6,64	17
C4_01360W_A	PGA53	orf19.4651	6,64	17
CR_03570C_A	YVH1	orf19.4401	6,64	17
CR_09410W_A		orf19.7337	6,64	17
C1_11790W_A		orf19.1137	6,64	17
C3_00490W_A	ESA1	orf19.5416	6,64	17
C4_06230C_A		orf19.2915	6,64	17
C3_02260C_A		orf19.1619	6,64	17
CR_01030W_A	DAL81	orf19.3252	6,64	17
C4_05090C_A	SRB8	orf19.736	6,64	17
CR_07350W_A		orf19.6134	6,64	17
C3_01930W_A	PXP2	orf19.1655	6,64	17
C1_13170C_A	MSH6	orf19.4945	6,64	17
C1_12600C_A	CHR1	orf19.3756	6,64	17
C4_05590W_A		orf19.1240	6,64	17
CR_02370W_A	ERG25	orf19.3732	6,64	17
C2_03800C_A		orf19.841	6,64	17
C2_08280W_A	EAF3	orf19.2660	6,64	17
C3_07360W_A	DLD2	orf19.6755	6,64	17
C4_06450W_A		orf19.2889	6,64	17
C1_00870W_A	LRO1	orf19.6018	6,64	17
C1_07660W_A		orf19.2778	6,64	17
C6_01110W_A	FAD2	orf19.118	6,64	17
CR_07750C_A		orf19.3704	6,64	17
C3_06400C_A		orf19.7425	6,64	17
C3_06740W_A		orf19.6829	6,64	17
C4_02830C_A	HCA4	orf19.2712	6,64	17
CR_04870C_A		orf19.6306	6,64	17

CR_02250C_A	CEX1	orf19.3744	6,64	17
C7_02860C_A		orf19.5175	6,64	17
CR_03100W_A	SMC5	orf19.2417	6,64	17
C6_00480C_A	FET31	orf19.4211	6,64	17
C3_06310C_A	ISW2	orf19.7401	6,64	17
C4_00780C_A		orf19.4163	6,64	17
C5_04190W_A	MRV2	orf19.3902	6,64	17
C1_04010C_A		orf19.4476	6,64	17

Anexo 2. Proteínas identificadas en las cepas CAF2-RFP y μ Ev93 con un valor $p < 0,05$. La *ratio* de abundancia CAF2-RFP/ μ Ev93 se expresa en \log_2 y la *ratio* del valor p en $-\log_{10}$.

Nombre sistemático	Nombre estándar	Identificador (assembly 19/21)	Ratio abundancia	Ratio Valor p
C5_05310W_A	PRE1	orf19.4025	-6,64	17
C4_00230W_A		orf19.5648	-6,64	17
C5_01420W_A		orf19.4132	-6,64	17
CR_03180W_A		orf19.2406	-6,64	17
C3_07920W_A		orf19.6187	-6,64	17
C2_09910C_A		orf19.1360.1	-6,64	17
C3_00660W_A		orf19.5391	-6,64	17
C6_04050W_A		orf19.1219	-6,64	17
C2_00070C_A	MPP10	orf19.1915	-6,64	17
CR_03210C_A	SSU72	orf19.2402	-6,64	17
C7_04240C_A		orf19.7149	-6,64	17
C7_04260W_A		orf19.7144	-6,64	17
CR_08880C_A		orf19.7283	-6,64	17
C4_05760W_A	CGT1	orf19.1261	-6,64	17
C5_05200C_A		orf19.4013	-6,64	17
C1_06780W_A	NPR1	orf19.6232	-6,64	17
C1_12450C_A	IRA2	orf19.5219	-6,64	17
C1_02850W_A		orf19.2973	-6,64	17
CR_09890C_A	BET2	orf19.7563	-6,64	17
C2_05170W_A		orf19.3548	-6,64	17
C6_03430C_A		orf19.5702	-6,64	17
C5_00090C_A		orf19.5688	-6,64	17
C1_05790W_A		orf19.2472.1	-6,64	17
C7_02450W_A		orf19.6464	-6,64	17
CR_10170C_A		orf19.7593	-6,64	17
CR_09680C_A	RTA4	orf19.6595	-6,64	17
C2_04170C_A		orf19.804.1	-6,64	17
C2_05180W_A	WH11	orf19.3548.1	-6,64	17
C7_01610W_A		orf19.6563.1	-6,64	17
C1_10740C_A	ASR1	orf19.2344	-6,64	17
C1_10220C_A	TPK1	orf19.4892	-6,64	17
C2_01920C_A		orf19.1504	-6,64	17
CR_04360C_A	NHP2	orf19.526	-6,64	17
C1_07160C_A		orf19.4450.1	-6,64	17
C7_01420W_A	GIR2	orf19.6587	-6,64	17
C2_07590W_A	VMA10	orf19.1866	-6,64	17

CR_02250C_A	CEX1	orf19.3744	-6,64	17
C5_01910W_A	GIS2	orf19.3182	-6,64	17
C1_08580C_A	VCX1	orf19.405	-6,48	17
C1_09750W_A		orf19.4839	-4,33	17
C2_06110W_A		orf19.4107	-3,97	17
C2_01900C_A		orf19.1500	-3,53	17
C1_02070W_A	HSP31	orf19.3664	-2,51	17
C2_04570W_A		orf19.4492	-2,38	17
C1_07360W_A		orf19.4435	-2,25	15,17643852
CR_03770C_A	RPS30	orf19.4375.1	-1,95	15,17643852
C4_04050C_A	RHD3	orf19.5305	-1,93	14,95458977
C7_04050W_A	HLJ1	orf19.7175	-1,89	5,248831303
C7_03270W_A		orf19.5126	-1,77	8,882820252
C3_06820C_A	TAF12	orf19.6820	-1,77	4,376510034
C4_03390W_A	CSH3	orf19.3366	-1,74	9,808595145
C5_05480W_A	DES1	orf19.4048	-1,73	4,560691772
C4_06650W_A		orf19.2867	-1,69	3,940340347
C6_01510W_A	OYE23	orf19.3433	-1,66	9,795229548
C7_03050W_A		orf19.5156	-1,64	10,46243866
C1_02330C_A		orf19.3690.2	-1,56	14,35252978
C1_13190W_A		orf19.4947	-1,56	11,04593321
C3_01140W_A		orf19.2516	-1,56	8,624481572
C7_04190C_A	UTP18	orf19.7154	-1,56	4,371840678
C2_10700C_A		orf19.5350	-1,52	3,310550121
C1_02110C_A	HGT2	orf19.3668	-1,46	6,239304082
C1_13680C_A	GCV3	orf19.5006	-1,41	9,362265089
C3_02120W_A		orf19.1634	-1,37	5,12624438
CR_07370W_A		orf19.6132	-1,36	5,860533096
C7_02840C_A	ERG5	orf19.5178	-1,35	11,01935465
C4_01160W_A	CRD2	orf19.4674.1	-1,31	3,971257357
C7_01740C_A		orf19.6551	-1,27	4,970377241
C1_10550C_A	GCA2	orf19.999	-1,26	8,164497864
C7_00140C_A		orf19.7109	-1,24	5,30640379
C6_01460C_A		orf19.3438	-1,23	6,113796792
C5_02190C_A		orf19.4225.1	-1,21	4,122524437
C1_01220C_A		orf19.3310	-1,2	2,974000081
C2_00300C_A	CKB1	orf19.2102	-1,17	3,175870824
C7_00920C_A		orf19.7022	-1,16	4,676158761
CR_02140W_A	RSR1	orf19.2614	-1,15	4,224741773
C4_03020W_A	MGM1	orf19.2690	-1,08	4,907748749
C1_04220C_A		orf19.1057	-1,07	5,180778975
C6_00330C_A	GNP1	orf19.1193	-1,04	3,60155179
C2_00210W_A	RPL38	orf19.2111.2	-1,01	6,689384761
C1_01630W_A		orf19.3353	-0,99	4,372062821
C7_00170W_A	VPS70	orf19.7106	-0,95	3,34468953
C1_10040W_A	ERO1	orf19.4871	-0,94	5,965998119
C3_04890W_A	CDR2	orf19.5958	-0,94	1,690917695
C7_00400W_A	LEU2	orf19.7080	-0,93	4,950085134
C4_01020C_A		orf19.4686	-0,91	2,03972102
CR_09600C_A	YKE2	orf19.6601.1	-0,88	1,5739891
C2_00850W_A	MSF1	orf19.2039	-0,86	2,798158808
C7_00790W_A		orf19.7038	-0,83	3,133933915
C2_10850C_A		orf19.5368	-0,83	2,268359265
C6_00090W_A		orf19.6328	-0,83	1,917070485
CR_00310C_A		orf19.7502	-0,82	4,017286859
CR_05390W_A	PST3	orf19.5285	-0,81	4,646253398
C1_06470W_A		orf19.6264.4	-0,81	4,054052161
C2_06080C_A		orf19.4112	-0,81	2,536535516
C1_01690C_A	LSC1	orf19.3358	-0,78	4,364936299

C7_02930C_A		orf19.5168	-0,78	2,375627475
C3_01430W_A		orf19.1708	-0,78	2,277109071
C1_00770C_A	ROT1	orf19.6029	-0,77	2,22770912
C6_02560W_A		orf19.5525	-0,76	4,178246435
C7_01710W_A		orf19.6553	-0,75	2,9111107621
C2_00190C_A		orf19.2113	-0,75	2,754800425
C2_07630C_A		orf19.1862	-0,73	3,948561342
CR_08480C_A		orf19.6415.1	-0,73	3,913293517
C6_00150W_A	ARD	orf19.6322	-0,72	3,396130211
C6_02630C_A		orf19.5533	-0,71	1,369620585
C2_10220C_A	PHO23	orf19.1759	-0,69	2,062912313
C1_07880C_A	GCS1	orf19.5059	-0,69	1,939562564
C1_09150W_A	AOX2	orf19.4773	-0,67	3,046069432
C1_04770C_A	ERG3	orf19.767	-0,67	2,880186705
C1_03020C_A	RPL13	orf19.2994	-0,66	3,328902695
C5_02600W_A	PUT1	orf19.4274	-0,66	2,408531179
C2_02260W_A		orf19.1544	-0,66	1,396703908
C4_07030W_A	MET16	orf19.3106	-0,65	2,013385605
CR_04780W_A	RPB8	orf19.6314	-0,65	1,774239164
CR_01490C_A		orf19.2533.1	-0,64	2,38514489
C7_01640W_A	LAT1	orf19.6561	-0,63	3,098467924
C7_02390W_A	AHP2	orf19.6470	-0,63	3,09549652
C3_05560W_A	PRE3	orf19.6991	-0,63	2,601308519
C7_03330C_A	SHM1	orf19.1342	-0,62	3,030781018
C6_04170C_A	SEC5	orf19.74	-0,62	2,309783153
C2_06770W_A		orf19.2228	-0,6	2,070537951
C1_02130C_A	GAL1	orf19.3670	-0,59	2,828643634
C3_03400C_A	VTI1	orf19.337	-0,59	2,219069812
C7_02060W_A	LIG1	orf19.6511	-0,59	1,6090544
C3_06240C_A		orf19.7409.1	-0,58	1,997749694
C6_02480W_A		orf19.5517	-0,57	1,807526815
C2_02860W_A	SUR2	orf19.5818	-0,57	1,753072291
C1_07230W_A	PHO15	orf19.4444	-0,57	1,492109133
CR_09270C_A	CBP1	orf19.7323	-0,56	2,373295188
C1_13650C_A		orf19.5003	-0,56	1,886570462
C7_02610C_A		orf19.2371	-0,56	1,734862796
C7_03660C_A		orf19.6701	-0,55	2,562183387
CR_05170C_A	FDH1	orf19.638	-0,55	2,558101615
C2_03990W_A	GCD7	orf19.825	-0,55	1,896806648
CR_02700W_A		orf19.2829	-0,54	1,653380175
C2_09510C_A		orf19.1403	-0,54	1,363718343
C2_01120W_A	KAR2	orf19.2013	-0,53	2,392213819
C6_02880W_A		orf19.5564	-0,53	1,943049982
C6_02410W_A		orf19.3482	-0,53	1,920836049
CR_10580W_A	PRO1	orf19.7638	-0,53	1,751703075
C7_02030W_A	HSP90	orf19.6515	-0,52	2,348130968
C7_01800C_A	PFK2	orf19.6540	-0,52	2,32509808
CR_06170W_A		orf19.3872	-0,52	1,816777903
C2_06290C_A	ATP14	orf19.5491.1	-0,51	2,049787525
C6_03620C_A		orf19.5730	-0,51	1,473159334
C2_05610C_A	RPS8A	orf19.6873	-0,5	2,22030862
C5_02230W_A		orf19.4230	-0,5	1,592291654
C7_04020C_A	PRE5	orf19.7178	-0,49	1,956771923
C7_03370C_A		orf19.1338	-0,49	1,849613261
C1_03130C_A	GGA2	orf19.3006	-0,48	1,554864808
C6_02470W_A		orf19.5516	-0,48	1,500502012
C3_04380C_A		orf19.5885	-0,46	1,928331404
C1_13870W_A	MET3	orf19.5025	-0,46	1,710222031
C1_02860C_A	YKT6	orf19.2974	-0,45	1,711261341

C3_03920W_A		orf19.6923.1	-0,45	1,601198459
C6_02610C_A	CDC37	orf19.5531	-0,44	1,645541805
C7_00300W_A		orf19.7092	-0,44	1,528085904
C2_08100W_A		orf19.2175	-0,44	1,441772296
C5_04490C_A	CAR1	orf19.3934	-0,44	1,355250522
C7_04300W_A	SPT6	orf19.7136	-0,43	1,583708501
C7_04040C_A	NPT1	orf19.7176	-0,43	1,420903078
C1_01740W_A	CTN1	orf19.4551	-0,42	1,443260616
C1_00800C_A	ERG2	orf19.6026	-0,41	1,320534907
C2_04370W_A		orf19.4517	-0,4	1,606110657
C7_03870W_A	RAD6	orf19.7195	-0,39	1,437987294
C7_04210C_A		orf19.7152	-0,38	1,54174194
C6_01700W_A	RPL32	orf19.3415.1	-0,37	1,443932411
CR_10840C_A	XYL2	orf19.7676	-0,34	1,325471406
C2_04010C_A	HSP21	orf19.822	-0,34	1,32011471
C4_02020W_A	CAT2	orf19.4591	0,49	1,373890894
C3_04670C_A	RPS15	orf19.5927	0,5	1,411071134
C2_01020W_A	HGT6	orf19.2020	0,53	1,580034823
C1_10680C_A		orf19.1840	0,53	1,560061579
C6_01610W_A	ANB1	orf19.3426	0,53	1,547895365
CR_09010C_A		orf19.7297	0,55	1,663485297
C5_03390C_A	FUR1	orf19.2640	0,55	1,317533942
C6_01930W_A	YHM1	orf19.685	0,56	1,71916132
C6_03230W_A	ARG3	orf19.5610	0,56	1,449406909
C1_11660W_A	GAD1	orf19.1153	0,57	1,762232705
C1_10470W_A		orf19.989	0,58	1,389440831
C3_04680W_A	RPP2B	orf19.5928	0,59	1,879248737
C5_02210W_A		orf19.4228	0,59	1,396670624
C1_13420C_A	KEM1	orf19.4969	0,59	1,361766299
C2_04280W_A		orf19.792	0,6	1,428911923
C6_03080C_A	ADO1	orf19.5591	0,61	2,012938199
C2_04220C_A	TAF14	orf19.798	0,61	1,51743735
C5_00500W_A	NAM7	orf19.939	0,62	1,444365701
C2_07140W_A		orf19.2269	0,63	1,94047669
C5_05300W_A	RIB5	orf19.4024	0,63	1,611773469
C1_04460C_A		orf19.6838	0,64	1,463180221
CR_09690C_A	PLB3	orf19.6594	0,65	1,807117379
C3_04000C_A	CTN3	orf19.2809	0,65	1,690702598
C4_00410W_A		orf19.5669	0,65	1,567070634
C3_02500W_A	PAM17	orf19.240	0,66	1,713016276
C6_03900W_A	NUP82	orf19.5765	0,67	1,80237367
C5_04470C_A		orf19.3932	0,69	2,542934391
C5_01230C_A		orf19.1946	0,69	2,104562573
C2_08130W_A	ARA1	orf19.2172	0,7	2,59875305
C3_04810C_A		orf19.5943.1	0,71	2,643398302
C6_02770W_A	MRT4	orf19.5550	0,71	2,012774266
CR_02860W_A	RHO1	orf19.2843	0,72	2,765475171
C1_10830W_A	BIG1	orf19.2334	0,72	1,637322003
C1_08120W_A	BUD6	orf19.5087	0,72	1,334861119
CR_02530W_A	DBP2	orf19.171	0,73	1,59599683
C1_08450C_A	CDC42	orf19.390	0,74	1,956672147
C1_00490C_A	TTR1	orf19.6059	0,76	2,759617996
C4_05180C_A		orf19.748	0,76	2,037386061
C3_06450W_A	GLG2	orf19.7434	0,79	1,840704235
C2_04790C_A		orf19.185	0,8	2,480816341
C5_03400C_A		orf19.2639.1	0,81	2,657948548
C3_02960C_A	KRE5	orf19.290	0,82	1,414919768
C3_03760W_A		orf19.6941	0,85	2,200520144
C2_04870C_A		orf19.4123	0,88	1,400120304

C2_10200W_A		orf19.1761	0,89	2,385064636
C4_03840C_A	RRP42	orf19.5039	0,94	1,927530109
C1_09290C_A	ARG5,6	orf19.4788	0,96	3,931860612
CR_10700W_A	RFC4	orf19.7658	0,97	3,00167544
C2_02740C_A	HPT1	orf19.5832	1	3,817524322
C6_00950C_A	TOP1	orf19.96	1	2,654586738
CR_05140W_A		orf19.640	1,02	1,433647747
CR_05500C_A		orf19.5852	1,02	1,393794012
C6_02330W_A		orf19.3475	1,04	5,49977824
C2_05590C_A		orf19.6872	1,04	3,183382121
C5_02080C_A	HSP12	orf19.3160	1,05	5,583533728
C1_08330C_A	ADH2	orf19.5113	1,06	5,668651023
CR_01300W_A		orf19.3223.1	1,06	3,222233901
C2_10250C_A	SET2	orf19.1755	1,07	1,451397433
C5_03250W_A	RMS1	orf19.2654	1,09	1,631008499
CR_09970W_A	UBC4	orf19.7571	1,11	6,193053671
CR_06730W_A	APG7	orf19.707	1,11	1,897501585
C2_05150W_A	PEX2	orf19.3546	1,11	1,617584092
CR_02110W_A	MCM6	orf19.2611	1,13	3,043498514
C4_03770W_A		orf19.1301	1,21	3,740560752
C1_10380C_A	CBK1	orf19.4909	1,23	4,225958051
C6_04420W_A		orf19.2125	1,31	6,720081941
C1_08810C_A	MSS116	orf19.4739	1,35	3,338607009
C3_04290C_A	SNF5	orf19.5871	1,43	3,175184732
CR_07860C_A	ASF1	orf19.3715	1,7	7,747522089
C4_06120W_A	GDH3	orf19.4716	1,91	12,34950031
C6_04220C_A	HBR2	orf19.1078	3,01	17
CR_00920W_A	CCE1	orf19.3264	6,64	17
CR_00590W_A	PHO81	orf19.7475	6,64	17
CR_06900C_A	ALG6	orf19.1843	6,64	17
C1_06210W_A	BUD16	orf19.1828	6,64	17
C1_00910W_A		orf19.6013	6,64	17
C6_03210C_A		orf19.5608	6,64	17
C6_00680C_A		orf19.4192.1	6,64	17
C4_00590C_A		orf19.4184	6,64	17
CR_10390W_A		orf19.7615	6,64	17
C3_07400W_A		orf19.6751	6,64	17
C5_03990W_A	MID1	orf19.3212	6,64	17
C1_04560W_A		orf19.6850	6,64	17
CR_05890C_A		orf19.6625	6,64	17
C7_02490W_A	PEX1	orf19.6460	6,64	17
CR_03860C_A		orf19.4357	6,64	17
C2_08640C_A	PST2	orf19.3612	6,64	17
C3_05280C_A		orf19.6007	6,64	17
C4_06470W_A		orf19.2887	6,64	17
C1_01240W_A	IFD3	orf19.3311	6,64	17
C1_01930W_A		orf19.4530.1	6,64	17
C1_10390C_A	RPL42	orf19.4909.1	6,64	17

Anexo 3. Proteínas identificadas en las cepas CAF2-RFP y μ Ev180 con un valor $p < 0,05$. La *ratio* de abundancia CAF2-RFP/ μ Ev180 se expresa en \log_2 y la *ratio* del valor p en $-\log_{10}$.

Nombre sistemático	Nombre estándar	Identificador (assembly 19/21)	Ratio abundancia	Ratio Valor p
C2_06940C_A	ARE2	orf19.2248	-6,64	17
C1_10740C_A	ASR1	orf19.2344	-6,64	17
CR_09890C_A	BET2	orf19.7563	-6,64	17
C1_00320W_A		orf19.6076	-6,64	17
C1_02850W_A		orf19.2973	-6,64	17
C1_05790W_A		orf19.2472.1	-6,64	17
C1_07160C_A		orf19.4450.1	-6,64	17
C2_01920C_A		orf19.1504	-6,64	17
C2_04170C_A		orf19.804.1	-6,64	17
C2_05170W_A		orf19.3548	-6,64	17
C2_07200W_A		orf19.2276	-6,64	17
C2_09910C_A		orf19.1360.1	-6,64	17
C3_00610W_A		orf19.5397	-6,64	17
C3_00660W_A		orf19.5391	-6,64	17
C3_07230W_A		orf19.6778	-6,64	17
C3_07920W_A		orf19.6187	-6,64	17
C4_00230W_A		orf19.5648	-6,64	17
C5_00090C_A		orf19.5688	-6,64	17
C5_01420W_A		orf19.4132	-6,64	17
C5_05200C_A		orf19.4013	-6,64	17
C7_00830C_A		orf19.7034	-6,64	17
C7_01610W_A		orf19.6563.1	-6,64	17
C7_02450W_A		orf19.6464	-6,64	17
C7_02480W_A		orf19.6461	-6,64	17
C7_04240C_A		orf19.7149	-6,64	17
C7_04260W_A		orf19.7144	-6,64	17
C4_05760W_A	CGT1	orf19.1261	-6,64	17
CR_05860W_A		orf19.6627	-6,64	17
CR_08880C_A		orf19.7283	-6,64	17
CR_10170C_A		orf19.7593	-6,64	17
C1_10030W_A	DBP3	orf19.4870	-6,64	17
C7_01420W_A	GIR2	orf19.6587	-6,64	17
C5_01910W_A	GIS2	orf19.3182	-6,64	17
C1_12450C_A	IRA2	orf19.5219	-6,64	17
C2_01780W_A	MSB2	orf19.1490	-6,64	17
CR_04360C_A	NHP2	orf19.526	-6,64	17
C4_05960W_A	NIF3	orf19.4406	-6,64	17
C1_06780W_A	NPR1	orf19.6232	-6,64	17
C2_05440W_A	PEX6	orf19.3573	-6,64	17
C5_05310W_A	PRE1	orf19.4025	-6,64	17
CR_09680C_A	RTA4	orf19.6595	-6,64	17
C1_05260C_A	SDH1	orf19.440	-6,64	17
CR_03210C_A	SSU72	orf19.2402	-6,64	17
C1_10220C_A	TPK1	orf19.4892	-6,64	17
C4_01880W_A	TYR1	orf19.4605	-6,64	17
C2_07590W_A	VMA10	orf19.1866	-6,64	17
C2_05180W_A	WH11	orf19.3548.1	-6,64	17
C1_10390C_A	RPL42	orf19.4909.1	-5,83	17
C1_09750W_A		orf19.4839	-5,35	17

CR_06900C_A	ALG6	orf19.1843	-3,08	10,11047932
C5_01540W_A		orf19.4149.1	-2,54	17
C3_04890W_A	CDR2	orf19.5958	-2,48	9,373382652
C4_01160W_A	CRD2	orf19.4674.1	-2,46	14,27334853
C2_09220W_A	DDR48	orf19.4082	-2,18	17
C1_10170W_A		orf19.4886	-2,16	9,510816884
C6_01510W_A	OYE23	orf19.3433	-2,01	14,87540852
C4_04050C_A	RHD3	orf19.5305	-1,96	17
C2_06110W_A		orf19.4107	-1,94	4,787405992
C1_02330C_A		orf19.3690.2	-1,9	17
C1_08580C_A	VCX1	orf19.405	-1,89	5,773469753
C1_02110C_A	HGT2	orf19.3668	-1,81	10,2169551
C5_05480W_A	DES1	orf19.4048	-1,77	5,081011766
C1_13190W_A		orf19.4947	-1,72	17
C1_02070W_A	HSP31	orf19.3664	-1,72	12,29638752
C7_04190C_A	UTP18	orf19.7154	-1,57	8,291145013
C1_13680C_A	GCV3	orf19.5006	-1,45	13,47746852
C4_03390W_A	CSH3	orf19.3366	-1,37	8,545767257
C1_03020C_A	RPL13	orf19.2994	-1,29	11,07696506
C1_09150W_A	AOX2	orf19.4773	-1,27	12,56969897
C7_03270W_A		orf19.5126	-1,27	6,310947051
C1_06560W_A		orf19.6255	-1,25	4,045042416
C2_00760C_A		orf19.2048	-1,24	8,443685918
C4_00570C_A	PCT1	orf19.4186	-1,23	5,586930184
C2_00210W_A	RPL38	orf19.2111.2	-1,22	10,10975611
C4_06650W_A		orf19.2867	-1,18	2,351042783
C3_07400W_A		orf19.6751	-1,17	2,620318302
C1_00180W_A	RPL16A	orf19.6085	-1,14	9,066660587
C2_03810C_A	RPL21A	orf19.840	-1,14	9,043491635
C6_01460C_A		orf19.3438	-1,14	6,046896297
C4_02200C_A		orf19.4570	-1,14	2,988788977
CR_02980C_A	SRP40	orf19.2859	-1,12	3,761708018
C7_00170W_A	VPS70	orf19.7106	-1,11	5,240497149
C1_10550C_A	GCA2	orf19.999	-1,11	9,34587594
C1_01220C_A		orf19.3310	-1,1	2,844256663
C2_04570W_A		orf19.4492	-1,1	5,338700546
C1_01060W_A	MBF1	orf19.3294	-1,05	7,920018758
C7_00750W_A	ACB1	orf19.7043.1	-1,04	8,442327629
C2_04600C_A	RPL17B	orf19.4490	-1,03	7,704664887
C6_00150W_A	ARD	orf19.6322	-1	7,866727178
CR_03770C_A	RPS30	orf19.4375.1	-0,95	4,993091884
C3_01470W_A	ARF3	orf19.1702	-0,94	4,103026281
C5_02190C_A		orf19.4225.1	-0,91	2,456467767
C6_02560W_A		orf19.5525	-0,91	6,355226453
CR_02140W_A	RSR1	orf19.2614	-0,89	3,236261594
C7_00350C_A		orf19.7085	-0,88	6,026201228
C1_13940W_A	SIM1	orf19.5032	-0,88	1,912596121
C1_06790C_A	MRPL19	orf19.6231	-0,87	3,844499657
C1_06470W_A		orf19.6264.4	-0,87	7,178861168
CR_02710W_A	RRP9	orf19.2830	-0,87	2,221925594
C7_00150W_A		orf19.7108	-0,86	5,698437983
C4_03190W_A		orf19.2671	-0,85	1,536987386
C7_03720C_A	HIS7	orf19.5505	-0,82	4,225470083
C2_02100W_A	SNF2	orf19.1526	-0,8	1,443689427
C1_09440W_A		orf19.4807	-0,8	2,152674533
C3_07150C_A	RPS12	orf19.6785	-0,79	5,119911028
C6_03920W_A	SNF4	orf19.5768	-0,77	3,132687464
C3_00820W_A	SCT1	orf19.1289	-0,76	2,814959518
C3_01710C_A	PPT1	orf19.1673	-0,75	6,149987687

C6_01760W_A	SEC12	orf19.3409	-0,75	2,875834053
C1_09760C_A	SHY1	orf19.4841	-0,75	1,791474555
C6_02880W_A		orf19.5564	-0,73	3,578797599
C5_04490C_A	CAR1	orf19.3934	-0,69	3,304558119
C4_01020C_A		orf19.4686	-0,69	1,653177764
C3_04180W_A	KRE9	orf19.5861	-0,66	2,75394711
C2_04480W_A		orf19.4504	-0,65	2,367439512
CR_00310C_A		orf19.7502	-0,64	4,963890265
C1_01940C_A		orf19.4529	-0,63	3,131783539
C2_00600C_A		orf19.2067	-0,62	1,783462981
C1_08790W_A	TPO3	orf19.4737	-0,62	1,638473169
C1_10040W_A	ERO1	orf19.4871	-0,62	3,621865368
C4_00330C_A		orf19.5660.1	-0,62	3,931297666
C6_01700W_A	RPL32	orf19.3415.1	-0,58	3,292691793
C7_02060W_A	LIG1	orf19.6511	-0,57	2,072865487
C7_00860W_A	SSR1	orf19.7030	-0,57	1,487032568
C2_09320C_A	PES1	orf19.4093	-0,57	4,2076537
C2_02260W_A		orf19.1544	-0,54	1,353680448
C2_03790C_A	ASR3	orf19.842	-0,53	3,455378772
C3_00110C_A	SEC6	orf19.5463	-0,53	1,608473671
C1_04220C_A		orf19.1057	-0,52	2,437918119
C7_02840C_A	ERG5	orf19.5178	-0,52	2,871015004
CR_05390W_A	PST3	orf19.5285	-0,51	2,835112186
C1_04240C_A	HHF1	orf19.1059	-0,51	2,803198597
C4_02120W_A	ERV29	orf19.4579	-0,51	2,754123215
C2_01120W_A	KAR2	orf19.2013	-0,51	2,790224829
C6_03820C_A		orf19.5757	-0,5	1,665572366
CR_00620C_A	ARG1	orf19.7469	-0,5	2,757753006
C1_12680W_A		orf19.6355	-0,5	1,702819358
C1_02130C_A	GAL1	orf19.3670	-0,5	2,767000245
C1_12390C_A	RPL27A	orf19.5225.2	-0,46	2,484307031
C1_03940W_A		orf19.4468	-0,46	2,996197462
C7_00960W_A	RPS18	orf19.7018	-0,43	2,254615827
CR_08480C_A		orf19.6415.1	-0,4	2,059747168
C2_07260C_A	DQD1	orf19.2283	-0,4	1,469790939
C2_02270C_A		orf19.1545	-0,4	1,726132342
CR_03280W_A	IFR2	orf19.2396	-0,39	2,0549507
CR_01490C_A		orf19.2533.1	-0,39	1,779622608
C4_06710W_A		orf19.3139	-0,38	1,71623648
C1_11580W_A		orf19.1162	-0,38	1,347915318
C1_11060C_A	RPL2	orf19.2309.2	-0,37	1,938696016
C2_02510W_A	PRS1	orf19.1575	-0,35	1,591837859
C1_14460W_A		orf19.7264	-0,35	1,798298603
CR_10580W_A	PRO1	orf19.7638	-0,35	1,539094823
C2_04490W_A		orf19.4503	-0,35	2,224913847
C1_06890C_A		orf19.6220.4	-0,35	1,777194105
C1_06480C_A		orf19.6264.3	-0,34	1,597998595
C6_00930C_A		orf19.94	-0,34	1,743210295
C6_03400C_A	QCR7	orf19.5629	-0,34	1,751796187
C5_03540C_A	RPS25B	orf19.6663	-0,33	1,703887331
C1_13670W_A	OSM2	orf19.5005	-0,33	1,698926728
C7_03660C_A		orf19.6701	-0,32	1,637673846
C5_02230W_A		orf19.4230	-0,32	1,45724811
C3_04500C_A	RPL19A	orf19.5904	-0,32	1,65237853
C6_04170C_A	SEC5	orf19.74	-0,31	1,440620276
C1_01320W_A	MRS7	orf19.3321	-0,3	1,383632386
C3_03790W_A	MEU1	orf19.6938	-0,29	1,343038712
CR_03090C_A	MLC1	orf19.2416.1	-0,29	1,454429421
C7_02120C_A		orf19.6503	-0,29	1,367131529

C1_09520C_A		orf19.4816	-0,28	1,474019545
C4_07110C_A	PDA1	orf19.3097	-0,28	1,453206397
C3_05220W_A	CDR1	orf19.6000	-0,28	1,762047863
C1_11170W_A	WBP1	orf19.2298	-0,28	1,929048638
C2_05250C_A	AAT1	orf19.3554	-0,27	1,369691623
C7_00110W_A	SOD3	orf19.7111.1	-0,27	1,373513095
C7_04300W_A	SPT6	orf19.7136	-0,26	1,760634253
C7_02780W_A		orf19.5184	-0,26	1,884610573
C3_05560W_A	PRE3	orf19.6991	-0,26	1,96878248
C7_04210C_A		orf19.7152	-0,26	1,33952549
C2_02000W_A		orf19.1514	-0,26	1,655380895
C2_09640W_A	PMI1	orf19.1390	-0,26	1,327643137
CR_09380W_A	PRE8	orf19.7335	-0,24	1,763086859
C2_01390W_A		orf19.1444	-0,24	1,461879113
C2_09780C_A		orf19.1372	-0,24	1,745799904
C4_06720W_A	NOP1	orf19.3138	-0,24	1,319373402
C2_05290C_A		orf19.3558	-0,23	1,70523244
C7_03870W_A	RAD6	orf19.7195	-0,22	1,365579662
C3_04920C_A		orf19.5961	-0,21	1,547150022
CR_09330C_A		orf19.7328	-0,2	1,354882359
C2_09590C_A		orf19.1395	-0,16	1,327946
C5_01770C_A	OBPA	orf19.3198	0,56	1,377900583
C1_01910W_A		orf19.4532	0,57	1,45221315
C1_10780C_A	HNT1	orf19.2341	0,58	1,307164034
C6_04280W_A		orf19.1085	0,58	1,564092065
CR_07590W_A	EMP24	orf19.6293	0,59	1,529252985
C1_03010W_A	RPP1A	orf19.2992	0,59	1,324723764
C1_09030C_A	COX5	orf19.4759	0,59	1,313064971
C2_08130W_A	ARA1	orf19.2172	0,6	1,402079007
C2_00380C_A	RFA1	orf19.2093	0,6	1,626137382
CM_00380W	NAD5	CaalfMp13	0,6	1,454644217
C1_11380W_A	NEP1	orf19.665	0,6	1,402519491
C1_11670W_A		orf19.1152	0,6	1,537362274
C1_12360C_A	RIB3	orf19.5228	0,61	1,451066755
C2_04580W_A	ERG20	orf19.4491	0,61	1,455319377
C1_00640C_A	RPO41	orf19.6041	0,62	1,471295042
C5_00930C_A	TFS1	orf19.1974	0,64	1,599720045
C1_03210C_A	CDC12	orf19.3013	0,64	1,892662118
C1_02650W_A		orf19.2954	0,64	1,918735836
CM_00030W	COX2	CaalfMp01	0,65	1,627801175
C6_00370C_A	NOP5	orf19.1199	0,65	1,934251537
C5_00150C_A		orf19.5682	0,66	1,800628374
C5_04730C_A	SSD1	orf19.3959	0,67	2,005667934
C5_02860C_A	GRP2	orf19.4309	0,68	1,820783711
C2_00480C_A	PHHB	orf19.2079	0,68	1,639808328
C1_03550C_A	COQ6	orf19.3058	0,69	1,903811183
CR_09140C_A		orf19.7310	0,69	1,861775417
C3_02810C_A	FAA21	orf19.272	0,7	1,636093203
C5_03400C_A		orf19.2639.1	0,7	1,913683489
C1_02270C_A		orf19.3684	0,7	1,797049608
C5_00480C_A	SEC14	orf19.941	0,71	2,415074289
C1_10530W_A	SNL1	orf19.997	0,71	2,385036988
C1_04170C_A	HTA2	orf19.1051	0,71	1,996191284
CR_09590W_A		orf19.6602	0,72	1,302750957
CR_09100C_A		orf19.7306	0,74	1,975152949
C1_07630W_A		orf19.2782	0,74	1,505940391
C2_07070W_A		orf19.2262	0,76	2,833806592
CR_09950C_A	SIK1	orf19.7569	0,76	2,701413959
C6_01180C_A	EBP1	orf19.125	0,78	2,423670925

C4_02990C_A	GST2	orf19.2693	0,78	2,886772622
C3_02610C_A	GLX3	orf19.251	0,78	2,416145496
C5_02080C_A	HSP12	orf19.3160	0,79	2,503896302
C4_05860W_A		orf19.1273	0,81	1,618437008
C5_01190W_A		orf19.1953	0,83	1,743589328
C6_01390W_A	HOC1	orf19.3445	0,84	3,247596935
C3_04000C_A	CTN3	orf19.2809	0,85	2,067866881
C1_03300C_A	MAS1	orf19.3026	0,85	1,488595285
CR_08290W_A		orf19.6393	0,87	1,444093948
C6_02890C_A	HPD1	orf19.5565	0,88	1,906977911
CR_06050W_A	CDC28	orf19.3856	0,91	1,757329655
C7_03630C_A	TIM9	orf19.6696	0,92	1,469601209
C5_03390C_A	FUR1	orf19.2640	0,93	3,075587944
C1_08410C_A	SAM4	orf19.386	0,93	1,869111488
C1_13550C_A	NUP49	orf19.4987	0,93	1,487128073
C2_08010W_A	BLM3	orf19.2182	0,97	1,633782574
C4_00170W_A		orf19.5642	0,98	2,021945947
C2_10200W_A		orf19.1761	0,99	1,715456707
C4_04760C_A		orf19.3804	0,99	2,92258563
CR_08500W_A		orf19.6418	1	1,71374954
C1_12960C_A	BNI1	orf19.4927	1	1,407176967
C6_01070C_A	CIP1	orf19.113	1,04	5,749587867
C7_00940W_A	KEX1	orf19.7020	1,06	1,687415385
C5_00560W_A		orf19.933	1,06	4,360886815
CR_04820W_A		orf19.6311	1,07	2,260693678
C2_08620W_A		orf19.3615	1,08	2,932947183
C3_05710W_A	RCT1	orf19.7350	1,08	4,737265798
C4_03040W_A		orf19.2687.1	1,12	1,744474017
C1_04010C_A		orf19.4476	1,12	3,213127056
C5_01110W_A		orf19.1959	1,13	1,579048252
C2_00260C_A	MUQ1	orf19.2107	1,13	2,758068682
C6_01900C_A	DOG1	orf19.3392	1,14	1,646468247
CR_09370W_A	ELF1	orf19.7332	1,15	3,784514823
C1_01830C_A	UBC8	orf19.4540	1,15	2,614703026
C1_14420W_A	DDI1	orf19.7258	1,15	4,072008962
C1_13910C_A	MODF	orf19.5029	1,16	1,569423306
C1_04380W_A	SIT4	orf19.5200	1,24	1,41784489
CR_07890W_A	EFG1	orf19.610	1,25	3,037661212
CR_02950C_A		orf19.2852	1,27	4,203355436
C4_04500C_A		orf19.3836	1,28	2,078467883
C2_04050C_A	DCK1	orf19.815	1,3	4,434099965
C2_08590W_A	YWP1	orf19.3618	1,31	9,268234006
C2_09900C_A	TIM23	orf19.1361	1,33	6,222939582
C6_04420W_A		orf19.2125	1,34	7,282742247
C2_01840C_A	RAD7	orf19.1493	1,35	1,798932336
C6_00700C_A		orf19.3659	1,39	2,241445578
CR_05220C_A	GUT1	orf19.558	1,41	2,4063979
CR_08000C_A		orf19.597	1,49	5,190630969
CR_02570C_A		orf19.164	1,49	3,630628717
C6_03470W_A		orf19.5711	1,53	4,718884504
C1_03800W_A	RPP1	orf19.1029	1,54	1,637087312
C3_01480C_A	RKI1	orf19.1701	1,55	1,779529979
C7_03080W_A	LMO1	orf19.5147	1,57	4,672758085
C4_03590C_A	OSH3	orf19.1317	1,57	4,398835354
C1_09450C_A	NUP188	orf19.4808	1,59	3,860556367
C4_04750W_A		orf19.3806	1,6	2,113586809
C1_04520C_A	PHO85	orf19.6846	1,62	6,851402382
C6_02690C_A		orf19.5541	1,95	8,725091256
C3_06700C_A		orf19.7459	2,03	8,562153753

C3_02550C_A	DCG1	orf19.244	2,28	3,880558993
C5_02140C_A		orf19.4220	2,5	17
C3_06090C_A	OCH1	orf19.7391	2,54	8,149052811
C1_09980C_A		orf19.4864	3,29	17
C4_06000W_A	ALG1	orf19.4410	6,64	17
C1_13370W_A		orf19.4963	6,64	17
C3_04780C_A		orf19.5941	6,64	17
C4_03960W_A		orf19.787.1	6,64	17
C5_04410C_A		orf19.3928	6,64	17
C6_00170C_A		orf19.6319	6,64	17
C6_01890C_A		orf19.3393	6,64	17
C6_03430C_A		orf19.5702	6,64	17
C7_02340C_A		orf19.6477	6,64	17
CR_00920W_A	CCE1	orf19.3264	6,64	17
C4_06480C_A	CEK1	orf19.2886	6,64	17
C7_03060C_A	CHS6	orf19.5155	6,64	17
C6_01170W_A	CIC1	orf19.124	6,64	17
CR_00130C_A		orf19.7522	6,64	17
CR_05890C_A		orf19.6625	6,64	17
CR_07370W_A		orf19.6132	6,64	17
C6_00330C_A	GNP1	orf19.1193	6,64	17
C7_03170W_A	IFA21	orf19.5138	6,64	17
CR_02110W_A	MCM6	orf19.2611	6,64	17
C5_03990W_A	MID1	orf19.3212	6,64	17
CR_00560W_A	NTH1	orf19.7479	6,64	17
CR_00590W_A	PHO81	orf19.7475	6,64	17
C2_08640C_A	PST2	orf19.3612	6,64	17
C2_02430W_A	UTP21	orf19.1566	6,64	17

Anexo 4. Proteínas identificadas en las cepas CAF2-RFP y μ Ev366 con un valor $p < 0,05$. La *ratio* de abundancia CAF2-RFP/ μ Ev366 se expresa en \log_2 y la *ratio* del valor p en $-\log_{10}$.

Nombre sistemático	Nombre estándar	Identificador (assembly 19/21)	Ratio abundancia	Ratio Valor p
C6_04050W_A		orf19.1219	-6,64	17
C4_05760W_A	CGT1	orf19.1261	-6,64	17
C2_09910C_A		orf19.1360.1	-6,64	17
C2_01780W_A	MSB2	orf19.1490	-6,64	17
C2_01920C_A		orf19.1504	-6,64	17
CR_06900C_A	ALG6	orf19.1843	-6,64	17
C2_07590W_A	VMA10	orf19.1866	-6,64	17
C2_00070C_A	MPP10	orf19.1915	-6,64	17
C2_01000W_A	HGT7	orf19.2023	-6,64	17
C2_07200W_A		orf19.2276	-6,64	17
CR_03210C_A	SSU72	orf19.2402	-6,64	17
C1_05790W_A		orf19.2472.1	-6,64	17
C5_01910W_A	GIS2	orf19.3182	-6,64	17
C2_05180W_A	WH11	orf19.3548.1	-6,64	17
C5_05200C_A		orf19.4013	-6,64	17

C5_05310W_A	PRE1	orf19.4025	-6,64	17
C1_05260C_A	SDH1	orf19.440	-6,64	17
C1_07160C_A		orf19.4450.1	-6,64	17
C4_01880W_A	TYR1	orf19.4605	-6,64	17
C1_10030W_A	DBP3	orf19.4870	-6,64	17
C1_10220C_A	TPK1	orf19.4892	-6,64	17
C1_10290W_A	GCA1	orf19.4899	-6,64	17
C1_12450C_A	IRA2	orf19.5219	-6,64	17
C3_00660W_A		orf19.5391	-6,64	17
C4_00230W_A		orf19.5648	-6,64	17
CR_07920W_A		orf19.606	-6,64	17
C1_00320W_A		orf19.6076	-6,64	17
C3_07920W_A		orf19.6187	-6,64	17
C1_06780W_A	NPR1	orf19.6232	-6,64	17
C7_02450W_A		orf19.6464	-6,64	17
C7_01610W_A		orf19.6563.1	-6,64	17
CR_09680C_A	RTA4	orf19.6595	-6,64	17
C3_07230W_A		orf19.6778	-6,64	17
C7_01340W_A	MRE11	orf19.6915	-6,64	17
C7_00830C_A		orf19.7034	-6,64	17
C7_04240C_A		orf19.7149	-6,64	17
CR_08880C_A		orf19.7283	-6,64	17
CR_09890C_A	BET2	orf19.7563	-6,64	17
CR_10170C_A		orf19.7593	-6,64	17
C2_04170C_A		orf19.804.1	-6,64	17
C1_10550C_A	GCA2	orf19.999	-5,86	17
C2_06110W_A		orf19.4107	-5,11	17
C6_03430C_A		orf19.5702	-4,13	14,47746852
C1_08580C_A	VCX1	orf19.405	-3,62	13,04183647
C4_00970C_A	MDN1	orf19.4697	-3,56	11,96835564
C2_09220W_A	DDR48	orf19.4082	-3,26	17
C1_02110C_A	HGT2	orf19.3668	-3,24	17
C1_07360W_A		orf19.4435	-2,91	17
CR_03450W_A	HXT5	orf19.4384	-2,7	17
C4_06000W_A	ALG1	orf19.4410	-2,68	12,52580726
C7_04190C_A	UTP18	orf19.7154	-2,61	10,37287899
C5_01540W_A		orf19.4149.1	-2,48	17
C4_00560C_A	MMM1	orf19.4187	-2,01	4,535596353
C5_05480W_A	DES1	orf19.4048	-1,94	5,805797582
C4_04440W_A		orf19.3843	-1,86	9,205438523
C2_02100W_A	SNF2	orf19.1526	-1,83	3,866449163
C4_00630C_A	SEC72	orf19.4180	-1,82	8,094237064
C1_13190W_A		orf19.4947	-1,73	12,08594533
C6_02560W_A		orf19.5525	-1,71	15,35252978
C1_02330C_A		orf19.3690.2	-1,63	14,12208086
CR_08870W_A	PEX13	orf19.7282	-1,6	3,00972452
C4_01160W_A	CRD2	orf19.4674.1	-1,47	2,868086269
C3_06820C_A	TAF12	orf19.6820	-1,44	2,907923648
C3_04890W_A	CDR2	orf19.5958	-1,43	2,672715434
C3_07400W_A		orf19.6751	-1,33	2,488413067
C4_03390W_A	CSH3	orf19.3366	-1,32	4,874662713
C4_06650W_A		orf19.2867	-1,31	2,349187148
C6_00150W_A	ARD	orf19.6322	-1,29	9,432050863
C1_09760C_A	SHY1	orf19.4841	-1,28	2,942033939
C2_04480W_A		orf19.4504	-1,25	4,634455537
C2_04570W_A		orf19.4492	-1,24	4,539916407
C1_09750W_A		orf19.4839	-1,23	2,144022077
C1_02180W_A	GAL7	orf19.3675	-1,21	6,525312643
C2_08450W_A		orf19.3635	-1,21	4,10506567

C6_02980C_A		orf19.5576	-1,2	2,16029503
C6_01460C_A		orf19.3438	-1,19	4,743817176
C1_13550C_A	NUP49	orf19.4987	-1,19	3,400172431
C2_03810C_A	RPL21A	orf19.840	-1,13	7,44423657
C7_00140C_A		orf19.7109	-1,13	3,415784193
C1_02130C_A	GAL1	orf19.3670	-1,12	7,381260865
C3_04080W_A		orf19.913.2	-1,1	3,515291696
CR_04510W_A	HXK2	orf19.542	-1,08	6,974082108
C1_13680C_A	GCV3	orf19.5006	-1,08	6,190702493
C1_10280C_A		orf19.4898	-1,07	6,839652918
C2_00210W_A	RPL38	orf19.2111.2	-1,07	6,886667908
C6_01510W_A	OYE23	orf19.3433	-1,06	2,876693249
C4_04050C_A	RHD3	orf19.5305	-1,04	4,280544003
C4_01780C_A		orf19.4615	-1	2,359733068
CR_05380C_A	YCP4	orf19.5286	-0,97	5,80775015
C1_02150W_A	GAL10	orf19.3672	-0,96	5,767879082
CR_04520W_A	MIM1	orf19.542.2	-0,96	2,947233987
C2_00320W_A		orf19.2101	-0,94	1,643233694
C3_03010C_A	DTD2	orf19.297	-0,93	2,743574047
CR_02140W_A	RSR1	orf19.2614	-0,93	2,504559882
CR_05130C_A		orf19.641	-0,92	1,526800157
C1_10170W_A		orf19.4886	-0,9	1,421044182
C1_12680W_A		orf19.6355	-0,9	2,747918846
C1_10500W_A		orf19.993	-0,88	1,760627583
C1_13020C_A	SPC3	orf19.4930	-0,88	1,832920714
C1_09440W_A		orf19.4807	-0,87	1,706422207
C7_03270W_A		orf19.5126	-0,86	2,19120274
CR_00980C_A	CAB3	orf19.3260	-0,85	2,587921168
C2_01020W_A	HGT6	orf19.2020	-0,85	4,701599325
C3_05770C_A	SAM50	orf19.7358	-0,83	1,308243986
C6_03820C_A		orf19.5757	-0,83	2,526447788
C1_00180W_A	RPL16A	orf19.6085	-0,82	4,430067478
C1_13650C_A		orf19.5003	-0,82	2,862289263
C7_00150W_A		orf19.7108	-0,8	2,782305028
C1_03020C_A	RPL13	orf19.2994	-0,79	4,258423442
C3_00110C_A	SEC6	orf19.5463	-0,74	1,953165515
C1_03940W_A		orf19.4468	-0,71	2,954538111
C2_04200W_A	TBF1	orf19.801	-0,7	1,494172017
C2_06290C_A	ATP14	orf19.5491.1	-0,7	3,384413171
CR_02530W_A	DBP2	orf19.171	-0,68	1,645477416
C2_08790W_A	JEM1	orf19.3592	-0,67	1,67450955
C1_09810W_A		orf19.4846	-0,63	1,430742886
CR_00580W_A	YRB1	orf19.7477	-0,63	2,486679712
CR_10840C_A	XYL2	orf19.7676	-0,62	2,927992573
C3_01140W_A		orf19.2516	-0,62	1,634383685
C2_02860W_A	SUR2	orf19.5818	-0,61	1,681279404
CR_01140C_A	ERG27	orf19.3240	-0,61	1,668821277
CR_00230W_A		orf19.7511	-0,61	1,587855234
C5_05050W_A	ADH1	orf19.3997	-0,59	2,748070998
C6_02010C_A	GPD2	orf19.691	-0,59	1,74488179
C1_10040W_A	ERO1	orf19.4871	-0,59	2,760470195
C3_01710C_A	PPT1	orf19.1673	-0,59	2,548732514
C6_03260W_A		orf19.5614	-0,59	2,573110177
CR_05390W_A	PST3	orf19.5285	-0,58	2,664419329
C1_08500C_A	ENO1	orf19.395	-0,57	2,58980939
CR_00310C_A		orf19.7502	-0,57	2,268981984
CR_10850C_A	ATP16	orf19.7678	-0,57	2,63414199
C7_02840C_A	ERG5	orf19.5178	-0,54	2,434478991
C2_05460W_A	CDC19	orf19.3575	-0,54	2,424885156

C3_07810C_A	SEC61	orf19.6176	-0,54	2,484625504
C1_13320C_A		orf19.4959	-0,54	1,428931739
C2_06770W_A		orf19.2228	-0,53	1,523379699
C4_02270C_A	BFR1	orf19.4560	-0,53	2,37718585
CR_10740W_A	CSM1	orf19.7663	-0,53	1,467606721
C3_01470W_A	ARF3	orf19.1702	-0,52	1,350990132
C4_04530C_A	PHR1	orf19.3829	-0,51	2,212662443
C5_02580W_A		orf19.4271	-0,51	1,548795497
C1_05070C_A	GPI7	orf19.4064	-0,5	1,349371543
C5_02930C_A	GRE3	orf19.4317	-0,49	2,148752526
CR_10580W_A	PRO1	orf19.7638	-0,49	1,380526814
C4_04340C_A	YFH1	orf19.1413	-0,48	1,803851454
C5_04490C_A	CAR1	orf19.3934	-0,47	1,417031469
C6_03340C_A	GLC3	orf19.5622	-0,46	1,938916778
C1_12280C_A		orf19.5235	-0,45	1,795854994
C7_02890C_A	PMT1	orf19.5171	-0,45	1,760249205
C6_00850W_A		orf19.86	-0,45	1,87894778
CR_09550C_A	NUO1	orf19.6607	-0,44	1,624736556
C1_09800C_A	TVP18	orf19.4845	-0,43	1,34468085
C6_04170C_A	SEC5	orf19.74	-0,42	1,418432408
C1_01480C_A	RPS21	orf19.3334	-0,42	1,754895337
C2_01120W_A	KAR2	orf19.2013	-0,42	1,759647633
C4_07110C_A	PDA1	orf19.3097	-0,41	1,679628988
C1_00170W_A	LEU4	orf19.6086	-0,41	1,499380688
C1_11170W_A	WBP1	orf19.2298	-0,41	1,752573733
CR_00620C_A	ARG1	orf19.7469	-0,41	1,688148814
CR_02820W_A	PGM2	orf19.2841	-0,4	1,620955054
C1_13050W_A	RPL14	orf19.4931.1	-0,38	1,538336485
CR_00990W_A		orf19.3259	-0,38	1,373439659
C1_08050W_A		orf19.5077	-0,37	1,312603626
C1_01690C_A	LSC1	orf19.3358	-0,37	1,479262191
C2_04220C_A	TAF14	orf19.798	-0,36	1,307383428
C2_03270W_A	GPM1	orf19.903	-0,35	1,399176153
C1_01490W_A		orf19.3335	-0,35	1,378636389
CR_09270C_A	CBP1	orf19.7323	-0,35	1,424163773
C3_07020W_A	SSN6	orf19.6798	-0,35	1,362874423
C3_06750W_A		orf19.6828.1	-0,33	1,310410864
C6_00790C_A	CTR1	orf19.3646	0,56	1,365357409
C3_02610C_A	GLX3	orf19.251	0,56	1,354784244
C5_05490C_A	HTS1	orf19.4051	0,58	1,434047883
C5_03240W_A	BUB3	orf19.2655	0,58	1,455932373
C7_03920C_A	RPP1B	orf19.7188	0,58	1,449769411
C1_11660W_A	GAD1	orf19.1153	0,58	1,45854653
C5_04880C_A	PUT2	orf19.3974	0,61	1,560379748
C7_03030W_A		orf19.5158	0,62	1,411444696
C1_08330C_A	ADH2	orf19.5113	0,63	1,665965967
C1_04070C_A	BET4	orf19.1039	0,63	1,343531332
C2_08130W_A	ARA1	orf19.2172	0,63	1,678363497
C5_04440C_A	SFC1	orf19.3931	0,64	1,53970873
C7_02380C_A	CYP1	orf19.6472	0,64	1,734804696
C7_03360W_A	CPY1	orf19.1339	0,64	1,592279709
C6_03080C_A	ADO1	orf19.5591	0,64	1,729992347
C1_10780C_A	HNT1	orf19.2341	0,66	1,836651329
C4_01370W_A	ILV6	orf19.4650	0,66	1,616912982
C1_09460W_A	ERG12	orf19.4809	0,67	1,622254087
C1_02270C_A		orf19.3684	0,68	1,343372788
C6_01180C_A	EBP1	orf19.125	0,68	1,979734479
C3_01990W_A	RNA1	orf19.1649	0,69	1,846308335
C7_00550C_A	GLN4	orf19.7064	0,7	1,920272167

C6_01860C_A	HCH1	orf19.3396	0,73	1,955487148
C2_06890C_A		orf19.2244	0,73	1,947134911
C2_09600C_A		orf19.1394	0,74	1,318665105
C5_00930C_A	TFS1	orf19.1974	0,75	2,368981649
CR_10350C_A	TRX1	orf19.7611	0,77	2,453115284
C4_05670W_A	YME1	orf19.1252	0,77	1,440515189
C1_08410C_A	SAM4	orf19.386	0,77	1,344346894
C1_02480W_A	PMM1	orf19.2937	0,78	2,521418535
C1_06810W_A	CAT1	orf19.6229	0,78	2,571483694
C4_02340W_A		orf19.2769	0,79	2,640858786
C3_02150C_A	ERG6	orf19.1631	0,81	2,242957991
C2_03560C_A		orf19.863	0,84	2,163407554
C1_02590C_A	SNZ1	orf19.2947	0,84	2,917352202
C4_00170W_A		orf19.5642	0,84	1,427283618
C4_05320W_A	LYS1	orf19.1789.1	0,84	2,951325509
C1_11670W_A		orf19.1152	0,85	2,62866052
C2_01580W_A	REX2	orf19.1466	0,85	1,307748474
C2_05470W_A	COQ5	orf19.3577	0,86	1,832019608
CR_09950C_A	SIK1	orf19.7569	0,86	2,790856501
CR_09110C_A		orf19.7307	0,87	1,527741927
CR_01330W_A	CPA2	orf19.3221	0,87	2,78335636
C5_01770C_A	OBPA	orf19.3198	0,88	2,588891386
C3_04000C_A	CTN3	orf19.2809	0,89	1,775429211
CR_06500C_A		orf19.716	0,9	1,623646573
C1_02970W_A		orf19.2988	0,9	1,482142228
C1_02980W_A	GOR1	orf19.2989	0,9	1,53810125
CR_05150W_A		orf19.639.1	0,93	1,416156473
CR_09140C_A		orf19.7310	0,94	3,668927893
C6_02770W_A	MRT4	orf19.5550	0,94	1,976156199
C7_03120W_A	TIM54	orf19.5143	0,96	1,630090917
C2_04980C_A	CKA2	orf19.3530	1,01	2,269766335
C6_04650W_A		orf19.2163	1,02	1,889831204
C1_14420W_A	DDI1	orf19.7258	1,02	2,322538025
C6_02480W_A		orf19.5517	1,07	2,112112503
C1_07880C_A	GCS1	orf19.5059	1,07	1,455896751
C6_01070C_A	CIP1	orf19.113	1,07	3,871429731
C1_09290C_A	ARG5,6	orf19.4788	1,07	3,930960345
C3_05710W_A	RCT1	orf19.7350	1,09	4,924732292
C2_00260C_A	MUQ1	orf19.2107	1,09	2,309253474
CR_03760W_A		orf19.4375	1,11	2,712939901
CR_04650W_A		orf19.1738.1	1,12	2,297892206
C6_00950C_A	TOP1	orf19.96	1,12	1,666064891
C4_03040W_A		orf19.2687.1	1,18	2,053946531
C2_04010C_A	HSP21	orf19.822	1,18	5,727391936
C7_00940W_A	KEX1	orf19.7020	1,19	2,241692318
C2_08000C_A	KRE30	orf19.2183	1,2	5,878093389
CR_08890C_A	ASR2	orf19.7284	1,21	6,008138453
C1_08640W_A	RTG1	orf19.4722	1,21	1,488433163
C1_09450C_A	NUP188	orf19.4808	1,22	2,110468576
C2_05590C_A		orf19.6872	1,26	2,879243977
C1_12140W_A		orf19.5250	1,27	5,541093569
C2_09960W_A		orf19.1356	1,37	1,938802165
C4_04500C_A		orf19.3836	1,38	2,537939437
C1_09620C_A		orf19.4825	1,42	2,129790272
C3_06400C_A		orf19.7425	1,53	1,895028955
C1_08810C_A	MSS116	orf19.4739	1,54	2,735046659
C7_01510W_A		orf19.6578	1,6	2,076450519
C2_07490W_A	HEM15	orf19.1880	1,6	9,629781951
CR_08430W_A		orf19.6411	1,64	3,618678668

C1_13870W_A	MET3	orf19.5025	1,72	8,378040009
CR_04820W_A		orf19.6311	1,76	5,639260494
C1_00640C_A	RPO41	orf19.6041	1,79	9,454064045
C6_02890C_A	HPD1	orf19.5565	1,9	6,46739406
C5_02140C_A		orf19.4220	1,93	10,54607506
CR_03830C_A	MCM2	orf19.4354	2	5,110312016
C7_00600C_A		orf19.7059	2,24	4,050736009
C6_03240W_A		orf19.5611	2,28	9,76233742
C2_02740C_A	HPT1	orf19.5832	2,44	17
C2_04050C_A	DCK1	orf19.815	2,81	17
CM_00520W	COX3B	CaalfMp15	6,64	17
C6_00330C_A	GNP1	orf19.1193	6,64	17
C2_09840W_A	MTW1	orf19.1367	6,64	17
C1_06210W_A	BUD16	orf19.1828	6,64	17
C2_09020W_A	CDC47	orf19.202	6,64	17
C2_00170C_A	HMA1	orf19.2115	6,64	17
CR_02110W_A	MCM6	orf19.2611	6,64	17
C4_06480C_A	CEK1	orf19.2886	6,64	17
C1_03330C_A		orf19.3030	6,64	17
C5_03990W_A	MID1	orf19.3212	6,64	17
CR_00920W_A	CCE1	orf19.3264	6,64	17
C1_01220C_A		orf19.3310	6,64	17
C1_01240W_A	IFD3	orf19.3311	6,64	17
C2_08670C_A	UTP15	orf19.3609	6,64	17
C2_08640C_A	PST2	orf19.3612	6,64	17
C1_02300W_A		orf19.3687	6,64	17
C4_00590C_A		orf19.4184	6,64	17
CR_03860C_A		orf19.4357	6,64	17
C1_01930W_A		orf19.4530.1	6,64	17
C7_03170W_A	IFA21	orf19.5138	6,64	17
C7_03060C_A	CHS6	orf19.5155	6,64	17
C2_10850C_A		orf19.5368	6,64	17
C3_05280C_A		orf19.6007	6,64	17
C1_00910W_A		orf19.6013	6,64	17
CR_07370W_A		orf19.6132	6,64	17
C7_02470C_A		orf19.6462	6,64	17
C7_02340C_A		orf19.6477	6,64	17
C1_04560W_A		orf19.6850	6,64	17
C7_00430W_A		orf19.7077	6,64	17
CR_06520C_A		orf19.714	6,64	17
C3_06070C_A	PBS2	orf19.7388	6,64	17
CR_00590W_A	PHO81	orf19.7475	6,64	17
CR_00130C_A		orf19.7522	6,64	17
C4_03960W_A		orf19.787.1	6,64	17
C2_04270W_A	CAK1	orf19.793	6,64	17
C2_04100W_A		orf19.811	6,64	17

Anexo 5. Publicaciones relacionadas con esta tesis doctoral y otras publicadas durante el periodo de doctorado.

- Correia I, Román, E, Prieto D, Hidalgo-Vico S, Alonso-Monge R & Pla J (2019) Role of *Candida albicans* mating in genetic variability and adaptation to the host. *Fungal Biology Reviews* **33**.
- Urrialde V, Prieto D, Hidalgo-Vico S, Román E, Pla J & Alonso-Monge R (2019) Deletion of the *SKO1* gene in a *hog1* mutante reverts virulence in *Candida albicans*. *Journal of Fungi* **5**.
- Hidalgo-Vico S, Prieto D, Alonso-Monge R, Román E & Pla J (2021) The glyoxilate cycle is involved in the white-opaque switching in *Candida albicans*. *Journal of Fungi* **7**.
- Alonso-Monge R, Prieto D, Coman I, Rochas S, Arana DM, Hidalgo-Vico S, Román E & Pla J (2021) Identification of clinical isolates of *Candida albicans* with increased fitness in colonization of the murine gut. *Journal of Fungi* **7**.



British Mycological
Society promoting fungal science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fbr



Review

Role of *Candida albicans* mating in genetic variability and adaptation to the host

Inês CORREIA^a, Elvira ROMÁN^b, Daniel PRIETO^b, Susana HIDALGO-VICO^b,
Rebeca ALONSO-MONGE^b, Jesús PLA^{b,*}

^aBiomolecular Structure and Function Group, Instituto de Biología Molecular e Celular – IBMC, Instituto para a Investigação e Inovação em Saúde - i3S, Rua Alfredo Allen, 208, 4200-135, Porto, Portugal

^bDepartamento de Microbiología y Parasitología-IRYCIS, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza de Ramón y Cajal s/n, E-28040, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 November 2018

Received in revised form

7 March 2019

Accepted 11 June 2019

Keywords:

Candida albicans

Epigenetic

Mating

Morphogenesis

Variability

White opaque

ABSTRACT

Since its discovery at the end of the XIX century, *Candida albicans* has emerged as one of the most important human pathogenic fungi. This yeast efficiently colonizes the gastrointestinal cavity of humans, which is an important source for gastrointestinal-mediated dissemination of the fungus to internal organs under immune suppression. Controlling colonization may therefore lead to the eradication of *C. albicans* which may, in turn, be a useful strategy in the prevention of candidiasis. Recent studies indicate that colonization is influenced by -and related to-the white opaque (wo) transition, an epigenetic transition that has been shown to mediate several aspects of the biology of this fungus. Efficient mating in *C. albicans* occurs by a two-step process which involves the conversion to a homozygous mating type cell followed by a transition to the opaque state. The discovery of the opaque cell as the mating competent phase of this fungus provided an interesting evolutionary example of the role of mating in the adaptation to a mammalian host in a pathogenic fungus. A full sexual cycle has not been observed; rather, after mating, return to a diploid state is achieved by concerted chromosome loss, being this an important source of genetic variability for this opportunistic pathogen.

© 2019 Published by Elsevier Ltd on behalf of British Mycological Society.

1. Introduction

Candida species are the most prevalent fungal etiological agents of life-threatening invasive infections (called candidiasis), representing ~19 % of the infections in intensive care units of several developed and non-developed countries. This microorganism behaves as a harmless commensal of

the gastrointestinal and vaginal tract of humans in a significant (albeit not precisely determined) percentage of individuals. Its proliferation is normally controlled by the host immune system, and defects in it can result in the development of disease (Gow *et al.*, 2012; Iliev and Leonardi, 2017; Leonardi *et al.*, 2018; Netea and Brown, 2012; Romani, 2011). Predisposing factors include underlying diseases such as

* Corresponding author. Fax: +34 91 3941745.

E-mail address: jpla@ucm.es (J. Pla).

<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2019.06.001>

1749-4613/© 2019 Published by Elsevier Ltd on behalf of British Mycological Society.

neutropenia, leukemia, physical injuries or disruption of the gut mucosal barriers. Under these conditions, the fungus is able to disseminate to target organs causing severe disease. *C. albicans* is therefore considered an opportunistic pathogen and it is today probably the best model to analyze human fungal pathogenesis. No unique pathogenic determinant has been made responsible for its virulence. Rather, studies from several laboratories have revealed several traits that contribute to it, such as the ability to grow with different morphologies, the presence of different adhesion molecules and lytic enzymes, its metabolic flexibility and its ability to respond to environmental stress via signaling pathways. A quite interesting feature of this fungus is its genetic variability and its ability to engage in morphogenetic differentiation programs, such as the white opaque transition, an epigenetic transition which influence several aspects of its adaptation to the host. We will review here key findings that relate to the discovery of its mating cycles with other aspects of its biology such as virulence, biofilm formation and adaptation to the commensal state, providing a historical perspective.

2. Morphogenesis

The first descriptions of the microorganism known today as *Candida albicans* were done in the first half of the nineteenth century. In 1841, F.T. Berg established that thrush was caused by a mould-like fungus. Robin named this fungus found in different human tissues as *Oidium albicans* and its presence was correlated with diverse superficial and mucosal diseases (i.e. *champignon du muguet* or thrush). From the very initial observations (Audrey, 1887) it was determined that thrush was associated with a fungus whose form varied according to the medium on which it grew. Therefore, its dimorphic nature -the presence of two different morphologies- was soon discovered (Bourguignon, 1906), although different works soon revealed a polymorphic (rather than dimorphic) nature (reviewed in Barnett, 2008). The naming of this fungus was controversial because it was named *Monilia albicans*, being *Monilia* a genus containing fungi that commonly grow in plants. However, *C. albicans* may only appear in vegetables as a consequence of occasional human contamination. It was reclassified in 1923 as *Candida* by considering the ability of this genus, *Candida*, but not *Monilia*, to infect humans (reviewed in Odds, 1988). The genus *Candida* was originally included in the former *Deuteromycetes* class, which included several fungi where no sexual cycle was discovered (imperfect fungi), but it is now incorporated in the class *Saccharomycetes* (Hibbett et al., 2007) as new molecular biology methodologies have allowed a more precise phylogenetic classification.

As indicated, the term dimorphic transition was coined to refer to the environmentally-triggered conversion of yeast to hypha (and less frequently to the inverse) and received substantial attention given its potential role in virulence (Mitchell, 1998; Whiteway and Oberholzer, 2004). However, *C. albicans* can appear as a yeast (unicellular), a hypha, a pseudohypha or a chlamyospore (Fig. 1). Chlamyospores are thick-walled structures that develop under certain conditions such as the absence of light, specific nutrition conditions, low temperature and microaerophilia (Dujardin et al., 1980;

Montazeri and Hedrick, 1984). Their presence has been sometimes used to differentiate this organism from other *Candida* species, although other species like *Candida dubliniensis* also form chlamyospores (Staub and Morschhauser, 2007; Sullivan et al., 2005). These structures appear rarely and they have been hypothesized to represent resistance forms although this has not been proved.

The conversion of yeast-to-hypha is favored under laboratory conditions at high (37 °C) temperature, neutral pH (\approx 7) and the presence of specific nutrients (N-acetylglucosamine, proline or serum), all these features mimicking the mammalian host environment. This process has special relevance in the biology of this fungus due to its implication in virulence and pathogenicity (Alonso-Monge et al., 1999; Braun and Johnson, 1997; Lo et al., 1997). It is currently accepted that both forms (yeast and hypha) play a separate role during infection (Jacobsen et al., 2012) and that the ability to switch between both morphologies adds versatility to this microbe within the host. For example, while yeasts and hyphae are both commonly found in infected organs, one morphology may predominate in a particular organ (Lionakis et al., 2011). Yeast cells, due to their smaller size, have been proposed to mediate fungal dissemination within the bloodstream. However, hyphae play a crucial role during invasion through the endothelial and epithelial layers (Saville et al., 2003) (Moyes et al., 2015; Naglik et al., 2011) and they can inhibit the expression of human defensins in an oral experimental candidiasis model (Lu et al., 2006). Hyphae also seem to be more resistant to phagocytosis, being capable to pierce and kill macrophages upon yeasts ingestion by different mechanisms (Ghosh et al., 2009; Uwamahoro et al., 2014). Different studies demonstrate that mice with specific immune defects (B-cell deficient, T-cell deficient or mice lacking both functional T and B cells) are able to survive to an infection caused by yeasts but not by hyphae, though yeast cells were able to display a lethal pathogenic effect in mice severely immunocompromised by cyclophosphamide-cortisone acetate treatment (Saville et al., 2008). The different morphologies, therefore, represent different fungal adaptation mechanisms to environmental conditions found within the human host, having specific advantages during the stages of colonization, invasion and dissemination. Several authors have discussed the interest of using the dimorphic transition as targets to develop therapeutic drugs (Jacobsen et al., 2012; Noble et al., 2017; Shareck and Belhumeur, 2011).

3. Genetic variability

Although *C. albicans* is today a well-established model in fungal pathogenesis, early studies focused on the genetic identification of virulence traits revealed hard. *C. albicans* has no natural plasmids (such as the *S. cerevisiae* 2 μ plasmid) to develop an efficient genetic manipulation system (De Backer et al., 2000). The election of appropriate strains for genetic manipulation was also laborious. A first issue was the determination of its ploidy; the strikingly diverse frequency of isolation of auxotrophs (i.e. loss of heterozygosity) by mutagenesis from different clinical strains pointed towards the existence of natural heterozygosity among isolates (Whelan and

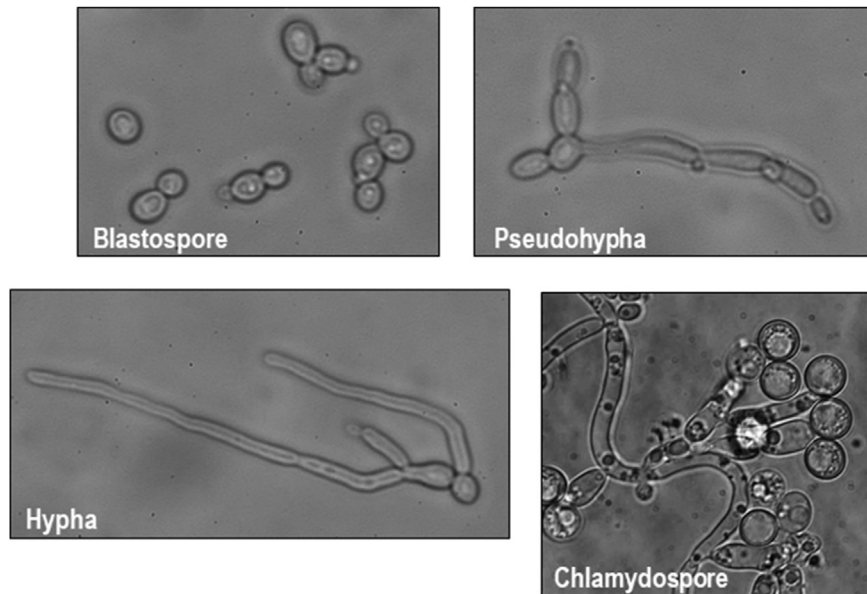


Fig. 1 – Distinct morphological states of *C. albicans*. The figure illustrates the different morphologies associated with *C. albicans*. Blastospores are the yeast unicellular form, with typical elliptical forms and asexual reproduction through budding. Bud elongation under defined environmental conditions triggers the formation of a germ tube that eventually produces a true hypha. Hyphae are different from pseudohyphae by the absence of cellular constrictions. Chlamydospores are round oval refractive cells with a thicker cell wall and are slightly larger than blastospores.

Magee, 1981) and diploidy. This was confirmed when combining precise measures of DNA content by flow cytometry and DNA renaturation studies (Riggsby et al., 1982). The absence of a sexual cycle led to the development of an artificial parasexual cycle by generating protoplasts using cell wall lytic enzymes and subsequent fusion under osmotically protected conditions (Poulter et al., 1981). Parasexual genetics found utility in the analysis of certain genetic traits such as auxotrophic markers or morphology (Gil et al., 1988). Physical mapping of the genome by pulsed field electrophoresis revealed that *C. albicans* had an approximately 16 megabase genome organized in 8 pairs of homologous chromosomes (Chu et al., 1993).

Several early studies using pulsed field electrophoresis reported a high variability of karyotypes among clinical isolates and laboratory strains (Chu et al., 1993; Magee and Magee, 1987; Magee, 1993; Navarro-García et al., 1995; Rustchenko-Bulgac, 1991; Rustchenko, 2007; Thrash-Bingham and Gorman, 1992). Sequencing of the clinical isolate SC5314 strain genome (a starting lineage for many molecular genetic studies-derived strains) (Braun et al., 2005; Tzung et al., 2001) revealed a 14.88 Mb size with the potential to encode 6354 genes (Braun et al., 2005). The group of J. Berman, then, used comparative whole genome hybridization among *C. albicans* strains to demonstrate chromosomal translocations in several laboratory host strains that were routinely used in molecular biology studies (Selmecki et al., 2005). For example, CAI4 (Fonzi and Irwin, 1993) frequently showed chromosome 2 trisomy (Selmecki et al., 2005) in addition to chromosome 1 (Chen et al., 2004). Changes in RM1000 (Negredo et al., 1997) and its

derived BWP17 strain (Wilson et al., 1999) occurred during the disruption of the *HIS1* gene (Pla et al., 1995) and resulted in the deletion of all genes telomeric to this gene in one chromosome.

Chromosomal reorganization in *C. albicans* was shown to occur dependent on growing conditions, such as carbon source or the presence of drugs such as 5-fluoroorotic acid, commonly used for the generation of mutant strains. For example, growing in sorbose frequently led to the loss of chromosome 5 (Janbon et al., 1998), while growth in certain carbon sources such as D-arabinose led to chromosome 6 trisomy and chromosome 2 alterations (Rustchenko et al., 1994). These changes were correlated with a distinct colony morphological appearance as occurred in the WO-1 strain (see later) but, most importantly, they were shown to have clinical significance. Fluconazole resistant strains frequently showed chromosome 5 modifications that ultimately lead to the altered expression of certain azole resistance genes (Selmecki et al., 2006, 2008). Interestingly, these changes occurred at higher rates during an experimental mouse infection (that is, *in vivo*) compared to those observed during standard laboratory *in vitro* growth conditions in liquid cultures (Forche et al., 2009, 2011), suggesting that they play a role in the generation of genetic variability during a mammalian infection, and probably, also during colonization. There are other mechanisms involved in the variability of the *C. albicans* genome and the loss of heterozygosity at certain loci may also be a consequence of mitotic recombination arising from gene conversion between homologues and subsequent crossovers.

4. Genetics of white-opaque switching

From the very initial observations of this fungus, a high diversity of colony morphologies on solid media was reported. The term phenotypic switching commonly refers to the variability of colonies on agar plates after prolonged periods of incubation. Slutsky referred to this in 1985 in *C. albicans* (Slutsky et al., 1985) as a separate process to the already known yeast-to-hypha transition and which had similarities to the rough-smooth colony phenotype observed in some bacteria. A particular type of switching was observed for a strain called WO-1. This transition (called **wo**, from white-opaque) was spontaneous and occurred between two states that were easily distinguishable by their cellular morphology (Slutsky et al., 1987). White cells grew as yeast like forms and developed standard cream colored colonies. Opaque cells were slightly elongated, had a prominent vacuole and cell surface irregularities (pimples) detectable by scanning electron microscopy and gave rise to easy distinguishable grey colonies on standard media plates (Fig. 2, upper panel); both morphotypes were easily distinguished by their preferential staining with the fluorochrome phloxine-B with white cells having a “normal” phloxine-B negative stain (dark pink) and opaque cells the less frequent phloxine-B positive pinky appearance (Fig. 2, lower panel). The term transition points towards a reversible -but heritable-trait, as white cells produced opaque cells but opaque cells could also lead to white cells and each cell type was stable under specific environmental conditions. After the discovery of the **wo** transition, a substantial effort was done to reveal the distinctive features of opaque cells. Differences in the composition of the cell wall, adhesion to different surfaces and measure recombination frequencies were reported. In addition, phase (white or opaque) specific genes were also identified (see (Soll, 2014b) for an excellent review).

While all these pioneering work highlighted important biological differences between white and opaque cells, it was only after the discovery of a mating type locus in *C. albicans* when the role of opaque cells was determined. Two independent simultaneous works demonstrated the ability of *C. albicans* to mate, already suggested by the inspection of its

genome as the particular *C. albicans* strain sequenced (SC5314) had all orthologues of *S. cerevisiae* mating type genes and showed heterozygosity at the mating-type-like (MTL) genes MAT α and MAT a (Hull and Johnson, 1999), similar to what occurs in *S. cerevisiae* diploid cells (Heitman et al., 2014). As mating genes lie on chromosome 5, the conditional loss of this chromosome by growing cells on sorbose allowed the construction of homozygous MTL a/a and MTL α/α diploids in the group of P. Magee; these diploids mated and generated recombinant, unicellular tetraploids (Magee and Magee, 2000). Similar results were obtained by genetic manipulation of mating type genes in A. Johnson’s laboratory. In addition, engineered strains were able to mate (as determined by auxotrophy analysis and DNA content) following infections with strains of opposite mating type in an experimental model of systemic infection in mice (Hull et al., 2000). Therefore, *C. albicans* was able to mate both in artificial and natural environments.

The relationship between mating type and switching was soon discovered. An analysis of different **wo** switcher strains revealed that they were all homozygous at the mating type locus (Lockhart et al., 2002). This work demonstrated that a significant proportion of clinical isolates were mating type homozygous cells. It also showed that **wo** switchers are present in different *C. albicans* clades and therefore, mating competent cells exist in natural patients’ populations of this microbe.

The process leading to homozygosity at the mating type occurs spontaneously and is environmentally induced by different mechanisms such as gene conversion, crossing over or even loss of one copy of chromosome 5 (where mating type locus resides) followed by duplication of the remaining copy (Wu et al., 2005, 2007). They would be responsible for the natural homozygosity found in approximately 3 % of the clinical isolates (Lockhart et al., 2002; Odds et al., 2007). MTL-homozygous cells then undergo a switch to the opaque phase and this change is epigenetic, each cell type being heritable for many generations without further alterations at the DNA sequence (Lockhart et al., 2003; Soll et al., 2003). The group of Johnson later discovered that MTL α 1 and MTL α 2 homeodomain proteins coordinately repress **wo** switching and that opaque cells are mating competent, being $\sim 10^6$ times more

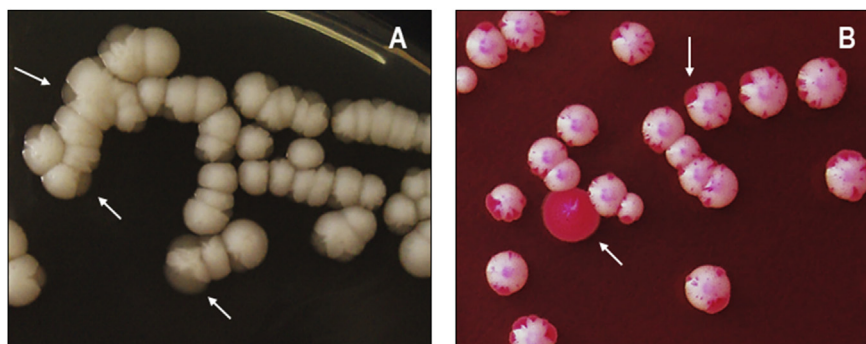


Fig. 2 – Macroscopic appearance of *C. albicans* opaque cells. A) A *C. albicans* **wo switcher strain was plated on YPD agar plates and allowed to grow at room temperature (below 21 °C) for three days. Regions of opaque cells are shown (arrows). B) Phloxine B staining of a switcher strain. The incorporation of Phloxine B in YPD plates allows the clear identification of opaque cells as pink sectors of otherwise normal white colonies.**

efficient in mating than the corresponding white cells (Miller and Johnson, 2002). MTL-homozygous opaque cells (a/a or α/α) sense opposite mating-type pheromones, resulting in the appearance of a *shmoo* (mating projection) and leading ultimately to nuclear fusion (Bennett and Johnson, 2006; Lockhart et al., 2003).

As *C. albicans* is diploid, cell fusion produces a tetraploid (a/a or α/α). Although meiosis-specific genes have been identified in the *C. albicans* genome based on their homology to those present in other fungi, a functional meiotic program has not been observed. Rather, these tetraploids undergo semi random chromosome loss to generate recombinant progeny with shuffled chromosomal combinations; these strains show different phenotypes on plates (Bennett and Johnson, 2003; Forche et al., 2008) and, interestingly, specific meiotic genes (such as SPO11) may participate in mitotic recombination. Therefore, the parasexual cycle is an effective mechanism to generate genetic diversity. Interestingly, Alby et al. (2009) have shown evidence for an autocrine-like system; the production of pheromone α cells promotes same-sex mating, therefore being an alternative mechanism for genetic exchange within unisexual populations of *C. albicans*. Recent studies demonstrated that diploid strains can also give rise to rare mating-competent haploid strains (Hickman et al., 2013). These strains have found usefulness in the functional analysis of specific genes in the laboratory, suggesting that chromosome loss allows cells to get rid of recessive lethal alleles.

Identification of the repressive role of the MTL locus on **wo** transition enabled the discovery of regulators of **wo** transition by different groups. The group of H. Liu identified Wor1 as a high copy suppressor of invasion defects of *S. cerevisiae* *flo8* mutants on solid media and showed how increased expression of WOR1 bypassed the requirements for Flo8 in Flo11 expression (a Flo8 target) (Huang et al., 2006). *wor1* mutants showed no apparent defects in growth and hyphal formation in a/α cells but, interestingly, they were blocked in the conversion to the opaque phase. No WOR1 transcripts were detected in mating-type heterozygous diploid cells, consistent with WOR1 being a mating-type regulated gene (Tsong et al., 2003). Ectopic expression of WOR1 from the constitutive ACT1 promoter resulted in an en-masse conversion to the opaque phase (Huang et al., 2006). Simultaneously, Wor1 was identified as regulator of the **wo** transition by screening of six potential putative $a1-\alpha2$ targets (Zordan et al., 2006). WOR1 expression was shown to be repressed by the $a1-\alpha2$ repressor complex, but expression of this gene from the MET3 promoter was sufficient to relieve mating repression in normal diploid a/α cells, converting the whole population to the opaque phase. These authors demonstrated that Wor1 binds its own promoter and accumulated in the opaque phase, behaving as a self-sustained feedback mechanism to maintain the opaque phase once Wor1 levels exceed a certain threshold in the cell. Similar results were obtained by the group of D. Soll, who identified Wor1 (then called Tos9) as an interacting partner with the MTL $a1-\alpha2$ corepressor complex via ChIP-chip immunoprecipitation analyses (Srikantha et al., 2006).

Additional regulatory genes of the **wo** transition (CZF1, WOR2, EFG1, AHR1 and WOR3) have been subsequently

identified by different methodologies (Lohse et al., 2013; Wang et al., 2011; Zordan et al., 2007). Efg1 is an essential regulator of morphogenesis, long time known to promote filamentation, chlamydospore formation (Sonneborn et al., 1999a; Stoldt et al., 1997) and to increase the frequency of conversion to the opaque phase (Sonneborn et al., 1999b). Ahr1 is a repressor of this transition as overexpression of this gene promotes the opaque to white conversion, being this process dependent on Efg1. By an analysis of genome wide chromatin immunoprecipitation and transcriptional profiling, three of these regulators (Wor1, Wor2 and Efg1) were found to bind upstream of Ssn6 (Hernday et al., 2016), a role for Ssn6 was hypothesized. Deletion of this gene results in an in-masse conversion of white to opaque cells indicating that it contributes to the stochastic nature of this conversion and represses the activation of Wor1 in white cells. More recently, a role for the general filamentation repressor TUP1 has been evidenced in the Wor1 regulatory network. Tup1 is a Ssn6 corepressor whose deletion renders the cells locked in the filamentous state (Braun and Johnson, 1997). The group of H. Liu has demonstrated that this protein associates with Wor1 in immunoprecipitation assays (Alkafeef et al., 2018). Although manipulation of *tup1* cells is difficult, they used conditional expression from the MET3 promoter to show that its absence triggered the conversion to the opaque phase even in the absence of Wor1. They also demonstrated that Tup1 occupies Wor1 auto responsive elements at the WOR1 promoter and that the absence of TUP1 bypasses the requirement of WOR1 for opaque cells formation, thus positioning this transcriptional corepressor downstream Wor1.

5. Role of mating and **wo** regulation in *C. albicans* biology

The white-opaque transition and its related mating program have relevance in several aspects of the biology of this fungus (Sasse et al., 2013; Soll, 2014b). This is not surprising as approximately 400 genes are differently regulated in both phases. Although several mating-specific genes are up-regulated in the opaque phase, most of them do not seem to be involved in mating pointing towards a role in additional processes (Lan et al., 2002; Tsong et al., 2003; Tuch et al., 2010). We will summarize here the involvement of **wo** switching in those processes that could mediate adaptation to different environments within a mammalian host such as biofilm formation, pathogenicity and commensalism.

C. albicans is able to form a multicellular biofilm both in the commensal and pathogenic state and many infections arise as a result of its ability to grow as a biofilm in medical devices such as venous or urinary catheters and artificial joints (Donlan and Costerton, 2002; Douglas, 2003). Switching plays an important role in the formation of biofilms. In addition to the biofilms produced by *C. albicans* heterozygous cells, homozygous (a/a or α/α) opaque cells produce pheromones that stimulate biofilm formation in white cells of the opposite mating type (Daniels et al., 2006). The thickness of the biofilm is increased in the presence of a minor proportion ("seed") of opaque cells and the biofilm matrix is optimized to support mating, so that the chemotropism of opaque cells within

this specialized environment is augmented. Although they have the same basic architecture as a conventional α/α biofilm, they are more permeable to low molecular weight compounds and are more susceptible to antifungal drugs such as fluconazole. These specialized biofilms are responsive to environmental conditions such as the presence of CO₂ and the type of the medium (Daniels et al., 2013; Park et al., 2013). Mating biofilms would have evolved by recruiting standard components from other pathways (pheromones, receptors and MAPK signaling cascade) to accommodate alternative transcription factors and develop a specific response. These “sexual” biofilms have been suggested as an adaptive mechanism to account for the putative selective pressure for *C. albicans* to mate within the host, which may be more difficult in standard biofilms (Soll, 2014a; Soll and Daniels, 2016).

Multiple studies have provided evidence for attenuated virulence of opaque cells compared to white cells. Opaque cells are less virulent in a mouse model of systemic infection and expression of the white specific gene *WH11* increases virulence (Kvaal et al., 1997). Interestingly, opaque cells colonize the skin more readily (Kvaal et al., 1999; Tsuboi et al., 1994) promoting the formation of cavities in the skin surface. Opaque cells are also capable of forming hyphae as do standard *C. albicans* cells, however they do not undergo the yeast-to-hypha transition under many conditions that induce it in white cells. This may be related to the decreased capacity of opaque cells to escape from phagocytes and to invade tissues (Anderson et al., 1989; Si et al., 2013). Opaque cells also seem to be more susceptible to reactive oxygen species (ROS) and therefore to phagocyte-mediated killing (Kolotila and Diamond, 1990), despite being able to avoid recognition and phagocytosis by macrophages and neutrophils. One possible mechanism could be loss of the capacity to release chemoattractants for PMNs (Geiger et al., 2004). *Drosophila* hemocyte-derived S2 and mouse RAW264.7 cell lines preferentially phagocytize white cells compared to opaque cells (Sasse et al., 2013); when mixed populations of white and opaque cells were mixed with neutrophils, white cells were more readily ingested in planktonic cultures but not under matrix embedded conditions which was thought to be caused by the lag in germ tube formation of opaque cells.

If the *wo* transition evolved to facilitate mating within the host, it may also play a role in commensalism, which is the natural state of *C. albicans* within an immunocompetent host. The development of commensal models (Bendel et al., 2002; Kinneberg et al., 1999; Koh, 2013; Neville et al., 2015; Prieto et al., 2016) has allowed identification of processes crucial for colonization of the mouse gut such as iron and glucose metabolism, signal transduction pathways and morphogenetic transitions (Noble, 2013; Perez et al., 2013; Pierce and Kumamoto, 2012; Prieto et al., 2014; Ramirez-Zavala et al., 2017; Vautier et al., 2015). Early work from the C. Kumamoto laboratory revealed a role for the *Efh1* transcription factor in colonization, as this mutant showed increased colonization over wild type (wt) cells in the mouse gut and overexpression of *Efh1* led to reduced colonization (White et al., 2007) suggesting that *C. albicans* was able to control its proliferation in this environment. In addition, *efg1* mutants showed enhanced fitness in this niche compared to wt cells (Pierce and Kumamoto, 2012). Interestingly, *Efg1* was

previously identified as a regulator of the white opaque (*wo*) transition (Sonneborn et al., 1999b).

The opaque phenotype cannot be maintained at physiological temperature (Slutsky et al., 1987; Rikkerink et al., 1988), at temperatures above 25 °C opaque cells revert to the white (Soll et al., 1993). This is consistent with white cells being mainly recovered from the kidneys of mice upon opaque cell injection (Kvaal et al., 1997) and it also supports the observation that opaque cells are able to colonize the skin, a niche with a lower temperature. Interestingly, the presence of high levels of CO₂, N-acetylglucosamine and anaerobic conditions promote the white-opaque transition even at 37 °C (Huang et al., 2009, 2010; Ramirez-Zavala et al., 2008), suggesting that this morphotype may play a role under defined host environments. In accordance with this, a novel morphological switch specific to the adaptation of the commensal lifestyle has been recently described. Upon passage through the mouse gastrointestinal tract, *C. albicans* cells with artificially augmented expression of *WOR1* (Pande et al., 2013) switched to a GUT (gastrointestinally induced transition) morphotype. GUT cells differ from opaque cells by surface ultrastructural details, by their *in vivo* fitness (low in opaque cells, high in GUT) and a differentiated transcriptomal program. In fact, cells overexpressing *WOR1* display an increased adhesion capacity specifically to gut mucosa (Prieto et al., 2017). In addition, a “white-gray-opaque” tristable phenotypic switching system has been discovered, which is dependent on the *Wor1-Efg1* regulators (Tao et al., 2014). Gray cells can be cultured *in vitro*, they are smaller than GUT and opaque cells and exhibit a unique global gene expression profile. Gray cells express a MTL-dependent high aspartyl protease activity, mate less efficiently than opaque cells and have a distinct effect on virulence and organ lodging upon systemic and cutaneous infection indicating that they could play separate roles in *C. albicans* biology within the host.

Pathogenic fungi as *C. albicans*, may live either aerobically, with high levels of O₂ in some mucosal tissues, or inside the human body under different degrees of hypoxia (reviewed in (Ernst and Tielker, 2009)). Therefore, fungal adaptation to different niches is not only required due to varying availability of nutrients and metals but also of oxygen and carbon dioxide. Inside the human body, CO₂ levels are around 100-fold higher than in the atmosphere, ranging between 4.5 and 30 %. Microorganisms themselves can generate and secrete CO₂ into their microenvironment and there is evidence for a gaseous signaling pathway that regulates their morphology and, consequently, virulence (Hall et al., 2010). The availability of both elements can therefore modulate other virulence factors, such as the yeast-to-hypha transition in *C. albicans*: while CO₂ has been shown to induce filamentous growth (Klengel et al., 2005; Hall et al., 2010) and stabilize the opaque phenotype (Huang et al., 2009), it also stabilizes cells in the opaque state allowing for mating at 37 °C (Dumitru et al., 2007; Ramirez-Zavala et al., 2008), and enhances filamentation on agar as well (Setiadi et al., 2006; Sonneborn et al., 1999a).

6. Conclusions

The existence of a mating cycle in *C. albicans* has been found in other closely related yeasts within the CUG clade (Fitzpatrick

et al., 2006), although a high diversity in the mating type locus has been observed. As meiosis has not been detected in *C. albicans*, genetic diversity is generated by the formation of tetraploid cells and reduction to the natural diploid state by a parasexual cycle with chromosome reorganizations. Other species within the CUG clade show high diversity at the MTL locus, as well as the absence of specific genes. What is peculiar (although not specific) to *C. albicans* is the necessity to engage into a different program (white-opaque) to become mating competent. Such conversion is epigenetically regulated and promoted by various environmental conditions. As *C. albicans* has no significant saprophytic life outside the host, the study of this transition during growth under laboratory conditions is somewhat artificial. The definition of the specific host conditions (niches, microenvironments and signals) that promote this process will be of primary importance and can be accomplished using appropriate genetic screenings. Furthermore, it is conceivable that with proper visualization tools, the mating process of *C. albicans* could be observed and analyzed *in vivo*, that is, within a mammalian host and in its native colonizing niches. This may ultimately lead to a more complete knowledge of the mechanisms that underlie genetic variability of this fungus and its adaptation to the commensal state. Both facts may enable the control of fungal populations in the human host in a future.

Acknowledgments

We thank Anja Forche for critical reading of the manuscript and very helpful comments. Work in our laboratory is supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad under Grant PGC2018-095047-B-100 and by Comunidad de Madrid under InGEMICS-CM S2017/BMD3691 (Group COMIPAT).

REFERENCES

- Alby, K., Schaefer, D., Bennett, R.J., 2009. Homothallic and heterothallic mating in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Nature* 460, 890–893.
- Alkafef, S.S., Yu, C., Huang, L., Liu, H., 2018. *Wor1* establishes opaque cell fate through inhibition of the general co-repressor *Tup1* in *Candida albicans*. *PLoS Genet.* 14, e1007176.
- Alonso-Monge, R., Navarro-García, F., Molero, G., Díez-Orejas, R., Gustin, M., Pla, J., Sánchez, M., Nombela, C., 1999. Role of the mitogen-activated protein kinase *Hog1p* in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 181, 3058–3068.
- Anderson, J., Cundiff, L., Schnars, B., Gao, M.X., Mackenzie, I., Soll, D.R., 1989. Hypha formation in the white-opaque transition of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 57, 458–467.
- Audrey, C., 1887. Sur l'évolution du champignon du muguet. *Rev. Med.* 7, 586–595.
- Barnett, J.A., 2008. A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. *Yeast* 25, 385–417.
- Bendel, C.M., Wiesner, S.M., Gani, R.M., Cebelinski, E., Wells, C.L., 2002. Cecal colonization and systemic spread of *Candida albicans* in mice treated with antibiotics and dexamethasone. *Pediatr. Res.* 51, 290–295.
- Bennett, R.J., Johnson, A.D., 2003. Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J.* 22, 2505–2515.
- Bennett, R.J., Johnson, A.D., 2006. The role of nutrient regulation and the *Gpa2* protein in the mating pheromone response of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 62, 100–119.
- Bourguignon, G., 1906. *Formes microbiennes du champignon du muguet. (morphologie et pathologie expérimentale).* Cour d'Appel.
- Braun, B.R., Johnson, A.D., 1997. Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUP1*. *Science* 277, 105–109.
- Braun, B.R., Van Het, H.M., d'Enfert, C., Martchenko, M., Dungan, J., Kuo, A., Inglis, D.O., Uhl, M.A., Hogues, H., Berriman, M., Lorenz, M., Levitin, A., Oberholzer, U., Bachewich, C., H Marcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Iouk, T., Zito, R., Frangeul, L., Tekaiia, F., Rutherford, K., Wang, E., Munro, C.A., Bates, S., Gow, N.A., Hoyer, L.L., Kohler, G., Morschhauser, J., Newport, G., Znaidi, S., Raymond, M., Turcotte, B., Sherlock, G., Costanzo, M., Ihmels, J., Berman, J., Sanglard, D., Agabian, N., Mitchell, A.P., Johnson, A.D., Whiteway, M., Nantel, A., 2005. A human-curated annotation of the *Candida albicans* Genome. *PLoS Genet.* 1, e1.
- Chen, X., Magee, B.B., Dawson, D., Magee, P.T., Kumamoto, C.A., 2004. Chromosome 1 trisomy compromises the virulence of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 51, 551–565.
- Chu, W.S., Magee, B.B., Magee, P.T., 1993. Construction of an *SfiI* macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J. Bacteriol.* 175, 6637–6651.
- Daniels, K.J., Park, Y.N., Srikantha, T., Pujol, C., Soll, D.R., 2013. Impact of environmental conditions on the form and function of *Candida albicans* biofilms. *Eukaryot. Cell* 12, 1389–1402.
- Daniels, K.J., Srikantha, T., Lockhart, S.R., Pujol, C., Soll, D.R., 2006. Opaque cells signal white cells to form biofilms in *Candida albicans*. *EMBO J.* 25, 2240–2252.
- De Backer, M.D., Magee, P.T., Pla, J., 2000. Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 463–498.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193.
- Douglas, L.J., 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 11, 30–36.
- Dujardin, L., Walbaum, S., Biguet, J., 1980. Effect of glucose and nitrogen concentrations on the morphology of *Candida albicans* and the formation of chlamydozoospores in synthetic culture media. *Mycopathologia* 71, 113–118.
- Dumitru, R., Navarathna, D.H., Semighini, C.P., Elowsky, C.G., Dumitru, R.V., Dignard, D., Whiteway, M., Atkin, A.L., Nickerson, K.W., 2007. *In vivo* and *in vitro* anaerobic mating in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 6, 465–472.
- Ernst, J.F., Tielker, D., 2009. Responses to hypoxia in fungal pathogens. *Cell. Microbiol.* 11, 183–190.
- Fitzpatrick, D.A., Logue, M.E., Stajich, J.E., Butler, G., 2006. A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol. Biol.* 6, 99.
- Fonzi, W.A., Irwin, M.Y., 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134, 717–728.
- Forche, A., Abbey, D., Pisithkul, T., Weinzierl, M.A., Ringstrom, T., Bruck, D., Petersen, K., Berman, J., 2011. Stress alters rates and types of loss of heterozygosity in *Candida albicans*. *MBio* 2.
- Forche, A., Alby, K., Schaefer, D., Johnson, A.D., Berman, J., Bennett, R.J., 2008. The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS Biol.* 6, e110.
- Forche, A., Magee, P.T., Selmecki, A., Berman, J., May, G., 2009. Evolution in *Candida albicans* populations during a single passage through a mouse host. *Genetics* 182, 799–811.

- Geiger, J., Wessels, D., Lockhart, S.R., Soll, D.R., 2004. Release of a potent polymorphonuclear leukocyte chemoattractant is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 72, 667–677.
- Ghosh, S., Navarathna, D.H., Roberts, D.D., Cooper, J.T., Atkin, A.L., Petro, T.M., Nickerson, K.W., 2009. Arginine-induced germ tube formation in *Candida albicans* is essential for escape from murine macrophage line RAW 264.7. *Infect. Immun.* 77, 1596–1605.
- Gil, C., Pomés, R., Nombela, C., 1988. A complementation analysis by parasexual recombination of *Candida albicans* morphological mutants. *J. Gen. Microbiol.* 134, 1587–1595.
- Gow, N.A., van de Veerdonk, F.L., Brown, A.J., Netea, M.G., 2012. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 112–122.
- Hall, R.A., De Sordi, L., Maccallum, D.M., Topal, H., Eaton, R., Bloor, J.W., Robinson, G.K., Levin, L.R., Buck, J., Wang, Y., Gow, N.A., Steegborn, C., Muhlschlegel, F.A., 2010. CO(2) acts as a signalling molecule in populations of the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 6, e1001193.
- Heitman, J., Carter, D.A., Dyer, P.S., Soll, D.R., 2014. Sexual reproduction of human fungal pathogens. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4.
- Hernday, A.D., Lohse, M.B., Nobile, C.J., Noiman, L., Laksana, C.N., Johnson, A.D., 2016. Ssn6 defines a new level of regulation of white-opaque switching in *Candida albicans* and is required for the stochasticity of the switch. *MBio* 7, e01565-01515.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lucking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Koljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schussler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.J., Zhang, N., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111, 509–547.
- Hickman, M.A., Zeng, G., Forche, A., Hiraoka, M.P., Abbey, D., Harrison, B.D., Wang, Y.M., Su, C.H., Bennett, R.J., Wang, Y., Berman, J., 2013. The 'obligate diploid' *Candida albicans* forms mating-competent haploids. *Nature* 494, 55–59.
- Huang, G., Srikantha, T., Sahni, N., Yi, S., Soll, D.R., 2009. CO₂ regulates white-to-opaque switching in *Candida albicans*. *Curr. Biol.* 19, 330–334.
- Huang, G., Wang, H., Chou, S., Nie, X., Chen, J., Liu, H., 2006. Bistable expression of *WOR1*, a master regulator of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103, 12813–12818.
- Huang, G., Yi, S., Sahni, N., Daniels, K.J., Srikantha, T., Soll, D.R., 2010. N-acetylglucosamine induces white to opaque switching, a mating prerequisite in *Candida albicans*. *PLoS Path.* 6, e1000806.
- Hull, C.M., Johnson, A.D., 1999. Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* 285, 1271–1275.
- Hull, C.M., Raisner, R.M., Johnson, A.D., 2000. Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* 289, 307–310.
- Iliev, I.D., Leonardi, I., 2017. Fungal dysbiosis: immunity and interactions at mucosal barriers. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 635–646.
- Jacobsen, I.D., Wilson, D., Wachtler, B., Brunke, S., Naglik, J.R., Hube, B., 2012. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 10, 85–93.
- Janbon, G., Sherman, F., Rustchenko, E., 1998. Monosomy of a specific chromosome determines L-sorbose utilization: a novel regulatory mechanism in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 5150–5155.
- Kinneberg, K.M., Bendel, C.M., Jechorek, R.P., Cebeliniski, E.A., Gale, C.A., Berman, J.G., Erlandsen, S.L., Hostetter, M.K., Wells, C.L., 1999. Effect of *INT1* gene on *Candida albicans* murine intestinal colonization. *J. Surg. Res.* 87, 245–251.
- Klengel, T., Liang, W.J., Chaloupka, J., Ruoff, C., Schroppel, K., Naglik, J.R., Eckert, S.E., Mogensen, E.G., Haynes, K., Tuite, M.F., Levin, L.R., Buck, J., Muhlschlegel, F.A., 2005. Fungal adenyl cyclase integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence. *Curr. Biol.* 15, 2021–2026.
- Koh, A.Y., 2013. Murine models of *Candida* gastrointestinal colonization and dissemination. *Eukaryot. Cell* 12, 1416–1422.
- Kolotila, M.P., Diamond, R.D., 1990. Effects of neutrophils and in vitro oxidants on survival and phenotypic switching of *Candida albicans* WO-1. *Infect. Immun.* 58, 1174–1179.
- Kvaal, C., Lachke, S.A., Srikantha, T., Daniels, K., McCoy, J., Soll, D.R., 1999. Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1* (*SAP1*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect. Immun.* 67, 6652–6662.
- Kvaal, C.A., Srikantha, T., Soll, D.R., 1997. Misexpression of the white-phase-specific gene *WH11* in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. *Infect. Immun.* 65, 4468–4475.
- Lan, C.Y., Newport, G., Murillo, L.A., Jones, T., Scherer, S., Davis, R.W., Agabian, N., 2002. Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 14907–14912.
- Leonardi, I., Li, X., Semon, A., Li, D., Doron, I., Putzel, G., Bar, A., Prieto, D., Rescigno, M., McGovern, D.P.B., Pla, J., Iliev, I.D., 2018. CX3CR1(+) mononuclear phagocytes control immunity to intestinal fungi. *Science* 359, 232–236.
- Lionakis, M.S., Lim, J.K., Lee, C.C., Murphy, P.M., 2011. Organ-specific innate immune responses in a mouse model of invasive candidiasis. *J. Innate Immun.* 3, 180–199.
- Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., Fink, G.R., 1997. Nonfilamentous *Candida albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90, 939–949.
- Lockhart, S.R., Pujol, C., Daniels, K.J., Miller, M.G., Johnson, A.D., Pfaller, M.A., Soll, D.R., 2002. In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics* 162, 737–745.
- Lockhart, S.R., Zhao, R., Daniels, K.J., Soll, D.R., 2003. Alpha-pheromone-induced "shmooing" and gene regulation require white-opaque switching during *Candida albicans* mating. *Eukaryot. Cell* 2, 847–855.
- Lohse, M.B., Hernday, A.D., Fordyce, P.M., Noiman, L., Sorrells, T.R., Hanson-Smith, V., Nobile, C.J., DeRisi, J.L., Johnson, A.D., 2013. Identification and characterization of a previously undescribed family of sequence-specific DNA-binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 110, 7660–7665.
- Lu, Q., Jayatilake, J.A., Samaranyake, L.P., Jin, L., 2006. Hyphal invasion of *Candida albicans* inhibits the expression of human beta-defensins in experimental oral candidiasis. *J Invest Dermatol* 126, 2049–2056.
- Magee, B.B., Magee, P.T., 1987. Electrophoretic karyotypes and chromosome numbers in *Candida* species. *J. Gen. Microbiol.* 133, 425–430.
- Magee, B.B., Magee, P.T., 2000. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of *MTLa* and *MTL α* strains. *Science* 289, 310–313.

- Magee, P.T., 1993. Variations in chromosome size and organization in *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*. *Trends Microbiol.* 1, 338–342.
- Miller, M.G., Johnson, A.D., 2002. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* 110, 293–302.
- Mitchell, A.P., 1998. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 687–692.
- Montazeri, M., Hedrick, H.G., 1984. Factors affecting spore formation in a *Candida albicans* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1341–1342.
- Moyes, D.L., Richardson, J.P., Naglik, J.R., 2015. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence* 6 (4), 338–346.
- Naglik, J.R., Moyes, D.L., Wachtler, B., Hube, B., 2011. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microb. Infect.* 13, 963–976.
- Navarro-García, F., Perez-Diaz, R.M., Magee, B.B., Pla, J., Nombela, C., Magee, P.T., 1995. Chromosome reorganization in *Candida albicans* 1001 strain. *J. Med. Vet. Mycol.* 33, 361–366.
- Negredo, A., Monteoliva, L., Gil, C., Pla, J., Nombela, C., 1997. Cloning, analysis and one-step disruption of the ARG5,6 gene of *Candida albicans*. *Microbiology* 143, 297–302.
- Netea, M.G., Brown, G.D., 2012. Fungal infections: the next challenge. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 403–405.
- Neville, B.A., d'Enfert, C., Bougnoux, M.E., 2015. *Candida albicans* commensalism in the gastrointestinal tract. *FEMS Yeast Res.* 15.
- Noble, S.M., 2013. *Candida albicans* specializations for iron homeostasis: from commensalism to virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 708–715.
- Noble, S.M., Gianetti, B.A., Witchley, J.N., 2017. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 96–108.
- Odds, F.C., 1988. *Candida* and candidosis. Baillière Tindall, London.
- Odds, F.C., Bougnoux, M.E., Shaw, D.J., Bain, J.M., Davidson, A.D., Diogo, D., Jacobsen, M.D., Lecomte, M., Li, S.Y., Tavanti, A., Maiden, M.C., Gow, N.A., d'Enfert, C., 2007. Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 6, 1041–1052.
- Pande, K., Chen, C., Noble, S.M., 2013. Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism. *Nat. Genet.* 45, 1088–1091.
- Park, Y.N., Daniels, K.J., Pujol, C., Srikantha, T., Soll, D.R., 2013. *Candida albicans* forms a specialized "sexual" as well as "pathogenic" biofilm. *Eukaryot. Cell* 12, 1120–1131.
- Perez, J.C., Kumamoto, C.A., Johnson, A.D., 2013. *Candida albicans* commensalism and pathogenicity are intertwined traits directed by a tightly knit transcriptional regulatory circuit. *PLoS Biol.* 11e1001510.
- Pierce, J.V., Kumamoto, C.A., 2012. Variation in *Candida albicans* EFG1 expression enables host-dependent changes in colonizing fungal populations. *MBio* 3, e00117-00112.
- Pla, J., Pérez-Díaz, R.M., Navarro-García, F., Sánchez, M., Nombela, C., 1995. Cloning of the *Candida albicans* HIS1 gene by direct complementation of a *C. albicans* histidine auxotroph using an improved double-ARS shuttle vector. *Gene* 165, 115–120.
- Poulter, R., Jeffery, K., Hubbard, M.J., Shepherd, M.G., Sullivan, P.A., 1981. Parasexual genetic analysis of *Candida albicans* by spheroplast fusion. *J. Bacteriol.* 146, 833–840.
- Prieto, A.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, e87128.
- Prieto, D., Correia, I., Pla, J., Roman, E., 2016. Adaptation of *Candida albicans* to commensalism in the gut. *Future Microbiol.* 11, 567–583.
- Prieto, D., Roman, E., Alonso-Monge, R., Pla, J., 2017. Overexpression of the transcriptional regulator WOR1 increases susceptibility to bile salts and adhesion to the mouse gut mucosa in *Candida albicans*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 389.
- Ramírez-Zavala, B., Mottola, A., Haubenreißer, J., Schneider, S., Allert, S., Brunke, S., Ohlsen, K., Hube, B., Morschhäuser, J., 2017. The Snf1-activating kinase Sak1 is a key regulator of metabolic adaptation and in vivo fitness of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 104 (6), 989–1007.
- Ramírez-Zavala, B., Reuss, O., Park, Y.N., Ohlsen, K., Morschhäuser, J., 2008. Environmental induction of white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Pathol.* 4, e1000089.
- Riggsby, W.S., Torres-Bauza, L.J., Wills, J.W., Townes, T.M., 1982. DNA content, kinetic complexity, and the ploidy question in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 2, 853–862.
- Rikkerink, E.H., Magee, B.B., Magee, P.T., 1988. Opaque-white phenotype transition: a programmed morphological transition in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 170, 895–899.
- Romani, L., 2011. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 275–288.
- Rustchenko-Bulgac, E.P., 1991. Variations of *Candida albicans* electrophoretic karyotypes. *J. Bacteriol.* 173, 6586–6596.
- Rustchenko, E., 2007. Chromosome instability in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 7, 2–11.
- Rustchenko, E.P., Howard, D.H., Sherman, F., 1994. Chromosomal alterations of *Candida albicans* are associated with the gain and loss of assimilating functions. *J. Bacteriol.* 176, 3231–3241.
- Sasse, C., Hasenberg, M., Weyler, M., Gunzer, M., Morschhäuser, J., 2013. White-opaque switching of *Candida albicans* allows immune evasion in an environment-dependent fashion. *Eukaryot. Cell* 12, 50–58.
- Saville, S.P., Lazzell, A.L., Chaturvedi, A.K., Monteagudo, C., Lopez-Ribot, J.L., 2008. Use of a genetically engineered strain to evaluate the pathogenic potential of yeast cell and filamentous forms during *Candida albicans* systemic infection in immunodeficient mice. *Infect. Immun.* 76, 97–102.
- Saville, S.P., Lazzell, A.L., Monteagudo, C., Lopez-Ribot, J.L., 2003. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot. Cell* 2, 1053–1060.
- Selmecki, A., Bergmann, S., Berman, J., 2005. Comparative genome hybridization reveals widespread aneuploidy in *Candida albicans* laboratory strains. *Mol. Microbiol.* 55, 1553–1565.
- Selmecki, A., Forche, A., Berman, J., 2006. Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science* 313, 367–370.
- Selmecki, A., Gerami-Nejad, M., Paulson, C., Forche, A., Berman, J., 2008. An isochromosome confers drug resistance in vivo by amplification of two genes, ERG11 and TAC1. *Mol. Microbiol.* 68, 624–641.
- Setiadi, E.R., Doedt, T., Cottier, F., Noffz, C., Ernst, J.F., 2006. Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. *J. Mol. Biol.* 361, 399–411.
- Sharek, J., Belhumeur, P., 2011. Modulation of morphogenesis in *Candida albicans* by various small molecules. *Eukaryot. Cell* 10, 1004–1012.
- Si, H., Hernday, A.D., Hirakawa, M.P., Johnson, A.D., Bennett, R.J., 2013. *Candida albicans* white and opaque cells undergo distinct programs of filamentous growth. *PLoS Pathog.* 9, e1003210.
- Slutsky, B., Buffo, J., Soll, D.R., 1985. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* 230, 666–669.
- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M., Soll, D.R., 1987. "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 169, 189–197.

- Soll, D.R., 2014a. The evolution of alternative biofilms in an opportunistic fungal pathogen: an explanation for how new signal transduction pathways may evolve. *Infect. Genet. Evol.* 22, 235–243.
- Soll, D.R., 2014b. The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of *Candida albicans*. *J. Oral Microbiol.* 6.
- Soll, D.R., Daniels, K.J., 2016. Plasticity of *Candida albicans* Biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 565–595.
- Soll, D.R., Lockhart, S.R., Zhao, R., 2003. Relationship between switching and mating in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 2, 390–397.
- Soll, D.R., Morrow, B., Srikantha, T., 1993. High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends Genet.* 9, 61–65.
- Sonneborn, A., Bockmuhl, D.P., Ernst, J.F., 1999a. Chlamyospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect. Immun.* 67, 5514–5517.
- Sonneborn, A., Tebarth, B., Ernst, J.F., 1999b. Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect. Immun.* 67, 4655–4660.
- Srikantha, T., Borneman, A.R., Daniels, K.J., Pujol, C., Wu, W., Seringhaus, M.R., Gerstein, M., Yi, S., Snyder, M., Soll, D.R., 2006. TOS9 regulates white-opaque switching in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 5, 1674–1687.
- Staib, P., Morschhauser, J., 2007. Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* – an enigmatic developmental programme. *Mycoses* 50, 1–12.
- Stoldt, V.R., Sonneborn, A., Leuker, C.E., Ernst, J.F., 1997. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J* 16, 1982–1991.
- Sullivan, D.J., Moran, G.P., Coleman, D.C., 2005. *Candida dubliniensis*: ten years on. *FEMS Microbiol. Lett.* 253, 9–17.
- Tao, L., Du, H., Guan, G., Dai, Y., Nobile, C.J., Liang, W., Cao, C., Zhang, Q., Zhong, J., Huang, G., 2014. Discovery of a "white-gray-opaque" tristable phenotypic switching system in *Candida albicans*: roles of non-genetic diversity in host adaptation. *PLoS Biol.* 12, e1001830.
- Thrash-Bingham, C., Gorman, J.A., 1992. DNA translocations contribute to chromosome length polymorphisms in *Candida albicans*. *Curr. Genet.* 22, 93–100.
- Tsong, A.E., Miller, M.G., Raisner, R.M., Johnson, A.D., 2003. Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: a case study in yeasts. *Cell* 115, 389–399.
- Tsuboi, R., Ogawa, H., Bramono, K., Richardson, M.D., Shankland, G.S., Crozier, W.J., Sei, Y., Ninomiya, J., Nakabayashi, A., Takaiuchi, I., et al., 1994. Pathogenesis of superficial mycoses. *J. Med. Vet. Mycol.* 32 (Suppl 1), 91–104.
- Tuch, B.B., Mitrovich, Q.M., Homann, O.R., Hernday, A.D., Monighetti, C.K., De La Vega, F.M., Johnson, A.D., 2010. The transcriptomes of two heritable cell types illuminate the circuit governing their differentiation. *PLoS Genet.* 6, e1001070.
- Tzung, K.W., Williams, R.M., Scherer, S., Federspiel, N., Jones, T., Hansen, N., Bivolarevic, V., Huizar, L., Komp, C., Surzycki, R., Tamse, R., Davis, R.W., Agabian, N., 2001. Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 3249–3253.
- Uwamahoro, N., Verma-Gaur, J., Shen, H.H., Qu, Y., Lewis, R., Lu, J., Bamberg, K., Masters, S.L., Vince, J.E., Naderer, T., Travençolo, A., 2014. The pathogen *Candida albicans* hijacks pyroptosis for escape from macrophages. *MBio* 5, e00003–e00014.
- Vautier, S., Drummond, R.A., Chen, K., Murray, G.I., Kadosh, D., Brown, A.J., Gow, N.A., MacCallum, D.M., Kolls, J.K., Brown, G.D., 2015. *Candida albicans* colonization and dissemination from the murine gastrointestinal tract: the influence of morphology and Th17 immunity. *Cell. Microbiol.* 17, 445–450.
- Wang, H., Song, W., Huang, G., Zhou, Z., Ding, Y., Chen, J., 2011. *Candida albicans* Zcf37, a zinc finger protein, is required for stabilization of the white state. *FEBS Lett.* 585, 797–802.
- Whelan, W.L., Magee, P.T., 1981. Natural heterozygosity in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 145, 896–903.
- White, S.J., Rosenbach, A., Lephart, P., Nguyen, D., Benjamin, A., Tzipori, S., Whiteway, M., Meccas, J., Kumamoto, C.A., 2007. Self-regulation of *Candida albicans* population size during GI colonization. *PLoS Path.* 3, e184.
- Whiteway, M., Oberholzer, U., 2004. *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 350–357.
- Wilson, R.B., Davis, D., Mitchell, A.P., 1999. Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J. Bacteriol.* 181, 1868–1874.
- Wu, W., Lockhart, S.R., Pujol, C., Srikantha, T., Soll, D.R., 2007. Heterozygosity of genes on the sex chromosome regulates *Candida albicans* virulence. *Mol. Microbiol.* 64, 1587–1604.
- Wu, W., Pujol, C., Lockhart, S.R., Soll, D.R., 2005. Chromosome loss followed by duplication is the major mechanism of spontaneous mating-type locus homozygosity in *Candida albicans*. *Genetics* 169, 1311–1327.
- Zordan, R.E., Galgoczy, D.J., Johnson, A.D., 2006. Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103, 12807–12812.
- Zordan, R.E., Miller, M.G., Galgoczy, D.J., Tuch, B.B., Johnson, A.D., 2007. Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Biol.* 5, e256.

Article

Deletion of the *SKO1* Gene in a *hog1* Mutant Reverts Virulence in *Candida albicans*

Verónica Urrialde, Daniel Prieto , Susana Hidalgo-Vico, Elvira Román , Jesús Pla and Rebeca Alonso-Monge * 

Departamento de Microbiología y Parasitología, Área de Microbiología, Facultad de Farmacia, Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS), Universidad Complutense de Madrid, Plaza de Ramón y Cajal s/n, E-28040 Madrid, Spain; veronicaurrialde@gmail.com (V.U.); adprieto@ucm.es (D.P.); shvico@ucm.es (S.H.-V.); elvirarg@ucm.es (E.R.); jesuspla@farm.ucm.es (J.P.)

* Correspondence: realonso@ucm.es; Tel.: +34-91-3941888; Fax: +34-91-3941745

Received: 14 October 2019; Accepted: 13 November 2019; Published: 15 November 2019



Abstract: *Candida albicans* displays the ability to adapt to a wide variety of environmental conditions, triggering signaling pathways and transcriptional regulation. *Sko1* is a transcription factor that was previously involved in early hypoxic response, cell wall remodeling, and stress response. In the present work, the role of *sko1* mutant in *in vivo* and *ex vivo* studies was explored. The *sko1* mutant behaved as its parental wild type strain regarding the ability to colonize murine intestinal tract, *ex vivo* adhesion to murine gut epithelium, or systemic virulence. These observations suggest that *Sko1* is expendable during commensalism or pathogenesis. Nevertheless, the study of the *hog1 sko1* double mutant showed unexpected phenotypes. Previous researches reported that the deletion of the *HOG1* gene led to avirulent *C. albicans* mutant cell, which was, therefore, unable to establish as a commensal in a gastrointestinal murine model. Here, we show that the deletion of *sko1* in a *hog1* background reverted the virulence of the *hog1* mutant in a systemic infection model in *Galleria mellonella* larvae and slightly improved the ability to colonize the murine gut in a commensalism animal model compared to the *hog1* mutant. These results indicate that *Sko1* acts as a repressor of virulence related genes, concluding that *Sko1* plays a relevant role during commensalism and systemic infection.

Keywords: *Candida albicans*; virulence; stress response; transcription factor; commensalism

1. Introduction

Living cells respond to external stimuli through signal transduction pathways. Surrounding changes are perceived by sensors that trigger specific signals through different pathways to transcription factors, which control gene expression. The signal transduction pathways that are mediated by MAP (Mitogen Activated Protein) Kinases are mechanisms that are conserved in all eukaryotic cells that play an important role in cell physiology and the response to stress [1]. In pathogenic microorganisms, these signaling pathways allow cells to face the host immune system [2]. The opportunistic pathogen *C. albicans* is a fungus that inhabits as a commensal in skin and mucosa of human beings, but behaves as a pathogen when immune barriers become broken or in immunocompromised individuals [3,4]. The HOG pathway, mediated by the MAP kinase *Hog1*, becomes activated in response to a wide variety of stresses [5–9]. Mutants in this pathway display enhanced sensitivity to oxidative agents, hyperosmotic conditions, metalloids, etc. Remarkably, the *hog1* mutant becomes avirulent in a systemic infection model in mice and is more susceptible to killing by phagocytes [10,11]. The *hog1* mutant is also unable to establish as a commensal in a murine gastrointestinal colonization model [12]. The *hog1* mutant is also more sensitive to Histatin 5 (Hst5), a cationic peptide that is present in the saliva with antifungal activity [13]. Hst5 triggers an osmotic stress response, increasing the expression, among

other genes, of the transcription factor *SKO1*. *Sko1* is the only transcription factor that has been reported to be phosphorylated by *Hog1* upon osmotic stress [14] and probably by other stresses [15] in *C. albicans*. Transcriptomic analyses revealed that *Sko1* controls the expression of genes that are implicated in carbohydrate metabolism, redox metabolism, and glycerol synthesis [16]. Other studies report that *Sko1* regulates the early hypoxic response [17], although the *sko1* mutant grows in the absence of O₂ similarly to the wild type and it is not sensitive to inhibitors of the electron transport chain contrary to what occurs to the *hog1* mutant [18]. Transcriptional studies suggest that *Sko1* acts as a repressor [15], similarly to its homolog in *Saccharomyces cerevisiae* [19,20]. The deletion of the *SKO1* gene in a *hog1* defective mutant partially suppresses its osmosensitivity in *C. albicans* [15]. Moreover, *Sko1* also acts as a transcriptional activator; this role has been extensively characterized in *S. cerevisiae*. In this microorganism, the phosphorylation of *Hog1* upon osmotic or oxidative stress triggers the phosphorylation of *Sko1*. The phosphorylated form of *Sko1* binds to *Cyc8*, *Tup1*, *SAGA*, and *Swi/Snf*, generating a complex at the target gene promoters, which activates or represses specific gene transcription [20–22].

In the present work, the role of *Sko1* in commensalism and virulence was explored in *C. albicans*; the *sko1* mutant behaved as wild type in both murine commensalism and *Galleria mellonella* systemic infection models. Nevertheless, significant differences were observed when a double *hog1 sko1* double mutant was analyzed, suggesting that *Sko1* controls the expression of genes during host-pathogen interaction.

2. Materials and Methods

2.1. Strains and Growth Conditions

Yeast strains that were used are listed in Table 1. To label the *C. albicans* strains, pNIM1R-GFP and pNIN1R-dTOM2 plasmids carrying, respectively, the GFP and dTOM2 fluorescent proteins under the control of the repressible tetracycline promoter *OP4* [12] were digested with *KpnI*-*KspI* to force recombination at the *ADH1* locus, generating strains RM100-GFP, *sko1*-dTOM2, and *hog1 sko1*-dTOM2, which express the fluorescent proteins constitutively in the absence of doxycycline.

Yeast strains were routinely grown at 37 °C in YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% glucose). SD medium (2% glucose, 0.67% yeast nitrogen base) plus amino acids and chloramphenicol (10 mg/L) was used to distinguish *C. albicans* strains that were labelled with dTOM2 from strains that were labelled with GFP.

The influence of the surrounding atmosphere was analyzed either by incubating the plates in an incubator that was designed for cell culture or in an anaerobic chamber. The cell culture incubator was programmed at 37 °C, 80% humidity, and 5% CO₂ in the presence of atmospheric O₂. Hypoxia was achieved using an anaerobic chamber and a commercial system, which ensures less than 0.1% O₂ in 2.5 h and more than 15% CO₂ (GENBox anaer, BioMérieux).

Drop tests were performed by spotting ten-fold serial dilutions of cells onto YPD plates that were supplemented with different concentrations of bile salts and incubated at 37 °C for 24 h.

Table 1. Strains that were used in this study.

Microorganism	Strain	Genotype	Nomenclature in the Manuscript and Figures	Source
<i>C. albicans</i>	RM100	ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 his1Δ::hisG/his1Δ::hisG-URA3-hisG ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434	wt	[23]
<i>C. albicans</i>	CNC13	his1Δ::hisG/his1Δ::hisG hog1::hisG-URA3-hisG/hog1::hisG ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434	hog1	[24]
<i>C. albicans</i>	VIC100	his1Δ::hisG/his1Δ::hisG sko1Δ::hisG/sko1Δ::hisG-URA3-hisG ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434	sko1	[15]
<i>C. albicans</i>	VIC200	his1Δ::hisG/his1Δ::hisG hog1::hisG/hog1::hisG sko1Δ::hisG/sko1Δ::hisG-URA3-hisG ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434	hog1 sko1	[15]
<i>C. albicans</i>	RM-GFP	his1Δ::hisG/his1Δ::hisG-URA3-hisG ADH1/adh1::tTA pTET ^{M0} GFP-SAT1 ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434	RM100-GFP	This work
<i>C. albicans</i>	VIC101	his1Δ::hisG/his1Δ::hisG sko1Δ::hisG/sko1Δ::hisG-URA3-hisG ADH1/adh1::tTA pTET-dTOM2-SAT1 ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434	sko1-dTOM2	This work
<i>C. albicans</i>	VIC201	his1Δ::hisG/his1Δ::hisG hog1::hisG/hog1::hisG sko1Δ::hisG/sko1Δ::hisG-URA3-hisG ADH1/adh1::tTA pTET-dTOM2-SAT1	hog1 sko1-dTOM2	This work

2.2. Virulence Assays in *Galleria mellonella*

C. albicans cells that were grown overnight in YPD at 37 °C were collected and washed twice in phosphate buffer saline (PBS). The cells' concentration was calculated by Neubauer chamber and 10⁶ cells in 10 μL were injected into the hemocoel at the last left pro-leg using a Hamilton syringe. Then, 20 larvae of approximately 400–500 mg weight were used for each infection group. Two groups were used as a control: larvae injected with PBS and larvae not inoculated. Larvae were maintained at 37 °C in darkness. Survival was monitored for 9 days after infection. Kaplan-Meier survival curves are shown and Log-rank (Mantel-Cox) test statistical analyses were performed.

2.3. Murine Intestinal Commensalism Model and Adhesion Assay

All experiments involving animals that were performed in this work were carried out in strict accordance with the regulations in the “Real Decreto 1201/2005, BOE 252” for the Care and Use of Laboratory Animals of the “Ministerio de la Presidencia”, Spain. The protocol that was used in the commensalism model was approved by the Animal Experimentation Committee of the University Complutense of Madrid (CEA 25/2012, BIO2012-31839-1) and Comunidad de Madrid according to Artículo 34 del RD 53/2013. All efforts were made to minimize suffering, even though the treatments did not result in disease in the animals. The number of animals that were used in the experimentation was minimized for ethical reasons.

The protocol for studying commensal colonization, which was used in this work, has been described previously [12]. Briefly, after 7 days of antibiotic pre-treatment (2 mg/mL streptomycin, 1 mg/mL bacitracin, and 0.1 mg/mL gentamycin), 10^7 *C. albicans* cells were inoculated in a single gavage. Stool samples were obtained every 2 to 4 days, were homogenized in PBS, and were cultured in SD plates to determine CFUs per gram. To analyze *C. albicans* loads in different portions of the gastrointestinal tract, mice were sacrificed and samples from the stomach, cecum, small and large intestine were aseptically separated, homogenized, and diluted in sterile PBS and cultured in SD plates.

To analyze the capacity to adhere to intestinal mucosa, we proceeded as previously described [12]. The Adhesion Relative Index was calculated by dividing the percentage of adhered cells from (wt or *sko1*)-dTOM2 strains, which were recovered by their percentage in the inoculum.

3. Results

3.1. The Lack of *Sko1* Does not Alter the Ability to Colonize the Murine Intestine

Since *Sko1* has been implicated in the early response to hypoxic growth conditions in *C. albicans* [17], we wonder if this transcription factor was required for *C. albicans* to establish as a commensal in the gastrointestinal tract due to its hypoxic environment. The *sko1* defective mutant was labelled with the dTOM2, a red fluorescence protein, while the parental strain RM100 was labelled with GFP. Then, a balanced mixed culture of both strains was intragastrically inoculated in mice that were previously treated with a combination of antibiotics. Colonization level was followed in time by CFUs, which were counted from stools (Figure 1a). Both strains colonized murine gut to the same level, displaying no significant difference between them. At the end of the experiment, the amount of each strain in the intestinal content of different portions of the intestine was quantified by the CFUs count (Figure 1b). The *sko1* mutant and the wild type strain showed a similar distribution along the intestine.

Adhesion to murine intestinal mucosa was also analyzed. Both labelled strains were mixed to an equal amount and were left to adhere to small intestine tissue (obtained from mice that were not previously colonized) for 150 min (Figure 1c). Then, the relative adhesion index was calculated for both strains. All these results indicate that the lack of *sko1* neither altered the adhesion to intestinal mucosa nor the ability to colonize murine gut.

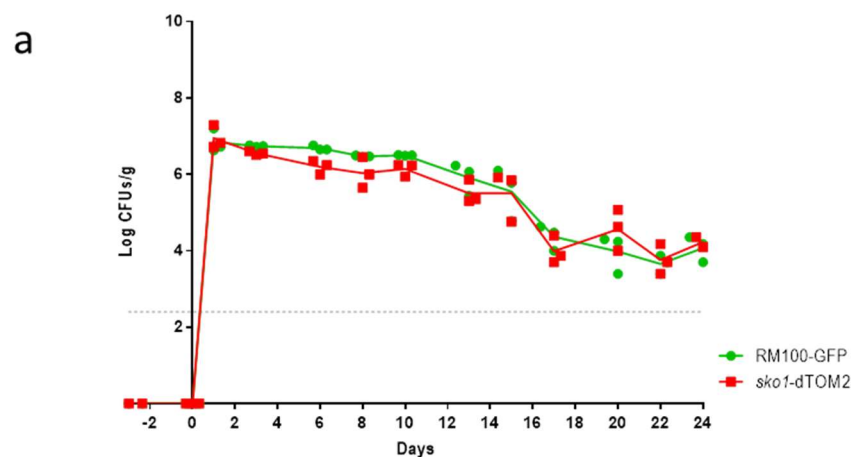


Figure 1. Cont.

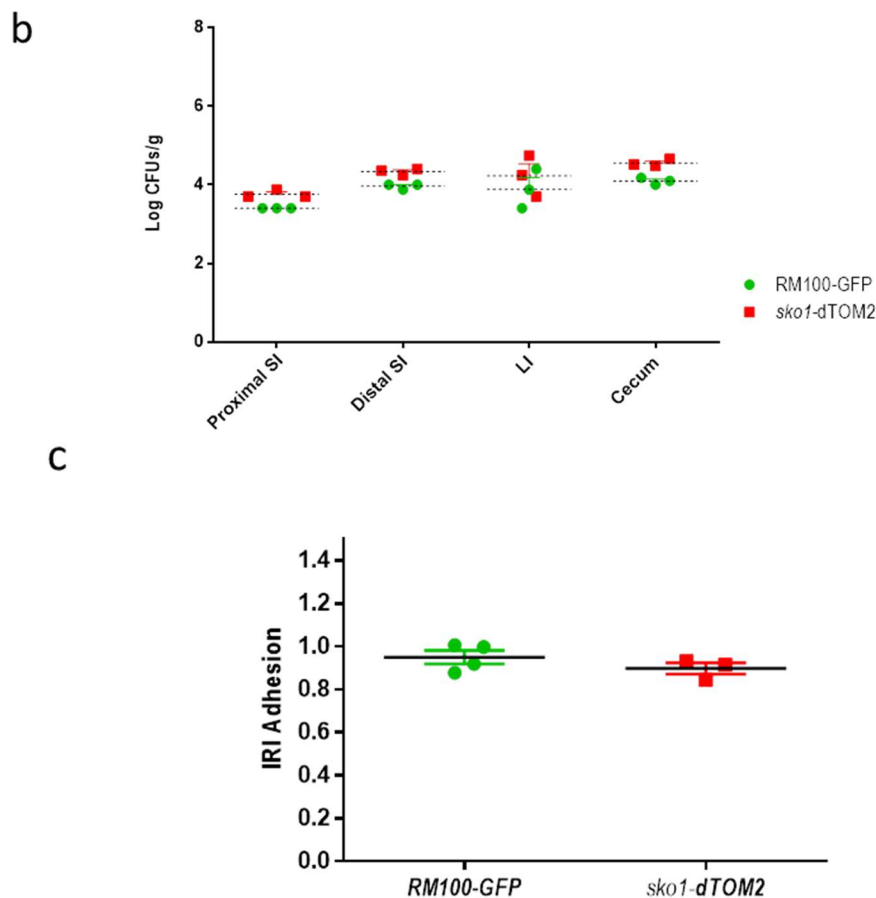


Figure 1. Role of Sko1 in murine gut colonization. **a)** C57BL/6J mice were treated with a combination of antibiotics for 1 week to reduce bacterial microbiota. Then, 10^7 *C. albicans* cells in 100 μ L of a balanced mix of *sko1*-dTOM2 and wt-GFP cells were inoculated intragastrically. The graph represents Log CFUs/g of faeces across time. Each square represents a single mouse ($n = 3$); **b)** At day 24, mice were euthanized and their intestine was split on proximal small intestine (SI), distal small intestine, large intestine (LI), and cecum. Samples were processed and *C. albicans* colonies were counted. Each single independent value is represented as the mean \pm SEM from three mice; **c)** Adhesion to intestinal mucosa was assayed using a mix of wt-GFP/wt-dTOM2 tagged strains as internal control and a mixture of wt-GFP and *sko1*-dTOM2 strains as samples. *C. albicans* mix was allowed to adhere to clean murine gut mucosa for 150 min and then the Adhesion Relative Index was calculated by dividing the percentage of adhered cells from wt or *sko1* strains labelled with the red fluorescence protein, which was recovered after 150 minutes of interaction with gut mucosa, by their percentage in the inoculum. Each point represents an individual assay.

3.2. The *sko1* Mutant is More Resistant to Bile Salts

The susceptibility to bile salts was also tested by spotting cell suspensions on YPD plates that were supplemented with a commercial mixture of bile salts. The *sko1* mutant displayed a clear resistance to the presence of bile salts (Figure 2a). This resistance was evidenced at high bile salts concentration (0.3% BS) since under these conditions, the parental RM100 was not able to grow. Moreover, the resistance to bile salts was observed under different environmental conditions: normoxia, hypoxia, or normoxia plus 5% CO_2 , suggesting that this phenotype does not depend on the amount of O_2 or CO_2 . Sensitivity to bile salts has been related to a defect in the colonization [12] or impaired colonization in the proximal small gut at early stages of the colonization [25]. We tested if this enhanced resistance to bile salts could be detected in the double *hog1 sko1* mutant and if this phenotype affects the ability to

colonize murine gut. The *hog1 sko1* double mutant displayed a severe sensitivity to bile salts under all tested conditions, similar to the sensitivity that was displayed by the *hog1* mutant (Figure 2a).

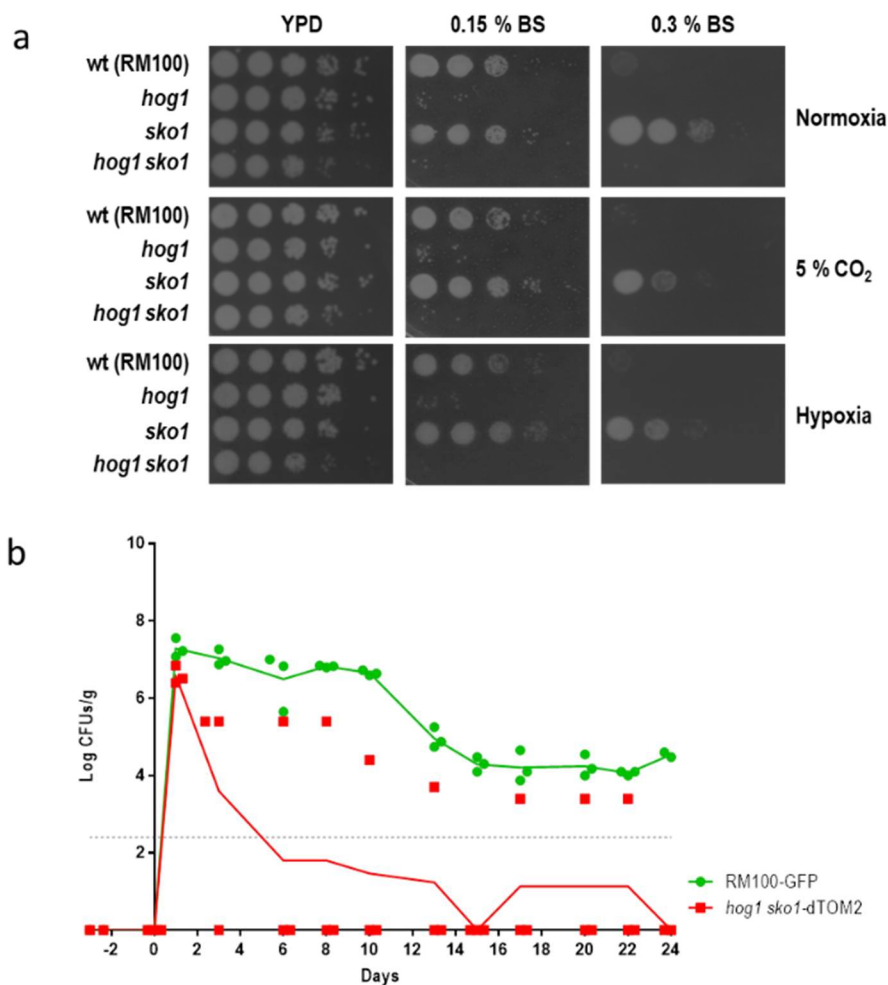


Figure 2. Influence of *SKO1* deletion in a *hog1* background. a) ten-fold dilution of cell suspensions of the indicated strains were spotted on YPD plates that were supplemented with different amounts of Bile Salts (BS). Plates were incubated under the specified conditions at 37 °C for 24 h (normoxia and 5% supplemented CO₂ atmosphere) or 48 h (for plates incubated under hypoxia). b) C57BL/6J mice that were pre-treated with antibiotics were inoculated with a balanced mix of wt-GFP/*hog1 sko1*-dTOM2 cells and colonization was followed across time. The graph represents Log CFUs/ g of faeces versus time. Each square represents a single mouse ($n = 3$).

Likewise, the ability of the *hog1 sko1* double mutant to colonize the murine gut was also analyzed. This mutant displayed a colonization rate significantly reduced compared to the wild type strain (and the *sko1* mutant). Remarkably, in one of the three analyzed mice, the *hog1 sko1* mutant was able to colonize the gut to detectable levels (Figure 2b), indicating that deletion of the *SKO1* gene in a *hog1* mutant strain improved survival into the murine gut. The *hog1* mutant was unable to establish gut colonization and was removed from the gut after 2 to 3 days post-inoculation [12].

3.3. *Sko1* is not Required for Virulence, but Lack of *Sko1* Enhances the Virulence of a *hog1* Mutant

Previous studies showed that the *Sko1* transcription factor was not required for virulence in *C. albicans* [15]. These studies were performed using a systemic infection model in mice. In the present work, the virulence of the *sko1* mutant was analyzed using an alternative infection model: *Galleria mellonella* larvae. To perform this, virulence assays 1×10^6 *C. albicans* cells were injected in the last

pro-leg of *G. mellonella* larvae and viability was followed in time (Figure 3). As expected, the *sko1* mutant behaved similarly to the wild type strain, meanwhile the *hog1* mutant was not virulent in this animal model. Surprisingly, the *hog1 sko1* mutant behaved as the *sko1* mutant and wild type strains, reverting the virulence of the *hog1* mutant.

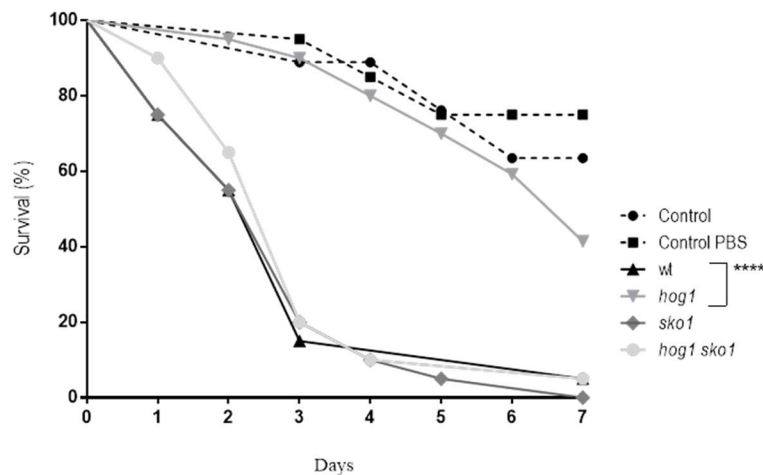


Figure 3. Virulence of *C. albicans* in a *G. mellonella* systemic infection model. 10^6 *C. albicans* cells were injected at the last left pro-leg of *G. mellonella* larvae and survival of the insect was followed in time. Control refers to *G. mellonella* larvae that was not inoculated and control PBS indicates larvae that was inoculated with PBS as stress control. Kaplan-Meier survival curves are shown and the Log-rank (Mantel-Cox) test displayed significant differences between the *hog1* mutant and the parental wild type strain. **** $p < 0.0001$.

4. Discussion

Metabolic adaptation and the ability to respond to environmental stresses have been extensively associated with *C. albicans* pathogenesis [26,27]. The capacity of *C. albicans* to sense changes in the environment and straight away respond, adapting to the new conditions as well as the capability to use a wide variety of nutrients, allows this fungus to inhabit different niches and cause diverse diseases. *C. albicans* is able to proliferate over the human body (skin and mucosa) besides its ability to disseminate to different organs, escaping from the immune system. Sko1 is a transcription factor that controls the expression of stress related and metabolic genes [16]. This transcription factor has been placed downstream of the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress and downstream of Psk1 in response to cell wall disturbing compounds [14]. Although no sensitivity to osmotic stress was detected in the *sko1* mutant at 1 M NaCl concentration [15], significant growth defect was detected at higher salt concentrations (1.5 M or 2 M NaCl) [16]. In addition, the *sko1* mutant displays a clear sensitivity to caspofungin and other cell wall disturbing compounds [14,15]. In spite of its role in osmotic stress signaling and cell wall biogenesis, the Sko1 transcription factor was dispensable for virulence in the murine systemic infection model and to survive phagocytes [15]. Here, we show that Sko1 is also not required for *C. albicans* to colonize murine gastrointestinal tract. Moreover, the distribution along the small and large intestine was similar in the *sko1* mutant and the wild type strain. There were no differences between wild type and *sko1* mutant strains regarding adhesion to intestinal epithelium *ex vivo*. Sko1 was also not required for virulence using the alternative invertebrate model *G. mellonella*. All these data suggest that Sko1 does not play a relevant role during systemic infection or commensalism in spite of its role in the stress response, cell wall biogenesis, and metabolism [15,16].

Surprisingly, the *sko1* mutant displayed an increased resistance to bile salts. Bile salts play a role in the digestion and absorption of lipids from the diet and, remarkably, these compounds have antimicrobial activity as they disturb the membranes. The *sko1* mutant was more resistant to bile salts than the wild type strain; this resistance could compensate the defect in the *sko1* mutant cell wall and

somehow allow the colonization of the gastrointestinal tract. There are two possibilities for why the *sko1* mutant is resistant to bile salts: a) the *sko1* displays a different membrane composition that is less susceptible to these compounds or b) bile salts cannot get the plasma membrane due to a different cell wall composition. Although no alteration on the membrane has been reported for the *sko1* mutant to our knowledge, a role as a repressor of fatty acid metabolism genes was reported by Marotta and co-workers [16]. Genes such as the fatty acid oxidase *FOX2* and the lipase *TGL1* are overexpressed in the *sko1* mutant. The *TGL1* gene remains uncharacterized in *C. albicans* and its ortholog codifies an enzyme with sterol esterase activity. Tgl1 is an integral component of the membrane, which function is to mobilize sterol ester stores from the membrane and to release free sterols and fatty acids in *S. cerevisiae* [28]. The overexpression of the *TGL1* gene that was observed in the *sko1* mutant may alter the membrane composition and therefore, alter the resistance to bile salts. The alterations in the membrane that confer resistance to bile salts are Hog1-dependent, suggesting that Hog1 is also involved in lipid homeostasis.

The role of Sko1 as a repressor of genes that are involved in the osmotic stress response has been previously reported in *C. albicans* [15,16]. The passage through the intestine could trigger an osmotic stress response in *C. albicans*, mainly in the large gut where the water is absorbed from the lumen. The lack of Sko1 in a *hog1* mutant background may allow the expression of genes that improve the osmotolerance *in vitro* [15] and, probably, the survival in the gut. The level of expression of these genes seems to not be enough to completely return the ability to become established as a commensal of the *hog1 sko1* double mutant, which is probably due to the fact that both genes, *SKO1* and *HOG1*, are required for the full expression of stress response genes [16].

Noteworthy, the deletion of the *SKO1* gene in a *hog1* mutant reverts the virulence and improves the ability to colonize the murine gastrointestinal tract. It was reported previously that Sko1 acts as transcriptional repressor of genes that are involved in virulence and filamentation [15]. Genes such as *ECE1*, *HWPI1*, and *WH11* at a physiological temperature (37 °C) were upregulated in both *sko1* and *hog1* mutants, and the *hog1 sko1* double mutant displayed an even higher expression level of these genes [15]. The *ECE1* gene encoded for a hypha specific protein that became split on several peptides, among them, the peptide called candidalysin [29]. This peptide acted as a cytolytic toxin, damaging epithelial host membranes, leading to the release of damage associated cytokines. Further, *ece1* mutants were avirulent in the animal model of mucosal infection [30] as well as zebrafish and murine models of systemic fungal infections [31]. The upregulation of *ECE1* reported previously [15], together with other genes that were implicated in virulence, may explain the restoration of virulence in the *hog1 sko1* double mutant. This upregulation may not be enough to completely revert the ability of the *sko1 hog1* double mutant to colonize the murine gut.

Although the *sko1* mutant behaves as the wild type strain concerning virulence and commensalism, the analyses of the *hog1 sko1* double mutant indicates that Sko1 mediates the expression of genes that are relevant for virulence and possibly for the commensal state of *C. albicans*.

Author Contributions: Conceptualization, J.P. and R.A.-M.; Methodology, D.P. and E.R.; Experimental work, V.U., D.P., and S.H.-V.; Writing—Original Draft Preparation, R.A.M.; Writing—Review and Editing, R.A.-M. and J.P.; Project Funding Acquisition, J.P.

Funding: Work in our laboratory at the Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, UCM is supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad under Grant PGC-2018-095047-B-100 and the Comunidad de Madrid under Grant S2017/BMD3691 InGEMICS-CM.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kultz, D. Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases. *J. Mol. Evol.* **1998**, *46*, 571–588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Day, A.M.; Quinn, J. Stress-Activated Protein Kinases in Human Fungal Pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Odds, F.C. *Candida* species and virulence. *ASM News* **1994**, *60*, 313–318.
4. Odds, F.C. Molecular phylogenetics and epidemiology of *Candida albicans*. *Future Microbiol.* **2010**, *5*, 67–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Alonso-Monge, R.; Navarro-García, F.; Román, E.; Negredo, A.I.; Eisman, B.; Nombela, C.; Pla, J. The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **2003**, *2*, 351–361. [[CrossRef](#)]
6. Urrialde, V.; Prieto, D.; Pla, J.; Alonso-Monge, R. The Pho4 transcription factor mediates the response to arsenate and arsenite in *Candida albicans*. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 118. [[CrossRef](#)]
7. Enjalbert, B.; Smith, D.A.; Cornell, M.J.; Alam, I.; Nicholls, S.; Brown, A.J.; Quinn, J. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **2006**, *17*, 1018–1032. [[CrossRef](#)]
8. Cui, S.; Hassan, R.Y.; Heintz-Buschart, A.; Bilitewski, U. Regulation of *Candida albicans* Interaction with Macrophages through the Activation of HOG Pathway by Genistein. *Molecules* **2016**, *21*, 162. [[CrossRef](#)]
9. Herrero-de-Dios, C.; Day, A.M.; Tillmann, A.T.; Kastora, S.L.; Stead, D.; Salgado, P.S.; Quinn, J.; Brown, A.J.P. Redox Regulation, Rather than Stress-Induced Phosphorylation, of a Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinase Modulates Its Nitrosative-Stress-Specific Outputs. *MBio* **2018**, *9*, e02229-17. [[CrossRef](#)]
10. Alonso-Monge, R.; Navarro-García, F.; Molero, G.; Díez-Orejas, R.; Gustin, M.; Pla, J.; Sánchez, M.; Nombela, C. Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 3058–3068.
11. Arana, D.M.; Alonso-Monge, R.; Du, C.; Calderone, R.; Pla, J. Differential susceptibility of mitogen-activated protein kinase pathway mutants to oxidative-mediated killing by phagocytes in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell. Microbiol.* **2007**, *9*, 1647–1659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Prieto, A.D.; Román, E.; Correia, I.; Pla, J. The HOG pathway is critical for the colonization of the mouse gastrointestinal tract by *Candida albicans*. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Vylkova, S.; Jang, W.S.; Li, W.; Nayyar, N.; Edgerton, M. Histatin 5 initiates osmotic stress response in *Candida albicans* via activation of the Hog1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Eukaryot. Cell* **2007**, *6*, 1876–1888. [[CrossRef](#)]
14. Rauceo, J.M.; Blankenship, J.R.; Fanning, S.; Hamaker, J.J.; Deneault, J.S.; Smith, F.J.; Nantel, A.; Mitchell, A.P. Regulation of the *Candida albicans* cell wall damage response by transcription factor Sko1 and PAS kinase Psk1. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 2741–2751. [[CrossRef](#)]
15. Alonso-Monge, R.; Román, E.; Arana, D.M.; Prieto, A.D.; Urrialde, V.; Nombela, C.; Pla, J. The Sko1 protein represses the yeast-to-hypha transition and regulates the oxidative stress response in *Candida albicans*. *Fungal Genet. Biol.* **2010**, *47*, 587–601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Marotta, D.H.; Nantel, A.; Sukala, L.; Teubl, J.R.; Rauceo, J.M. Genome-wide transcriptional profiling and enrichment mapping reveal divergent and conserved roles of Sko1 in the *Candida albicans* osmotic stress response. *Genomics* **2013**, *102*, 363–371. [[CrossRef](#)]
17. Sellam, A.; Hoog, M.V.; Tebbji, F.; Beaupaire, C.; Whiteway, M.; Nantel, A. Modeling the transcriptional regulatory network that controls the early hypoxic response in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **2014**, *13*, 675–690. [[CrossRef](#)]
18. Alonso-Monge, R.; Carvaihlo, S.; Nombela, C.; Rial, E.; Pla, J. The Hog1 MAP kinase controls respiratory metabolism in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiology* **2009**, *155*, 413–423. [[CrossRef](#)]
19. Proft, M.; Pascual-Ahuir, A.; de Nadal, E.; Arino, J.; Serrano, R.; Posas, F. Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J.* **2001**, *20*, 1123–1133. [[CrossRef](#)]
20. Proft, M.; Struhl, K. Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol. Cell* **2002**, *9*, 1307–1317. [[CrossRef](#)]
21. Zapater, M.; Sohrmann, M.; Peter, M.; Posas, F.; de Nadal, E. Selective requirement for SAGA in Hog1-mediated gene expression depending on the severity of the external osmotic stress conditions. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 3900–3910. [[CrossRef](#)]
22. Rep, M.; Proft, M.; Remize, F.; Tamas, M.; Serrano, R.; Thevelein, J.M.; Hohmann, S. The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Mol. Microbiol.* **2001**, *40*, 1067–1083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Negredo, A.; Monteoliva, L.; Gil, C.; Pla, J.; Nombela, C. Cloning, analysis and one-step disruption of the ARG5,6 gene of *Candida albicans*. *Microbiology* **1997**, *143*, 297–302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. José, C.S.; Alonso-Monge, R.; Pérez-Díaz, R.M.; Pla, J.; Nombela, C. The mitogen-activated protein kinase homolog HOG1 gene controls glycerol accumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 5850–5852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Prieto, D.; Roman, E.; Alonso-Monge, R.; Pla, J. Overexpression of the Transcriptional Regulator WOR1 Increases Susceptibility to Bile Salts and Adhesion to the Mouse Gut Mucosa in *Candida albicans*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Wilson, D.; Mayer, F.L.; Miramon, P.; Citiulo, F.; Slesiona, S.; Jacobsen, I.D.; Hube, B. Distinct roles of *Candida albicans*-specific genes in host-pathogen interactions. *Eukaryot. Cell* **2014**, *13*, 977–989. [[CrossRef](#)]
27. Mayer, F.L.; Wilson, D.; Hube, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* **2013**, *4*, 119–128. [[CrossRef](#)]
28. Koffel, R.; Tiwari, R.; Falquet, L.; Schneiter, R. The *Saccharomyces cerevisiae* YLL012/YEH1, YLR020/YEH2, and TGL1 genes encode a novel family of membrane-anchored lipases that are required for steryl ester hydrolysis. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 1655–1668. [[CrossRef](#)]
29. Moyes, D.L.; Wilson, D.; Richardson, J.P.; Mogavero, S.; Tang, S.X.; Wernecke, J.; Hofs, S.; Gratacap, R.L.; Robbins, J.; Runglall, M.; et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature* **2016**, *532*, 64–68. [[CrossRef](#)]
30. Richardson, J.P.; Mogavero, S.; Moyes, D.L.; Blagojevic, M.; Kruger, T.; Verma, A.H.; Coleman, B.M.; Diaz, J.D.; Schulz, D.; Ponde, N.O.; et al. Processing of *Candida albicans* Ece1p Is Critical for Candidalysin Maturation and Fungal Virulence. *MBio* **2018**, *9*, e02178-17. [[CrossRef](#)]
31. Swidergall, M.; Khalaji, M.; Solis, N.V.; Moyes, D.L.; Drummond, R.A.; Hube, B.; Lionakis, M.S.; Murdoch, C.; Filler, S.G.; Naglik, J.R. Candidalysin Is Required for Neutrophil Recruitment and Virulence During Systemic *Candida albicans* Infection. *J. Infect. Dis.* **2019**, *220*, 1477–1488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

The Glyoxylate Cycle Is Involved in White-Opaque Switching in *Candida albicans*

Susana Hidalgo Vico, Daniel Prieto , Rebeca Alonso Monge , Elvira Román *  and Jesús Pla * 

Departamento de Microbiología y Parasitología-IRYCIS, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain; shvico@ucm.es (S.H.V.); adprieto@ucm.es (D.P.); realonso@ucm.es (R.A.M.)

* Correspondence: elvirarg@ucm.es (E.R.); jpla@ucm.es (J.P.)

Abstract: *Candida albicans* is a commensal yeast that inhabits the gastrointestinal tract of humans. The master regulator of the white-opaque transition *WOR1* has been implicated in the adaptation to this commensal status. A proteomic analysis of cells overexpressing this transcription factor (*WOR1^{OE}*) suggested an altered metabolism of carbon sources and a phenotypic analysis confirmed this alteration. The *WOR1^{OE}* cells are deficient in using trehalose and xylose and are unable to use 2C sources, which is consistent with a reduction in the amount of Icl1, the isocitrate lyase enzyme. The *icl1Δ/Δ* mutants overexpressing *WOR1* are deficient in the production of phloxine B positive cells, a main characteristic of opaque cells, a phenotype also observed in mating type hemizygous *mtla1Δ icl1Δ/Δ* cells, suggesting the involvement of Icl1 in the adaptation to the commensal state. In fact, *icl1Δ/Δ* cells have reduced fitness in mouse gastrointestinal tract as compared with essentially isogenic heterozygous *ICL1/icl1Δ*, but overproduction of *WOR1* in an *icl1Δ/Δ* mutant does not restore fitness. These results implicate the glyoxylate shunt in the adaptation to commensalism of *C. albicans* by mechanisms that are partially independent of *WOR1*.



Citation: Vico, S.H.; Prieto, D.; Monge, R.A.; Román, E.; Pla, J. The Glyoxylate Cycle Is Involved in White-Opaque Switching in *Candida albicans*. *J. Fungi* **2021**, *7*, 502. <https://doi.org/10.3390/jof7070502>

Academic Editor: David S. Perlin

Received: 8 June 2021
Accepted: 22 June 2021
Published: 24 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: commensalism; glyoxylate cycle; **wo** switching; fungal pathogenesis; epigenetics; opaque cells; oxidative stress

1. Introduction

Candida albicans is a commensal yeast that inhabits the gastrointestinal tract of healthy people, where it behaves as a harmless commensal. When host defenses are altered, *C. albicans* can translocate through the gut epithelium and disseminate via the blood stream, causing severe systemic diseases with as much as 50% mortality [1–3]. Previously, several virulence factors have been identified in this fungus using an acute systemic infection model in mice [4]. However, in recent years, the popularization of models of colonization of the mammalian gastrointestinal tract [5] has allowed the identification of factors promoting the establishment of the fungus in this location. Inhibition of colonization may promote the eradication (or, at least, the control) of fungal populations in this niche and could be an effective prophylactic approach for the prevention of endogenous candidiasis in immunosuppressed patients [6–9]. Several genes have been shown to be involved in colonization (see [10–12] for recent reviews) and their nature is diverse as they regulate the metabolic status of the fungus and encode components of signaling pathways and/or morphogenetic transitions [13–19].

The white opaque transition (**wo**) is an environmentally regulated epigenetic program that produces opaque (mating competent) cells from homozygous **a/a** and α/α diploids, therefore, allowing mating and subsequent tetraploid formation (see [20] for a review). Opaque cells differ from white cells in that they are more elongated, positive to phloxine B staining, and having a distinct transcriptional program [21–23]. The **wo** conversion has important biological consequences, as opaque cells colonize more readily the skin of mammals [24] but are less virulent as compared with white cells in a mouse model of systemic

infection [25], consistent with their unstable phenotype at high (37 °C) temperatures. Wor1 is the master regulator of the **wo** transition; deletion of *WOR1* blocks the conversion to the opaque phase and its expression is repressed in heterozygous mating type white cells by the action of two homeodomain proteins ($a1/\alpha2$) [26–29]. Other **wo** regulators have been identified among previously identified opaque-enriched genes [22,23] by in silico selection of transcriptional regulators [30] and the regulatory interactions among them analyzed by chromatin immunoprecipitation and gene expression profiling [30,31] or by a systematic screening using a collection of strains deleted for transcription factors [32]. The complexity of this transition is revealed by the involvement of chromatin reorganization via histone modifications [33–35].

Interestingly, Wor1 is involved in the **wo** transition and also in the adaptation to commensalism. This was suggested by the fact that the morphogenetic regulator Efg1 [36], also involved in the **wo** transition [37], is an important regulator of fungal loads in mouse gastrointestinal (GI) tract, as *efg1*Δ cells show higher fungal levels in the gut as compared with wild type cells [15]. *WOR1* overexpression (*WOR1*^{OE}) from the *MET3* promoter provokes an en masse conversion of the white population to phloxine B positive cells in **a/α** mating type cells [29], thus, overriding repression by the $a1/\alpha2$ dimer. *WOR1*^{OE} **a/α** cells have an increased fitness in mouse GI tract [27], in striking contrast with the behavior of opaque cells derived from spontaneous switching of mating type homozygous cells that are rapidly lost [27]. Therefore, Wor1 has been suggested to mediate a morphological switch (termed GUT from gastrointestinally induced transition) via its increased expression upon passage through the mouse intestine, presumably converting a subset of *C. albicans* cells to the commensal status. GUT cells are morphologically slightly different from opaque cells and display a specific transcriptional program [27].

The changes occurring in *WOR1*^{OE} cells that lead to an increase in fitness are not completely understood. Pande et al. reported significant changes in lipid, glucose, and iron metabolism genes and an increased expression of genes involved in N-acetyl glucosamine metabolism, a monosaccharide produced primarily by GI tract bacteria [27]. *WOR1*^{OE} cells have an altered consumption of glucose and are sensitive to antimycin A [38], suggesting an altered balance in their respiratory metabolism. In this study, we characterized the phenotype of *WOR1*^{OE} cells by different means. A proteomic analysis of *WOR1* overexpressing cells reveals changes in enzymes involved in the utilization of certain carbon sources and a repression of the glyoxylate cycle in these cells. We demonstrate that the growth of *WOR1*^{OE} cells is altered in the presence of alternative carbon sources and show a role for the glyoxylate cycle in the production of opaque cells and the fitness of *C. albicans* cells in mouse GI tract.

2. Materials and Methods

2.1. Strains and Growth Conditions

All *C. albicans* strains used in this work are listed in Table 1. The construction of strains defective in *ICL1* or *MTLa1* or those overproducing Wor1 are described in the next section. In addition to the standard collection name, we provide a more descriptive name used in this manuscript.

Yeast strains were routinely grown at 37 °C in YPD liquid medium (2% glucose, 2% peptone, and 1% yeast extract). Growth was estimated by OD₆₀₀ measurements. Drop tests for susceptibility/resistance or growth on carbon sources assays were performed by spotting 5 μL drops containing 10⁵ cells and ten-fold serial dilutions of stationary cells (grown for 18–20 h in YPD liquid medium at 37 °C) onto minimal medium (MM) agar plates (0.5% ammonium sulphate, 0.17% yeast nitrogen base without amino acids, and 2% agar) which was supplemented with 0.2% of sodium acetate, sodium citrate, ethanol, glycerol, glucose or 0.1% of olive oil/0.2% Tween 80. Plates were incubated at 37 °C for 72 h. Growth on xylose or trehalose was performed in 96-well microtiter plates by inoculating 10³ cells per well in MM supplemented with the indicated concentrations of xylose or trehalose and incubated at 37 °C for 2 or 6 days, respectively. Observation of

white/opaque colonies was performed by spreading 200 colony forming units (CFUs) on YPD supplemented with 10 µg/mL of phloxine B (Sigma-Aldrich, city, state, country) and incubated for 48 h before photographs were taken. To induce white-opaque switching, 300 CFUs were spread per YPD plate (pH = 6) and supplemented with 5 µg/mL of phloxine B [43]. Plates were incubated at 28 °C for 48–72 h covered in aluminum foil. Fresh stools from mice collected during in vivo fitness assays were homogenized in sterile water and plated on SD medium (2% glucose, 0.5% ammonium sulphate, 0.17% yeast nitrogen base, amino acids, and 2% agar) supplemented with 20 µg/mL chloramphenicol.

Table 1. Strains of *C. albicans* used in this study.

Strain Name	Common Name in Manuscript	Background Strain and Genotype	Source
CAI4		<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	[39]
CAI4-pNRUe		[CAI4] <i>ADH1/adh1::tTATET^{PR}-myc-URA3</i>	[40]
CAI4-RFP		[CAI4] <i>ADH1/adh1::tTATET^{PR}-dTOM2-URA3</i>	[38]
CAI4-WOR1 ^{OE}		[CAI4] <i>ADH1/adh1::tTATET^{PR}-WOR1-myc-URA3</i>	[38]
MLC9		[CAI4] <i>icl1::hisG/icl1::hisG</i>	[41]
MRC10	<i>icl1Δ/Δ</i>	[CAI4] <i>icl1::hisG/icl1::hisG RPS10/rps10::URA3</i>	[42]
MRC11	<i>icl1Δ/Δ-pICL1</i>	[<i>icl1Δ/Δ</i>] <i>RPS10/rps10::ICL1-URA3</i>	[42]
SHV1	<i>icl1Δ/Δ-pICL1-GFP</i>	[<i>icl1Δ/Δ-pICL1</i>] <i>ADH1/adh1::tTATET^{PR}-GFP-myc-SAT1</i>	This study
SHV2	<i>icl1Δ/Δ-RFP</i>	[<i>icl1Δ/Δ</i>] <i>ADH1/adh1::tTATET^{PR}-dTOM2-SAT1</i>	This study
SHV3	<i>icl1Δ/Δ-pNRUe</i>	[<i>icl1Δ/Δ</i>] <i>ADH1/adh1::tTATET^{PR}-myc-URA3</i>	This study
SHV4	<i>icl1Δ/Δ-WOR1^{OE}</i>	[<i>icl1Δ/Δ</i>] <i>ADH1/adh1::tTATET^{PR}-WOR1-myc-URA3</i>	This study
SHV5	<i>icl1Δ/Δ-mtla1Δ</i>	[<i>icl1Δ/Δ</i>] <i>mtla1Δ::SAT1</i>	This study
SHV6	<i>icl1Δ/Δ-pICL1-mtla1Δ</i>	[<i>icl1Δ/Δ-pICL1</i>] <i>mtla1Δ::SAT1</i>	This study

2.2. Genetic Procedures

The pNIM1R-dTOM2 and pNIM1R-GFP [17] plasmids were both used to generate fluorescent *icl1Δ/Δ*-RFP and *icl1Δ/Δ*-pICL1-GFP labeled strains. These plasmids allow a repressible tetracycline dependent regulation of both fluorescent proteins (TET-OFF system) and carry the *SAT1* dominant marker. The products after digestion with *KpnI* and *KspI* restriction enzymes were integrated at the *ADH1* locus of *icl1Δ/Δ* and *icl1Δ/Δ*-pICL1 *C. albicans* strains. Transformants were selected on YPD supplemented with 200 µg/mL of nourseothricin. Empty control vector pNRUe [40] and pNRUX-WOR1-myc [38] tetracycline repressible plasmids that carry the *URA3* marker were digested with *KpnI* and *KspI* and products were integrated at the *ADH1* region of the MLC9 strain to generate *icl1Δ/Δ*-pNRUe and *icl1Δ/Δ*-WOR1^{OE} strains. Transformants were selected in SD plates with 2% glucose and without uracil. *C. albicans* transformation by electroporation was performed using described procedures [40].

Deletion of *MTLA1* gene was performed using the Transient CRISPR-Cas9 system [44,45]. The *CaCAS9* cassette was amplified from the plasmid pV1093 [46]. The sgRNA cassette expressed under the *SNR52* promoter and directed against the *MTLA1* region was constructed by single-joint PCR. A first round PCR was carried out by amplification of the *SNR52* promoter and the 20 bp overlapping *MTL1* guide sequence by using *SNR52/F* forward primer and *SNR52/R_MTL1* reverse primer. The second round PCR amplified the 20 bp complementary guide sequence and the sgRNA scaffold by using the *sgRNA/F_MTL1* forward primer *sgRNA/R* reverse primer. First and second round PCRs were carried out by using the

pV1093 plasmid as a template. Third round nested PCR for construction of the sgRNA expression cassette used both PCR products and SNR52/N forward primer and sgRNA/N reverse primer. The repair template cassette which contains the *SAT1* selection marker and 80 bp *MTLA1* additions on both sides was amplified from pNIM1R-RFP by using MATa1_del_F forward primer and MATa1_del_R reverse primer. The guide sequence from the sgRNA cassette hybridizes at the *MTLA1* region enabling CaCas9 to break the double strand, triggering the homology-directed repair by integration of the *SAT1* cassette. PCR products of CaCAS9, sgRNA, and *SAT1* repair template cassettes were used to co-transform *icl1Δ/Δ* and *icl1Δ/Δ*-pICL1 strains following the same procedure and selected on YPD supplemented with nourseothricin; *icl1Δ/Δ*-pICL1 is a reintegrant strain in the *RPS10* locus where *ICL1* expression is driven from its own promoter. Genomic DNA from transformants was used to determine *MTLA1* deletion by PCR using oRS108 forward primer (inside *MTLA1* sequence), Comp_del_F forward primer (inside *SAT1* sequence), and oRS109 reverse primer (outside of recombination site). All primers are listed in Table 2.

Table 2. Primers used in this study.

Primer Name	Sequence (5'→3')
SNR52/F	AAGAAAGAAAAGAAAACCAGGAGTGAA
SNR52/R_MTL1	CTCACGCTTCAATTGTAAGACAAATTAATAAGTTTACGCAAGTC
sgRNA/F_MTL1	TCTTACAATGGAAGCGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA
sgRNA/R	ACAAATATTTAAACTCGGGACCTGG
SNR52/N	GCGGCCGCAAGTGATTAGACT
sgRNA/N	GCAGCTCAGTGATTAAGAGTAAAGATGG
MATa1_del_F	TTTCTGCGTATTGTGATAAATAACTTTTTTCCCTCTAAAAATATTGATTAGAGGCAC AAAATAAAAAATCACCTTCAACCCGTCAAAACCTAGAGAATAATAAAGAAAACG
MATa1_del_R	CCCACCAAGACATGTTACGAATAGATCTATTAGTTAGCAATATTCTGTTTGATAAT ACATACCCAAACTCTTATTTGGGAGCAGGACCACCTTTGATTGTAATAG
Comp_del_F	CACGTATAAAACTAGACCTCAAGTCTCG
oRS108	ATGAACTCAGAAATAGAAAGTAGC
oRS109	CTAGGTTGAATTTGAACTTGATT

2.3. Protein Extraction and Proteomics Analysis

Proteins were extracted from 300 µL overnight cultures (18–20 h of growth in YPD medium at 37 °C). These conditions were chosen for proteomic analysis as they gave a superior reproducibility in test pilot studies. Under these conditions, most of the cells remained in yeast form. Cell extracts were obtained by using glass beads in a Fast prep breaker, as described previously [47]. The supernatant was collected, and the protein concentration was measured using a Bradford assay. Protein extracts were precipitated with MeOH/chloroform and resuspended in 8 M Urea. Protein extracts (100 µg) were reduced with 10 mM DTT (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37 °C followed by alkylation with 55 mM iodoacetamide (Sigma-Aldrich) for 1 h in the dark at room temperature. Proteins were digested with 1/50 (*w/w*) of recombinant trypsin (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) in 25 mM ammonium bicarbonate adjusted to pH = 8.5 and incubated overnight at 37 °C. Digested peptides were desalted and concentrated, as described before [48]. Peptides were analyzed by reverse phase liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (RP-LC-ESI-MS/MS) on a nano Easy-nLC 1000 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA,) coupled to a Q-Exactive HF mass spectrometer (Thermo Scientific). Desalted peptides were concentrated by loading them on an Acclaim PepMap 100 column (Thermo Scientific, 20 mm × 75 µm inner diameter, 3 µm diameter C18 and 100 Å pore size). Peptides were separated and eluted on a C18 Picofrit column (Thermo Scientific Easy Spray Column, PepMap RSLC C18 500 mm × 75 µm inner diameter, 2 µM

diameter, 100 Å pore size) with an integrated spray tip at a flow rate of 250 nL/min for 240 min. Buffer A (2% acetonitrile and 0.1% formic acid) and buffer B (0.1% formic acid on acetonitrile, gradient from 2 to 40%) were used. Peptides were detected with a Q-Exactive mass spectrometer at a m/z range of 350–2000 Da with a mass resolution of 60,000 and acquired using data-dependent acquisition (DDA). The 15 most abundant precursors with charges of 2–6+ (threshold 8×10^3) were selected for higher energy collisional dissociation (HCD) fragmentation with a dynamic exclusion of 27 s. The normalized collision energy was 27%.

Peptide identification was carried out by using the Mascot v. 2.6.1 search engine (MatrixScience) through the Protein Discoverer 2.2 Software (Thermo Scientific) and the CGD21 database from <http://www.candidagenome.org> accessed on date 10 April 2018. The following parameters were used: tolerances of 10 ppm for precursor ions and 0.02 Da for MS/MS fragment ions, up to two missed cleavage sites from trypsin digestion and allowing optional methionine oxidation and fixed carbamidomethylation of cysteine. The acceptance criteria for protein identification were an FDR < 1% and at least one unique peptide identified with high confidence (percolator q -value < 0.01). Protein quantification was carried out, as previously described [48]. Protein extracts were treated for mass spectrometry at the Proteomics Unit of the Universidad Complutense de Madrid.

CGD was the main database used for the functional classification. GO Slim Mapper tool was used for the analysis by cellular component, while the ontological enrichment analysis by biological process was carried out by PathoYeasttract, Rank by GO.

2.4. In Vivo Procedures

In vivo fitness assays were performed on 7–10-week-old female mice C57BL/6 (Charles River Laboratories España S.A.U, St. Cugat del Vallés, Barcelona, España) [17]. In these experiments, two different genetically labeled strains (either GFP or RFP) were administered by gavage and the relative colonization of each strain was determined by counting green/red colonies, as described by [17]. Genetic labeling was stable and resulted in a rather homogenous fluorescence in all cells leading to easily distinguishable colonies on solid medium. Colonization assays were started four days before with antibiotic pretreatment (2 mg/mL streptomycin, 1 mg/mL bacitracin, and 0.1 mg/mL gentamycin) and 0.25 mg/mL fluconazole added to drinking water. One day before inoculation, fluconazole was retired and a single gavage of 10^7 cells in 100 µL PBS was then intragastrically inoculated. Fresh stool samples were collected from each mouse every 2–4 days and mechanically homogenized in PBS. Ten-fold serial dilutions were plated on SD medium supplemented with 20 µg/mL chloramphenicol and incubated at 37 °C for 2 days. The fungal population was quantified by CFU determination. Experiments involving animals were carried out in the animal facility at the Medical School of the Universidad Complutense de Madrid in strict accordance with the regulations “Real Decreto 1201/2005, BOE 252” for the Care and Use of Laboratory Animals of the “Ministerio de la Presidencia,” Spain. The commensalism model used in these experiments was approved by the Animal Experimentation Committee of the University Complutense of Madrid (CEA 33-2015) and Comunidad de Madrid according to Artículo 34 del RD 53/2013 (PROEX 226/15). The treatments did not result in disease and procedures minimized any suffering. The number of animals used in every experiment was adjusted to a minimum for ethical reasons.

3. Results

3.1. Analysis of Proteome in *WOR1* Overexpressing Cells

To characterize the phenotype of *WOR1*^{OE} cells, we used strain CAI4-*WOR1*^{OE} [38], a CAI4-derived strain (being therefore mating type a/α cells) where the expression of an ectopically integrated wild type allele of *WOR1* is under the strong and tightly regulated TET^{OFF} promoter, a tetracycline repressible version of the TET promoter [49]. We performed a proteomic analysis of these cells after growing for 18–20 h in YPD medium at 37 °C as compared with the same strain carrying the empty vector (CAI4-pNRUe). Whole cell ex-

tracts were obtained from these cells and subjected to LC-MS/MS (liquid chromatography mass spectrometry analysis, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Among the 3254 identified proteins, only 3190 could be quantified. To determine the number of proteins that decreased or increased in the CAI4-WOR1^{OE} strain, we used the \log_2 ratio < -0.5 or \log_2 ratio > 0.5 , respectively, and only considered peaks with a CAI4-WOR1^{OE}/CAI4-pNRUe (control strain) abundance ratio with a statistical significance $p < 0.05$ (expressed as $-\log_{10} p > 1.3$). This resulted in 242 proteins that are represented in the Volcano plot (Figure 1A). We also considered proteins that showed a variability ratio $< 30\%$ between replicates, had more than one identified peptide, and a Mascot score > 13 resulting in 379 proteins; 37 were only detected in the CAI4-pNRUe control strain (abundance ratio expressed in $\log_2 < -6.64$), 169 were only detected in the WOR1^{OE} strain ($\log_2 > 6.64$), and 173 were common to both. Within this subset, 163 proteins were less abundant in the CAI4-WOR1^{OE} strain, while only a few (10) were increased (Figure 1B).

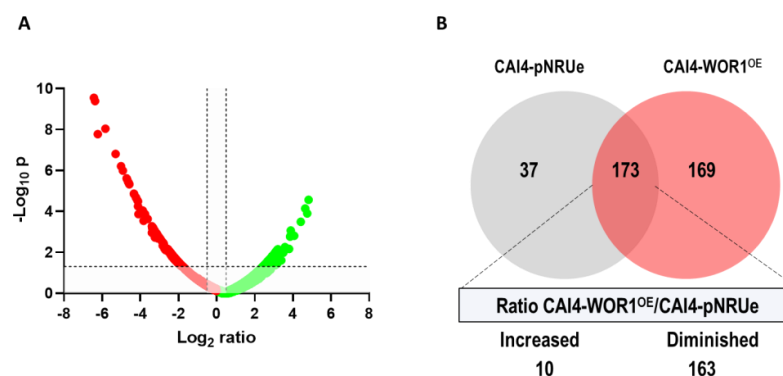


Figure 1. Proteome changes in cells overproducing Wor1. **(A)** Volcano plot of differentially abundant proteins (CAI4-WOR1^{OE}/CAI4-pNRUe ratio). The \log_{10} of the p -value is plotted against abundance (\log_2 ratio) for each individual protein. Proteins that were found in lower abundance in WOR1^{OE} cells are shown in red whereas proteins with higher abundance are shown in green. Horizontal dotted line indicates the limit for p -values ($p = 0.05$, that correspond to $-\log_{10} p = 1.3$). Vertical dotted lines indicate the \log_2 ratio = ± 0.5 threshold. **(B)** Venn diagram with the number of proteins identified exclusively in one strain or in both strains, based on a variability ratio $< 30\%$ between replicates and a Mascot score > 13 .

Among those proteins less abundant in WOR1^{OE}, we identified cytoplasmic (74), nuclear (32), mitochondrial (25) or ribosomal proteins (24), as well as proteins located in the mitochondrial envelope (15), plasma membrane (14), cell wall (13), cytoskeleton (7), vacuole (3), peroxisome (2), endoplasmic reticulum (2), or Golgi (2). Among the 10 proteins identified with highest abundance in the CAI4-WOR1^{OE} strain, we identified proteins located in the nucleus (5), cytoplasm (3), and mitochondria (2). Wh11, a protein only found in white budding-phase cells and absent in opaque budding phase cells, or Adh5, regulated by white-opaque switch, were less abundant in cells overproducing Wor1, thus, validating our data.

Our analysis revealed a significant decrease in the abundance of proteins involved in carbon metabolism and nutrient acquisition processes, such as Icl1 (isocitrate lyase), Pck1 (phosphoenolpyruvate kinase), Adh5 (alcohol dehydrogenase), Glx3 (glutathione-independent glyoxalase), and the high affinity transporters for glucose Hgt1 and Hgt19. We also found proteins within this subset related to mitochondria at different steps such as the import and sorting of proteins of nuclear origin. We also found within this subset the translocase of the outer membrane (TOM) complex that mediates translocation of proteins across or into the outer membrane (OM). In particular, Tom22 or the orf19.6062; orf19.6062, the putative Tim23 translocase subunit which takes in proteins with a cleavable mitochondrial targeting sequence (MTS) directing them into the matrix or the inner membrane. We also found Tim9, Tim13, and Tim22 together with small soluble proteins in the IMS (called

Tim), which deliver into the IM the proteins of the so-called mitochondrial carrier family (MCF) that lacks a cleavable MTS. Others were enzymatic systems involved in mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS), such as the cytochrome-c oxidase Cox4, or Cyb5 (cytochrome b5) that form part of the electron chain, or C1_06840cp_a, C2_01720cp_a, and C7_01610wp_a that are involved in the assembly of complex IV cytochrome-b oxidase, or Atp20 (subunit g of the mitochondrial membrane ATP synthase). We also found some proteins that form part of mitochondrial ribosomes such as C1_0670wp_a y Cr_04580wp_a. A set of proteins related to the cellular response to stress were also decreased, such as the oxido reductases Pst2 and Cip1, the catalase Cat1, and the thioredoxin peroxidase Dot5.

A total of 169 proteins were only found in the *WOR1^{OE}* strain. The analysis by cellular component determined that most of the proteins were located in the nucleus (60) followed by the cytoplasm (57), membrane (37), chromosome (22), nucleolus (13) plasma membrane (12), Golgi apparatus (9), mitochondria (8), endoplasmic reticulum (8), cytoskeleton (8), vacuole (5), and peroxisome (3), among others (Supplementary List).

3.2. *WOR1* Is Involved in the Use of Non-Fermentable Two Carbon Sources

As proteomics revealed changes in the enzymes involved in carbon metabolism, we tried to determine the behavior of cells in specific carbon sources. We determined the ability to grow on minimal media at 37 °C using trehalose and xylose as carbon sources (Figure 2A,B) by measuring O.D. The O.D. reached under the conditions tested (2 days for xylose and 6 days for trehalose) by *CAI4-WOR1^{OE}* strain grown in xylose containing medium was 30–40% of the parental strain; these defects were more evident in the presence of trehalose, as *WOR1^{OE}* cells were completely unable to use this disaccharide as a carbon source (Figure 2B).

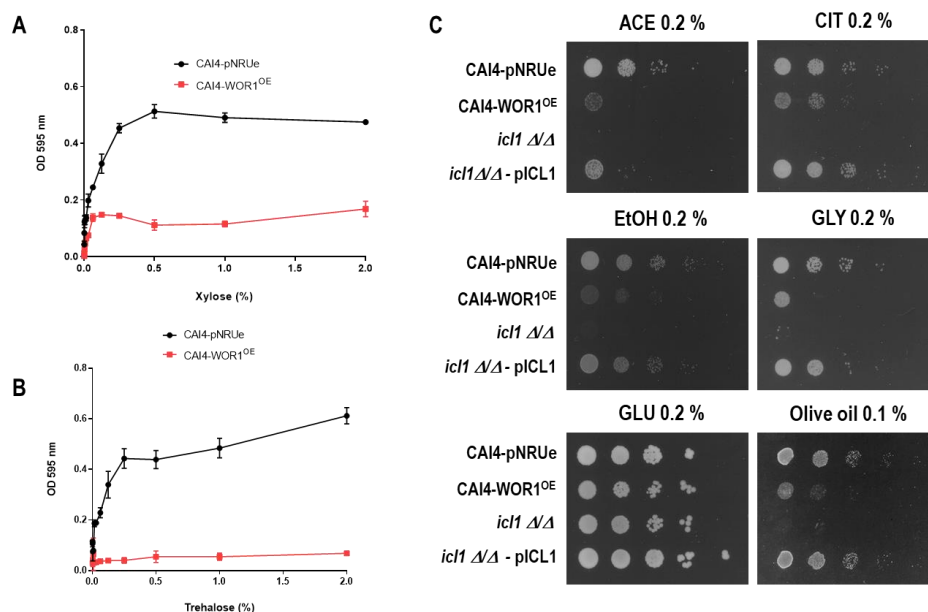


Figure 2. Comparative growth of strains in different carbon sources. Growth of pNRUe and *WOR1^{OE}* strains on MM medium supplemented with different concentrations of (A) xylose or (B) trehalose. The 96-well microtiter plates were incubated for 2 days (xylose) or 6 days (trehalose). Values are mean \pm standard deviation of three independent replicates. (C) 10^5 cells and ten-fold dilutions from overnight growing cells from CAI4-pNRUe, CAI4-WOR1^{OE}, *icl1 ΔΔ*, and *icl1 ΔΔ*-pICL1 strains were spotted onto MM plates without amino acids and supplemented with 0.2% of sodium acetate (Ace), sodium citrate (CIT), ethanol (EtOH), glycerol (GLY), glucose (GLU), or olive oil. Plates were incubated at 37 °C for 72 h before being scanned.

Interestingly, our proteome analysis also revealed that the isocitrate lyase Icl1, a key enzyme in the glyoxylate cycle, showed reduced levels when *WOR1* was overexpressed (the log₂ ratio *WOR1^{OE}*/pNRUe was -3.76). The glyoxylate cycle allows cells to use two carbon

sources bypassing two sequential decarboxylation steps in the Krebs cycle [41]. Therefore, we analyzed the growth of *WOR1^{OE}* cells on different carbon sources in solid media. The overexpression of *WOR1* resulted in a significant growth defect in nonfermentable carbon sources such as acetate, citrate, ethanol, and glycerol in a standard drop assay (Figure 2C), a phenotype resembling those of *icl1Δ/Δ* mutants [41] (Figure 2C). Such differences were not observed in the presence of the fermentable carbon source glucose. Growth defects were also observed in olive oil supplemented minimal medium, consistent with the role of the glyoxylate cycle in metabolizing acetyl-CoA intermediates derived from the β-oxidation of fatty acids. We conclude that overexpression of *WOR1* in *C. albicans* alters the carbon metabolism of the cells by reducing its ability to use some carbohydrates and, mainly, two carbon sources probably via a reduction in the glyoxylate shunt.

3.3. *icl1Δ/Δ* mutants Fail to Produce Phloxine B+ Cells in *WOR1* Overexpressing Cells

Given the defects in the utilization of carbon sources by *WOR1* overexpressing cells, we analyzed the role of the glyoxylate cycle in *WOR1^{OE}*. For this purpose, we ectopically expressed *WOR1* from the constitutive TET^{OFF} promoter in *icl1Δ/Δ* mutants and noticed that the production of phloxine B positive cells in *icl1Δ/Δ-WOR1^{OE}* cells was defective at 37 °C, with most of the cells being mainly negative (or very slightly pink), indicating a defect in retaining this fluorochrome (Figure 3A). This effect was observed both at 37 °C and 30 °C (not shown) and was largely suppressed by high temperature (42 °C). Cells from the *icl1Δ/Δ-WOR1^{OE}* mutant at 37 °C showed a heterogeneous colony size, with a reduced number of small colonies that retained more actively the fluorochrome with cells resembling those found in *WOR1^{OE}* strains (with larger cells with a larger vacuole, but not true elongated as opaque cells). However, the most abundant bigger colonies were white and phloxine B negative with typical rounded cells (Figure 3B); however, this did not occur with wild type *WOR1^{OE}* cells being all of them phloxine B+.

These results, obtained from an artificial and ectopically expressed *WOR1*, prompted us to investigate whether the glyoxylate cycle could be involved in opaque cell formation. As this spontaneous conversion occurs in a/α hemizygous mating-type cells, we deleted the mating gene *MTLa1* in *icl1Δ/Δ* mutants and *icl1Δ/Δ/ICL1* reintegrants (see Material and Methods) and analyzed the production of opaque cells at 28 °C in 5% CO₂ atmosphere. As shown in Figure 4, *icl1Δ/Δ-mtla1* mutants switched 4.4 ± 2.1 times less frequently than *icl1Δ/Δ/ICL1-mtla1* heterozygous cells. No statistical differences were found with light pink colonies. In addition, opaque cells appeared as smaller colonies as compared with white cells, suggesting the importance of a functional glyoxylate cycle in opaque cells. Collectively, these results indicate that the conversion to the opaque phase is influenced by a functional glyoxylate cycle and suggests that *WOR1^{OE}* regulates this conversion, at least in part, via repression of this pathway.

3.4. *icl1Δ/Δ* Mutants Are Defective in Gastrointestinal Colonization

As *WOR1^{OE}* has been shown to influence gastrointestinal colonization improving the fitness of *C. albicans* (deletion of *WOR1* reduces fitness) [27], we wondered whether deletion of *ICL1* would also affect colonization. For this purpose, we used a competitive fitness assay between *icl1Δ/Δ* and *icl1Δ/Δ-pICL1* mutants. Cells were genetically labeled with GFP or RFP and inoculated as a 1:1 inoculum of both cell types by gavage to mice. As shown in Figure 5A, the *icl1Δ/Δ* mutant showed fitness defects as compared with isogenic *icl1Δ/Δ-pICL1* cells, with a continuous and slow reduction in fungal colonization (determined by CFUs in stools). The *icl1Δ/Δ* cells were outcompeted by the reintegrated *ICL1* strain, being evident from day 15 onwards until they were not detected in most mice after ≈30 days of growth. To determine whether *icl1Δ/Δ* colonization defects could be restored by *WOR1^{OE}*, we did a similar experiment with *icl1Δ/Δ* and *icl1Δ/Δ-WOR1^{OE}* cells. As shown in Figure 5B, the overproduction of *WOR1* does not outcompete an *icl1Δ/Δ* mutant.

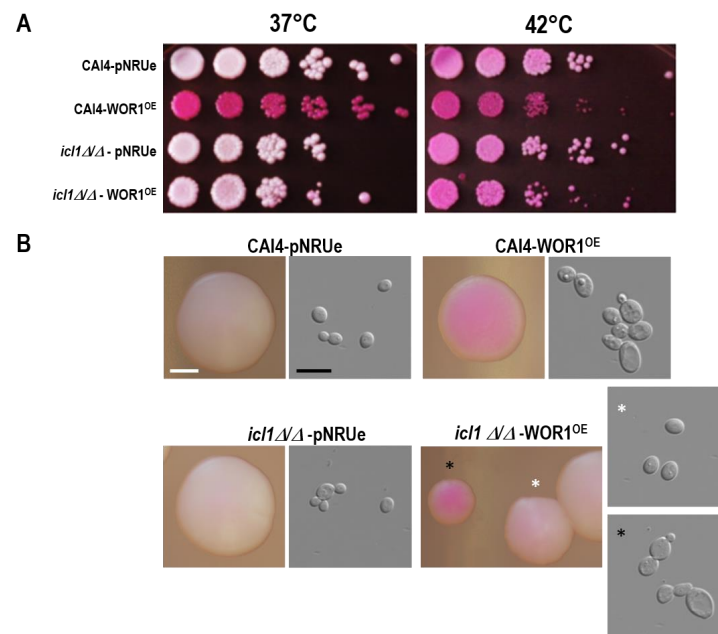


Figure 3. Effect of *WOR1* overexpression on phloxine B+ cell formation in wt and *icl1Δ/Δ* backgrounds. **(A)** Production of phloxine B + cells. Cells were grown for 18–20 h at 37 °C. Cells of CAI4-pNRUe, CAI4-WOR1^{OE}, *icl1Δ/Δ*, and *icl1Δ/Δ*-WOR1^{OE} strains were spotted onto YPD supplemented with 10 μg/mL of phloxine B and incubated at 37 °C for 48 h. **(B)** 200 CFUs were spread on the same media and incubated at 37 °C for 48 h. White scale bar stands for 0.5 mm; black scale bar stands for 10 μm. Photographs of individual colonies and their corresponding cells are shown and marked with either a white or black asterisk.

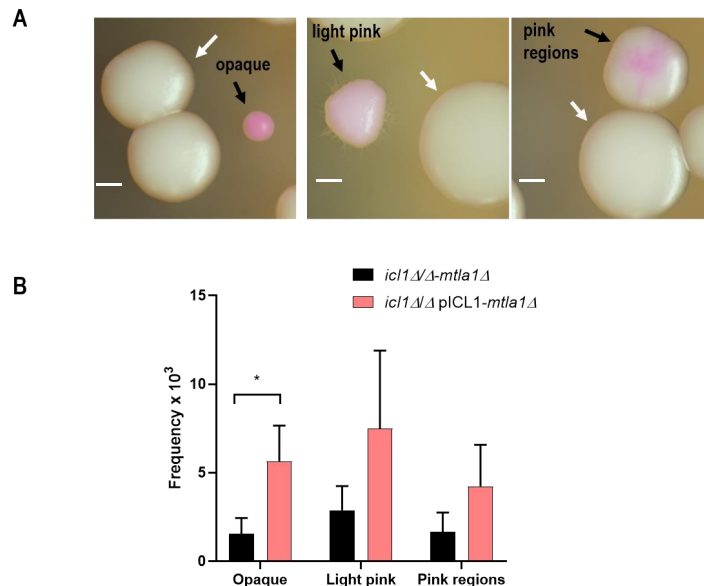


Figure 4. Induction of white-opaque conversion in *icl1Δ/Δ-mtla1* and *icl1Δ/Δ/ICL1-mtla1* strains. 300 CFUs were spread onto YPD pH = 6 plates supplemented with 5 μg/mL phloxine B and incubated in the dark for 2 days at 28 °C and 5% CO₂. The upper picture **(A)** indicates the appearance of the different counted colonies as standard white colonies (white arrows) or pink colored colonies (black arrows), either opaque, light pink, or mixed colored colonies (pink regions) in *icl1Δ/Δ-mtla1*. White scale bar stands for 1 mm. Data **(B)** are shown as mean with standard deviation (SD) from six independent experiments (*n* ≈ 2500 colonies from each strain per experiment). The frequency (colonies of the indicated type/1000 total colonies) is represented. A *t*-test was used to determine the significance (*p* = 0.021, * *p* < 0.05).

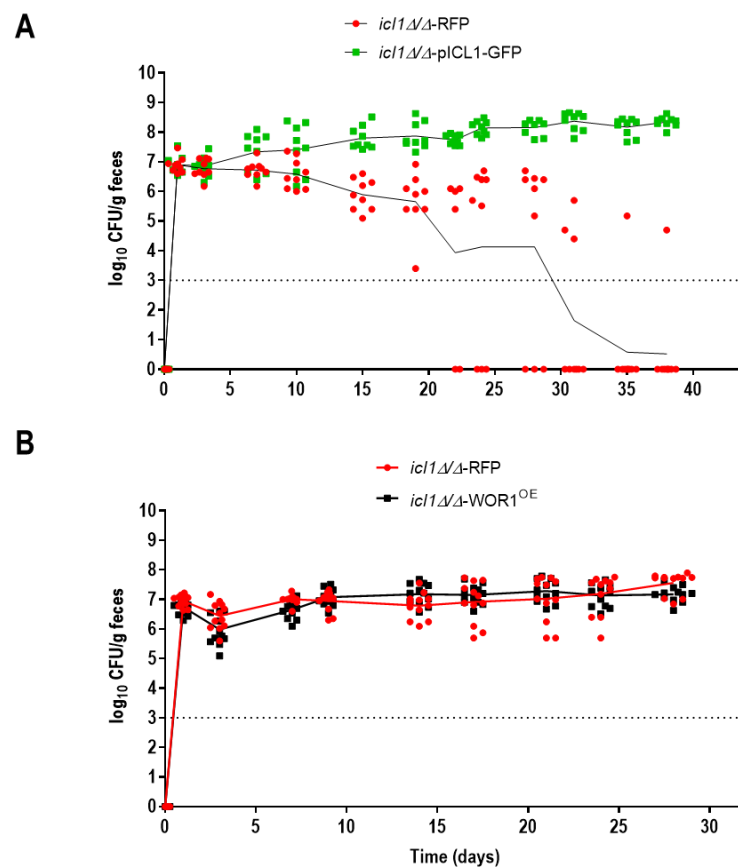


Figure 5. Gastrointestinal colonization of *icl1Δ/Δ* mutants. Oral antibiotic therapy was given to mice starting 4 days before inoculation by gavage of 10^7 cells of a 1:1 mixture of *icl1Δ/Δ*-RFP and *icl1Δ/Δ*-pICL1-GFP ($n = 9$) (A) or *icl1Δ/Δ*-RFP and *icl1Δ/Δ*-WOR1^{OE} ($n = 12$) (B). The dotted line indicates the limit of detection of the method used.

These results demonstrate a relevant role of Icl1 in facilitating commensalism of *C. albicans* in the gastrointestinal tract of mice.

4. Discussion

The ability to colonize the mammalian gastrointestinal tract is a key trait in *C. albicans*, as many of the nosocomial systemic fungemia have an endogenous origin via dissemination from the gastrointestinal pool. Therefore, understanding which factors promote the colonization of this fungus in the gut may have important practical consequences.

The Wor1 regulator has been described as a factor promoting increased fitness in mouse intestine [27] and it triggers in vivo an epigenetic switch that enables colonization. Our in vitro proteomic analyses revealed that overexpression of *WOR1* is associated with a change in the pattern of carbon source assimilation, with a reduction in the ability to use certain fermentable and 2C sources. These changes are in concordance with those already observed in a previous transcriptomic analysis [27], with a downregulation of genes involved in the catabolism of glucose and also with some changes observed in an extensive opaque cell phenotypic profiling study [50]. Our proteomic analysis revealed a significant decrease in proteins involved in carbon metabolism and nutrient acquisition processes. In particular, we found Icl1 (isocitrate lyase), Pck1 (phosphoenolpyruvate kinase), Adh5 (alcohol dehydrogenase), Glx3 (glutathione-independent glyoxalase), or the high affinity transporters for glucose Hgt1 and Hgt19. Pck1 and Glx3 participate in the metabolism of pyruvate, the final product of glycolysis. Pyruvate can enter the mitochondria and produces acetyl-CoA or remains in the cytoplasm to generate lactate or ethanol involving Adh5 activity. The differential metabolic profile observed in the

WOR1^{OE} strain suggests a decrease in glycolysis and an increase in gluconeogenesis, in accordance with the transcriptomic data reported by Pande and co-workers [27]. Moreover, the decrease in glycolytic enzymes may explain the hypersensitivity to sodium azide exhibited by *WOR1*^{OE} cells [38]. These cells, thus, become more dependent on the ATP generated by the electron transport chain.

Icl1 is a key enzyme in the glyoxylate pathway which enables the use of 2C sources bypassing the decarboxylation steps of the Krebs cycle enabling gluconeogenesis. It is therefore important for growth in nutrient-limited environments such as those that occur inside phagocytic cells where lipids and amino acids can be used as an alternative to hexose depletion and the glyoxylate cycle, β -oxidation, and gluconeogenesis metabolic pathways are required to use less favored carbon sources. These pathways have been shown to be important during systemic infection since deletion of genes encoding key enzymes in the pathways, such as *FOX2* (β -oxidation), *ICL1* (glyoxylate cycle), or *FBP1* (gluconeogenesis), confer virulence defects to a different extent [42]. Thus, it seems that *C. albicans* acquires and assimilates nonfermentable (non-sugar) compounds not only as an alternative carbon source during infection [41] but also during colonization, as shown by the reduced fitness of *icl1* Δ/Δ mutants in mouse GI. The glyoxylate cycle takes place in peroxisomes which are involved in fatty acid metabolism [51], and therefore one explanation for this result would invoke fatty acid assimilation. The availability of glucose is scarce in rodent food and would be very limited in distal regions of the GI where the use of alternative carbon sources (such as fatty acids) could be relevant. The concentration of fatty acids changes along the GI tract and it has been shown that a coconut oil diet enriched in medium-chain fatty acids alters the fungal load of *C. albicans* in mouse GI [52]. The ability to use 2C compounds or other carbon sources such as glycerol could be, additionally, important only in specific locations of the gut (e.g., distal part) or after a specific period of adaptation of the fungal cells [53]. Since *C. albicans* usually depends on the mitochondrial oxidative phosphorylation to obtain energy, metabolic adaptation is crucial for *C. albicans* to survive and colonize the intestine. We found that *WOR1* overexpression caused a reduction in the amount of Icl1. However, as deletion of *ICL1* impairs the use of nonfermentable carbon sources this result is in apparent contradiction with the proposed role of *WOR1* in promoting colonization. This would indicate the existence of *ICL1*-independent but *WOR1*-dependent mechanisms for adaptation to the GI tract, that is, downregulation of the glyoxylate cycle would be compensated by other mechanisms that remain to be discovered. Such mechanisms could involve adhesion to the mucosal surfaces, resistance to stressful conditions found in the GI tract (detergents such as bile salts, oxidants, pH, oxygen availability, etc.) or competition with the endogenous microbiota. In any case, caution must be taken while analyzing these data, as our proteomic analysis was carried out under well-defined laboratory conditions (as occurs with related studies on opaque and GUT cells) and the actual conditions in the mammalian gut are clearly different and complex.

The proteomic changes observed were only partially coincident with those observed for previous transcriptional studies on opaque cells [21–23] and GUT cells [27]. A detailed analysis of coincidences and discrepancies is shown in the Supplementary List. It should be noted that, *ICL1* is described as an opaque specific gene in two of these publications [21,23] and its expression is augmented in GUT cells versus white α/α cells but not versus opaque cells [27], suggesting it could be related to *WOR1*. The expression of several white specific genes is decreased in *WOR1*^{OE} in our proteomic analysis (*ASR1*, *HSP21*, *IFE2*, *HSP12*, and *GIS2*) but there are also some opaque genes with reduced levels such as the mentioned *ICL1*, *PST2* (encoding a flavoredoxin), *FDH1* (encoding a formate reductase), and orf19.94 (unknown function). Regarding those proteins with increased abundance in this study in *WOR1*^{OE}, most of them are identified as opaque specific (e.g., *OP4*, a usual reporter of the opaque phase) but there are some white specific genes such as orf19.1691 (a putative plasma membrane protein) or *TPO4* (a putative spermidine transporter). This analysis reveals an overall reasonable degree of concordance among these studies but also highlights discrepancies as expected from different morphogenetic programs. In addition, both the methodology (mRNA, protein) and

the experimental conditions used for the study (temperature, nutrient, and phase of growth) can clearly influence the outcome and interpretation of the results.

Another important result from this work is that the glyoxylate cycle participates in the generation of phloxine B positive cells, which is a characteristic of *WOR1* overexpression. The ability to retain this fluorochrome is also a landmark of opaque cells; however, opaque cells differ from *WOR1*^{OE} cells by their elongated morphology, heat sensitivity, the existence of protuberances in the surface, and mating competent status; they are able to form mating projections and are generated via a spontaneous epigenetic switch through mating type repression release and not via ectopic overexpression of *WOR1*. They have a characteristic transcriptional program [21,22] which is only partially overlapping with those of GUT cells [27]. As deletion of *ICL1* in hemizygous α -mating-type cells reduces the frequency of opaque cell formation and overexpression of *WOR1* partially restores the generation of phloxine B positive cells, these results clearly point to a positive role of *Icl1* in the **wo** transition. Nevertheless, when the *ICL1* gene was overexpressed in a *wor1* mutant, cells did not become phloxine B positive (data not shown), indicating the dominant effect of *WOR1* over *ICL1* in **wo** switching. As the glyoxylate cycle takes place in peroxisomes, organelles involved in lipid beta-oxidation among other functions [54], a proposed explanation is that *C. albicans icl1* Δ/Δ mutants are somehow altered in lipid homeostasis which would render cells less permeable to phloxine B. In any case, as *WOR1*^{OE} does not restore colonization levels of *icl1* Δ/Δ mutants, this indicates that phloxine B positiveness cannot be taken as a trait of the adapted GI form in *C. albicans* per se.

In conclusion, we show that the glyoxylate shunt pathway is involved in colonization of mouse GI by mechanisms that are independent of the transcriptional **wo** regulator *Wor1* and the generation of phloxine B positive cells. Understanding how these changes promote adaptation to the gastrointestinal niche open the possibility to control *C. albicans* colonization for therapeutic purposes.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof7070502/s1>, Supplementary List.

Author Contributions: Conceptualization, S.H.V., R.A.M., E.R., D.P. and J.P.; methodology, S.H.V. and D.P.; formal analysis, S.H.V., E.R., D.P., R.A.M. and J.P.; investigation, S.H.V. and D.P.; data curation, S.H.V. and D.P.; writing—original draft preparation, E.R. and J.P.; writing—review and editing, J.P., E.R. and R.A.M.; project administration, J.P.; funding acquisition, J.P. and R.A.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by grants PGC2018-095047-B-I00 from MINECO and InGEMICS (B2017/BMD-3691) from CAM.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Animal Experimentation Committee of the University Complutense of Madrid (CEA 33-2015) and Comunidad de Madrid according to Artículo 34 del RD 53/2013 (PROEX 226/15).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank M. Lorenz for sharing *icl1* Δ/Δ strains.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References


1. Gudlaugsson, O.; Gillespie, S.; Lee, K.; Berg, J.V.; Hu, J.; Messer, S.; Herwaldt, L.; Pfaller, M.; Diekema, D. Attributable Mortality of Nosocomial Candidemia, Revisited. *Clin. Infect. Dis.* **2003**, *37*, 1172–1177. [[CrossRef](#)]
2. Pappas, P.G.; Lionakis, M.S.; Arendrup, M.C.; Ostrosky-Zeichner, L.; Kullberg, B.J. Invasive candidiasis. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2018**, *4*, 18026. [[CrossRef](#)]
3. Brown, G.D.; Denning, D.W.; Gow, N.A.R.; Levitz, S.M.; Netea, M.G.; White, T.C. Hidden killers: Human fungal infections. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 165rv113. [[CrossRef](#)]
4. Mayer, F.L.; Wilson, D.; Hube, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* **2013**, *4*, 119–128. [[CrossRef](#)]

5. Koh, A.Y. Murine models of *Candida* gastrointestinal colonization and dissemination. *Eukaryot. Cell* **2013**, *12*, 1416–1422. [[CrossRef](#)]
6. Magill, S.S.; Swoboda, S.M.; Johnson, E.A.; Merz, W.G.; Pelz, R.K.; Lipsett, P.A.; Hendrix, C.W. The association between anatomic site of *Candida* colonization, invasive candidiasis, and mortality in critically ill surgical patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2006**, *55*, 293–301. [[CrossRef](#)]
7. Miranda, L.N.; van der Heijden, I.M.; Costa, S.F.; Sousa, A.P.; Sienna, R.A.; Gobara, S.; Santos, C.R.; Lobo, R.D.; Pessoa, V.P., Jr.; Levin, A.S. *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J. Hosp. Infect.* **2009**, *72*, 9–16. [[CrossRef](#)]
8. Voss, A.; Hollis, R.J.; Pfaller, M.A.; Wenzel, R.P.; Doebbeling, B.N. Investigation of the sequence of colonization and candidemia in nonneutropenic patients. *J. Clin. Microbiol.* **1994**, *32*, 975–980. [[CrossRef](#)]
9. Marco, F.; Lockhart, S.R.; Pfaller, M.A.; Pujol, C.; Rangel-Frausto, M.S.; Wiblin, T.; Blumberg, H.M.; Edwards, J.E.; Jarvis, W.; Saiman, L.; et al. Elucidating the origins of nosocomial infections with *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the complex probe Ca3. *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 2817–2828. [[CrossRef](#)]
10. Prieto, D.; Correia, I.; Pla, J.; Román, E. Adaptation of *Candida albicans* to commensalism in the gut. *Future Microbiol.* **2016**, *11*, 567–583. [[CrossRef](#)]
11. Witchley, J.N.; Penumetcha, P.; Abon, N.V.; Woolford, C.A.; Mitchell, A.P.; Noble, S.M. *Candida albicans* Morphogenesis Programs Control the Balance between Gut Commensalism and Invasive Infection. *Cell Host Microbe* **2019**, *25*, 432–443.e6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Neville, B.A.; d’Enfert, C.; Bougnoux, M.E. *Candida albicans* commensalism in the gastrointestinal tract. *FEMS Yeast Res.* **2015**, *15*, fov081. [[CrossRef](#)]
13. Noble, S.M. *Candida albicans* specializations for iron homeostasis: From commensalism to virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* **2013**, *16*, 708–715. [[CrossRef](#)]
14. Perez, J.C.; Kumamoto, C.A.; Johnson, A.D. *Candida albicans* commensalism and pathogenicity are intertwined traits directed by a tightly knit transcriptional regulatory circuit. *PLoS Biol.* **2013**, *11*, e1001510. [[CrossRef](#)]
15. Pierce, J.V.; Kumamoto, C.A. Variation in *Candida albicans* *EFG1* expression enables host-dependent changes in colonizing fungal populations. *MBio* **2012**, *3*, e00117–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Vautier, S.; Drummond, R.A.; Chen, K.; Murray, G.I.; Kadosh, D.; Brown, A.J.; Gow, N.A.; MacCallum, D.M.; Kolls, J.K.; Brown, G.D. *Candida albicans* colonization and dissemination from the murine gastrointestinal tract: The influence of morphology and Th17 immunity. *Cell. Microbiol.* **2015**, *17*, 445–450. [[CrossRef](#)]
17. Prieto, A.D.; Román, E.; Correia, I.; Pla, J. The HOG pathway is critical for the colonization of the mouse gastrointestinal tract by *Candida albicans*. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87128.
18. Ramírez-Zavala, B.; Mottola, A.; Haubenreißer, J.; Schneider, S.; Allert, S.; Brunke, S.; Ohlsen, K.; Hube, B.; Morschhäuser, J. The Snf1-activating kinase Sak1 is a key regulator of metabolic adaptation and in vivo fitness of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **2017**, *104*, 989–1007. [[CrossRef](#)]
19. Román, E.; Huertas, B.; Prieto, D.; Diez-Orejas, R.; Pla, J. *TUP1*-mediated filamentation in *Candida albicans* leads to inability to colonize the mouse gut. *Future Microbiol.* **2018**, *13*, 857–867. [[CrossRef](#)]
20. Soll, D.R. The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of *Candida albicans*. *J. Oral Microbiol.* **2014**, *6*. [[CrossRef](#)]
21. Tuch, B.B.; Mitrovich, Q.M.; Homann, O.R.; Hernday, A.D.; Monighetti, C.K.; De La Vega, F.M.; Johnson, A.D. The transcriptomes of two heritable cell types illuminate the circuit governing their differentiation. *PLoS Genet.* **2010**, *6*, e1001070. [[CrossRef](#)]
22. Lan, C.Y.; Newport, G.; Murillo, L.A.; Jones, T.; Scherer, S.; Davis, R.W.; Agabian, N. Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14907–14912. [[CrossRef](#)]
23. Tsong, A.E.; Miller, M.G.; Raisner, R.M.; Johnson, A.D. Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: A case study in yeasts. *Cell* **2003**, *115*, 389–399. [[CrossRef](#)]
24. Kvaal, C.; Lachke, S.A.; Srikantha, T.; Daniels, K.; McCoy, J.; Soll, D.R. Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1* (*SAP1*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 6652–6662. [[CrossRef](#)]
25. Kvaal, C.A.; Srikantha, T.; Soll, D.R. Misexpression of the white-phase-specific gene *WH11* in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. *Infect. Immun.* **1997**, *65*, 4468–4475. [[CrossRef](#)]
26. Srikantha, T.; Borneman, A.R.; Daniels, K.J.; Pujol, C.; Wu, W.; Seringhaus, M.R.; Gerstein, M.; Yi, S.; Snyder, M.; Soll, D.R. *TOS9* regulates white-opaque switching in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **2006**, *5*, 1674–1687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Pande, K.; Chen, C.; Noble, S.M. Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 1088–1091. [[CrossRef](#)]
28. Huang, G.; Wang, H.; Chou, S.; Nie, X.; Chen, J.; Liu, H. Bistable expression of *WOR1*, a master regulator of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 12813–12818. [[CrossRef](#)]
29. Zordan, R.E.; Galgoczy, D.J.; Johnson, A.D. Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 12807–12812. [[CrossRef](#)]
30. Zordan, R.E.; Miller, M.G.; Galgoczy, D.J.; Tuch, B.B.; Johnson, A.D. Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, e256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Hernday, A.D.; Lohse, M.B.; Fordyce, P.M.; Nobile, C.J.; DeRisi, J.L.; Johnson, A.D. Structure of the transcriptional network controlling white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **2013**, *90*, 22–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Lohse, M.B.; Ene, I.V.; Craik, V.B.; Hernday, A.D.; Mancera, E.; Morschhauser, J.; Bennett, R.J.; Johnson, A.D. Systematic Genetic Screen for Transcriptional Regulators of the *Candida albicans* White-Opaque Switch. *Genetics* **2016**, *203*, 1679–1692. [[CrossRef](#)]
33. Stevenson, J.S.; Liu, H. Regulation of white and opaque cell-type formation in *Candida albicans* by Rtt109 and Hst3. *Mol. Microbiol.* **2011**, *81*, 1078–1091. [[CrossRef](#)]
34. Srikantha, T.; Tsai, L.; Daniels, K.; Klar, A.J.; Soll, D.R. The histone deacetylase genes *HDA1* and *RPD3* play distinct roles in regulation of high-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 4614–4625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hnisz, D.; Schwarzmuller, T.; Kuchler, K. Transcriptional loops meet chromatin: A dual-layer network controls white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **2009**, *74*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Stoldt, V.R.; Sonneborn, A.; Leuker, C.E.; Ernst, J.F. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J.* **1997**, *16*, 1982–1991. [[CrossRef](#)]
37. Sonneborn, A.; Tebarth, B.; Ernst, J.F. Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 4655–4660. [[CrossRef](#)]
38. Prieto, D.; Román, E.; Alonso-Monge, R.; Pla, J. Overexpression of the Transcriptional Regulator *WOR1* Increases Susceptibility to Bile Salts and Adhesion to the Mouse Gut Mucosa in *Candida albicans*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 389. [[CrossRef](#)]
39. Fonzi, W.A.; Irwin, M.Y. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **1993**, *134*, 717–728. [[CrossRef](#)]
40. Román, E.; Correia, I.; Salazin, A.; Fradin, C.; Jouault, T.; Poulain, D.; Liu, F.T.; Pla, J. The Cek1-mediated MAP kinase pathway regulates exposure of α -(1,2) and β -(1,2)-mannosides in the cell wall of *Candida albicans* modulating immune recognition. *Virulence* **2016**, *7*, 558–577. [[CrossRef](#)]
41. Lorenz, M.C.; Fink, G.R. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* **2001**, *412*, 83–86. [[CrossRef](#)]
42. Ramirez, M.A.; Lorenz, M.C. Mutations in alternative carbon utilization pathways in *Candida albicans* attenuate virulence and confer pleiotropic phenotypes. *Eukaryot. Cell* **2007**, *6*, 280–290. [[CrossRef](#)]
43. Shapiro, R.S.; Chavez, A.; Porter, C.B.M.; Hamblin, M.; Kaas, C.S.; DiCarlo, J.E.; Zeng, G.; Xu, X.; Revtovich, A.V.; Kirienko, N.V.; et al. A CRISPR-Cas9-based gene drive platform for genetic interaction analysis in *Candida albicans*. *Nature Microbiol.* **2018**, *3*, 73–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Min, K.; Ichikawa, Y.; Woolford, C.A.; Mitchell, A.P. *Candida albicans* Gene Deletion with a Transient CRISPR-Cas9 System. *mSphere* **2016**, *1*, e00130-16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Román, E.; Coman, I.; Prieto, D.; Alonso-Monge, R.; Pla, J. Implementation of a CRISPR-Based System for Gene Regulation in *Candida albicans*. *mSphere* **2019**, *4*, e00001-19. [[CrossRef](#)]
46. Vyas, V.K.; Barrasa, M.I.; Fink, G.R. A CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families. *Sci. Adv.* **2015**, *1*, e1500248. [[CrossRef](#)]
47. Martin, H.; Rodriguez-Pachon, J.M.; Ruiz, C.; Nombela, C.; Molina, M. Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 1511–1519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Rico-San Román, L.; Horcajo, P.; Regidor-Cerrillo, J.; Fernández-Escobar, M.; Collantes-Fernández, E.; Gutiérrez-Blázquez, D.; Hernández-Sánchez, M.L.; Saeij, J.P.J.; Ortega-Mora, L.M. Comparative tachyzoite proteome analyses among six *Neospora caninum* isolates with different virulence. *Int. J. Parasitol.* **2020**, *50*, 377–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Park, Y.N.; Morschhauser, J. Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **2005**, *4*, 1328–1342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Ene, I.V.; Lohse, M.B.; Vladu, A.V.; Morschhauser, J.; Johnson, A.D.; Bennett, R.J. Phenotypic Profiling Reveals that *Candida albicans* Opaque Cells Represent a Metabolically Specialized Cell State Compared to Default White Cells. *MBio* **2016**, *7*. [[CrossRef](#)]
51. Piekarska, K.; Hardy, G.; Mol, E.; van den Burg, J.; Strijbis, K.; van Roermund, C.; van den Berg, M.; Distel, B. The activity of the glyoxylate cycle in peroxisomes of *Candida albicans* depends on a functional beta-oxidation pathway: Evidence for reduced metabolite transport across the peroxisomal membrane. *Microbiology* **2008**, *154*, 3061–3072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Gunsalus, K.T.; Tornberg-Belanger, S.N.; Matthan, N.R.; Lichtenstein, A.H.; Kumamoto, C.A. Manipulation of Host Diet To Reduce Gastrointestinal Colonization by the Opportunistic Pathogen *Candida albicans*. *mSphere* **2016**, *1*, e00020-15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Prieto, D.; Pla, J. Distinct stages during colonization of the mouse gastrointestinal tract by *Candida albicans*. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Aksit, A.; van der Klei, I.J. Yeast peroxisomes: How are they formed and how do they grow? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, *105*, 24–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Article

Identification of Clinical Isolates of *Candida albicans* with Increased Fitness in Colonization of the Murine Gut

Rebeca Alonso-Monge ^{1,*}, Daniel Prieto ¹, Ioana Coman ¹, Sara Rochas ^{1,†}, David M. Arana ², Susana Hidalgo-Vico ¹, Elvira Román ¹ and Jesús Pla ^{1,*}

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología-IRYCIS, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain; adprieto@ucm.es (D.P.); icoman@ucm.es (I.C.); sararochaslopez@gmail.com (S.R.); shvico@ucm.es (S.H.-V.); elvirarg@ucm.es (E.R.)

² Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Getafe, 28905 Getafe, Spain; dmlinooa@salud.madrid.org

* Correspondence: realonso@ucm.es (R.A.-M.); jpla@ucm.es (J.P.)

† Current address: Servicio de Hematología y Hematoterapia, Hospital Clínico San Carlos, C/Profesor Martín Lagos s/n, 28040 Madrid, Spain.

Abstract: The commensal and opportunistic pathogen *Candida albicans* is an important cause of fungal diseases in humans, with the gastrointestinal tract being an important reservoir for its infections. The study of the mechanisms promoting the *C. albicans* commensal state has attracted considerable attention over the last few years, and several studies have focused on the identification of the intestinal human mycobiota and the characterization of *Candida* genes involved in its establishment as a commensal. In this work, we have barcoded 114 clinical *C. albicans* isolates to identify strains with an enhanced fitness in a murine gastrointestinal commensalism model. The 114 barcoded clinical isolates were pooled in four groups of 28 to 30 strains that were inoculated by gavage in mice previously treated with antibacterial therapy. Eight strains that either exhibited higher colonization load and/or remained in the gut after antibiotic removal were selected. The phenotypic analysis of these strains compared to an RFP-tagged SC5314 wild type strain did not reveal any specific trait associated with its increased colonization; all strains were able to filament and six of the eight strains displayed invasive growth on Spider medium. Analysis of one of these strains, CaORAL3, revealed that although mice required previous bacterial microbiota reduction with antibiotics to be able to be colonized, removal of this procedure could take place the same day (or even before) *Candida* inoculation. This strain was able to colonize the intestine of mice already colonized with *Candida* without antibiotic treatment in co-housing experiments. CaORAL3 was also able to be established as a commensal in mice previously colonized by another (CaHG43) or the same (CaORAL3) *C. albicans* strain. Therefore, we have identified *C. albicans* isolates that display higher colonization load than the standard strain SC5314 which will surely facilitate the analysis of the factors that regulate fungal colonization.

Keywords: commensalism; adaptation; mycobiota; *Candida albicans*; murine gut; fitness



Citation: Alonso-Monge, R.; Prieto, D.; Coman, I.; Rochas, S.; Arana, D.M.; Hidalgo-Vico, S.; Román, E.; Pla, J. Identification of Clinical Isolates of *Candida albicans* with Increased Fitness in Colonization of the Murine Gut. *J. Fungi* **2021**, *7*, 695. <https://doi.org/10.3390/jof7090695>

Academic Editor: Richard D. Cannon

Received: 28 July 2021

Accepted: 24 August 2021

Published: 27 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Candida albicans is the most prevalent fungal pathogen in humans world-wide. It can cause either superficial or systemic infections and among these, invasive candidiasis are an important health problem and are frequently linked to invasive procedure in medicine [1]. *C. albicans* colonizes the skin and mucosal surfaces of around 70% of the human population [2,3] and there is no significant life of this fungus outside the mammalian host; therefore, being colonized by *C. albicans* is a prerequisite for a subsequent infection [4]. Colonization takes place during infancy [5] and the same strain remains as a commensal for years as revealed by longitudinal molecular typing studies [6]. The main cause of candidiasis are commensal strains being the gut an important source of infections [7,8].

Prolonged antibiotic treatment, alterations of the immune system or disruption of the natural barriers result in translocation through intestinal barriers to the blood stream [9,10].

The use of murine commensalism models has allowed for the identification of some genes relevant for the establishment of the fungus as a commensal. As laboratory mice are not naturally colonized by *C. albicans*, different approaches have been used to allow *C. albicans* colonization. These make use of gnotobiotic mice [11,12], immunocompromised adult mice [10] or animals with a reduced microbiota due to the use of a wide spectrum antibiotic therapy [13–16]. Many different genes have been shown to mediate gut colonization [17–19]. These genes encode transcription factors [15], MAP kinases [14] or enzymes involved in metabolic routes [20,21] or morphogenetic transitions [11,22–25]. Although many of these studies have made use of deletion mutants, gene overexpression strains have also been studied. Thus, the study of a conditional overexpressing gene collection allowed for the identification of the transcription factor Crz2 as an important regulator of early adaptation to the murine gut [26] or even the regulator of the white-opaque switch, Wor1 [22,27]. Some phenotypic traits have been related to colonization, such as bile salts tolerance, adhesion to different surfaces, oxygen-dependent metabolism and cellular morphology.

We have previously reported a murine model with partially depleted bacterial microbiota and the use of fluorescence tagged *C. albicans* strains to perform competitive fitness experiments in the same animal by both culture-dependent and independent detection methods [14]. Culture-dependent methods allowed us to discriminate between two strains due to the red color developed by the RFP (Red Fluorescent Protein) carrying strain on Synthetic Define solid medium. Pool analyses of several strains are also possible: Perez and co-workers have made use of barcoded transcription factor mutant library to perform analysis in mouse models of intestinal colonization and disseminated infection [15]. Similarly, Znaidi and co-workers barcoded a collection of tetracycline-inducible gene overexpression strains [26]. These strategies require the extraction of DNA of fungal cells and perform qPCR with barcode specific primers to estimate the abundance of each mutant. NGS (Next Generation Sequencing) methodologies are powerful tools to analyze microbiota but also to identify pathogens in patients at risk [28] or genetic markers of antifungal resistance [29]. Here, we report the barcoding of a collection of *C. albicans* clinical isolates obtained from hospitalized patients or healthy donors to identify strains with enhanced ability to colonize the murine gastrointestinal tract using NGS. In total, 8 out of 114 *C. albicans* strains established as a commensal and remained with high fungal loads despite removal of antibiotic therapy. One of these strains was further characterized being a promising strain for improving gut commensalism model in mice.

2. Materials and Methods

2.1. Strains and Growth Conditions

The clinical *C. albicans* isolates were supplied by the Getafe University Hospital or obtained from healthy volunteers at the Department of Microbiology and Parasitology of the Faculty of Pharmacy of the Universidad Complutense de Madrid (UCM). These strains were barcoded with a DNA fragment that differs in 6 pb and that allows their further identification (Supplementary file S1). Other *C. albicans* used in this work are listed in Table 1:

Table 1. *C. albicans* strains used in this work.

Strain Name	Strain Background and Genotype	Reference
SC5314-RFP	SC5314 <i>ADH1/adh1::SAT1-dTOM2</i>	This work
CaORAL3-RFP	CaORAL3 <i>ADH1/adh1::SAT1-dTOM2</i>	This work

Yeast strains were routinely grown in YPD liquid medium (2% glucose, 2% peptone, 1% yeast extract) at 37 °C in an orbital shaker. Growth was estimated by OD₆₀₀ mea-

surements. YPD plates supplemented with chloramphenicol to 20 µg/mL was used for counting fungal CFUs. To count CFUs in RFP-labelled and unlabeled *C. albicans* strain mixtures, SD-chloramphenicol (2% glucose, 0.5% ammonium sulphate, 0.17% yeast nitrogen base supplemented with amino acids, 2% agar and 20 µg/mL chloramphenicol) plates were used.

2.2. Genetic Procedures

To barcode the *C. albicans* clinical isolates, we generated a collection of plasmids derived from pDUP3 vector [30]. This plasmid carries the *SAT1* dominant marker and a 550 bp flanking region of homology to the *NEUT5L* intergenic region that facilitates integration in this region of the *C. albicans* genome that does not affect cell physiology. The following degenerated primers: o-barcode-up (GGCCGCGTAGATCTGACCGTCGNNNNNNNTACGTA CTGCACGTAT) and o-barcode-lw (CGATACGTGCAGTACGTANNNNNNNCGACGGTCA-GATCTACGC) were used to generate a double stranded DNA fragment leaving *Not* I and *Cla* I cohesive ends (N represent random degeneracy at that position). Both primers were mixed at the same concentration and exposed to 90 °C for 10 min followed by 5 min at 60 °C and 5 min at 50 °C to allow homologue pairing. The double chain DNA obtained with cohesive ends was introduced in the *Not* I-*Cla* I pDUP3 digested plasmid. We incorporated a *Bgl* II internal restriction site in the sequence (underlined) to identify those plasmids that integrated the barcode. Individual pDUP3-barcode plasmids were sequenced to generate and order the barcoded vector collection. One hundred fourteen *C. albicans* strains (as well as SC5314 strain) were transformed with individual plasmids after *Sfi* I digestion to direct the integration at the *NEUT5L* locus by electroporation [31]) and transformants were selected on YPD solid plates supplemented with 200 µg/mL of nourseothricin. The correct integration was confirmed by PCR using the primers: o-seqDUP3up (GCTTGATATCCCGCGGTGGAGC) and o-complw (CACGAATCGTTAATAAGCTGTGATTGC) and sequencing.

The pNIM1R-dTOM2 [14] plasmid was used to generate fluorescent SC5314-RFP and CaORAL3-RFP labelled strains. This plasmid allows a tight tetracycline regulation (repressible) of the RFP fluorescent gene (TET-OFF system) and carries the *SAT1* dominant marker. The plasmid pNIM1R-dTOM2 was digested with *Kpn* I and *Ksp* I restriction enzymes and integrated at the *ADH1* region of *C. albicans* strains. *C. albicans* strains were similarly transformed by electroporation and transformants were selected on YPD supplemented with 200 µg/mL of nourseothricin.

2.3. In Vivo Procedures

The protocol used in the colonization model was approved by the Animal Experimentation Committee of the UCM (CEA 33-2015) and Comunidad de Madrid according to the Artículo 34 del RD53/2013 (PROEX 226/15). This model does not result in disease and all procedures were conducted to minimize mice suffering. Mice euthanasia was performed by CO₂ inhalation following standard protocols (AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition). The number of animals per experiment was adjusted to the minimum for ethical reasons. Female mice C57BL/6 obtained from Charles River RMS, Spain, were housed in sterile cages with unlimited access to sterile food and water, and used within an age of 7–10 weeks-old. Mice housing and other non-invasive procedures took place in the animal facility from the Medical School of the UCM.

The gut colonization assay was performed following the protocol described previously [32] with minor modifications. Briefly, after 4–10 days of antibiotic pre-treatment (2 mg/mL streptomycin, 1 mg/mL bacitracin, 0.1 mg/mL gentamycin and 0.25 mg/mL fluconazole, fluconazole was removed one day before *C. albicans* inoculation), 10⁷ *C. albicans* cells were intra-gastrically introduced in a single inoculation by gavage. Antibiotic treatment was removed in most experiments when stated. In some experiments, a second inoculation was performed when stated. In the co-housing experiments, mice from different groups were put together in the same cage without performing any artificial inoculation. Colonization was determined by counting *C. albicans* CFUs in fresh stools obtained from

each individual mouse at different time points. A 40 mg/mL feces suspension in sterile PBS was mechanically homogenized, serially diluted and cultured on YPD or SD-agar plates with chloramphenicol (20 µg/mL). Colonies were associated to a specific population in accordance to the colony color when RFP expressing strains were involved. To analyze *C. albicans* loads in the gastrointestinal tract, mice were sacrificed and samples from the stomach, cecum, small and large intestine were aseptically obtained, homogenized in sterile PBS and cultured in SD plates for CFUs counting.

2.4. NGS Assay

To perform the NGS assay, colonies from the stools of mice colonized with the pools of barcoded strains were collected and the genomic DNA was extracted. The amount of DNA was quantified in a nanodrop and equalized to generate the libraries for Illumina sequencing. A fragment of 272 pb flanking the barcode sequence was used as template for NGS. DNA libraries were prepared following minor modifications of the “16S Metagenomic Sequencing Library Preparation” [33] with adapted primers including locus specific sequences Calbtg Fw.2 (5' CTTGATATCCCGCGGTGGAGC 3') and Calbtg Rv (5' GTGAGGGTTAATTCGAGCTTGGCG 3'). Two rounds of amplifications were performed to add the Illumina adapters and library index to the DNA fragments. Illumina sequencing by synthesis was performed with paired-end reads of 166 nt and 136 nt using the MiSeq System (Illumina, San Diego, CA, USA).

The data analysis was performed with the “CLC Genomics Workbench” software (QIAGEN Bioinformatics) and the following steps: quality filtering of the reads, merge of paired-end reads, and Motif Search comparing with the known barcodes for each inoculum with a precision limit of 100%. The percentage of every strain was calculated along the experiment. Those strain with a higher colonization load or those than were detected after antibiotic treatment removal were selected for further experimentation. NGS assays design and analyses was performed at the Unidad de Genómica of the UCM.

2.5. *C. albicans* Filamentation Assay

To analyze the ability to filament, 10^5 *C. albicans* cells were inoculated in one mL of pre-warmed fetal bovine serum and incubated at 37 °C in an orbital shaker. Samples were taken after 3 h and photographed using a Nikon Eclipse TE2000-U microscope at 100× magnification. Images were captured by a Hamamatsu ORCA-ER CCD camera using AquaCosmos 1.3 software. All images were processed identically and mounted using Adobe Photoshop 7.0.

To analyze the colony morphology of *C. albicans* on Spider medium (1% nutrient broth, 1% mannitol, 0.2% K₂HPO₄, and 1.5% agar), 50–100 yeast cells were plated on Spider plates medium, incubated at 37 °C for 5 days before pictures were taken.

2.6. Supplementary Material and Methods

2.6.1. Susceptibility Assays

Drop tests for susceptibility/resistance assays were performed by spotting 5 µL drops containing cell suspension from 10^5 to 10^2 *C. albicans* cells onto solid YPD plates supplemented with different concentrations and compounds. Plates were incubated for 24 h under different O₂/CO₂ concentration.

The white/opaque transition was induced by plating 50–100 CFUs on YPD supplemented with 10 µg/mL phloxine B (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and incubated at 24 °C for 96 h before photographs are taken.

2.6.2. Adhesion Assay

Adhesion to plastic was performed in 24-well flat bottom plates for culture cells. Five hundred cells were added to each well in RPMI 1640 medium and allowed to adhere for 30 min. Medium carrying non adhered cells was spread on YPD for CFUs count. Adhered cells were mechanically removed and spread on YPD for CFUs count. Cell

adhesion was expressed as percentage of adhesion (adhered cells * 100/(adhered cells + non-adhered cells)).

HT29 cell line were grown on DMEM medium with high glucose (25 mM) (Gibco, Waltham, MA, USA), 10% of heat inactivated fetal bovine serum and penicillin/streptomycin (100 units/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin) in a humidified incubator with 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Culture medium was changed every 2 days until seeding in a 24-well flat bottom plates for culture cell. When HT29 cultures were confluent the adhesion assay was performed. Culture medium was removed and 1 mL of the same medium lacking serum was added per well. Parallely, *C. albicans* cells grown overnight in YPD at 37 °C were washed twice with PBS, counted in a Neubauer chamber and resuspended in DMEM medium with high glucose plus penicillin/streptomycin. *C. albicans* isolates were mixed with SC5314-RFP to equal amount and 2×10^5 *C. albicans* cells were added per well. For this, the culture medium was replaced by 1 mL of medium containing the mix of *C. albicans* cells to 2×10^5 cell per mL. Plate was incubated in a humidified incubator with 5% CO₂ atmosphere at 37 °C for 1 h. Then, culture medium was removed and, *C. albicans* cells attached to the HT29 cell line were recovered adding 500 µL of water plus 0.2% Triton twice and mechanically removed. 100 µL from different dilutions were plated on SD medium to distinguish the two types of colonies and to allow CFUs count. Mixed culture adhesion was expressed as Adherence Relative Index (ARI) that was calculated dividing the percentage of adhered cells from every strain by their percentage in the inoculum.

2.6.3. Phospholipase Activity

Phospholipase activity was determinate by growing *C. albicans* strains on egg yolk containing media and measuring the precipitation zone. Two media were used as some differences have been reported: SEA and MEA [34]. SEA (Sabouraud Egg Agar) medium was prepared as follow: 0.65% Sabouraud's dextrose, 1–0.5 M NaCl, 0.0055% CaCl₂ and 2% agar were re-suspended in 900 mL H₂O₂ and autoclaved. In parallel, one egg was immersed in 70% ethanol for 3 h to disinfect it, then, the yolk was added to 250 mL 0.2% saline solution and homogenized, 100 mL of this solution were added to the 900 mL medium previously prepared and homogenized [35,36]. MEA (Malt Egg Agar) consist in 2% malt extract agar, 2% agar, 2% dextrose, 1–0.5 M NaCl, 0.005% CaCl₂ and 1% sterile egg yolk (prepared similarly to SEA medium) [34].

Stationary phase growing cells were resuspended at O.D. 1 and 2.5 µL drop was spotted onto MEA or SEA agar plates. Plates were incubated for 120 h at 30 °C, 37 °C in normoxia or 37 °C in hypoxia before plates were scanned and precipitation halos were measured using the J-image. Each isolate was tested in replicates of three in two different days. The phospholipase activity was defined as the ratio of colony diameter to the diameter of the dense white zone of precipitation around phospholipase positive colonies.

2.7. *C. albicans* Susceptibility Testing

Sensititre YeastOne microdilution methods (Thermo Fisher, Waltham, MO, USA) was used as a commercial colorimetric test for the determination of minimum inhibitory concentrations. To perform the test, a 0.5 McFarland suspension of each yeast strain was prepared and 100 µL were inoculated into a culture medium provided by the manufacturer (Sensititre yeast One broth). Plates containing lyophilized antifungals were rehydrated with inoculum suspension using a multichannel pipette (100 µL in each well). The panels had the following serial dilutions: 0.125–8 µg/mL for amphotericin B, 0.12–256 µg/mL for fluconazole, 0.008–8 µg/mL for voriconazole, posaconazole, micafungin and caspofungin, 0.015–8 µg/mL for anidulafungin, 0.016–16 µg/mL for itraconazole and 0.06–64 µg/mL for 5-fluorocytosine. Plates were covered with adhesive and incubated at 35 °C for 24 h. Sensititre YeastOne uses a colorimetric assay for MIC evaluation, where no growth is detected, and the color changes from blue to pink depending on fungal growth. The MIC values were interpreted according to the breakpoints stated in CLSI M27-S4 [37].

3. Results

3.1. Identification of Clinical Isolates of *Candida albicans* with Increased Gut Colonization Load

To identify clinical isolates with an increased ability to colonize the gastrointestinal tract, a competitive assay was performed with 114 barcoded *C. albicans* clinical isolates. To barcode the *C. albicans* strains, different clinical strains isolated from different body localizations (see supplementary file S1) and identified as *C. albicans* by MALDI-TOF (were transformed with a plasmid carrying a unique and distinguishable sequence as well as the *SAT1* gene that confers resistance to nourseothricin. These barcoded strains were randomly grouped into four pools, each pool consisted of 29–30 strains including a SC5314-barcoded control strain per group (Supplementary file S1). Pools were inoculated by gavage in groups of three mice previously treated with a mix of antibiotics in the drinking water. Stool samples were taken at 0, 7 and 21 days, where antibiotic treatment was then removed, and two more samples were taken at 42 and 60 days' post-inoculation. Samples were processed for CFUs counting and genomic DNA was extracted in pool from solid plates growth to perform NGS analyses.

As seen in Figure 1, fungal colonization load was similar for all groups in the first 20 days, although greater differences could be observed at day 40 following removal of the antibiotic therapy (at day 21 (Figure 1)). The NGS assay was performed by Illumina sequencing and revealed that most of the inoculated strains were detected in a low relative amount or were even undetectable, including the SC5314-barcoded strain used as reference (Supplementary file S1). In total, 8 out of 114 strains were selected either because they showed a high colonization rate compared with their competitors or because they remained in the intestine after removal of antibiotic in the drinking water of mice. The *C. albicans* selected strains and the body localization from they were isolated are listed in Table 2. Although the number of clinical isolates of *C. albicans* was higher than that of strains obtained from healthy individuals (105 versus 9) in the screening one out of eight strains came from a healthy donor indicating that neither the clinical status of the individuals or body location of isolation (vagina, gut, etc.) was overrepresented in this subset of strains selected.

Table 2. *C. albicans* strains selected in our competitive pool commensalism assay.

Strain	Origin	Sample
Practs 2018-1	Commensal	Stool culture
CaORAL2	Hospital	Oral cavity
CaORAL3	Hospital	Oral cavity
CaHG14	Hospital	Bronchoalveolar lavage
CaHG22	Hospital	Pharyngeal exudate
CaHG43	Hospital	Pharyngeal exudate
CaHG65	Hospital	Urine culture
CaURI1	Hospital	Urine culture

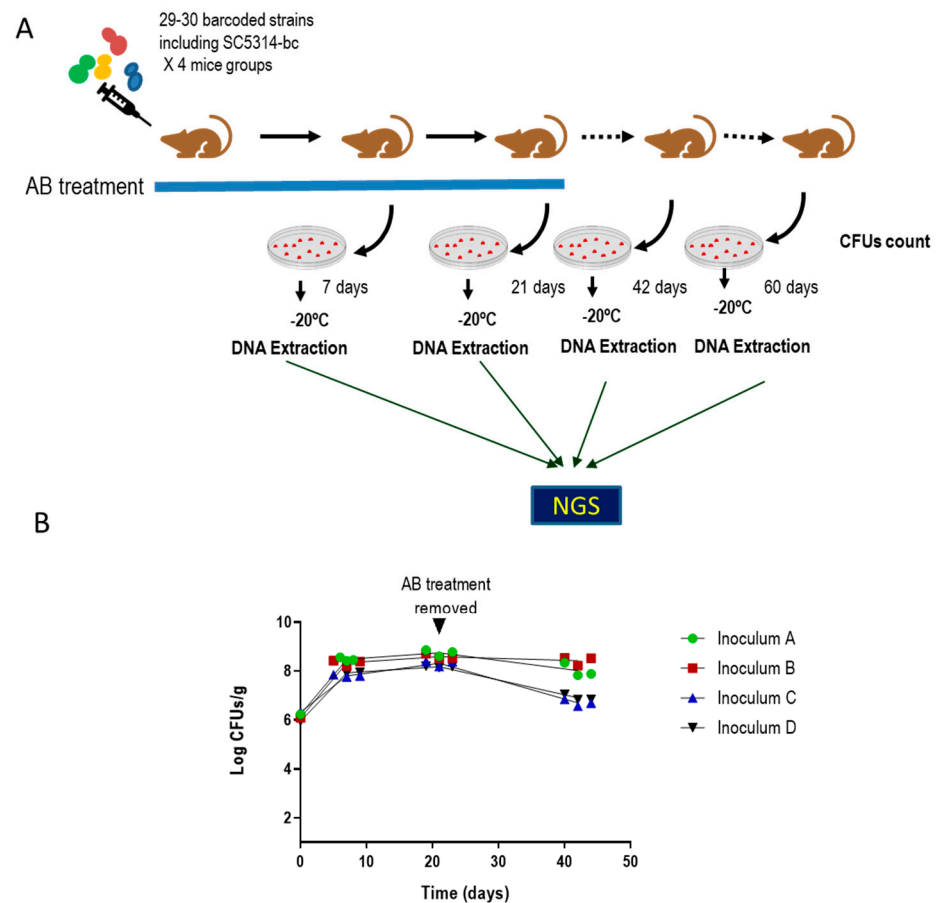


Figure 1. Assay to identify *C. albicans* clinical isolates with increased ability to colonize the murine gut. (A) Schematic representation of the assay. (B) Fungal colonization load of *C. albicans* strains in pool. Inoculum A, B, C and D correspond to the four pools of *C. albicans* barcoded strains (supplementary file S1). Each *C. albicans* strains pool was inoculated intragastrically in 3 mice with a partially depleted microbiota. Antibiotic treatment was maintained for 21 days after *C. albicans* gavage then, it was removed. Stools were taken at different time points and processed for CFUs counting. Data are represented and expressed as log CFUs per stool gram versus time (days). Each replicate is shown and each line represents the mean of the data.

3.2. Selected *C. albicans* Strains Displayed Enhanced Fitness Compared to SC5314

To confirm that the selected *C. albicans* strains display an enhanced ability to colonize the murine gastrointestinal tract, a competitive assay was performed between each selected strain and an RFP-labelled SC5314 strain [14]. All the selected strains (Table 2) were able to colonize the murine intestine of C57BL/6 mice to higher or similar levels than the control strain SC5314-RFP; moreover, all these strains remained in the intestine for a prolonged period (greater than 20 days) after removal of antibiotic therapy that took place at 17 day (Figures 2 and S1). These results validate our screening while, additionally, allow the identification of *C. albicans* strains that could persist as a commensal without antibiotic treatment.

Selected strains were phenotyped to identify traits that could be responsible for the fitness increase over SC5314. The susceptibility to different types of stress, the ability to adhere to polystyrene or to the human epithelial intestinal HT-29 cell line, the tolerance to bile salts or their phospholipase activity, among other phenotypes, were tested. Significant differences were observed in the susceptibility to bile salts and their phospholipase activity in vitro (Table 3 and Figures S2–S6). While no differences were detected when osmotic stress (NaCl), inhibitor of the electron transport chain or adhesion to epithelial intestinal HT-29 cell line were tested, two out of eight strains displayed an enhanced tolerance to menadione

(Pract.2018-1 and CaHG14) and one strain (CaORAL3) displayed decreased adherence to polystyrene. No differences were observed among strains when other oxidative agents were analyzed. All the analyzed strains were heterozygous for the mating type and did not stain with phloxine B. We conclude that the enhanced ability to colonize the murine gut does not correlate with any of the phenotypes tested and may, therefore, rely on other characteristic(s) not yet determined in our studies or in a combination of them. The summary of the most relevant phenotypic features is shown in Table 3.

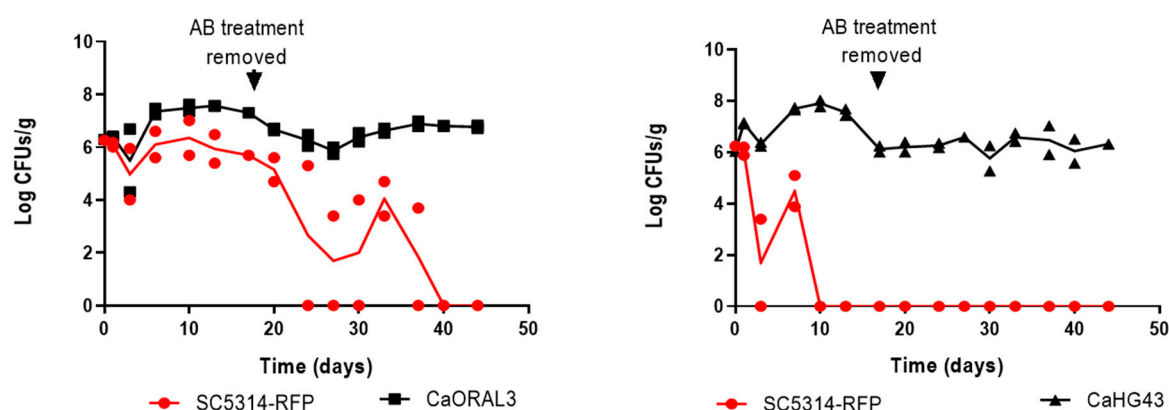


Figure 2. Competitive colonization assays. CaORAL3 and CaHG43 strains were inoculated in a 1:1 ratio with SC5314-RFP in 3 mice by gavage. The time course of fungal colonization load was followed by CFUs counting of stools in SD-chloramphenicol medium. Antibiotic treatment was removed at day 17. Figure S1 shows the colonization load for the other six selected *C. albicans* strains in competition with the SC5314-RFP.

Table 3. Summary of phenotypic characteristic displayed by the selected *C. albicans* isolated in comparison to standard SC5314-RFP. Only differences are shown in the table. S sensible, R resistant, <adhesion to polystyrene compared to SC5314-RFP, ↓ low phospholipase activity, +++ very high phospholipase activity, ++ high phospholipase activity, ns means no significant differences were observed.

Strain	Invasiveness in Spider Medium	Adhesion to Polystyrene	Bile Salts Sensitivity	Menadione	Phospholipase Activity (SEA)
Pract. 2018-1	n.s.	n.s.	R	R	n.s.
CaORAL2	n.s.	n.s.	R	n.s.	n.s.
CaORAL3	n.s.	<	R	n.s.	n.s.
CaHG14	Non invasive	n.s.	n.s.	R	n.s.
CaHG22	n.s.	n.s.	S	n.s.	↓
CaHG43	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+++
CaHG65	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓
CaURI1	Non invasive	n.s.	n.s.	R	++

The Minimum Inhibitory Concentration to different antifungals was tested following the CLSI protocols (Table S1). All the selected *C. albicans* isolates were sensitive to the drugs tested according to CLSI standards.

3.3. Strains with Increased Fitness Are Able to Form True Hyphae

The adaptation of *C. albicans* to the murine gastrointestinal tract has been correlated with the loss of the ability to filament via mutations in the *FLO8* gene [25]. To determine if the enhanced fitness of the selected *C. albicans* strain correlated with alterations in the yeast-to-hypha transition, we tested the ability to filament in either in liquid or solid media. Stationary phase cultures in YPD at 37 °C were inoculated in serum to 10⁵ cells per mL and incubated at 37 °C for 3 h (Figure 3A). All the strains were able to form true hyphae in serum; filaments could also be observed in the pre inoculum (YPD liquid medium) indicating that these strains retained the ability to filament.

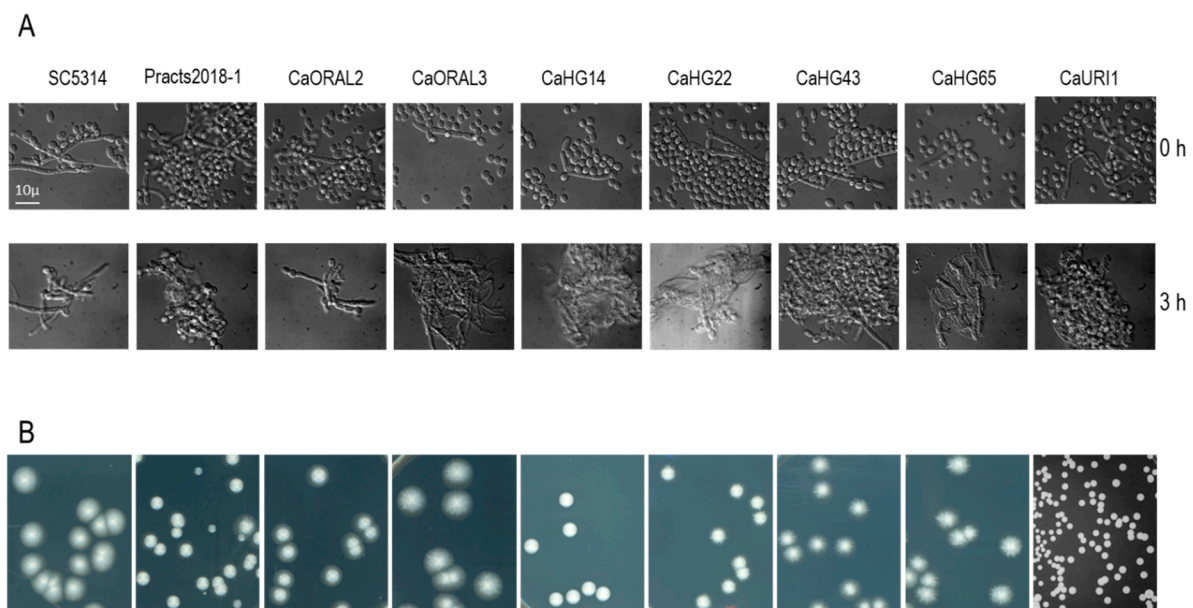


Figure 3. Ability to perform the yeast-to hypha transition in liquid and on solid media. (A) The strains indicated in the upper row were grown in YPD overnight at 37 °C (time 0) and refreshed in pre-warmed serum. Samples were taken 3 h later and photographed under the microscope. (B) In total 50 to 100 cells from cultures in the stationary phase were spread on Spider medium and incubated for 5 days at 37 °C.

In addition, fifty to one hundred CFUs were spread on Spider medium and incubated at 37 °C for 5 days to observed agar invasion (Figure 3B). Six out of eight strains were able to invade on Spider medium plates. Consequently, the enhanced ability to colonize murine gut does not correlate with the deficiency to invade or with significant defects in morphogenesis.

3.4. CaORAL3 Strain Still Requires Antibiotic Treatment to Colonize Murine Gut

The CaORAL3 strain was selected for further characterization and the ability to colonize naïve mice was analyzed. CaORAL3 was unable to colonize the mouse gut without previous antibiotic therapy. As shown in Figure 4A, when 10^7 *C. albicans* cells were inoculated intra-gastrically in non-antibiotic treated mice, low CFUs were recovered from stools at days 1 and 7 post-inoculation but not at subsequent days. A similar dose of inoculum enabled colonization in mice treated with antibiotics for 4 days before *C. albicans* gavage, the antibiotics treatment was maintained for 9 days' post-inoculation (Figure 4B). The removal of antibiotics did not alter the colonization level that remained invariable for as long as 44 days. To check whether these high levels are needed for the stable maintenance in the antibiotic-regime, we forced the reduction of fungal cells by oral administration of nystatin and fluconazole for 4 days; this resulted in a severe reduction of fungal loads; however, the remaining yeast cells were able to eventually recover previous fungal levels after stop of antifungal treatment (Figure 4C).

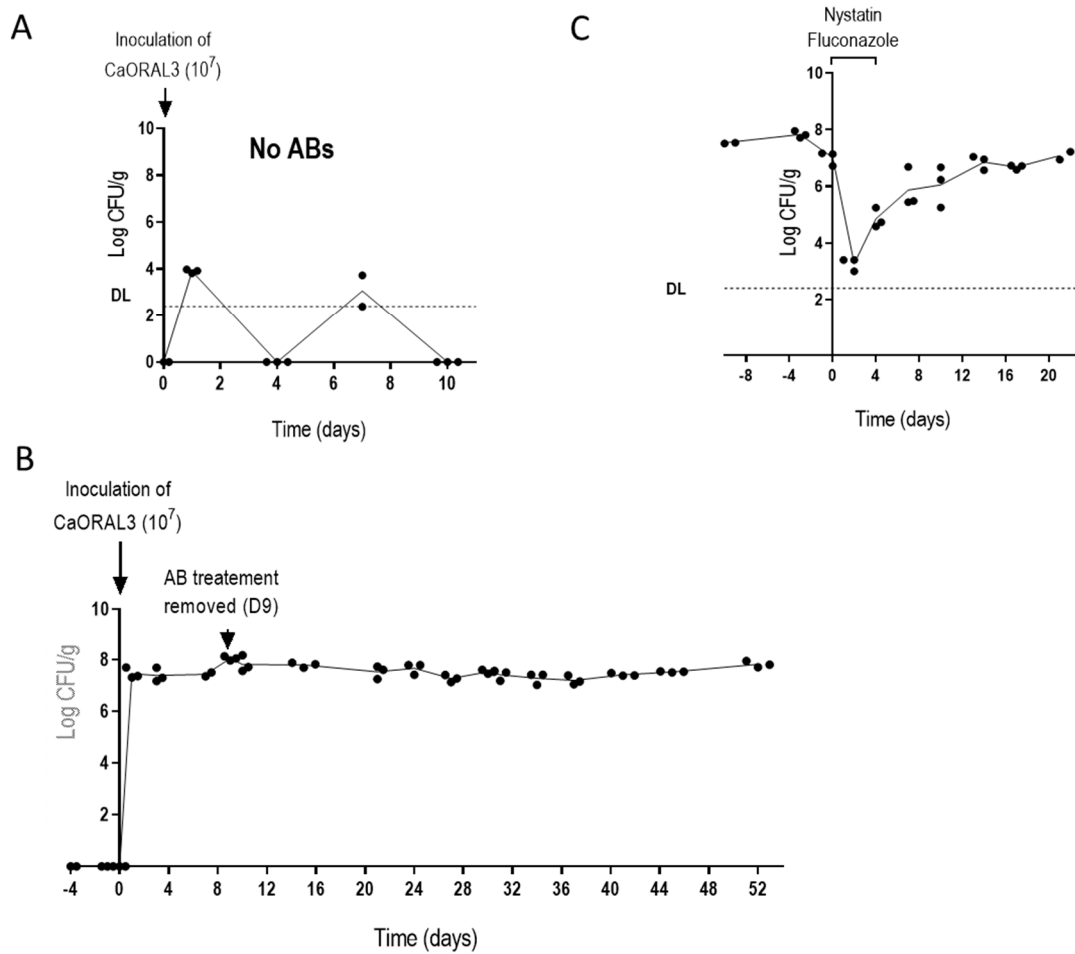


Figure 4. Effect of the antibiotic treatment on CaORAL3 colonization. (A) A suspension of CaORAL3 cells was inoculated in non-antibiotic treated mice. (B) CaORAL3 cells were inoculated in Ab-treated mice 4 days prior plus 9 days after *C. albicans* inoculation. Colonization rate was followed in time and expressed as Log CFUs per g of stools. (C) Effect of nystatin and fluconazole administration over CaORAL3 colonization rate.

These results indicate that *C. albicans* colonization occurs in the new gastrointestinal conditions (that is after antibiotic treatment) but do not provide information about the actual role of fungal cell in promoting these conditions. Therefore, a set of experiments were designed where CaORAL3 was inoculated 3 days before (B), just after (J) or 7 days after (A) a 10-days antibiotic treatment. In other words, three groups of mice were treated with the same antibiotic regimen for 10 days (days 1–10) and CaORAL3 cells were introduced by gavage at day 7 (B), day 10 (J) or day 17 (A). The three groups exhibited comparable colonization loads, although a slightly higher colonization load was observed in B group indicating a partial-albeit not essential- contribution of the fungi for inducing the permissive conditions (Figure 5B). These experiments suggest that antibiotics cause microbiota alterations that allow the colonization by CaORAL3 and that this alteration remains stable for at least 7 days after removal of the treatment.

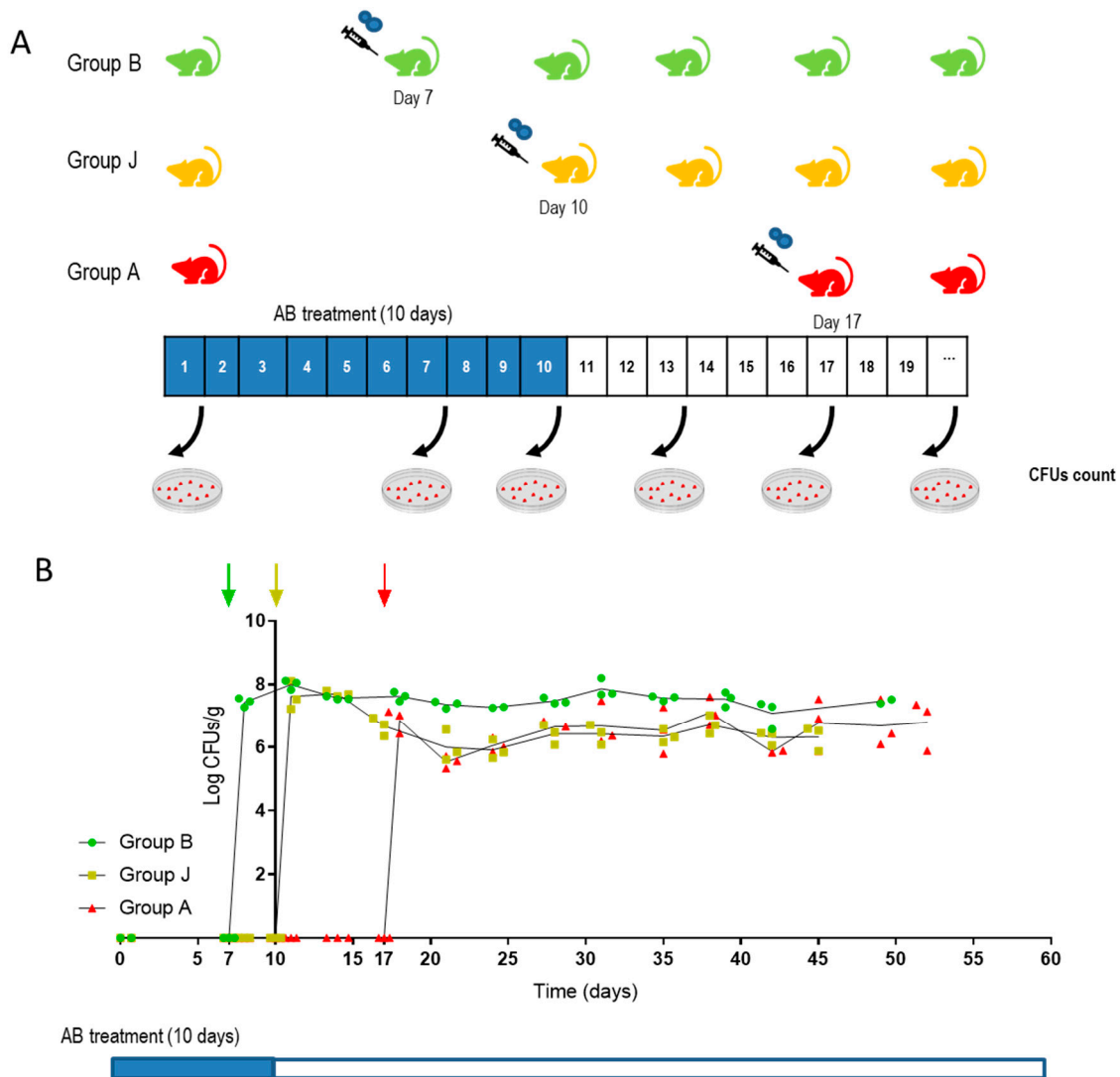


Figure 5. Determination of the minimum antibiotic regimen to allow gut colonization (A) Schematic representation of the assay, three groups of mice were treated with antibiotics for 10 days, 10^7 CaORAL3 cells were inoculated 3 days before (B), just after (J) or 7 days after (A) the 10-days antibiotic treatment. Stool samples were taken at different time and processed for CFUs count. Data are shown as Log CFU/g of feces (B). Arrows indicate *C. albicans* inoculation for each group.

3.5. Changes in the Intestinal Microbiota Allow CaORAL3 Colonization

To analyze the effect of naïve microbiota on *C. albicans* CaORAL3 colonization, we performed two different approaches: (1) gavage with extracts of feces and (2) co-housing with naïve mice. In the first approach we compared two identical groups of mice colonized with CaORAL3 where the antibiotics were retired at least 30 days before the experiment; both groups presented similar fungal loads ($\approx 10^6$ CFU/g). The first was inoculated intragastrically twice (separated 48 h) with feces from naïve mice (group F) while the second one was maintained as control (group C) (Figure 6A). Naïve microbiota led to a ≈ 100 -fold decrease in CaORAL3 colonization load; however, this strain was able to persist in the gut at above threshold levels for more than 30 days after naïve microbiota inoculation. The second approach used co-housing, therefore allowing a “natural” interchange of microbiota (including fungi) among mice due to coprophagia [14]. Two naïve mice (group N) were introduced in a cage with a group of 2 mice colonized with CaORAL3, where the antibiotics were retired at least 30 days before (group H) (Figure 6B). Acquisition of conventional microbiota resulted in a slow decreased of fungal levels in group H up to a 10-fold reduction, that remained stable for more than 3 weeks. Surprisingly, CaORAL3 strain was detected

also in naïve mice (group N). From the first day of co-housing group N showed a stable *C. albicans* colonization, although the levels in the new-introduced mice were lower than in the previously inoculated mice (around 10^5 CFU/g) (Figure 6B). However, CaORAL3 strain samples obtained from group H feces were not able to colonize naïve mice after in vitro growth and inoculated by gavage. These results suggest that intestinal microbiota is important to control *C. albicans* colonization but once *C. albicans* has been established as a commensal, a fecal transplant is not enough to remove CaORAL3 strain from the intestine.

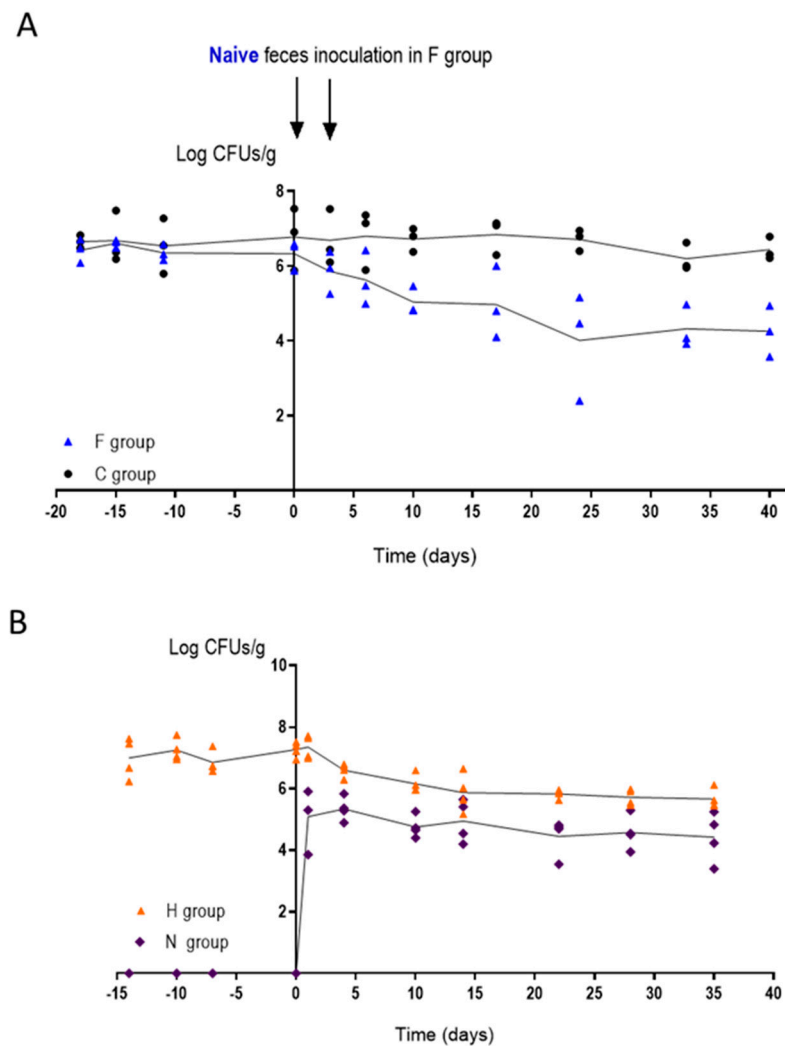


Figure 6. Influence of the microbiota in mice stably colonized with CaORAL3 strain and without antibiotic treatment for 30 days. (A) Feces from naïve mice was inoculated in F group and colonization load was followed in time. Group C was followed as control. (B) Naïve mice (N group) were introduced in the cage of mice previously colonized by CaORAL3 (H group) and colonization load was followed in time. Results of two independent assays are shown in the graph.

3.6. CaORAL3 Is Able to Colonize Murine Gut Previously Colonized with *C. albicans*

We next determined whether CaORAL3 could impede the colonization of a wild type reference strain. To analyze this, we introduced intra-gastrically an inoculum of 10^7 RFP-labeled SC5314 yeast cells from an in vitro culture in mice previously colonized by CaORAL3 and where antibiotics were retired 39 days before (Figure 7). As observed in Figure 7A, the SC5314-RFP strain was unable to establish a long-term colonization, although medium fungal loads (10^{4-6}) were achieved during the first 10 days. In a parallel control group, CaORAL3-RFP obtained from an in vitro culture was inoculated in mice previously colonized by CaORAL3; the RFP labeled strain also showed lower loads at

the beginning, but it ended up reaching roughly the same high colonization loads than already colonizing CaORAL3 (Figure 7B). *Post mortem* analyses revealed that CaORAL3 and CaORAL3-RFP displayed the same distribution along the gastrointestinal tract, indicating that the strain inoculated in second place was able to compete and occupy the same niche as the previously established strain (Figure 7C). In a separate experiment, we introduced cells of CaORAL3-RFP strain in mice previously colonized by CaHG43 strain where the antibiotics were retired 39 days before (Figure 7D). Again, CaORAL3 was established in the gut indicating that this strain can compete even when other *C. albicans* strains are already occupying the intestine.

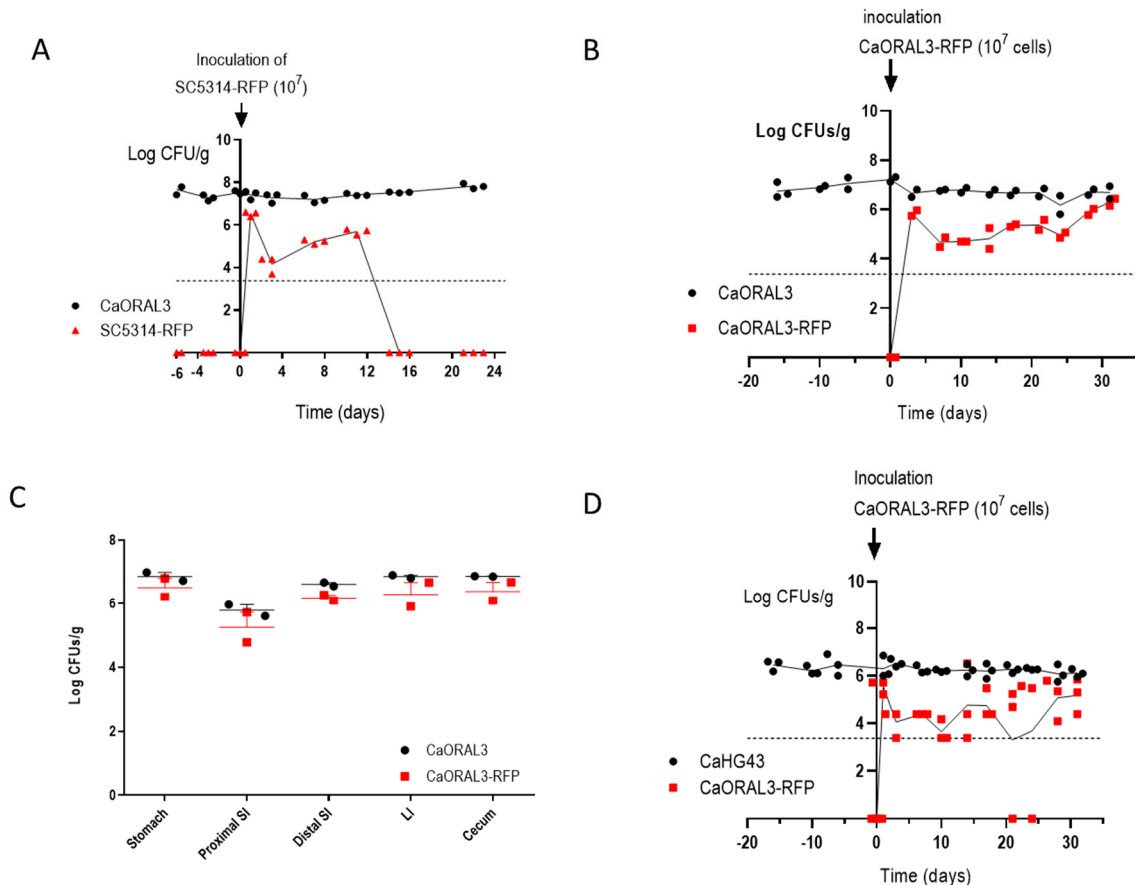


Figure 7. Competition between CaORAL3 and other *C. albicans* strains in the murine commensalism model. (A) 10^7 SC5314-RFP cells were inoculated in mice previously colonized by CaORAL3 cells and without antibiotic treatment for 39 days. Colonization load was followed in time by spreading stool suspension on SD-chloramphenicol medium to distinguish white/red colonies. (B,D) 10^7 CaORAL3 cells tagged with RFP were inoculated in mice previously colonized by (B) CaORAL3 or (D) CaHG43 strains and without antibiotic treatment for 39 days. Colonization load was followed similarly. (C) At the end of the experiments, mice from groups in (B) were euthanized and the amount of each strain was quantified in the different portions of the gastrointestinal tract.

4. Discussion

C. albicans remains as the most prevalent fungal pathogen in humans [1] probably because its derived infections are mainly endogenous. The intestine (mainly the cecum) contains elevated number of *C. albicans* cells that can cause disseminated candidiasis when host defenses are compromised. Experimental animals are essential models to analyze the virulence of *C. albicans* as well as the determinants of adaptation to the commensal state [9]. However, laboratory mice do not carry *C. albicans* as a natural commensal in their intestine. This fact requires us to manipulate the natural gut microbiota to enable colonization via the use of gnotobiotic mice or mice where the endogenous bacterial components of the

microbiota have been significantly reduced by antibiotic administration. Both models lead to similar colonization loads (estimated by CFUs counting) in stools or intestinal content [11] although differences were observed in the morphology and localization of the fungal cells. An advantage of the second model is that it can be conveniently manipulated (interrupted or altered) and mimics a frequent risk factor for human candidiasis [14,23,27]. Using this model, we have screened a collection of clinical isolates by an NGS-barcoding strategy analyzing up to 29–30 different strains in a single group of mice and selecting 2–3 strains per group with high ability to colonize the mouse gut.

The development of animal models to study the commensalism to molecular level revealed the relevance of different genes and metabolic pathways in this process. Over-expression of the transcription factor Crz2 leads to a higher tolerance to bile salts and acid pH under hypoxia [38], features that could explain the improved ability to colonize murine gut. Similarly, the lack of the MAP kinase Hog1 leads to bile salts and oxidative stress susceptibility which correlates with the inability to establish as a commensal in the murine gut [14]. Following the idea that certain phenotypic characteristics could predict the greater or lesser capacity to colonize the gut, the collection of clinical isolates was analyzed before and after the commensalism assay. Susceptibility to bile salts, oxidative stress, electron transport chain inhibitors or phospholipase activity, among other phenotypes, were checked. Differences were observed in the susceptibility to different stresses such as bile salts or menadione, which revealed the variability between the different isolates of *C. albicans* distributed in the population and, possibly the adaptation to specific niche or microbiota. None of the strains were homozygous for the mating type nor displayed GUT or opaque morphologies [22,27]. Although many of these characteristics have been previously related to alterations in the ability to colonize murine gut [14,26,27], in our phenotyping not a single trait was identified as predictor of the higher fitness in commensalism. This may indicate that commensalism is a multifactorial process lying on different attributes. Moreover, we focus on just a few of many chemicals and stimuli that are part of the intestinal environment. In any case, transcription factors or signaling elements seem to be the key for the establishment of *C. albicans* as a commensal.

The adaptation of *C. albicans* to murine gut by long-term gastrointestinal colonization in germ-free antibiotic treated mice allowed the selection of non-virulent non-filamentous *C. albicans* cells [25]. This suggests that dimorphic transition is not crucial for *C. albicans* to colonize murine gut in agreement with results obtained by different approaches [11,23,39]. The clinical strains analyzed in the present work retained the ability to filament whatever the origin from which they were isolated. This fact suggests that evolution in murine or human guts force to develop different phenotypes. The microbiota seems to play an essential role in this process. It is also evident the differences between mice and humans and the necessity to develop animal models closer to human in order to be able to extrapolate the observations made in the mouse.

Interestingly, the CaORAL3 strain keeps colonizing the gastrointestinal tract after antibiotics are removed; therefore, in a way quite more similar to the human case. This strain is able to establish as a commensal with just a short-term antibiotic treatment. Even more, it can establish in the murine gut of non-antibiotic treated mice co-habiting with mice previously colonized or colonize mice previously colonized by other *C. albicans* strain. Previous studies indicate that *C. albicans* requires a time (15–21 days) to adapt to murine gut, these adapted cells displayed a higher fitness and were able to impair the establishment of non-adapted *C. albicans* cells [40]. This study was performed with derived strains from the CAF2 wild type strain and suggests that during prolonged stays in the murine gut transcriptomic and/or epigenetic changes must be taken place in order to improve adaptation to this niche. CaORAL3 strain behaved as an adapted strain. Remarkably, this strain remains (although at lower levels) in the murine gut even when mice were inoculated (natural or artificially) with non-antibiotic treated murine microbiota. All these characteristics make this strain an important starting point for new experimental models in

which the role of probiotic or human microbiota and its interaction with *C. albicans* can be analyzed in the murine gut.

Antibiotic treatment is required to colonize the murine gut even for CaORAL3 strain. In our assays the changes in the microbiota that allowed *C. albicans* establishment remain for at least 7 days after antibiotic treatment removal as indicate the fact that CaORAL3 was able to colonize gastrointestinal tract in mice without antibiotic administration for 7 days before *C. albicans* gavage. Antibiotic treatment is usually correlated with an important decrease of the microbiota in amount and in diversity [41]. However, our results show that the *Candida* permissive microbiota can be somehow transferred to cohoused untreated mice, therefore suggesting the presence of certain refractory and transmissible microorganisms that may promote those permissive conditions. These microorganisms may also impair the effective acquisition of regular microbiota, since inoculation with it causes a reduction on the *C. albicans* load level but does not remove it from the gut. Previous publications where the role of the microbiota in *C. albicans* colonization was analyzed, reported that commensal bacteria act as a barrier being critical for *C. albicans* colonization [41]. To our knowledge, all the studies previously reported required the maintenance of the antibiotic treatment, otherwise *C. albicans* became removed from the murine gut. Among the great diversity of the bacterial microbiota *Lactobacillus rhamnosus* [42], *Blautia producta* and *Bacteroides thetaiotamicron* [43] were identified as critical to prevent *C. albicans* colonization, but none as relevant for favor fugal establishment.

Deeper characterization of the microbiota is required to identify those filum, genus or species that allow CaORAL3 colonization. Anyway, the identification of 8 out of 114 *C. albicans* strains able to remain in the gut after stopping the antibiotic treatment suggests that CaORAL3 is not the only strain with improved fitness in gut and insinuates the existence of an important diversity among *C. albicans* commensal strains. The sequencing of the complete genomes of these strains and their comparative analysis may give us an idea of the genetics reorganizations or mutations involved in the increased fitness in the mouse gastrointestinal tract. Thus, microbiota and the immune system are relevant, but *C. albicans* diversity must be also taken in consideration when addressing these types of studies.

C. albicans has been traditionally judged as a human pathogen; then, the virulence and the analysis of the virulence factors has been the focus of attention for years. Nevertheless, the fact that *C. albicans* is the main permanent fungus in the human microbiota unfolds new perspectives and open the question of its role in the microbiota. Wild type *C. albicans* strains able to colonize murine gut by minimally altering the microbiota may provide a more physiological model to analyze the role of the commensal bacteria, host immune system and *C. albicans* interactions.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof7090695/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, R.A.-M., E.R., D.P., J.P.; methodology, D.P., D.M.A., I.C., S.R.; formal analysis, S.H.-V., E.R., D.P., R.A.-M., J.P.; investigation, S.R., S.H.-V., I.C., D.P., D.M.A.; data curation, S.H.-V., D.P.; writing—original draft preparation, R.A.-M., J.P.; writing—review and editing, R.A.-M., J.P., E.R., D.P.; project administration, J.P.; funding acquisition, J.P., R.A.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Grant PGC2018-095047-B-I00 from MINECO and InGEMICS (B2017/BMD-3691) from CAM.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Animal Experimentation Committee of the University Complutense of Madrid (CEA 33-2015) and Comunidad de Madrid according to Artículo 34 del RD 53/2013 (PROEX 226/15).

Informed Consent Statement: This study does not involve patients or human subjects, nor is it included in a clinical trial. A database was designed, assigning a code to each sample so that the data is anonymized. This study was carried out in accordance with EU legislation on personal data, specifically Organic Law 3/2018, of December 5, on the Protection of Personal Data and guarantee of

digital rights, Royal Decree 1720/2007, Law 41/2002, of November 14, basic regulating the autonomy of the patient and rights and obligations regarding information and clinical documentation. Bioethics regulations will be respected according to the Declaration of Helsinki, the Belmont report, the Oviedo Convention on Human Rights and Biomedicine and Law 14/2007, of July 3, on biomedical research. Absolute confidentiality and confidentiality have been maintained regarding any data that may be known during the performance of the work, especially those of a personal nature, which have been not used for a purpose other than that determined, nor will it be transferred to others, not even for conservation purposes.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in supplementary material.

Acknowledgments: We thank the Centro de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid for the NGS assays and analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Pappas, P.G.; Lionakis, M.S.; Arendrup, M.C.; Ostrosky-Zeichner, L.; Kullberg, B.J. Invasive candidiasis. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2018**, *4*, 18026. [[CrossRef](#)]
- Odds, F.C. *Candida and Candidosis*; Baillière Tindall: London, UK, 1988; Volume 2.
- McCarty, T.P.; Pappas, P.G. Invasive Candidiasis. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2016**, *30*, 103–124. [[CrossRef](#)]
- Vergidis, P.; Clancy, C.J.; Shields, R.K.; Park, S.Y.; Wildfeuer, B.N.; Simmons, R.L.; Nguyen, M.H. Intra-Abdominal Candidiasis: The Importance of Early Source Control and Antifungal Treatment. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0153247. [[CrossRef](#)]
- Russell, C.; Lay, K.M. Natural history of *Candida* species and yeasts in the oral cavities of infants. *Arch. Oral Biol.* **1973**, *18*, 957–962. [[CrossRef](#)]
- Odds, F.C.; Davidson, A.D.; Jacobsen, M.D.; Tavanti, A.; Whyte, J.A.; Kibbler, C.C.; Ellis, D.H.; Maiden, M.C.; Shaw, D.J.; Gow, N.A. *Candida albicans* strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 3647–3658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Miranda, L.N.; van der Heijden, I.M.; Costa, S.F.; Sousa, A.P.; Siembra, R.A.; Gobara, S.; Santos, C.R.; Lobo, R.D.; Pessoa, V.P., Jr.; Levin, A.S. *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J. Hosp. Infect.* **2009**, *72*, 9–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nucci, M.; Anaissie, E. Revisiting the source of candidemia: Skin or gut? *Clin. Infect. Dis.* **2001**, *33*, 1959–1967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Koh, A.Y. Murine Models of *Candida* Gastrointestinal Colonization and Dissemination. *Eukaryot. Cell* **2013**, *12*, 1416–1422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Koh, A.Y.; Kohler, J.R.; Coggs, K.T.; van Rooijen, N.; Pier, G.B. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bohm, L.; Torsin, S.; Tint, S.H.; Eckstein, M.T.; Ludwig, T.; Perez, J.C. The yeast form of the fungus *Candida albicans* promotes persistence in the gut of gnotobiotic mice. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006699. [[CrossRef](#)]
- Phillips, A.W.; Balish, E. Growth and invasiveness of *Candida albicans* in the germ-free and conventional mouse after oral challenge. *Appl. Microbiol.* **1966**, *14*, 737–741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wiesner, S.M.; Jechorek, R.P.; Garni, R.M.; Bendel, C.M.; Wells, C.L. Gastrointestinal colonization by *Candida albicans* mutant strains in antibiotic-treated mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2001**, *8*, 192–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Prieto, A.D.; Román, E.; Correia, I.; Pla, J. The HOG pathway is critical for the colonization of the mouse gastrointestinal tract by *Candida albicans*. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87128. [[CrossRef](#)]
- Perez, J.C.; Kumamoto, C.A.; Johnson, A.D. *Candida albicans* commensalism and pathogenicity are intertwined traits directed by a tightly knit transcriptional regulatory circuit. *PLoS Biol.* **2013**, *11*, e1001510. [[CrossRef](#)]
- White, S.J.; Rosenbach, A.; Lephart, P.; Nguyen, D.; Benjamin, A.; Tzipori, S.; Whiteway, M.; Meccas, J.; Kumamoto, C.A. Self-Regulation of *Candida albicans* Population Size during GI Colonization. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, e184. [[CrossRef](#)]
- Prieto, D.; Correia, I.; Pla, J.; Roman, E. Adaptation of *Candida albicans* to commensalism in the gut. *Future Microbiol.* **2016**, *11*, 567–583. [[CrossRef](#)]
- Neville, B.A.; d'Enfert, C.; Bougnoux, M.E. *Candida albicans* commensalism in the gastrointestinal tract. *FEMS Yeast Res.* **2015**, *15*. [[CrossRef](#)]
- Perez, J.C. *Candida albicans* dwelling in the mammalian gut. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *52*, 41–46. [[CrossRef](#)]
- Mamouei, Z.; Zeng, G.; Wang, Y.M.; Wang, Y. *Candida albicans* possess a highly versatile and dynamic high-affinity iron transport system important for its commensal-pathogenic lifestyle. *Mol. Microbiol.* **2017**, *106*, 986–998. [[CrossRef](#)]
- Chen, C.; Pande, K.; French, S.D.; Tuch, B.B.; Noble, S.M. An iron homeostasis regulatory circuit with reciprocal roles in *Candida albicans* commensalism and pathogenesis. *Cell Host Microbe* **2011**, *10*, 118–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pande, K.; Chen, C.; Noble, S.M. Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 1088–1091. [[CrossRef](#)]

23. Roman, E.; Huertas, B.; Prieto, D.; Diez-Orejas, R.; Pla, J. *TUP1*-mediated filamentation in *Candida albicans* leads to inability to colonize the mouse gut. *Future Microbiol.* **2018**, *13*, 857–867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Pierce, J.V.; Kumamoto, C.A. Variation in *Candida albicans* *EFG1* expression enables host-dependent changes in colonizing fungal populations. *mBio* **2012**, *3*, e00117-12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Tso, G.H.W.; Reales-Calderon, J.A.; Tan, A.S.M.; Sem, X.; Le, G.T.T.; Tan, T.G.; Lai, G.C.; Srinivasan, K.G.; Yurieva, M.; Liao, W.; et al. Experimental evolution of a fungal pathogen into a gut symbiont. *Science* **2018**, *362*, 589–595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Znaidi, S.; van Wijlick, L.; Hernandez-Cervantes, A.; Sertour, N.; Desseyn, J.L.; Vincent, F.; Atanassova, R.; Gouyer, V.; Munro, C.A.; Bachellier-Bassi, S.; et al. Systematic gene overexpression in *Candida albicans* identifies a regulator of early adaptation to the mammalian gut. *Cell Microbiol.* **2018**, *20*, e12890. [[CrossRef](#)]
27. Prieto, D.; Roman, E.; Alonso-Monge, R.; Pla, J. Overexpression of the Transcriptional Regulator *WOR1* Increases Susceptibility to Bile Salts and Adhesion to the Mouse Gut Mucosa in *Candida albicans*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 389. [[CrossRef](#)]
28. Armstrong, A.E.; Rossoff, J.; Hollemon, D.; Hong, D.K.; Muller, W.J.; Chaudhury, S. Cell-free DNA next-generation sequencing successfully detects infectious pathogens in pediatric oncology and hematopoietic stem cell transplant patients at risk for invasive fungal disease. *Pediatr. Blood Cancer* **2019**, *66*, e27734. [[CrossRef](#)]
29. Biswas, C.; Chen, S.C.; Halliday, C.; Kennedy, K.; Playford, E.G.; Marriott, D.J.; Slavin, M.A.; Sorrell, T.C.; Sintchenko, V. Identification of genetic markers of resistance to echinocandins, azoles and 5-fluorocytosine in *Candida glabrata* by next-generation sequencing: A feasibility study. *Clin. Microbiol. Infect.* **2017**, *23*, 676.e7–676.e10. [[CrossRef](#)]
30. Gerami-Nejad, M.; Zacchi, L.F.; Matter, K.; McClellan, M.; Berman, J. Shuttle vectors for facile gap repair cloning and integration into a neutral locus in *Candida albicans*. *Microbiology* **2013**, *159 Pt 3*, 565. [[CrossRef](#)]
31. Köhler, G.A.; White, T.C.; Agabian, N. Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 2331–2338. [[CrossRef](#)]
32. Prieto, A.D.; Román, E.; Correia, I.; Pla, J. Role of *Candida albicans* MAPK Pathways in Colonization of the Mouse Gastrointestinal Tract. In Proceedings of the 12th ASM Conference on Candida and Candidiasis, New Orleans, LA, USA, 26–30 March 2014.
33. Illumina. *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*; Part#15044223 Rev. B; Illumina: San Diego, CA, USA, 2013.
34. Echevarria, A.; Durante, A.G.; Arechaval, A.; Negroni, R. Comparative study of two culture media for the detection of phospholipase activity of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* strains. *Rev. Iberoam. Micol.* **2002**, *19*, 95–98.
35. Macfarlane, M.G.; Knight, B.C. The biochemistry of bacterial toxins: The lecithinase activity of *Cl. welchii* toxins. *Biochem. J.* **1941**, *35*, 884–902. [[CrossRef](#)]
36. Ellepola, A.N.; Samaranyake, L.P.; Khan, Z.U. Extracellular phospholipase production of oral *Candida albicans* isolates from smokers, diabetics, asthmatics, denture wearers and healthy individuals following brief exposure to polyene, echinocandin and azole antimycotics. *Braz. J. Microbiol.* **2016**, *47*, 911–916. [[CrossRef](#)]
37. Wayne, P. *M27 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, 4th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, NY, USA, 2017; Available online: https://clsi.org/media/1897/m27ed4_sample.pdf (accessed on 26 July 2021).
38. Znaidi, S.; Barker, K.S.; Weber, S.; Alarco, A.M.; Liu, T.T.; Boucher, G.; Rogers, P.D.; Raymond, M. Identification of the *Candida albicans* Cap1p regulon. *Eukaryot. Cell* **2009**, *8*, 806–820. [[CrossRef](#)]
39. Pierce, J.V.; Dignard, D.; Whiteway, M.; Kumamoto, C.A. Normal adaptation of *Candida albicans* to the murine gastrointestinal tract requires Efg1p-dependent regulation of metabolic and host defense genes. *Eukaryot. Cell* **2013**, *12*, 37–49. [[CrossRef](#)]
40. Prieto, D.; Pla, J. Distinct stages during colonization of the mouse gastrointestinal tract by *Candida albicans*. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 792. [[CrossRef](#)]
41. Matsuo, K.; Haku, A.; Bi, B.; Takahashi, H.; Kamada, N.; Yaguchi, T.; Saijo, S.; Yoneyama, M.; Goto, Y. Fecal microbiota transplantation prevents *Candida albicans* from colonizing the gastrointestinal tract. *Microbiol. Immunol.* **2019**, *63*, 155–163. [[CrossRef](#)]
42. Ribeiro, F.C.; de Barros, P.P.; Rossoni, R.D.; Junqueira, J.C.; Jorge, A.O. *Lactobacillus rhamnosus* inhibits *Candida albicans* virulence factors in vitro and modulates immune system in *Galleria mellonella*. *J. Appl. Microbiol.* **2017**, *122*, 201–211. [[CrossRef](#)]
43. Fan, D.; Coughlin, L.A.; Neubauer, M.M.; Kim, J.; Kim, M.S.; Zhan, X.; Simms-Waldrup, T.R.; Xie, Y.; Hooper, L.V.; Koh, A.Y. Activation of HIF-1 α and LL-37 by commensal bacteria inhibits *Candida albicans* colonization. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 808–814. [[CrossRef](#)]

