


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II

BÚSQUEDA DE NUEVAS DIANAS ANTIFÚNGICAS: IDENTIFICACIÓN  
Y CARACTERIZACIÓN DE GENES ESENCIALES DE  
*Saccharomyces cerevisiae*

TESIS DOCTORAL

MARÍA JOSÉ POZUELO DE FELIPE  
Madrid, 1998



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II

BÚSQUEDA DE NUEVAS DIANAS ANTIFÚNGICAS: IDENTIFICACIÓN  
Y CARACTERIZACIÓN DE GENES ESENCIALES DE  
*Saccharomyces cerevisiae*

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Farmacia por:

MARÍA JOSÉ POZUELO DE FELIPE

Trabajo realizado en *SmithKline Beecham* bajo la dirección de los doctores:  
JESÚS DE LA FUENTE CARRALERO y ANA MARÍA ROA ARRANZ

**A mi abuela**

**A mis padres**

**A Pablo**

**A Julio**

Ahora que ya veo próxima la finalización de este trabajo, quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que han estado implicadas en él y que han hecho posible la llegada de este momento.

Recuerdo que fue a finales de 1992 la primera vez que entré en el Centro de Investigación Básica de *SmithKline-Beecham*, en Tres Cantos, para entrevistarme con José M<sup>a</sup> Sánchez Puellas y Emilio Álvarez. A ellos debo la posibilidad que he tenido de realizar este trabajo, ya que al seleccionarme para solicitar una beca del Ministerio de Educación y realizar una tesis doctoral sobre genética de levaduras, me abrieron las puertas para trabajar durante cuatro años en su empresa. He de reconocer que me asustaba un poco la idea de trabajar en investigación básica, ya que mi formación, tras finalizar el periodo F.I.R. en el departamento de Microbiología y Parasitología del Ramón y Cajal, era eminentemente clínica. Por supuesto que en el momento de la entrevista no transmití estos miedos a mis entrevistadores.

Poco después tuve que hablar con Steve Elson, y debo agradecerle que me aceptara para trabajar en su Centro, aunque en aquel momento sólo podía ofrecer a la empresa mi trabajo.

Desde el principio tuve el apoyo incondicional de José María Sanchez Puellas al que quiero agradecerle el haber facilitado tanto mi trabajo experimental como la ardua labor de la escritura. Además tengo que agradecerle otras muchas cosas que han marcado mi vida y que nunca podré olvidar.

Jesús de la Fuente y Emilio Álvarez fueron los que guiaron mis primeros pasos en el mundo de la investigación. Quisiera agradecer a Jesús sus orientaciones a lo largo de todo este tiempo, así como su ayuda directa en los momentos más difíciles y su rigor científico, que han guiado el desarrollo de este trabajo.

También Emilio Álvarez estuvo conmigo al principio, y debo agradecerle sus pacientes explicaciones y los consuelos que me brindaba cuando me sentía desaminada por culpa de los primeros resultados erróneos obtenidos.

He de reconocer que los comienzos no fueron fáciles, aunque siempre he tenido a mi lado personas entusiastas, como Ricardo Macarrón y Ana Bardera, compañeros de laboratorio que me transmitían el ánimo que en ocasiones me faltaba. Me gustaría agradecerles su apoyo y disponibilidad en cualquier momento y decirles que, aunque posteriormente hayamos estado en laboratorios diferentes, siempre los he sentido cerca.

La llegada de Ana Roa al Centro supuso un cambio radical para mí. Con su personalidad fuerte y positiva, sus ganas de trabajar, su rigor científico y espíritu crítico, ha sido una maestra ideal de la que he aprendido gran parte de lo que sé. Trabajar en mesas contiguas nos ha permitido compartir buenos y malos ratos, aunque ahora, mirando hacia atrás, no parece que fueran tan malos. La supervisión continua de los resultados, su interés y sus consejos, han marcado de manera directa la evolución de este trabajo. Quiero agradecerle su amistad, su ayuda y sobre todo el tiempo que me ha dedicado, ya que quien la conoce sabe que es un bien escaso y por tanto, muy preciado para ella.

También la presencia de Julio Caubín en el Centro durante el último año, ha influido enormemente en mí. Su organización, serenidad y equilibrio, su disponibilidad para facilitarme el trabajo en cualquier momento, así como su gran capacidad docente, fueron las primeras cualidades que descubrí en él. Posteriormente, su ayuda incondicional, apoyo moral y desconocimiento de lo que al desaliento se refiere, han resultado ser una ayuda inestimable durante el tiempo que ha durado la escritura de este trabajo.

Otras personas del Centro de Investigación Básica también han estado directamente relacionadas con mi trabajo, como Ana Sacristán, nuestra Sherlock Holmes, capaz de localizar cualquier libro o revista en la biblioteca más recóndita del planeta. Quisiera agradecerle su ayuda y especialmente su buen humor. Asimismo Angel Risueño y Juan Olmo han facilitado mi trabajo con su labor de limpieza del material y preparación de medios de cultivo.

En general todos los compañeros, especialmente los "Microbiólogos" han mostrado un gran interés por mi tesis y por mi persona. La sonrisa de Ángeles y Susi así como la dulzura de Mati y Maite han sido un estímulo para mí durante todo este tiempo. También quiero agradecer a Paco su ayuda y entusiasmo con los fermentadores, y a Concha su apoyo. Cómo no agradecer a Manolo Valmaseda sus explicaciones sobre todo tipo de temas, y sus consejos sobre la vida misma. Un recuerdo muy especial para Marian Vinuesa, mi compañera becaria, con la que he compartido tardes y noches de trabajo.

También quiero agradecer a los "Químicos" los ánimos que me han dado durante este tiempo y, particularmente a Chus y a Alfonso sus explicaciones sobre temas desconocidos para mí.

Asimismo los compañeros de "Screening" también han mostrado interés, especialmente los becarios Elena y Mosta, que me han facilitado el trabajo ofreciéndome sus protocolos y su material. Quiero agradecer a Carmen Carranza su apoyo y sus consejos, que tan dócilmente he seguido y tan buen resultado me han dado.

Del mismo modo, guardo un recuerdo especial de Magda y Dave, los "Biotecnólogos" que ahora están en EEUU. Gracias por iniciarme en las técnicas básicas de la manipulación del DNA.

No puedo olvidar a Raúl, aunque que me ayudó a informatizar los resultados evitándome hacer multitud de operaciones con la calculadora, tampoco a los "Informáticos" ni a las "Chicas de administración" ni a los "Chicos de mantenimiento" por facilitar mi trabajo en la medida de sus posibilidades.

Sin embargo, no sólo tengo agradecimientos para personas de *SmithKline Beecham*, ya que durante este tiempo he tenido la posibilidad de relacionarme con investigadores de otros grupos, y he de decir que todos ellos me han tratado de manera excepcional.

Así, quiero agradecer al Profesor César Nombela su gran cordialidad y su labor de tutoría. Estoy especialmente agradecida al grupo de Levaduras del departamento de Microbiología II de esta facultad, por acogerme como si de uno de ellos se tratara. Recuerdo con especial cariño los seminarios de las tardes del Viernes a los que asistía de vez en cuando, pues el interés que mostraban por mi trabajo y sus consejos basados en una amplia experiencia, eran muy valiosos para mí. Quiero agradecer a la Profesora María Molina sus enseñanzas y su amabilidad, así como la ayuda directa de Humberto, Victor y Javi, ya doctores los tres. Cómo no agradecer a Javier Regidor sus enseñanzas sobre inmunolocalización. También guardo un recuerdo especial de Amalia, que con su sonrisa hacía más fáciles los estudios de citometría de flujo, y del Dr. Alberto Barrientos, que me ha ayudado en diferentes ensayos y en la interpretación de los resultados obtenidos. Quiero agradecer al resto de los profesores y becarios del departamento su amabilidad y simpatía.

Un agradecimiento muy especial a la Profesora Carmen Ascaso, no sólo por su inestimable ayuda en las técnicas de microscopía electrónica, sino por mostrarme su entusiasmo y sus magníficas cualidades humanas.

También quiero recordar a Kitty, que en el Centro de Investigaciones Biológicas me enseñó alguna técnica desconocida, y a mis antiguos compañeros del Ramón y Cajal, especialmente al Dr. Fernando Baquero, Dr. Rafael Cantón y Dra. Aurora Sánchez-Sousa por mantenerme abiertas las puertas del departamento.

Tengo que agradecer a mis padres su apoyo continuo durante todo este tiempo, sus consejos y su comprensión, muy especialmente durante el último año, que ha sido el más difícil de todos. Un recuerdo muy especial para mi abuela, que me ha animado en los momentos bajos, y para Pablo que con su sentido del humor me ha acompañado siempre.

No puedo olvidar a mis amigos, especialmente a Carmen, Begoña y Miriam, por su ayuda en temas científicos, pero sobre todo por su estímulo, su comprensión y por sus palabras de ánimo que nunca me han faltado.

## INDICE

<b>I INTRODUCCIÓN</b>	1
1. SITUACION ACTUAL DE LAS INFECCIONES FÚNGICAS	1
1.1. Grupos de riesgo	1
1.2. Patógenos y patologías más frecuentes	2
1.3. Un problema en expansión	4
2. ANTIFÚNGICOS DE USO CLÍNICO ACTUAL	5
2.1. Antifúngicos poliénicos	6
2.2. Derivados azólicos	7
2.3. Alilaminas y tiocarbamatos	10
2.4. Morfolinas	11
2.5. Fluoropirimidinas	11
2.6. Griseofulvina	12
3. LIMITACIONES DE LA TERAPÉUTICA ACTUAL: INCREMENTO DE LAS RESISTENCIAS	13
3.1. Resistencia a la anfotericina B	13
3.2. Resistencia a los derivados azólicos	13
3.3. Resistencias a la 5-FC	14
3.4. Resistencias a la griseofulvina	14
4. NUEVAS PERSPECTIVAS EN EL TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES FÚNGICAS	14
4.1. Descubrimiento de nuevos antifúngicos	15
4.2. Modificación y mejora de los antifúngicos conocidos	15
4.3. Terapia combinada	16
4.4. Inmunomodulación	17
5. DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS	17
5.1. Dianas biológicas de interés	20
5.1.1. Selección de dianas según criterios bioquímicos	21
5.1.1.1. Pared celular	22
5.1.1.2. Membrana plasmática	27
5.1.1.3. Síntesis de proteínas	30
5.1.1.4. Ácidos nucleicos	31
5.1.1.5. Otras rutas metabólicas	32
5.1.1.6. Otras dianas celulares	33
5.1.2. Selección de dianas según criterios genéticos	34
5.1.2.1. <i>S. cerevisiae</i> como organismo modelo	34
5.1.2.2. Secuenciación del genoma de <i>S. cerevisiae</i>	36
5.1.2.3. Análisis funcional del genoma de <i>S. cerevisiae</i>	36
5.1.2.4. Mutantes condicionales	38
5.1.3. Obtención de dianas	43
5.2. Colecciones de compuestos	44
5.2.1. Colecciones de productos naturales	44
5.2.2. Colecciones de compuestos puros	46
5.2.3. Colecciones de compuestos obtenidos por química combinatoria	46
5.3. Compuestos diseñados de manera racional	47
5.4. Ensayos utilizados en la búsqueda de compuestos activos	47
5.5. Identificación del compuesto activo	49
5.6. Ensayos preclínicos	50
5.7. Ensayos clínicos	53
5.8. Procedimientos legislativos y regulatorios	54
<b>II OBJETIVOS</b>	55
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	57
1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS	57
2. GENOTECAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS	57

3. MEDIOS DE CULTIVO Y OTRAS DISOLUCIONES UTILIZADAS	62
3.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	62
3.2. Medios de cultivo para levaduras	62
3.3. Otras disoluciones utilizadas	64
4. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS	64
4.1. Condiciones de conservación y de crecimiento de las cepas	64
4.1.1. Cepas de <i>E. coli</i> .	64
4.1.2. Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	64
4.2. Determinación del crecimiento celular	64
4.2.1. Turbidimetría	64
4.2.2. Recuento de células en cámara de Neubauer	65
4.2.3. Observación microscópica directa de los cultivos en lámina	65
4.3. Determinación del número de viables	65
4.3.1. Recuento de colonias	65
4.3.2. Visualización directa al microscopio óptico	65
4.3.3. Citometría de flujo	65
4.4. Determinación del comportamiento celular	66
4.4.1. Comportamiento en medio sólido	66
4.4.2. Comportamiento en medio líquido	66
4.4.2.1. Comportamiento de las cepas según su concentración celular	66
4.4.2.2. Comportamiento en diversas condiciones de cultivo	66
4.4.2.3. Sensibilidad a diferentes compuestos en medio líquido	66
4.5. Sincronización celular	67
4.6. Estudio de la tasa de reversión de la mutación	67
4.7. Técnicas genéticas	67
4.7.1. Mutagénesis	67
4.7.1.1. Mutación con luz ultravioleta	67
4.7.1.2. Mutación con etilmetano sulfonato	68
4.7.1.3. Mutación con ácido nitroso	68
4.7.1.4. Mutación con nitrosoguanidina	68
4.7.1.5. Mutación por congelación a -20°C y descongelación	69
4.7.1.6. Mutación por calentamiento	69
4.7.2. Obtención de diploides: conjugación	69
4.7.3. Esporulación y disección de ascas	69
4.8. Técnicas de citometría de flujo	70
4.8.1. Determinación del contenido en DNA de un cultivo de <i>S. cerevisiae</i>	70
4.8.2. Determinación de algunos parámetros celulares de <i>S. cerevisiae</i>	70
4.8.3. Estudio semicuantitativo de quitina	71
4.9. Técnicas de microscopía	71
4.9.1. Microscopía óptica	71
4.9.2. Microscopía electrónica de barrido	71
4.9.3. Microscopía electrónica de transferencia	72
4.9.4. Microscopía confocal	73
5. TECNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR: MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS	73
5.1. Manipulación del DNA	73
5.1.1. Aislamiento del DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	73
5.1.2. Aislamiento del DNA plasmídico de <i>S. cerevisiae</i>	74
5.1.3. Aislamiento del DNA total de <i>S. cerevisiae</i> y de <i>C. albicans</i>	75
5.1.4. Aislamiento del DNA total de <i>A. fumigatus</i>	75
5.1.5. Aislamiento del DNA total de linfocitos humanos	75
5.1.6. Amplificación de genotecas en <i>E. coli</i>	75
5.1.7. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	76
5.1.8. Extracción del DNA a partir de geles de agarosa	76
5.1.9. Determinación del tamaño, pureza y concentración del DNA	76
5.1.10. Digestión del DNA	76
5.1.11. Desfosforilación del extremo 5' del DNA	76
5.1.12. Ligación del DNA	77

5.1.13. Transferencia del material genético	77
5.1.13.1. Transformación de <i>E. coli</i>	77
5.1.13.2. Transformación de levaduras	77
5.1.14. Secuenciación del DNA	77
5.1.15. Hibridación DNA-DNA, <i>Southern blot</i>	78
5.1.16. Amplificación de DNA mediante PCR	78
5.1.17. Determinación de los sitios de iniciación de la transcripción mediante el empleo de la técnica de extensión con un iniciador ( <i>primer extensión</i> )	78
5.2. Estudio del RNA	79
5.2.1. Extracción de RNA total y purificación del mRNA	79
5.2.2. Determinación del tamaño, pureza y concentración del RNA	79
5.2.3. Hibridación RNA-DNA, <i>Northern blot</i>	80
6. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	80
6.1. Obtención de proteínas heterólogas	80
6.1.1. Expresión en <i>E. coli</i>	80
6.1.2. Expresión en <i>S. cerevisiae</i>	80
6.2. Cuantificación de proteínas	81
6.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS	81
6.4. Inmunodetección de proteínas: <i>Western blot</i>	81
6.5. "Sistema dos híbridos"	82
7. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS	82
8. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS DE DNA Y DE PROTEÍNAS	83
<b>IV. RESULTADOS</b>	85
1. OBTENCIÓN DE UNA COLECCIÓN DE MUTANTES CONDICIONALES	85
1.1. Mutagénesis	85
1.2. Aislamiento de mutantes condicionales	85
2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES CONDICIONALES	88
2.1. Estudio del crecimiento en medio líquido	88
2.2. Estudio de la viabilidad, la morfología, la reversión del fenotipo y el efecto inóculo	92
3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS MUTANTES	92
3.1. Estudios de complementación	92
3.2. Clasificación de los mutantes en "grupos de complementación"	93
4. CLONACIÓN DEL GEN <i>HSP30</i>	94
5. CLONACIÓN DEL GEN <i>CDC68</i>	98
6. CLONACIÓN DEL GEN <i>TAF<sub>II</sub>145</i>	99
7. CLONACIÓN DEL GEN <i>PRP19</i>	101
8. CLONACIÓN DEL GEN <i>MTF1</i>	103
9. CLONACIÓN DEL GEN <i>MPS1</i>	105
10. CLONACIÓN DEL GEN <i>YPL007C</i>	107
11. SELECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CON MAYOR INTERÉS COMO DIANAS ANTIFÚNGICAS	109
12. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA Mps1p COMO DIANA ANTIFÚNGICA	110
12.1. Búsqueda de homologías	111
12.2. Caracterización de la proteína mutada <i>Mps1p</i>	112
12.3. Expresión y purificación de la proteína <i>Mps1p</i>	112
12.4. Búsqueda de interacciones con otras proteínas mediante el "sistema dos híbridos"	114
13. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA Ypl007cp COMO DIANA ANTIFÚNGICA	114
13.1. Estudio del gen <i>YPL007C</i>	114
13.1.1. Interrupción del gen <i>YPL007C</i>	114
13.1.2. Búsqueda de homologías	117
13.1.3. Análisis de la secuencia	118
13.1.4. Regulación transcripcional del gen <i>YPL007C</i>	119
13.1.5. Efecto de las alteraciones en el nivel de expresión del gen <i>YPL007C</i>	124

13.1.6. Inmunolocalización de la proteína de fusión C-LYTA-Ypl007cp mediante microscopía confocal	127
13.1.7. Búsqueda de interacciones con otras proteínas mediante el “sistema dos híbridos”	128
13.2. Estudio funcional mediante la caracterización del mutante TD28mj103	129
13.2.1. Obtención del mutante TD28mj103	129
13.2.2. Caracterización fisiológica del mutante	132
13.2.2.1. Estudio del fenotipo termosensible	132
13.2.2.2. Crecimiento en diferentes fuentes de carbono	138
13.2.2.3. Crecimiento en presencia y ausencia de oxígeno	138
13.2.2.4. Análisis de metabolitos	140
13.2.2.5. Efecto de la sobreexpresión del gen <i>YPL007C</i>	143
13.2.2.6. Capacidad y eficiencia de apareamiento	143
13.2.2.7. Sensibilidad a diferentes tipos de estrés	145
13.2.2.8. Comportamiento en presencia de diferentes compuestos	150
13.2.2.9. Estudio del potencial de membrana mitocondrial	153
13.2.2.10. Estudio del contenido de proteínas y de lípidos	155
13.2.2.11. Estudio de la actividad peroxidasa y superóxido dismutasa	155
13.2.2.12. Estudio morfológico y estructural	155
13.2.2.13. Búsqueda de genes supresores de la mutación termosensible	159
13.3. Producción de la proteína de fusión C-LYTA-Ypl007cp en <i>S. cerevisiae</i> y <i>E. coli</i>	159
<b>V. DISCUSIÓN</b>	165
-Búsqueda de nuevas dianas antifúngicas mediante el estudio de mutantes condicionales	165
-Obtención y caracterización de una colección de mutantes condicionales	166
-Evaluación del interés de las proteínas identificadas como posibles dianas antifúngicas	169
-La proteína Hsp30p como diana antifúngica	170
-La proteína Cdc68p como diana antifúngica	171
-El factor TAF <sub>II</sub> 145 como diana antifúngica	173
-La proteína Prp19p como diana antifúngica	174
-La proteína Mflp como diana antifúngica	175
-La proteína Mps1p como diana antifúngica	177
-La proteína Ypl007cp como diana antifúngica	181
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	193
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	195
<b>VIII. ABREVIATURAS</b>	209

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. SITUACIÓN ACTUAL DE LAS INFECCIONES FÚNGICAS

Las infecciones producidas por hongos han sufrido un incremento importante durante las dos últimas décadas, como resultado de una mayor aplicación de las prácticas médicas de carácter invasivo, y al aumento de la población que padece alteraciones en el sistema inmunitario (Fridkin y Jarvis, 1996). La etiología de las infecciones fúngicas, especialmente las de carácter invasivo, también se ha visto modificada, identificándose algunos hongos que tradicionalmente habían sido considerados no patógenos, como son *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Fusarium* spp (Fridkin y Jarvis, 1996; Perfect y Schell, 1996) como agentes etiológicos de este tipo de infecciones.

La diversidad actual de estas infecciones, junto con las características de inmunodepresión que poseen la mayoría de los pacientes infectados, ha puesto de manifiesto la limitación de los fármacos antifúngicos actualmente disponibles para el tratamiento de estas infecciones (Hay, 1993). Numerosas cepas de diversas especies fúngicas resistentes a las drogas, bien con resistencias intrínsecas, o bien adquiridas como consecuencia de tratamientos largos con la droga, son cada vez más frecuentes entre los pacientes inmunodeprimidos infectados (Klebsier *et al.*, 1997). Por otro lado, las frecuentes recaídas que sufren este tipo de pacientes tras el tratamiento con agentes fungistáticos que detienen el crecimiento del hongo, ha mostrado la necesidad de utilizar en situaciones de inmunodepresión, fármacos fungicidas, que eliminen la presencia del hongo (Meunier, 1995; Graybill, 1996).

A pesar de los recientes avances en la terapéutica antifúngica, mediante el desarrollo de nuevos fármacos de mayor actividad y menor toxicidad que los disponibles hasta hace dos décadas, todavía no se poseen los fármacos suficientes para el tratamiento efectivo de un grupo cada vez más numeroso de pacientes inmunodeprimidos, cuyo crecimiento sigue previsto para las próximas décadas (Graybill, 1996).

#### 1.1. Grupos de riesgo

Cualquier individuo sano es susceptible de sufrir una infección por hongos. Sin embargo, existen una serie de factores, que predisponen a una parte de la población a padecer un determinado tipo de infecciones, como son las de carácter invasivo.

La mayoría de los individuos que padecen infecciones invasivas por hongos, particularmente por las especies consideradas como no patógenas y por las especies oportunistas, pertenecen a dos poblaciones de riesgo: (i) individuos sometidos a prácticas médicas de carácter invasivo, y (ii) individuos con defensas inmunitarias disminuidas frente a los agentes patógenos, es decir individuos inmunodeprimidos. Entre las prácticas médicas de carácter invasivo, destacan como más frecuentes la implantación de prótesis valvulares o de catéteres venosos, que facilitan la entrada del hongo en el torrente sanguíneo. Por otro lado, dependiendo de la naturaleza de la inmunodepresión, se pueden diferenciar varios grupos de pacientes especialmente susceptibles de padecer infecciones fúngicas, como son los infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), los

que presentan patologías sanguíneas como la granulocitopenia, los transplantados, los sometidos a quimioterapia citotóxica, los quemados, los recién nacidos, y las embarazadas. El grupo mayoritario está constituido por los individuos infectados por el VIH, en el que algunas infecciones fúngicas como las candidiasis orofaríngeas, llegan a afectar a la mitad de los pacientes infectados (Walsh y Butler, 1990). En general, el tratamiento de estos pacientes con los fármacos disponibles no es efectiva, y se producen frecuentes recaídas tras su finalización.

## 1.2. Patógenos y patologías más frecuentes

Las infecciones originadas por hongos son muy variadas, tanto por la localización de la infección, como por el tipo de patología que producen (Mandel *et al.*, 1991).

Las infecciones fúngicas más frecuentes, son las micosis superficiales, es decir, aquellas que afectan a la piel y a las membranas mucosas. Son infecciones provocadas por levaduras del género *Candida*, y por dermatofitos como *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*. Las más frecuentes son las candidiasis orofaríngeas que afectan a pacientes con SIDA, y las candidiasis vaginales y las tiñas, que también pueden afectar a individuos sin alteraciones en el sistema inmunitario.

Las micosis subcutáneas suelen ser poco frecuentes, aunque en determinadas zonas del trópico constituyen infecciones endémicas. Los hongos atraviesan las barreras protectoras del individuo, piel y mucosas, asociados a procesos traumáticos, y sobreviven en el tejido subcutáneo causando una patología. Las infecciones subcutáneas mejor conocidas son la esporotricosis, originada por *Sporothrix schenckii*, la cromoblastomicosis, originadas por diversos hongos como *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa* y *Cladosporium carrionii*, y los micetomas, que además de ser causados por hongos filamentosos, como *Pseudoallescheria boydii* y *Aspergillus nidulans*, también pueden ser originadas por actinomicetos.

Las micosis invasivas (tabla 1), han sufrido un incremento importante durante las dos últimas décadas, como consecuencia directa del aumento de la población inmunodeprimida (Herbrecht, 1996). Se pueden clasificar en dos grupos según la naturaleza del agente infeccioso (Pfaller y Wenzel, 1992; Walsh *et al.*, 1996). El primer grupo lo constituyen las infecciones oportunistas, en las que el agente patógeno sólo se comporta como tal en determinadas ocasiones, dependiendo de las características del individuo al que infecta. Los pacientes afectados por este tipo de patógenos, suelen ser personas con alteraciones en el sistema inmunológico, y presentan diversas manifestaciones clínicas dependiendo de la ruta de entrada del hongo. En general, los hongos oportunistas penetran vía respiratoria, y desde el pulmón se diseminan a otras localizaciones como el cerebro y el riñón. El segundo grupo de micosis invasivas está constituido por las infecciones respiratorias endémicas, originadas por hongos de regiones geográficas determinadas. Suelen ser infecciones localizadas en el pulmón, que rara vez se diseminan a otros lugares del organismo en los individuos con un sistema inmunológico no alterado. En el caso de los pacientes inmunodeprimidos, la posibilidad de desarrollar infecciones invasivas es elevada, y el tratamiento de éstas es difícil, siendo necesario recurrir, en muchas ocasiones, a la eliminación quirúrgica del tejido infectado y al tratamiento de las alteraciones inmunitarias. La dificultad del tratamiento reside en la escasez de antifúngicos disponibles capaces de alcanzar los tejidos infectados y de provocar la eliminación del hongo, sin originar efectos secundarios importantes en el

paciente. La mayoría de los antifúngicos actúan como fungiestáticos y no provocan la eliminación total del hongo en los pacientes inmunodeprimidos, por lo que son frecuentes las recaídas una vez finalizado el tratamiento. Además, la elevada duración de la terapia antifúngica en infecciones invasivas, favorece el incremento de la resistencia de las cepas patógenas a los compuestos utilizados (Walsh *et al.*, 1996).

Tabla 1: Agentes patógenos y oportunistas más frecuentes responsables de las infecciones fúngicas invasivas \*

AGENTE ETIOLÓGICO	LOCALIZACIÓN NATURAL DEL AGENTE	FOCOS DE INFECCIÓN	FACTORES DE RIESGO	PROBLEMAS TERAPÉUTICOS	TERAPIA RECOMENDADA
<b>HONGOS OPORTUNISTAS</b>					
<u>Levaduras oportunistas</u>					
<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. krusei</i> <i>C. lusitaniae</i> <i>C. guilliermondi</i>	Flora del tracto digestivo	Orofaringe, esófago, vagina, riñón, hígado, bazo, corazón, ojos, piel, SNC, sangre	Terapias con citotóxicos y corticosteroides. Infección por VIH	Resistencias adquiridas e intrínsecas a los antifúngicos disponibles	Imidazoles, anfotericina B, flucitosina
<i>Criptococcus neoformans</i>	Frutas, verduras, excrementos de palomas	Tracto respiratorio inferior, sistema nervioso, y diseminado	Infección por VIH y neoplasias	Recaídas tras la finalización del tratamiento	Anfotericina B, flucitosina, fluconazol, itraconazol
<i>Trichosporon beigeli</i>	Tierras, plantas en descomposición	Sangre, riñón, pulmón, ojos, piel	Tratamientos con corticosteroides y neutropenia	Resistencia a anfotericina B. Elevada mortalidad en inmunodeprimidos	Imidazoles
<u>Hongos filamentosos oportunistas</u>					
<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus flavus</i>	Aire y tierra	Pulmón y cerebro	Tratamientos con corticosteroides y granulocitopenia	Los antifúngicos no alcanzan los tejidos infectados	Anfotericina B, itraconazol
<i>Zygomycetes: Rhizopus spp., Mucor spp., Absidia spp.</i>	Tierra, polvo	Pulmón, senos nasales y SNC	Tratamientos con corticosteroides y granulocitopenia	Resistencias a los antifúngicos	Anfotericina B y cirugía
<i>Pseudoallescheria boydii</i>	Tierra	Pulmón y SNC	Granulocitopenia	Resistencias a los antifúngicos	Cirugía para eliminar tejidos infectados
<i>Fusarium spp.</i>	Tierra	Pulmón y piel	Granulocitopenia y traumatismos	Resistencias a los antifúngicos	Imidazoles, anfotericina B
Hongos dematiáceos: <i>Alternaria, Bipolaris, Cladosporium</i>	Plantas en descomposición, aire	Pulmón, SNC, piel y mucosas	Inmunodepresión	Respuestas variadas a los fármacos. Elevada mortalidad	Anfotericina B, azoles y cirugía

(continuación de la tabla 1)

HONGOS QUE ORIGINAN MICOSIS ENDÉMICAS					
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Tierra y excrementos de pájaros	Pulmón y diseminada en mucosa oral y SNC	Inmunodepresión e infección por VIH	Frecuentes recaídas	Itraconazol, ketoconazol anfotericina B
<i>Coccidioides immitis</i>	Tierra en el suroeste de EEUU, América Central y del Sur	Pulmón y diseminada en piel y meninges	Inmunodepresión, infección por VIH, algunos grupos raciales	Resistencias a imidazoles. Elevada mortalidad y recaídas en enfermos VIH+ infectados	Imidazoles, anfotericina B
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Tierra enriquecida con excrementos de animales	Pulmón, piel y huesos	Inmunodepresión	Frecuentes resistencias a antifúngicos	Itraconazol, ketoconazol anfotericina B
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Tierra de Sudamérica y América Central	Pulmón y cutáneomucosa diseminada	Inmunodepresión	Tratamientos largos para evitar recidivas	Itraconazol, ketoconazol anfotericina B
<i>Penicillium marneffei</i>	Tierras del sudeste de Asia	Diseminada	Inmunodepresión, infección por VIH	Frecuentes recaídas	Itraconazol anfotericina B

\*Los datos de esta tabla han sido tomados de Walsh, 1992; Fridkin y Jarvis, 1996; Reynolds, 1996; Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 1997.

### 1.3. Un problema en expansión

Durante las dos últimas décadas, se ha producido un elevado incremento de las infecciones fúngicas originadas por hongos oportunistas y de las de carácter endémico.

Los hongos oportunistas infectan mayoritariamente a un grupo de población inmunodeprimida, y tienen por tanto, especial relevancia en las infecciones que padecen los pacientes hospitalizados, que son denominadas infecciones nosocomiales (Fridkin y Jarvis, 1996). Los datos recogidos en un estudio realizado en hospitales de EEUU durante el periodo 1980 a 1990, mostraron el aumento de los pacientes hospitalizados infectados por hongos, que ascendieron de 2 a 3,8 casos por 1000 pacientes estudiados (Beck-Sagué *et al.*, 1993). Los patógenos más frecuentemente aislados fueron *C. albicans* y otras especies de *Candida*, cuya incidencia presentó un ascenso proporcionalmente superior al del resto de los hongos patógenos, de modo que *Candida albicans* supone actualmente entre el 52 y 63% de todas las infecciones fúngicas nosocomiales (Klepser *et al.*, 1997). Además del incremento de las infecciones producidas por las diferentes especies de *Candida*, también son cada vez más frecuentes las provocadas por los hongos oportunistas *Torulopsis glabrata* y *Aspergillus spp* (Beck-Sagué *et al.*, 1993). Asimismo, se han identificado como agentes etiológicos de infecciones en pacientes inmunodeprimidos, algunos hongos que habían sido considerados tradicionalmente no patógenos, como algunas especies de *Candida* y de *Fusarium* (Fridkin y Jarvis, 1996; Perfect y Schell, 1996).

De manera similar han aumentado las infecciones fúngicas por hongos oportunistas en pacientes no hospitalizados, denominadas infecciones comunitarias, especialmente en la población infectada por el VIH. Los datos recogidos en España durante el periodo 1990-

1994 por el estudio EPINE (Sociedad Española de Higiene y Medicina Preventiva Hospitalarias y Grupo de Trabajo Epincat, 1995), han revelado un incremento desde el 4% del total de infecciones declaradas en los años anteriores a 1992, hasta el 7,9% en 1994. Los hongos patógenos más frecuentes en estos pacientes han sido *C. albicans* y otras especies de *Candida*.

Las infecciones provocadas por los hongos de regiones endémicas como *H. capsulatum*, *C. immitis* y *B. dermatidis*, también se han incrementado como consecuencia del aumento de la población infectada por el VIH y del turismo en las regiones endémicas. Estudios recientes han identificado infecciones provocadas por *H. capsulatum* y *C. immitis* en el 50 y 25% respectivamente, de los pacientes con SIDA que habitan en las regiones endémicas (Ampel, 1996).

## 2. ANTIFÚNGICOS DE USO CLÍNICO ACTUAL

El tratamiento de las infecciones fúngicas, ha evolucionado mucho más lentamente que la terapéutica antibacteriana, debido a dos razones fundamentales. Por un lado, los hongos son células eucarióticas, al igual que las células de mamíferos, y comparten con ellas procesos que se han mantenido muy conservados a lo largo de la evolución. Esta similitud ha dificultado la identificación de compuestos capaces de actuar selectivamente sobre las enzimas fúngicas, sin provocar efectos tóxicos sobre las de mamíferos. Por otro lado, la escasa incidencia de infecciones fúngicas, que hasta hace dos décadas se ha mantenido constante, ha propiciado que las industrias farmacéuticas no dedicaran una inversión fuerte al desarrollo de nuevas sustancias antifúngicas.

Actualmente, el incremento de las infecciones provocadas por hongos (Frikdin y Jarvis, 1996), junto con la aparición de resistencias a algunos de los antifúngicos más utilizados (Odds, 1993 y 1996), ha impulsado el interés por la búsqueda de nuevas sustancias que cubran las necesidades terapéuticas actuales. Como consecuencia, se han identificado nuevas moléculas activas, y se han mejorado las características de las ya conocidas, comercializándose algunas de ellas. Estos nuevos fármacos han conseguido mejorar el tratamiento de las infecciones fúngicas superficiales, pero siguen resultando insuficientes para el tratamiento de las infecciones sistémicas, ya que además de ser escasos (tabla 1), poseen limitaciones en cuanto a su espectro de acción, potencia, seguridad y propiedades farmacocinéticas, por lo que se hace necesaria la obtención de nuevos fármacos antifúngicos (Hay, 1993; Graybill, 1996).

Los principales compuestos con actividad antifúngica, disponibles en el mercado para el tratamiento clínico de infecciones por hongos, actúan a dos niveles fundamentales (figura 1): (i) a nivel de la membrana plasmática, provocando alteraciones bien por interacción directa con ella, como es el caso de los compuestos poliénicos, o bien mediante la inhibición de la biosíntesis del ergosterol, como los derivados azólicos, las alilaminas, los tiocarbamatos, y las morfolininas, y (ii) a nivel de la biosíntesis de los ácidos nucleicos, como las fluoropirimidinas. También, se dispone de otras sustancias antifúngicas que actúan a diferentes niveles metabólicos (figura 1), y que poseen aplicación clínica en determinadas situaciones, como es la griseofulvina que actúa como inhibidor de los procesos de agregación de microtúbulos (Georgopapadakou y Walsh, 1996)

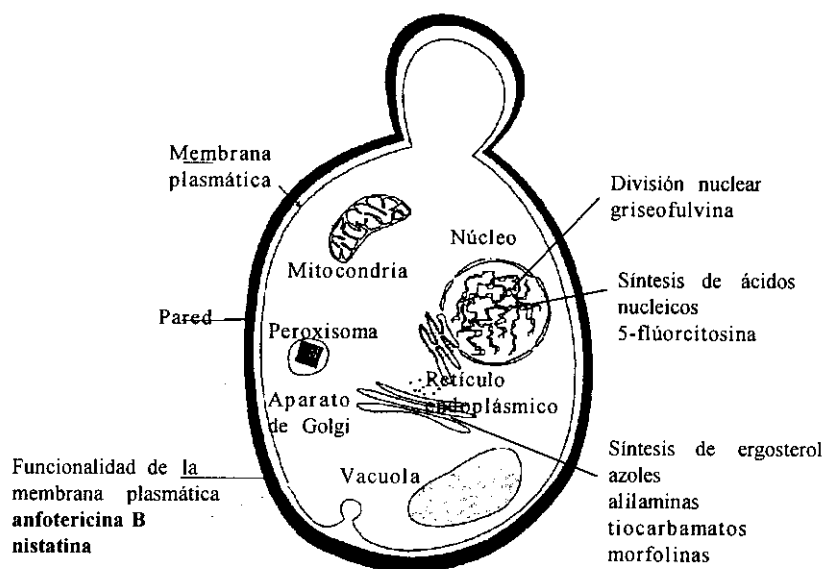


Figura 1: Lugares de acción de los antifúngicos comercializados.

## 2.1. Antifúngicos poliénicos

Los antibióticos poliénicos, son moléculas producidas por diferentes especies de *Streptomyces*. Poseen actividad fungiestática o fungicida dependiendo de la concentración utilizada y de la sensibilidad del organismo implicado. Su espectro de acción es el mayor de todos los antifúngicos disponibles en la actualidad (Brajtburg *et al.*, 1990; Gallis *et al.*, 1990). Se muestran activos frente a patógenos frecuentes, como son diversas especies de *Candida*, *C. neoformans*, *A. fumigatus*, *H. capsulatum*, y *P. brasiliensis*. Sin embargo, los dermatofitos y los hongos dematiáceos son considerados resistentes.

La anfotericina B (figura 2), es uno de los fármacos más utilizados en la actualidad para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas. Es capaz de interactuar con los esteroides de las membranas plasmáticas de los hongos y de los mamíferos. Su relativa especificidad hacia las células fúngicas, viene determinada por su mayor afinidad hacia el ergosterol, esteroide mayoritario de la membrana plasmática de muchos hongos, que por su homólogo en mamíferos, el colesterol. La anfotericina B, se une a estos componentes estructurales de la membrana plasmática originando desorganizaciones, posiblemente mediante la formación de poros hidrofílicos o canales, constituidos por pequeños agregados de la anfotericina B y el esteroide (Urbina *et al.*, 1987). Como consecuencia, se producen alteraciones en la permeabilidad para los protones, salida de los iones potasio intracelulares, y la muerte celular. Recientemente, también se le ha atribuido lesiones oxidativas en la membrana plasmática, lo cual podría contribuir a su actividad fungicida (Brajtburg *et al.*, 1990).

Su utilización clínica está limitada por los efectos secundarios que origina en los pacientes tratados. Es frecuente una toxicidad a nivel renal, que se incrementa cuando se utiliza junto a otros agentes potencialmente nefrotóxicos, como son los antibióticos aminoglicósidos o las ciclosporinas, y en pacientes con alteraciones renales de base. Para evitar los efectos secundarios, se han intentado realizar modificaciones estructurales de su molécula, pero han resultado infructuosas. Sin embargo, las nuevas formulaciones farmacéuticas en las que la droga se suministra en el interior de liposomas (Adler-Moore y Proffitt, 1993), han dado buenos resultados clínicos, permitiendo la administración de dosis superiores del antifúngico, con menores efectos tóxicos renales.

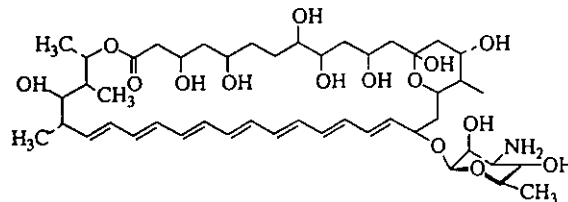


Figura 2: Estructura química de la anfotericina B

La nistatina (figura 3) es una molécula estructuralmente similar a la anfotericina B, que actúa como fungiestático sobre hongos dermatofitos y levaduras, aunque su acción sobre los primeros es moderada. En la actualidad solamente se dispone de formulaciones de aplicación tópica, aunque la nistatina liposomal está en avanzado proceso de desarrollo (Walsh *et al*, 1996).

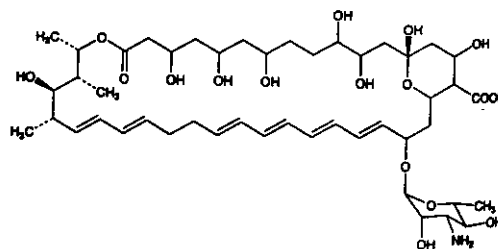


Figura 3: Estructura química de la nistatina

## 2.2. Derivados azólicos

Son compuestos sintéticos que han sufrido un desarrollo importante en los últimos años (Fomtling, 1988). Poseen en su estructura química un anillo azólico, que puede tener dos nitrógenos, en el caso de los imidazoles, como el miconazol y el ketoconazol, o tres nitrógenos, en el caso de los triazoles, como fluconazol e itraconazol (figura 4). Actúan mayoritariamente como fungiestáticos sobre un amplio grupo de hongos tanto levaduriformes como filamentosos. En los ensayos realizados *in vivo* se muestran activos frente a la mayoría de los hongos causantes de infecciones sistémicas, como son *C. neoformans*, *C. albicans*, *C. immitis*, *H. capsulatum*, *B. dermatidis*, *P. brasiliensis* y *S. schenckii*. Son menos activos frente a algunas levaduras como *C. krusei* y *Torulopsis glabrata* (Polak, 1990; Georgopapadakou y Walsh, 1996).

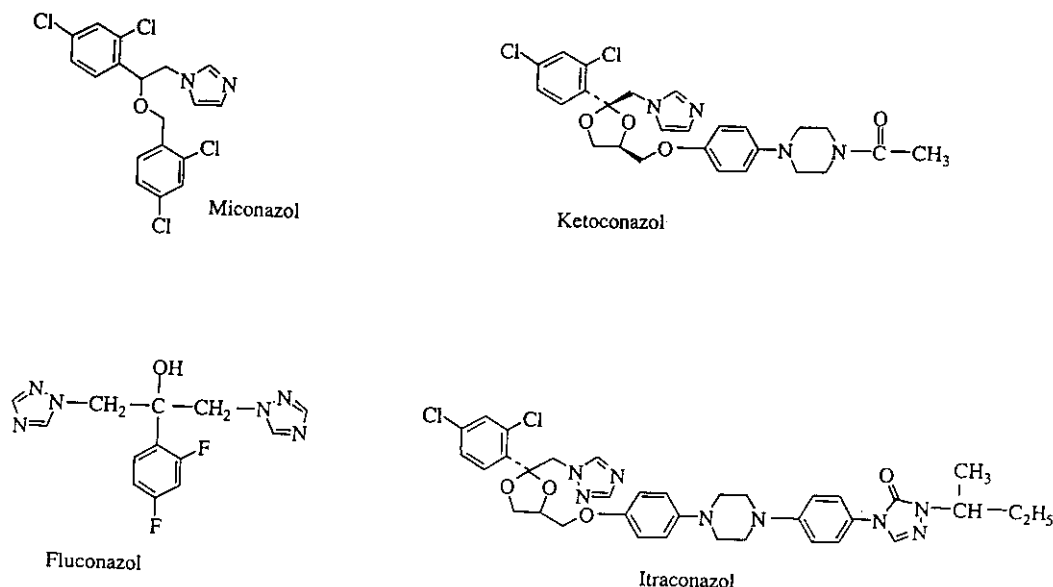


Figura 4: Estructura química de algunos antifúngicos azólicos.

Los derivados azólicos interfieren la biosíntesis del ergosterol, mediante la inhibición de la enzima  $14\alpha$ -lanosterol desmetilasa dependiente del citocromo P-450, que realiza la desmetilación del lanosterol (Polak, 1990) (figura 5). La mayor afinidad de estos compuestos por la enzima de los hongos que por la de mamíferos, les confiere cierta selectividad antifúngica. El bloqueo de la desmetilación del lanosterol, origina una acumulación de este compuesto y una disminución de los niveles normales de ergosterol de la membrana plasmática. Como consecuencia, se produce una modificación de las propiedades físico-químicas de la membrana, y se altera la funcionalidad de algunas de las proteínas asociadas a ella, como son las implicadas en el transporte o aquellas que participan en la síntesis de quitina (Vanden Bossche, 1985). Además, también se modifican otras funciones regulatorias propias del ergosterol, provocando alteraciones en el crecimiento y en la proliferación celular (Parks *et al.*, 1992). También se han observado cambios celulares a nivel mitocondrial en hongos tratados con este tipo de antifúngicos, ya que el ergosterol es un componente muy abundante de la membrana mitocondrial interna (Vanden Bossche, 1985).

Los derivados imidazólicos, como bifonazol, clotrimazol, econazol, flutrimazol, miconazol, omoconazol, oxiconazol, sertaconazol y tioconazol, pueden interactuar con la membrana plasmática y dañarla directamente, además de interferir con el proceso biosintético del ergosterol (Fromtling, 1988). Son fungicidas a elevadas concentraciones y tóxicos para el huésped, por lo que se suelen utilizar a nivel tópico a excepción del ketoconazol.

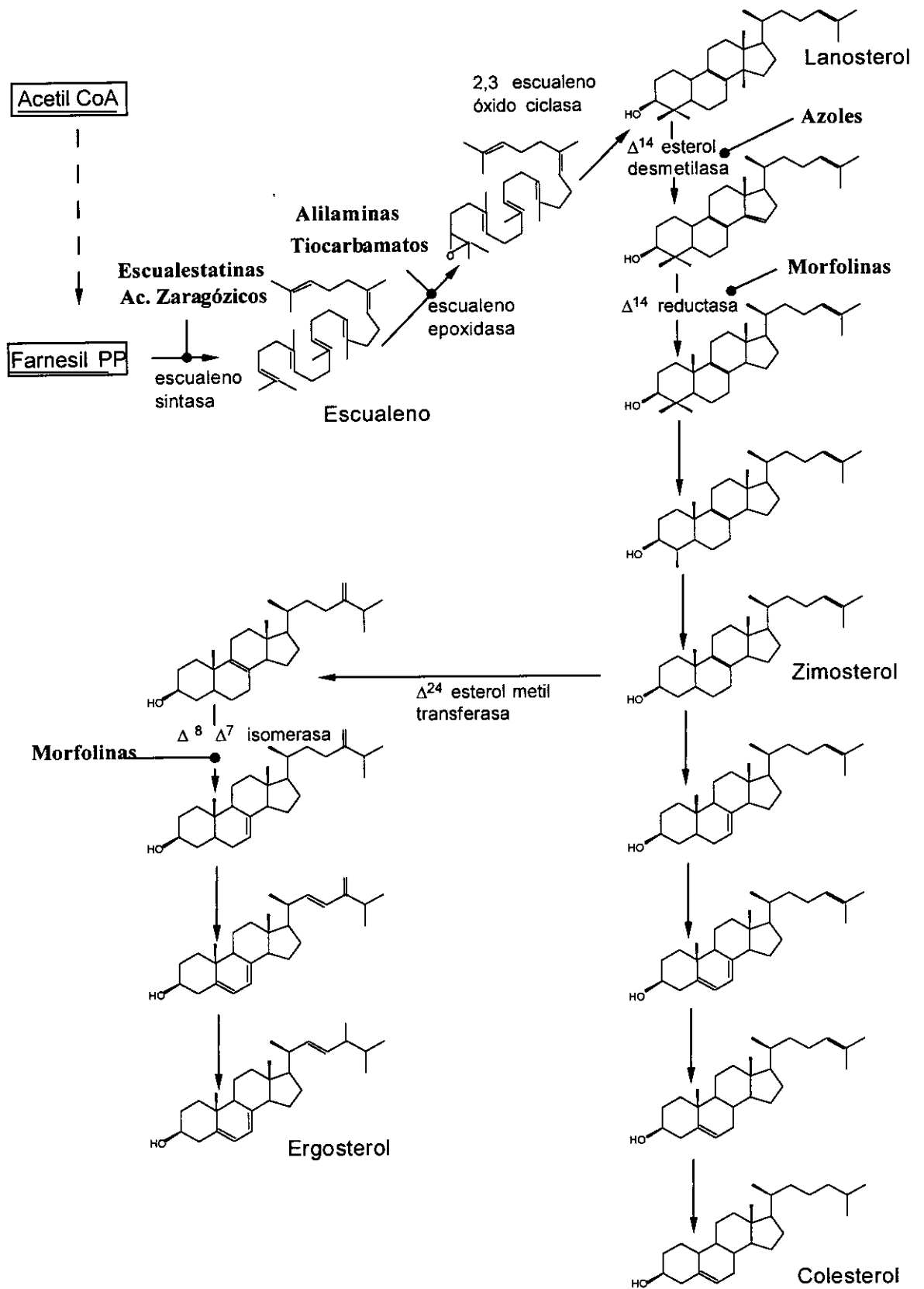


Figura 5: Rutas de biosíntesis del ergosterol y del colesterol, y lugares de acción de algunos antifúngicos.

Los derivados triazólicos, además de presentar actividad antifúngica frente a la mayoría de los hongos patógenos, poseen unas buenas características farmacocinéticas y una baja toxicidad, que les permiten ser utilizados actualmente como tratamiento de elección en las micosis sistémicas en pacientes inmunocompetentes. Entre ellos destaca el fluconazol, que puede ser administrado vía oral y vía intravenosa, y el itraconazol, que presenta en los ensayos *in vitro*, una mayor actividad sobre *Aspergillus*, aunque su baja solubilidad en agua impide su administración intravenosa y dificulta su absorción oral (Richardson, 1993). A pesar de que su actividad fungistática sobre los hongos podría limitar su utilidad en pacientes con sistema inmunológico deprimido, los resultados experimentales han demostrado, que se muestran efectivos en el tratamiento de las micosis sistémicas en este tipo de pacientes, por lo que su utilización es cada vez más frecuente (Ampel, 1996).

Los derivados azólicos, no producen gran toxicidad, pero sí se han detectado efectos secundarios sobre el sistema endocrino, como consecuencia de la inhibición de otras enzimas dependientes del citocromo P-450 de mamíferos, que participan en la síntesis de hormonas esteroideas (Hanger *et al.*, 1988). Estos efectos, son más pronunciados con los imidazoles que con los triazoles.

### 2.3. Alilaminas y Tiocarbamatos

Las alilaminas y los tiocarbamatos, son agentes antifúngicos sintéticos, con acción fungicida sobre la mayoría de los hongos patógenos, y especialmente activos frente a los hongos dermatofitos (Petranyi *et al.*, 1987). Su actividad sobre hongos levaduriformes es inferior, especialmente frente a *C. albicans*, sobre la que tiene actividad fungistática. En la actualidad se dispone de dos antifúngicos de tipo alilaminas: la naftifina, de aplicación tópica, y la terbinafina, de administración oral y tópica (Ryder, 1988), y de un antifúngico de tipo tiocarbamato, el tolnaftato, también de uso tópico (figura 6)

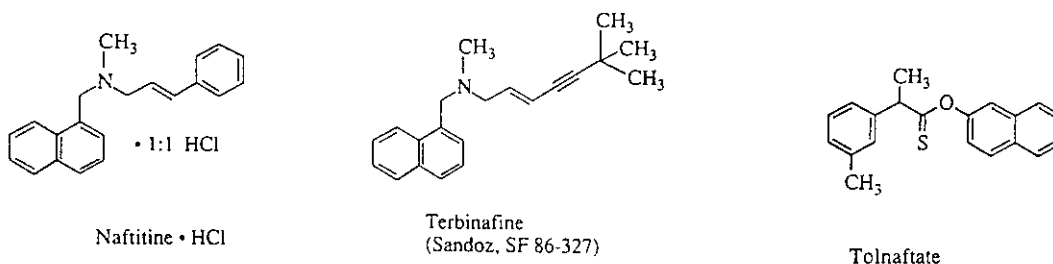


Figura 6: Estructura química de alilaminas y tiocarbamatos de uso clínico

Los tres compuestos actúan como inhibidores reversibles no competitivos de la escualeno epoxidasa, enzima independiente del citocromo P-450, que participa en la biosíntesis del ergosterol en los hongos, y del colesterol, en los mamíferos, (figura 5). La afinidad de estos compuestos por la enzima fúngica es superior a la mostrada por su homóloga en mamíferos, por lo que presentan una actividad selectiva sobre los hongos. La carencia de ergosterol y la acumulación de escualeno, provocan modificaciones en la estructura celular, como un engrosamiento de la pared celular, y alteraciones en la membrana plasmática, así como en la funcionalidad de las proteínas asociadas a ella. La toxicidad de estos compuestos es inferior a la de los derivados azólicos, pero su pobre

farmacocinética hace que puedan ser utilizados solamente contra los dermatofitos, a pesar de que las alilaminas tienen una amplia actividad antifúngica *in vitro* (Ryder, 1988).

## 2.4. Morfolinas

Las morfolinas son compuestos sintéticos, que presentan actividad fungistática y fungicida sobre hongos dermatofitos, dimórficos, dematiáceos y levaduriformes, mientras que carecen de actividad frente a *Aspergillus*. El único antifúngico de este tipo disponible para uso clínico es la amorolfina (figura 7), que actúa como fungicida en el tratamiento tópico de infecciones en las uñas.

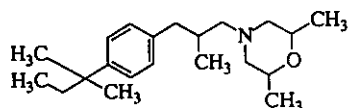


Figura 7: Estructura química de la amorolfina

También interfieren a nivel de la biosíntesis del ergosterol, inhibiendo la  $\Delta^{14}$  esterol reductasa y la  $\Delta^8$ - $\Delta^7$  esterol isomerasa (Baloch y Mercer, 1987) (figura 5), actuando como análogos de los intermediarios carbocatiónicos implicados en ambas reacciones. Como resultado se produce, al menos en *S. cerevisiae*, la alteración de la membrana plasmática como consecuencia de la acumulación de intermediarios metabólicos y depósitos anormales de quitina, probablemente como resultado de una alteración en la actividad de las enzimas implicadas en la biosíntesis de quitina (Kerkenaar, 1987).

Los problemas de toxicidad que presenta, han impedido su utilización en infecciones sistémicas.

## 2.5. Fluoropirimidinas

La 5-flúorcitosina (5-FC, o flucitosina) (figura 8), posee un espectro de acción limitado frente a los hongos patógenos, por lo que suele usarse en combinación con otras moléculas de actividad antifúngica reconocida. La asociación con anfotericina B, permite la obtención de buenos resultados en el tratamiento de las meningitis originadas por *C. neoformans* y en candidiasis diseminadas (Francis y Walsh, 1992). Solamente es usado como agente antifúngico único, en el tratamiento de micosis del tracto urinario, ya que los niveles de 5-FC en esta localización son 100 veces superiores a los del suero.

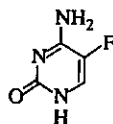


Figura 8: Estructura química de la 5-FC.

La 5-FC actúa como análogo estructural de los metabolitos intermediarios de la biosíntesis de los ácidos nucleicos. La 5-FC es conducida al interior de las células por una citosina permeasa y es desaminada a 5-fluorouracilo (5-FU) mediante una citosina

desaminasa. La baja actividad, o la ausencia de esta última enzima en las células de mamíferos, determina la selectividad de esta molécula sobre los hongos, sin producir efectos tóxicos colaterales. El 5-FU puede seguir dos rutas metabólicas en el interior celular: (i) ser convertido, tras varios intermediarios metabólicos, en 5-fluorouridina trifosfato y competir con la uridina trifosfato para incorporarse al RNA fúngico, y (ii) ser convertido a 5-fluoro-2-deoxiuridina monofosfato, que constituye un potente inhibidor de la síntesis de DNA a nivel de la timidilato sintetasa (Polak, 1990).

Se ha detectado cierta toxicidad en los individuos tratados vía oral, debido probablemente, a la conversión del 5-FC a 5-FU por bacterias intestinales. Además esta toxicidad se eleva considerablemente en presencia de una insuficiencia renal inducida por anfotericina B (Georgopapadakou y Walsh, 1996).

## 2.6. Griseofulvina

La griseofulvina (figura 9) es una molécula producida por ciertas especies de *Penicillium*, como el *P. griseofulvum*. A pesar de que numerosas especies fúngicas no patógenas son sensibles a ella, solamente las infecciones originadas por dermatofitos, responden a este antifúngico de administración oral.

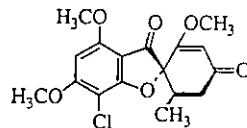


Figura 9: Estructura química de la griseofulvina

La griseofulvina interacciona con las  $\beta$ -tubulinas de las células de los mamíferos y de los hongos (Iwasaki, 1993), y origina una inhibición de los procesos de agregación de los microtúbulos. Las células quedan detenidas en metafase y son incapaces de completar la mitosis. La mayor selectividad de esta droga frente a los hongos, viene determinada por la diferente permeabilidad que muestran las células fúngicas y de mamíferos frente a ella. También existen diferencias en cuanto a la capacidad de penetrar al interior celular de diferentes especies de hongos, resultando inactiva frente a patógenos como *C. albicans* (Polak, 1990).

### 3. LIMITACIONES DE LA TERAPÉUTICA ACTUAL: INCREMENTO DE LAS RESISTENCIAS

El incremento de los hongos causantes de infecciones humanas, que presentan resistencias a los antifúngicos actuales, ha sido corroborado a nivel internacional (Klepser *et al.*, 1997). La reciente aceptación de unas normas generales para la realización de las pruebas de sensibilidad *in vitro* frente a los fármacos disponibles (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 1992; Cormican y Pfaller, 1996), ha permitido comparar los resultados obtenidos en diferentes laboratorios a nivel mundial, y obtener unos datos precisos acerca de las resistencias actuales. Es interesante destacar el incremento de los hongos que presentan resistencia adquirida a los antifúngicos utilizados en tratamientos prolongados. También son cada vez más frecuentes, las infecciones producidas por cepas con resistencia intrínseca a los fármacos disponibles (Rex *et al.*, 1995; Klepser *et al.*, 1997).

#### 3.1. Resistencia a la anfotericina B

La identificación de cepas resistentes a anfotericina B, ha sido muy escasa durante los treinta años de su utilización en el tratamiento de infecciones fúngicas. En los últimos años se han descrito algunas cepas resistentes de *C. albicans* a este antifúngico (Klepser *et al.*, 1997). La mayoría de estas cepas poseen alteraciones en la composición de los lípidos de membrana, como niveles muy bajos de ergosterol (Dick *et al.*, 1980) y modificaciones de los fosfolípidos. Otro mecanismo de resistencia descrito, consiste en una actividad catalasa incrementada que disminuye la susceptibilidad celular al daño oxidativo (Sokol-Anderson *et al.*, 1988). Si bien la resistencia a anfotericina B es todavía escasa en *C. albicans*, otras especies de *Candida*, como son *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* y *C. lusitanae*, se comportan frecuentemente como resistentes, especialmente las cepas aisladas de pacientes inmunodeprimidos y que han sido tratados durante periodos largos con este antifúngico (Drutz y Lehrer, 1978). Además, la resistencia intrínseca a la anfotericina B, es común en hongos de incidencia creciente como son *C. krusei*, *T. glabrata* y diversas especies de *Trichosporon* y de *Fusarium* (Meunier, 1995).

#### 3.2. Resistencia a los derivados azólicos

La utilización frecuente de los derivados azólicos en el tratamiento de infecciones fúngicas de carácter sistémico, ha generado la aparición de cepas resistentes a este tipo compuestos. Así, se han aislado cepas de *Candida* resistentes a ketoconazol, en pacientes infectados que habían sido tratados durante varios meses con la droga (Odds, 1993; Vanden Bossche *et al.*, 1994). La resistencia a fluconazol, ha sido demostrada en aislamientos de *C. albicans*, procedentes de enfermos con SIDA y candidiasis orofaríngea (Dupont, 1993), y en otras especies de *Candida* y *C. neoformans*. La falta de experiencia clínica en la utilización del itraconazol, no ha permitido establecer, hasta el momento, la frecuencia de la aparición de cepas resistentes en los pacientes tratados con este antifúngico.

Los estudios moleculares orientados al conocimiento de los mecanismos de resistencia a los azoles, han identificado tres mecanismos diferentes:

(i) Disminución de la concentración intracelular de antifúngico, como consecuencia de una menor entrada del antifúngico al interior celular, o debido a un incremento de su transporte hacia el exterior. Estudios recientes apoyan al último mecanismo como la principal causa de la disminución de la concentración intracelular de la droga (Parkinson *et al.*, 1995).

(ii) Superproducción de las enzimas dependientes del citocromo P-450, posiblemente por amplificación génica (Vanden Bossche *et al.*, 1994). El incremento de las moléculas que constituyen las dianas antifúngicas, requiere la presencia de una mayor cantidad de la droga para la producción de los mismos efectos inhibitorios.

(iii) Alteraciones estructurales de la diana, de manera que disminuye su interacción con el antifúngico (Vanden Bossche *et al.*, 1994).

Además, algunos hongos de incidencia creciente, como *C. krusei*, *Aspergillus* y *Fusarium*, presentan una resistencia intrínseca a derivados azólicos, como el fluconazol.

### **3.3. Resistencias a la 5-FC**

El uso de la 5-FC como agente único ha generado con elevada frecuencia, la aparición de cepas resistentes a este antifúngico. La resistencia está determinada por la mutación en cualquiera de las enzimas necesarias para la acción de la 5-FC, particularmente la uracil fosforribosiltransferasa (Fasoli y Kerridge, 1988). Por este motivo, debe asociarse a la anfotericina B para su utilización clínica.

### **3.4. Resistencias a la griseofulvina**

Se han descrito cepas resistentes a la griseofulvina, que poseen alteraciones en los mecanismos de transporte del antifúngico al interior celular. En estos casos la concentración intracelular del compuesto resulta insuficiente para conseguir su acción antifúngica (Polak, 1990).

## **4. NUEVAS PERSPECTIVAS EN EL TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES FÚNGICAS**

El incremento de las especies resistentes a los antifúngicos actualmente disponibles, así como el aumento de las infecciones fúngicas producidas por hongos, cuyo poder patógeno era desconocido anteriormente, ha puesto de manifiesto la limitación del arsenal antifúngico actual (Graybill, 1996). Además, la aparición de una población cada vez más numerosa de pacientes con alteraciones en el sistema inmunitario, que obliga a la utilización prioritaria de sustancias fungicidas frente a las fungiestáticas (Meunier, 1995; Graybill, 1996), junto con los problemas farmacocinéticos y de toxicidad de los antifúngicos comercializados que limitan su uso clínico, han motivado la investigación y desarrollo de nuevas alternativas para el tratamiento de estas infecciones (Graybill, 1996):

- Descubrimiento de nuevos antifúngicos.
- Modificación y mejora de los antifúngicos conocidos.
- Terapia combinada.
- Inmunomodulación.

#### **4.1. Descubrimiento de nuevos antifúngicos**

Durante los últimos años, se ha producido un incremento importante de los fármacos antifúngicos disponibles, debido al creciente interés mostrado por la industria farmacéutica en combatir las infecciones fúngicas. Las aproximaciones adoptadas para el descubrimiento de nuevos antifúngicos difieren de las utilizadas hace unos años, como consecuencia del mayor conocimiento a nivel genético y molecular de los hongos, y de la automatización de todos los procesos realizados. En la actualidad, se tiende a realizar un diseño racional de la droga, buscando compuestos que actúen sobre una enzima fúngica previamente seleccionada y que cumplan la mayoría de unos requisitos deseables que se indican a continuación (Marriot, 1990):

- Selectividad sobre la diana fúngica
- Amplio espectro de acción, que incluya hongos levaduriformes, filamentosos, oportunistas y endémicos
- Acción fungicida
- Ausencia de toxicidad en el huésped
- Elevado tiempo de vida media en el plasma
- Escasa unión a proteínas plasmáticas
- Buena distribución por todos los tejidos del organismo y en el líquido cefalorraquídeo
- Disponible en formulaciones orales y parenterales
- Ausencia de interacciones con el metabolismo de otros fármacos

El proceso de descubrimiento de nuevos antifúngicos es largo, complejo y caro, y requiere normalmente más de diez años para que un compuesto, considerado de interés por su actividad específica sobre una enzima fúngica, pueda estar disponible en el mercado. Este proceso es comentado con detalle más adelante en este trabajo.

#### **4.2. Modificación y mejora de los antifúngicos conocidos**

La mayoría de los antifúngicos disponibles en la actualidad, presenta alguna característica que dificulta su uso en pacientes con infecciones fúngicas. Las modificaciones estructurales de sus moléculas, así como posibles cambios en la formulación de los principios activos, podrían mejorar las propiedades de los compuestos con poder antifúngico reconocido, pero cuyas propiedades farmacocinéticas y de toxicidad limitan su utilización terapéutica (Marriot, 1990). Además, su espectro de acción podría ser ampliado, de manera que resultaran activos frente a la mayoría de los patógenos actuales (Boyle, 1990).

La modificación estructural de aquellos que presenten problemas farmacocinéticos, como escasa absorción o elevada degradación metabólica, podría generar compuestos de igual o mayor actividad, pero con unas características que mejoraran su potencial terapéutico. Los nuevos imidazoles, como fluconazol e itraconazol, son un ejemplo claro de la mejora conseguida mediante la adición de nuevos radicales a la estructura básica de los imidazoles primitivos, de actividad muy limitada (Tarbit, 1990). Por otro lado, los problemas de toxicidad, mostrados por la anfotericina B, junto a su escasa absorción vía oral, han dado lugar a frecuentes fracasos terapéuticos, a pesar de presentar actividad *in vitro* sobre la mayoría de los hongos patógenos. Sin embargo, a pesar de que las modificaciones realizadas en la estructura de la anfotericina B no han conseguido mejorar estas características, el desarrollo de formulaciones farmacéuticas en las que la droga se administra en el interior de liposomas (Adler-Moore y Proffitt, 1993), han permitido administrar dosis superiores de anfotericina B, sin provocar efectos tóxicos importantes.

#### 4.3. Terapia combinada

Algunos fármacos antifúngicos son capaces de potenciar su actividad cuando son utilizados de manera combinada. La utilización conjunta de diferentes antifúngicos que actúen sobre diferentes dianas, podría aumentar la potencia de cada uno de ellos, de manera que resultaran activos sobre la mayoría de los agentes patógenos. Al mismo tiempo se dificultaría la aparición de cepas resistentes. Diferentes combinaciones de los antifúngicos disponibles en la actualidad han sido evaluados *in vitro* e *in vivo*, y se han identificado algunas combinaciones de fármacos, que presentan un aumento en el espectro de acción sobre los patógenos fúngicos, y una mejora en la evolución de los pacientes tratados con este tipo de terapia, en comparación con la terapia única. Estas combinaciones incluyen: (i) la utilización de compuestos que afectan a diferentes estructuras celulares, (ii) compuestos que actúan sobre la misma estructura celular, como es la membrana plasmática.

(i) El uso de una terapia combinada, ha quedado establecida para el tratamiento de algunas infecciones como la meningitis criptocócica, mediante la combinación de anfotericina B y 5-FC, comentado con anterioridad en este trabajo. Sin embargo la nefrotoxicidad de la anfotericina B, origina una acumulación de 5-FC que origina efectos secundarios en el paciente, por lo que se han buscado nuevas combinaciones, como 5-FC y fluconazol, cuya utilización conjunta incrementa la actividad que poseen cada uno por separado frente a diversos aislamientos de *C. neoformans in vitro* (Nguyen *et al.*, 1995). Los regímenes orales de esta combinación, han mostrado los mismos efectos aditivos en modelos animales, sin embargo, en los estudios humanos con pacientes con meningitis criptocócica e infecciones por *C. albicans* y *C. tropicalis*, los resultados han sido contradictorios (Graybill, 1996). Por otro lado, la efectividad del uso conjunto de triazoles y compuestos que inhiben la biosíntesis de la pared celular, como son papulacandina B y nikkomicinas, ha quedado demostrada *in vitro*, aunque su eficacia en el tratamiento de infecciones fúngicas en humanos, todavía no está claramente definida (Sugar *et al.*, 1995).

(ii) La combinación de fluconazol y anfotericina B, ha mostrado una mayor efectividad en el tratamiento de infecciones sanguíneas por *Candida* en modelos animales y en humanos, que la utilización de la anfotericina B como único antifúngico (Sugar *et al.*, 1994). Otra combinación de ketoconazol y naftifina, ha mostrado un incremento de la actividad sobre numerosos hongos, especialmente sobre los filamentosos, aunque este efecto no ha podido ser verificado en modelos animales y humanos (Sud y Feingold, 1985).

#### 4.4. Inmunomodulación

La mejora de la respuesta inmune del huésped frente al agente causante de la infección, es otra de las alternativas actualmente en desarrollo para el tratamiento de las infecciones fúngicas (Georgopadakou y Walsh, 1996; Graybill, 1996).

La inmunización activa y pasiva mediante la utilización de vacunas y anticuerpos, constituye una estrategia prometedora, tanto para la prevención como para el tratamiento de infecciones fúngicas. Los antígenos capsulares de *C. neoformans*, *C. immitis* e *H. capsulatum* poseen una elevada inmunogenicidad, por lo que podrían ser utilizados como vacunas. Asimismo, diversas proteínas inducidas en los hongos como respuesta a diferentes tipos de estrés (*Heat shock proteins*), como la Hsp90 de *C. albicans*, son capaces de provocar una respuesta inmune importante del organismo al que infectan, por lo que también podrían tener utilidad como vacunas (Suzue y Young, 1996).

La utilización de citoquinas humanas recombinantes, ha disminuido la granulocitopenia de pacientes sometidos a terapias con fármacos citotóxicos, y ha reducido la incidencia de las infecciones fúngicas sufridas por un grupo de pacientes inmunodeprimidos (Rowe *et al.*, 1995; Graybill, 1996). De este modo ha quedado demostrado su interés para la profilaxis de infecciones fúngicas en este tipo de pacientes, aunque todavía no ha sido determinada su posible efectividad en el tratamiento de infecciones ya establecidas (Walsh *et al.*, 1996).

### 5. DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS ANTIFÚNGICOS

Las primeras aproximaciones al descubrimiento de nuevos fármacos antifúngicos, consistieron en el estudio del comportamiento empírico de un pequeño grupo de hongos patógenos, frente a una colección de compuestos no muy numerosos y obtenidos en su mayoría de la fermentación de microorganismos y de extractos de plantas (Debono y Gordee, 1990). Aquellos compuestos que inhibían el crecimiento fúngico, o producían importantes alteraciones celulares, eran seleccionados para posteriores estudios. A pesar de que la mayoría de los antifúngicos actuales han sido detectados mediante esta aproximación empírica, las demandas de la industria farmacéutica actual, en cuanto al número y velocidad de salida de nuevos fármacos al mercado, han obligado a la utilización de tecnologías de elevado rendimiento, difícilmente aplicables utilizando esta aproximación (Broach y Thorner, 1996). Sin embargo, la identificación de las dianas sobre las que actúan los compuestos seleccionados de esta manera, ha sido el punto de partida para el desarrollo de las estrategias racionales orientadas a la búsqueda de nuevos antifúngicos, que se utilizan mayoritariamente en la actualidad (Debono y Gordee, 1990).

La aproximación racional al descubrimiento de compuestos activos, requiere en primer lugar, la identificación de potenciales dianas antifúngicas. *A priori*, tienen interés como posibles dianas, todas aquellas moléculas o estructuras, que además de estar implicadas directamente en procesos relacionados con la proliferación y viabilidad celular, sean exclusivas de los hongos, o presenten diferencias significativas con las de mamíferos. También es necesario disponer de una colección numerosa de compuestos para enfrentar a la diana, y determinar su interacción con ella, de manera que su número y variabilidad es

decisivo para que exista una probabilidad razonable de encontrar alguno activo. Sin embargo, la posibilidad de diseñar moléculas antifúngicas a partir del conocimiento tridimensional de la diana sobre la que deben actuar, podría reducir el número de compuestos analizados, limitándose a pequeñas modificaciones de una estructura activa (Blundell, 1996). El estudio de la potencia y selectividad de los compuestos activos permite seleccionar aquellos que son interesantes y cuya estructura química es posteriormente determinada. En el caso de que la información obtenida tras el conocimiento de su estructura química y otros datos bioquímicos, sugiera su posible uso terapéutico, se realizan procesos de optimización del producto, encaminados a disminuir su toxicidad y mejorar su farmacocinética. Los ensayos realizados *in vitro* permiten conocer el espectro de acción del compuesto, y los ensayos *in vivo* con animales, verifican si el producto se comporta en estos modelos de la manera esperada. Finalmente, los estudios en humanos, son los que determinan si un compuesto con actividad antifúngica, y en una formulación determinada, puede ser comercializado para ser utilizado en la terapéutica humana (Ryley y Barret-Bee, 1992).

El descubrimiento de nuevos fármacos antifúngicos, es un proceso complejo y lento, que requiere un periodo medio superior a diez años, desde que se inician las primeras etapas de investigación básica, hasta que el producto puede estar disponible en el mercado (figura 10). El correcto desarrollo de cada una de las etapas implicadas en el proceso, así como la disponibilidad de un soporte automatizado e informatizado, son elementos clave de los que dependerán los resultados finales obtenidos.

Especialistas en diversas disciplinas científicas, como son microbiología, biología molecular, farmacología y química, participan en el proceso de desarrollo de nuevos antifúngicos, trabajando de una manera coordinada en las diferentes etapas concretas del proceso (figura 11).

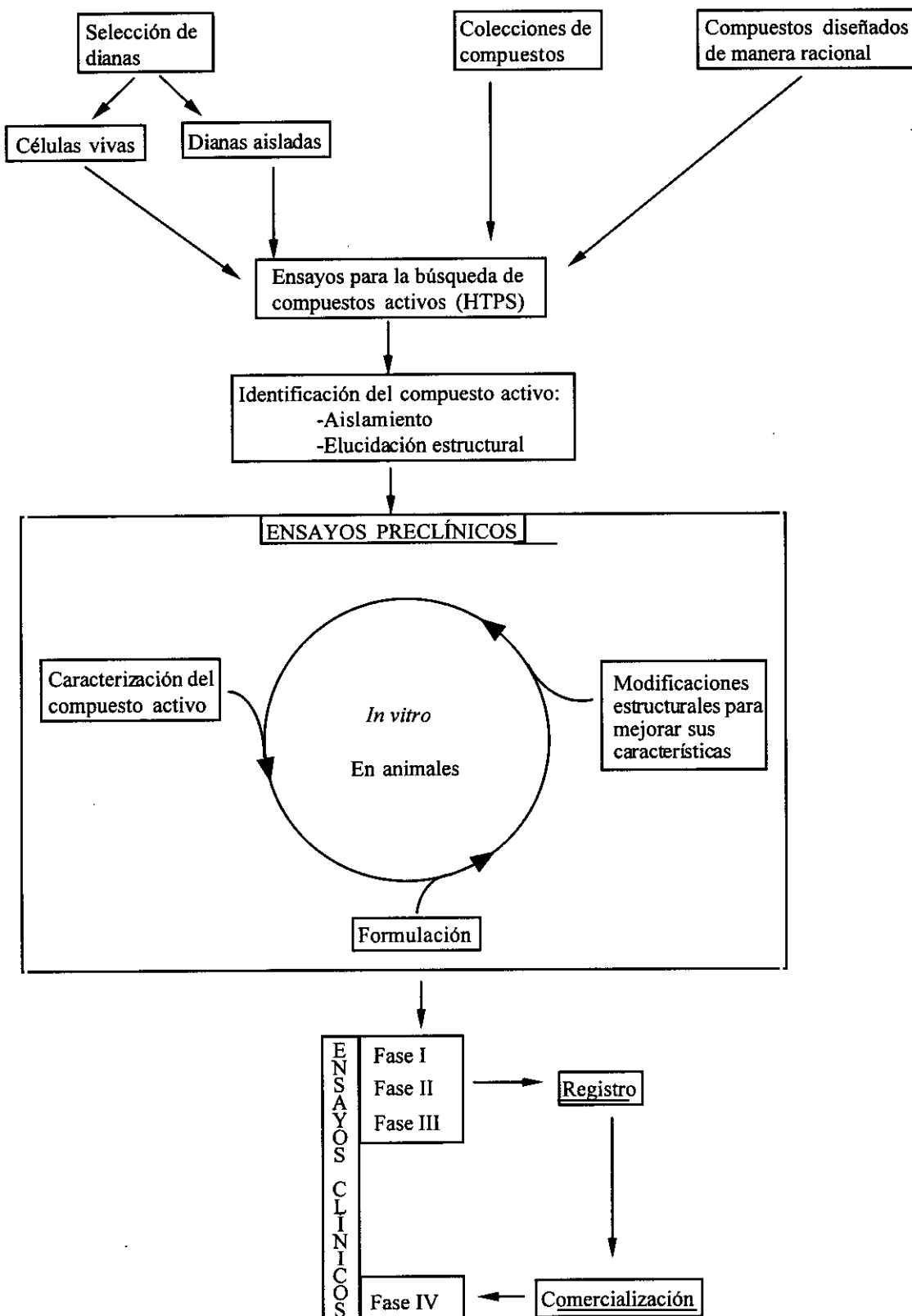


Figura 10: Etapas del proceso de descubrimiento de nuevos antifúngicos

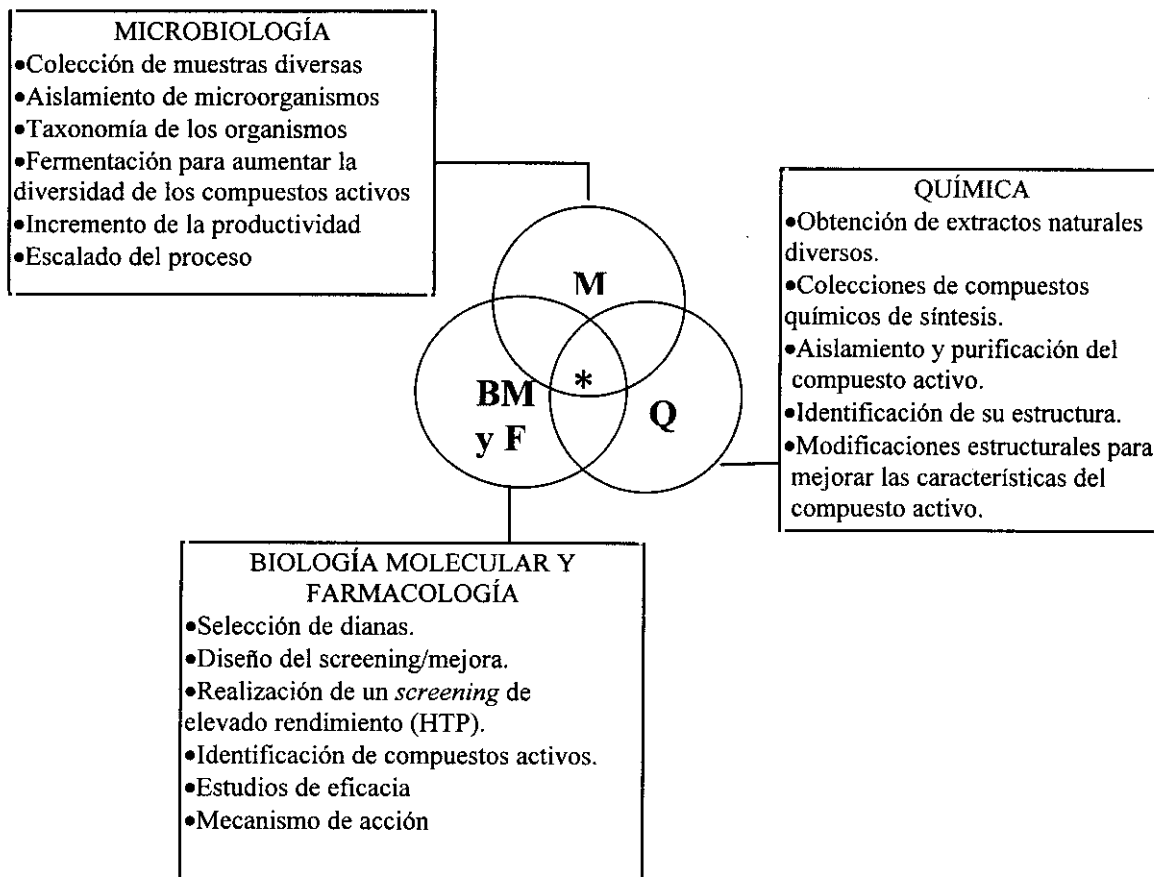


Figura 11: Disciplinas científicas necesarias para un programa de descubrimiento de nuevos antifúngicos y tareas asignadas. \* Equipo integrado de trabajo para el descubrimiento de dianas antifúngicas

### 5.1. Dianas biológicas de interés

La mayoría de los antifúngicos comercializados actualmente actúan inhibiendo selectivamente los procesos relacionados con la membrana plasmática, como se ha comentado con anterioridad en este trabajo. Sin embargo, los hongos poseen numerosas estructuras y proteínas exclusivas, o con propiedades diferentes a las de mamíferos, que podrían constituir nuevas dianas. La selección de aquellas frente a las cuales se podrían buscar compuestos activos, constituye el primer paso en el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos antifúngicos. Las moléculas seleccionadas deben cumplir algunos de los requisitos deseables para presentar ciertas posibilidades de éxito como dianas antifúngicas con aplicación terapéutica (Kerridge y Vanden Bossche, 1990):

(i) La diana elegida deber ser esencial para el crecimiento del hongo. No siempre es necesario provocar la muerte del hongo, ya que si su crecimiento resulta enlentecido, el balance entre huésped y patógeno puede ser alterado lo suficiente para permitir que las defensas del huésped eliminen al hongo. Por el contrario, en individuos inmunodeprimidos, sí es necesario destruir al patógeno para prevenir las recaídas que ocurren tras la finalización del tratamiento.

(ii) Debe ser selectiva para que el huésped lo tolere a la concentración requerida en el lugar de la infección. Teóricamente, las sustancias capaces de actuar a nivel de

estructuras o procesos exclusivos de hongos, poseerán una actividad selectiva y ausencia de toxicidad. Sin embargo, no es necesaria la ausencia de la diana fúngica elegida en las células de mamíferos, siendo suficiente para una actividad antifúngica selectiva, que ambas estructuras homólogas presenten una afinidad diferencial por las sustancias inhibidoras.

(iii) Debe tenerse en cuenta que la diana resulte fácilmente accesible a la droga, ya que todos los organismos eucarióticos muestran una compartimentación intracelular de las funciones metabólicas.

(iv) Los ensayos de interacción *in vitro* entre la molécula elegida como diana y sus posibles compuestos inhibidores, deben ser sencillos de realizar y fácilmente automatizables. El conocimiento de la actividad de la diana elegida, facilita el diseño del ensayo, así como su obtención en gran cantidad y en estado puro y activo, es indispensable para la realización de los ensayos de elevado rendimiento (HTP).

Las dianas elegidas pueden ser directamente purificadas y utilizadas para la búsqueda de inhibidores selectivos mediante estudios *in vitro* a gran escala, o bien, tras un estudio detallado de ellas, diseñar drogas nuevas y realizar modificaciones de los compuestos activos conocidos, para conseguir un aumento de su selectividad, su potencia y la disminución de sus efectos tóxicos sobre las células de mamíferos.

Los conocimientos actuales sobre el metabolismo de los hongos y de los mamíferos, a pesar de no ser completo, ha permitido identificar algunos procesos metabólicos con características diferenciales entre ellos. Algunas de las enzimas o factores implicados en estos procesos, y que cumplen la mayoría de los requisitos básicos anteriormente mencionados, han sido seleccionadas como dianas antifúngicas, ya que el conocimiento bioquímico de los procesos en los que participan, las presentan como dianas selectivas para los hongos. Por otro lado, el creciente conocimiento del genoma de los hongos, ha permitido seleccionar nuevas dianas antifúngicas a partir de genes cuyos productos génicos bien son exclusivos para estas especies, o bien poseen suficientes diferencias con sus homólogos en mamíferos como para suponer su posible inhibición selectiva.

### **5.1.1. Selección de dianas según criterios bioquímicos.**

Las dianas fúngicas que han sido seleccionadas según sus diferencias bioquímicas con las células de mamíferos son numerosas y variadas (figura 12). Algunas de ellas han permitido identificar algunos compuestos con actividad antifúngica, cuya posible utilización terapéutica está siendo evaluada en la actualidad.

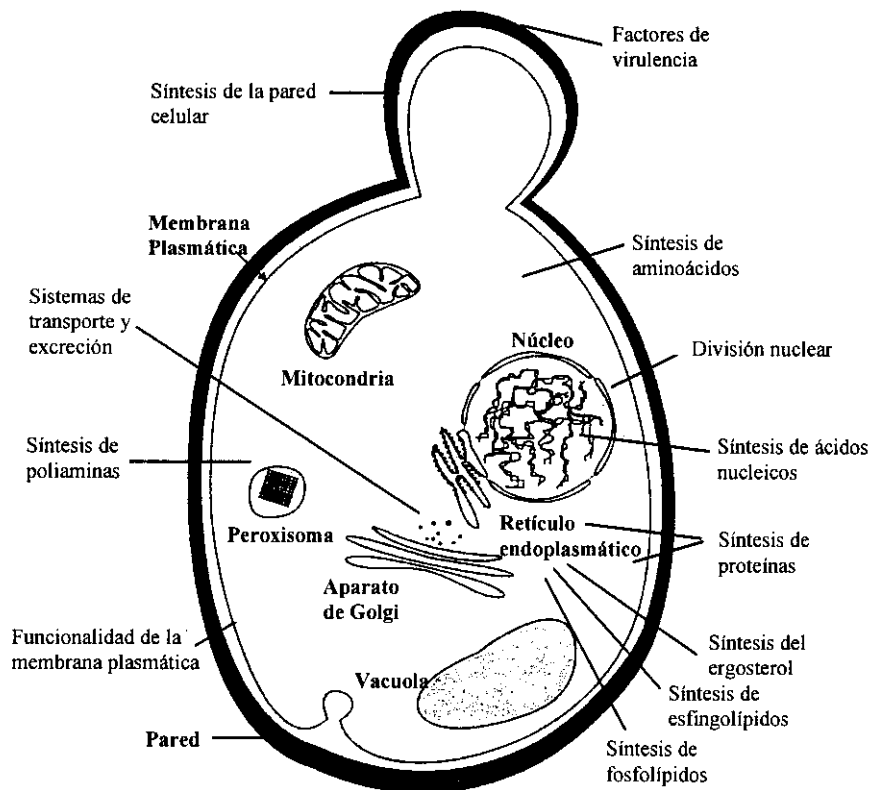


Figura 12: Potenciales dianas de nuevos antifúngicos

### 5.1.1.1. Pared celular

La pared fúngica constituye una diana de interés para la búsqueda de agentes antifúngicos, ya que es una estructura esencial para los hongos, que se encuentra ausente en las células de mamíferos. La pared celular rodea externamente a las células fúngicas, confiriéndoles su morfología característica y protegiéndolas de las agresiones físicas y químicas del entorno, así como de las enzimas líticas. Regula la entrada y la salida de moléculas, retiene en el espacio periplásmico diversas proteínas, previene a la célula de la desecación, participa en la adherencia y aglutinación, y juega un papel importante en la patogenicidad (Rhodes, 1988).

La composición de la pared celular es característica de cada especie fúngica (tabla 2) e incluso varía entre las diferentes formas, levaduriforme y filamentosa, adoptadas por un mismo hongo (Debono y Gordee, 1994). Posee una estructura multilaminar compuesta principalmente por varios carbohidratos, que se encuentran en forma libre, o asociados a proteínas o a lípidos, y cuyas proporciones varían entre las diferentes especies de hongos. Los polímeros de N-acetilglucosamina (quitina), de glucosa (celulosa y glucanos) y manosa (mananos), son los polisacáridos más habituales constituyentes de esta estructura. El conocimiento de sus rutas biosintéticas, ha permitido seleccionar algunas enzimas implicadas en etapas fundamentales del proceso, y se han diseñado ensayos *in vitro* con el objeto de buscar sustancias que interaccionen con ellas (Ryley y Barrett-Bee, 1992).

Tabla 2: Composición de la pared de algunos de los hongos patógenos más frecuentes

Hongos patógenos	Composición de la pared
<i>Candida albicans</i>	Manoproteínas, quitina, glucanos $\beta(1-3)$ , $\beta(1-6)$
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Manoproteínas, glucanos $\beta(1-3)$ , $\beta(1-6)$
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Galactomanano, quitina, glucanos $\alpha(1-3)$ , $\beta(1-3)$ , $\beta(1-6)$
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Galactomanano, quitina, glucanos $\alpha(1-3)$ , $\beta(1-3)$ , $\beta(1-6)$
<i>Blastomyces dermatidis</i>	Galactomanano, quitina, glucanos $\alpha(1-3)$ , $\beta(1-3)$
Dermatofitos	Galactomanano, quitina, glucanos solubles en álcali con enlaces $\beta(1-3)$ y $(1-6)$ ; lineales $\alpha(1-4)$ con ramificaciones en $\alpha(1-6)$

## (i) Síntesis de quitina

La quitina es un componente minoritario de la pared celular de levaduras como *S. cerevisiae* y *C. albicans*. Constituye menos del 1% del total de la pared de *C. albicans* en estado levaduriforme, y cerca del 10% en su forma miceliar. Se localiza fundamentalmente en la región del septo, y en las cicatrices que quedan en las células en el lugar de gemación. Las paredes de las formas miceliales de otros hongos dimórficos como *B. dermatidis*, *C. immitis* e *H. capsulatum*, también poseen un 10-20% de quitina, que se localiza en la región apical de la hifa.

La quitina está constituida por un homopolímero lineal de residuos de  $\beta(1-4)$ -N-acetilglucosamina (GlcNAc), sintetizado en la cara citoplasmática de la membrana plasmática. Es secretado al exterior celular, donde se agrega en forma de rígidas fibrillas formando enlaces de hidrógeno entre sí, con el glucano y con diversas manoproteínas que se disponen entre ellas. Las enzimas que se encargan de la polimerización de las subunidades de GlcNAc son exclusivas de los hongos y se denominan quitín sintetasas (Chs). Estas enzimas están asociadas a la membrana plasmática, y han sido encontradas como zimógenos en homogeneizados celulares (Cid *et al.*, 1995). Se conocen varias actividades quitín sintetasas en *S. cerevisiae* y *C. albicans* :

- Actividad quitín sintetasa 1, codificada por *CHS1*, es la responsable de reparar los daños en el septo primario y en la cicatriz de gemación, producidos durante el proceso de separación celular (Kang *et al* 1984).

- Actividad quitín sintetasa 2, codificada por *CHS2*, está implicada en la formación del septo primario (Silverman, 1988), y en la síntesis de la quitina de *C. albicans* durante su fase miceliar.

- Actividad quitín sintetasa 3, codificada por *CHS3*, que con la ayuda de las proteínas codificadas por *CHS4* y *CHS5*, parece ser la responsable de la biosíntesis de la mayoría de la quitina de la pared, y de la formación del anillo de quitina en la base de la yema. También participa en la formación de la capa de quitosán, derivado desacetilado de la quitina, que forma parte de la pared de las ascosporas (Bulawa y Osmond, 1990).

Los mutantes obtenidos en cada uno de estos genes, presentan una cantidad de quitina muy reducida en su pared celular, pero mantienen su crecimiento. Lo mismo ocurre con los mutantes *chs1chs3* ó *chs1chs2*, mientras que los alterados en los tres genes, *chs1chs2chs3*, son incapaces de proliferar. El proceso de síntesis de quitina es, por tanto, un proceso esencial para las células fúngicas, en el que están implicadas proteínas funcionalmente redundantes. De este modo, para que cualquier compuesto que actúe en esta ruta muestre actividad antifúngica, debe ser capaz de alterar el funcionamiento de las tres enzimas (Cid *et al.*, 1995).

Las polioxinas y nikkomicinas son análogos estructurales de la UDP-N-acetilglucosamina (di o tripéptidos de L-aminoácidos unidos a uridina, a veces, también modificada), que inhiben competitivamente las actividades quitín sintetasa (Decker, 1990). Poseen una potente actividad inhibitoria *in vitro* de las actividades 1 y 3, pero inhiben en menor cuantía la 2, que es capaz de compensar el defecto enzimático y permite que las células se mantengan viables (Cabib, 1991; Gaughram, 1994).

La diana de las polioxinas y nikkomicinas se encuentra en la parte interna de la membrana plasmática. El transporte de estos compuestos al interior celular, se realiza mediante la misma permeasa que la de los péptidos de los fluidos corporales. La baja actividad mostrada frente a *C. albicans* y otros hongos, ha sido atribuida a una incapacidad para atravesar la membrana y alcanzar la diana, por lo que se han desarrollado derivados de polioxina unidos a péptidos transportadores, capaces de superar este inconveniente, cuya actividad *in vivo* aún no está evaluada (Georgopapadakou, 1994). Además, la sinergia observada entre los inhibidores de la quitín sintetasa y los inhibidores de la síntesis de glucano, permite considerar la posibilidad de una utilización combinada de ambos compuestos como una nueva alternativa a la terapéutica antifúngica (Sugar *et al.*, 1995).

La quitinasa es otra enzima esencial para el mantenimiento de la plasticidad de la pared celular durante el crecimiento y proliferación celular. Los mutantes de *S. cerevisiae* que poseen este gen interrumpido, forman agregados celulares y se muestran incapaces de separarse después de la división celular. Sin embargo, su papel como diana antifúngica no está totalmente establecido, ya que la demetilalosamidina, que actúa como inhibidor específico de la quitinasa, carece de actividad antifúngica a pesar de originar alteraciones en la separación celular (Sakuda, 1990).

## (ii) Síntesis de glucano

Las distintas especies de hongos poseen diferentes cantidades y tipos de glucanos en su pared celular. Este componente constituye el entramado básico de la pared e interacciona con todos los restantes componentes mediante enlaces de hidrógeno, hidrofóbicos y covalentes (Elorza *et al.*, 1989). Constituye un 60% del peso seco total de la pared, y está formado por dos homopolímeros de glucosa, uno mayoritario formado por largas cadenas del azúcar unidas mediante enlaces  $\beta(1-3)$  y cadenas laterales ocasionales en  $\beta(1-6)$ , denominado 1,3- $\beta$ -glucano, y otro menos abundante, formado por cadenas más

cortas de residuos unidos en  $\beta(1-6)$  y abundantes ramificaciones en  $\beta(1-3)$ , llamado 1,6- $\beta$ -glucano (Klis, 1994).

Durante el crecimiento celular, se produce una continua polimerización de azúcares para generar nuevo material, que es intercalado en el entramado ya existente. La síntesis de la pared celular, es por tanto, un proceso continuo regulado temporal y espacialmente.

Las rutas de biosíntesis de ambos tipos de glucano, han sido analizadas mediante la caracterización de diferentes mutantes resistentes a aquellas sustancias que provocaban una alteración de la pared celular de células fúngicas en crecimiento (Douglas *et al.*, 1994; Castro *et al.*, 1995)

El 1,3- $\beta$ -glucano es sintetizado mayoritariamente por la enzima 1,3- $\beta$ -glucano sintetasa a partir de unidades de UDP-glucosa. Esta enzima está asociada a la membrana plasmática y posee dos subunidades: una capaz de producir el alargamiento de las cadenas de glucano, y otra capaz de unir GTP. La primera subunidad, codificado por el gen *FKS1*, es una proteína integral de membrana, cuya interrupción no es letal en *S. cerevisiae*, aunque origina una reducción del 50% en el contenido de glucano en la pared, y por tanto, una fragilidad celular considerable. Los hongos *C. albicans*, *C. neoformans* y *A. fumigatus*, poseen genes homólogos a *FKS1*. Una segunda enzima implicada en la síntesis del 1,3- $\beta$ -glucano es la codificada por *FKS2*, de características muy similares a la anterior. La eliminación de ambos genes, es letal para *S. cerevisiae*.

Las papulacandinas, las equinocandinas y las acualeacinas, son productos naturales capaces de inhibir la actividad 1,3- $\beta$ -glucano sintetasa, impidiendo el crecimiento de la cadena de glucano por ausencia de incorporación de glucosa al glucano en formación (Tkacz, 1992). Estructuralmente las papulacandinas son ácidos grasos derivados del disacárido  $\beta(1,4)$  galactosilglucosa, y las equinocandinas y acualeacinas, son ácidos grasos derivados de los hexapéptidos cíclicos.

El espectro de acción de estos compuestos es limitado, ya que si bien son muy activas *in vitro* frente a *C. albicans* y algunas otras especies de *Candida*, resultan inactivos frente a hongos filamentosos y dimórficos, como *A. fumigatus*, *A. niger* y *C. neoformans*. La actividad *in vivo* es mucho menor a la mostrada *in vitro*, como consecuencia de su mala farmacocinética y baja solubilidad. Las modificaciones estructurales realizadas para mejorar su eficacia *in vivo*, han llevado al desarrollo de análogos semisintéticos con mejores propiedades farmacocinéticas. Así se ha desarrollado la cilofungina, a partir de la equinocandina, y que a pesar de mostrarse como un antifúngico prometedor por su actividad fungicida, elevada potencia y relativa baja toxicidad, tuvo que ser descartado, por presentar toxicidad asociada al vehículo de la formulación que facilitaba su solubilización (Georgopapadakou y Walsh, 1996).

El proceso bioquímico responsable de la formación del 1,6- $\beta$ -glucano, no es conocido en su totalidad, por lo que no se han podido desarrollar sustancias, que interfieran con los procesos de síntesis de este componente de la pared celular (Tkacz, 1992). Las sustancias de este tipo, tendrían especial interés para combatir infecciones originadas por hongos cuyo principal componente de pared fuera el 1,6- $\beta$ -glucano, como es el *C. neoformans*.

(iii) Síntesis de manano

El manano constituye un 40% del peso seco total de la pared, confiriéndole propiedades importantes como la porosidad, y participando directamente en la virulencia del hongo. Está formado por un elevado contenido de residuos de manosa, unidas covalentemente a proteínas, en proporción variable según su localización en la pared celular. Así, el manano de la superficie externa posee un 80% de proteínas, mientras que el de la interna, que se encuentra firmemente unido al glucano, posee solamente un 20% de proteínas.

El proceso de síntesis de manano es complejo, y participan en él numerosas enzimas. La etapa de unión de los oligosacáridos de manosa a las proteínas, no puede ser inhibida selectivamente en los hongos, debido, aparentemente, a una gran similitud con el proceso que tiene lugar en mamíferos. Sin embargo, procesos posteriores, como son la unión de las manoproteínas al glicofosfatidilinositol, previo al transporte hasta la parte externa de la pared celular, y la formación de enlaces entre las manoproteínas y el 1,3- $\beta$ -glucano, no son compartidos con células de mamíferos, por lo que podrían constituir dianas selectivas (Georgopapadakou y Tkacz, 1995).

Se han identificado sustancias que interaccionan con el manano, como son las benanomicinas (Takeuchi *et al.*, 1988) y pradimicinas (Oki *et al.*, 1988), que forman complejos insolubles en presencia de calcio y alteran la membrana, dando lugar a una liberación del potasio intracelular. Las pradimicinas han dado buenos resultados en modelos animales infectados con *Cryptococcus*, *Candida* y *Aspergillus*. Actualmente, los derivados solubles de estos compuestos, se encuentran en fase de desarrollo (Georgopapadakou y Walsh, 1996).

(iv) Factores de virulencia asociados a la pared celular

La invasión fúngica de tejidos celulares o epiteliales, va precedida de un proceso de adherencia a esta superficie celular, en el que participan diversas moléculas de naturaleza diferente entre las especies fúngicas. Todas aquellas aproximaciones orientadas a inhibir los procesos de adherencia e invasión tisular, podrían resultar efectivas para la profilaxis de las infecciones producidas por hongos (Georgopapadakou y Walsh, 1996).

En *C. albicans*, se conoce la presencia de unas moléculas directamente implicadas en la adherencia tisular, que han sido denominadas adhesinas. El bloqueo directo de estas moléculas, reduce de manera importante la capacidad del hongo para producir una infección fúngica (Klotz *et al.*, 1992). Por otro lado, la formación de un tubo germinativo favorece la penetración de *C. albicans* a través de los tejidos, por lo que su inhibición podría evitar el establecimiento de la infección.

También se conocen enzimas hidrolíticas asociadas a la pared celular de los hongos, implicadas directamente con su virulencia. En *C. albicans*, se han descrito enzimas de tipo fosfolipasa (Ibarahim *et al.*, 1995) y proteasa (Fusek *et al.*, 1994), como esenciales para el establecimiento de las infecciones fúngicas en las membranas mucosas.

Otras moléculas y procesos de diferente naturaleza, han sido relacionados con la capacidad virulenta de diversos hongos, como son aquellas que componen la cápsula de *C. neoformans* (Kwon-Chung y Rhodes, 1986).

La utilización de las adhesinas como posibles dianas para evitar infecciones fúngicas, presenta especial interés debido a que su localización en la parte exterior de la

célula las hace accesibles a los compuestos activos, sin necesidad de que éstos deban atravesar la membrana plasmática para alcanzar la diana.

Hasta el momento, se carece de datos suficientes para poder afirmar que la alteración de estas moléculas es capaz de evitar la infección en cualquier tipo de paciente. Por otro lado, la variabilidad de las moléculas implicadas en la virulencia entre las diferentes especies fúngicas, podría limitar el uso de los compuestos activos frente a ellas.

A pesar de que ninguna de las sustancias con actividades implicadas en la biosíntesis de la pared celular, han sido comercializadas hasta el momento, se investiga sobre la posibilidad de obtener nuevos fármacos antifúngicos mediante modificaciones estructurales de las sustancias conocidas.

### 5.1.1.2. Membrana plasmática

La membrana plasmática está constituida por una bicapa lipídica que contiene una mezcla de lípidos polares y proteínas asimétricamente localizadas, cuyas interacciones determinan la estructura de la membrana (Van der Rest *et al.*, 1995). Esta membrana realiza numerosas funciones esenciales para la célula. Actúa como barrera selectiva entre la célula y su entorno, y está involucrada en el mantenimiento de la estructura celular, ya que participa en la síntesis de la pared. Es la responsable de la entrada y excreción selectiva de materiales diversos, así como de la transmisión de numerosas señales al interior celular. Además, es la matriz de diversas proteínas con actividades diferentes (Kerridge y Vanden Bossche, 1990).

La membrana de los hongos contiene, al igual que la de mamíferos, esteroides, fosfolípidos y esfingolípidos, como componentes mayoritarios, pero difiere en el tipo de esteroides y esfingolípidos que posee (Van der Rest *et al.*, 1995).

Cualquier alteración en la composición de la membrana, origina una variación de sus propiedades físicas, como la fluidez, que depende de su composición lipídica. La funcionalidad de las proteínas asociadas a la membrana también se ve modificada como consecuencia de estas alteraciones, originándose una disminución de la viabilidad y del crecimiento celular.

La importancia de la membrana plasmática para la proliferación y la viabilidad celular, y la diferente composición entre las membranas fúngicas y las humanas, hacen que sea considerada como una diana terapéutica importante (Georgopapadakou y Walsh, 1996). La mayoría de los fármacos comercializados hasta el momento actúan a este nivel, como ya se comentó anteriormente. En la actualidad, están en desarrollo farmacéutico otros compuestos capaces de interactuar con la membrana mediante mecanismos diferentes, y que son comentados a continuación.

#### (i) Síntesis de ergosterol

El ergosterol, es el componente principal de las células fúngicas, mientras que en mamíferos predomina el colesterol (Zinser *et al.*, 1991). Las diferencias estructurales entre ambos esteroides son mínimas (figura 5), pero resultan esenciales para el crecimiento de la mayoría de los hongos. Los esteroides son de vital importancia en la estabilidad de la membrana plasmática ya que controlan el grado de fluidez de la membrana, fundamental para su función de barrera y correcto funcionamiento de las enzimas asociadas a ella.

La modificación de la biosíntesis del ergosterol origina alteraciones en las células fúngicas, provocando la detención del crecimiento celular e incluso la muerte del hongo. La síntesis del colesterol y del ergosterol se realiza mediante una ruta biosintética que posee etapas comunes para ambos esteroides, y difiere en las etapas posteriores a la biosíntesis del zimosterol (figura 5). Las enzimas que participan exclusivamente en la síntesis del ergosterol son dianas antifúngicas muy interesantes, aunque la inhibición de etapas comunes en la producción de ambos esteroides también tiene interés, ya que a diferencia de los hongos, las células de mamíferos pueden tomar colesterol sanguíneo vía lipoproteínas de baja densidad (Brown y Goldstein, 1986). Así, los antifúngicos comercializados de tipo azólico, anteriormente comentados, actúan inhibiendo la desmetilación del lanosterol, etapa compartida en la síntesis de colesterol y ergosterol, modificando la composición de la membrana plasmática. La existencia de otras etapas de la ruta de biosíntesis del ergosterol, susceptibles de ser inhibidas selectivamente y generar un resultado final de muerte celular fúngica, está siendo objeto de numerosos estudios (Georgopapadakou y Walsh, 1996).

Las enzimas que actúan en las etapas de la síntesis del ergosterol anteriores a la formación de escualeno (figura 5), participan también en la biosíntesis de otros compuestos celulares esenciales para las células de mamíferos, por lo que su inhibición probablemente originaría toxicidad. Las escualestatinas y ácidos zaragóxicos, que actúan como inhibidores de la escualeno sintetasa (figura 5), no han mostrado actividad antifúngica, debido probablemente a su incapacidad para alcanzar la diana (Georgopapadakou y Walsh, 1996).

Las enzimas que actúan en etapas posteriores a la formación de escualeno (figura 5), como son la 2,3 escualeno óxido ciclasa (Jolidon *et al.*, 1993) y la  $\Delta^{24}$  esterol metiltransferasa (Oehlschlager y Czyzewska, 1992), han sido propuestas como dianas adecuadas para el diseño de antifúngicos, especialmente la última, ya que carece de homólogo en mamíferos. Los antifúngicos diseñados capaces de inhibir estas enzimas se encuentran en proceso de estudio.

#### (ii) Síntesis de fosfolípidos

La matriz lipídica de las membranas plasmáticas de hongos como *S. cerevisiae*, está compuesta por fosfolípidos asimétricamente distribuidos, similares a los de las membranas de las células de mamíferos, y que participan en la correcta funcionalidad de la membrana. La cara citoplasmática de la membrana, está enriquecida en fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilserina (PS), al igual que las membranas de eritrocitos, mientras que en la cara externa, predomina la fosfatidilcolina (PC) y los esfingolípidos (Van der Rest *et al.*, 1995).

Las rutas de síntesis de los fosfolípidos fúngicos PE, PI, PC, fosfatidilglicerol y cardiolipina o difosfatidil glicerol, son básicamente iguales a las de sus homólogos en mamíferos. La única diferencia conocida radica en la biosíntesis de PS, que se origina en hongos a partir de CDP-diacilglicerol y serina, mientras que en mamíferos se requiere el intercambio del grupo etanolamina del PE o del grupo colina de PC, por serina.

#### (iii) Síntesis de esfingolípidos

Los esfingolípidos son componentes esenciales de la membrana plasmática de células de mamíferos y de hongos, y se localizan principalmente en la cara externa de ésta.

El 90% de los esfingolípidos, se encuentra asociado a la membrana plasmática, sin que hayan sido detectados en las membranas nucleares y mitocondriales. Participan en el correcto funcionamiento de las enzimas asociadas a la membrana y se han descrito mutantes carentes de esfingolípidos con alteraciones en la actividad de la ATPasa de membrana, así como alteraciones en la permeabilidad. También se les ha relacionado con la síntesis de la pared celular, actuando como anclaje para sus componentes (Losel, 1989).

Las células fúngicas poseen algunos esfingolípidos que están ausentes en las células de mamíferos, como los glicofosfoesfingolípidos, supuestamente localizados en el lado externo de la membrana plasmática (Op den Kamp, 1979), y otros que difieren de sus homólogos de mamíferos (Lester y Dickinson, 1993). La inhibición de la síntesis de estos compuestos, podría generar una actividad antifúngica selectiva.

Hasta el momento actual, sólo se conocen compuestos que interaccionan con enzimas comunes en las células fúngicas y de mamíferos, implicadas en la ruta biosintética de los esfingolípidos, como son las esfingofunginas (Zweerink *et al.*, 1992). Su actividad se basa en la inhibición de la serina palmitoiltransferasa, que realiza la primera reacción biosintética de los esfingolípidos en hongos y en mamíferos, y cuya actividad selectiva no ha sido demostrada por el momento.

#### (iv) Sistemas de transporte

La membrana plasmática está constituida por numerosas proteínas asociadas a los lípidos, identificándose en *S. cerevisiae* hasta ciento cincuenta polipéptidos únicos (Rank y Robertson, 1983). Las proteínas de transporte, son probablemente las proteínas mayoritarias, ya que cada aminoácido es transportado por una o más proteínas, y los diferentes azúcares lo hacen mediante proteínas distintas. La membrana plasmática de una célula de levadura, puede contener de  $10^5$  a  $10^6$  moléculas transportadoras, que constituyen aproximadamente un 50% del total de las proteínas de la membrana, sin incluir la  $H^+$  ATPasa que por sí misma puede llegar a constituir el 50% de las proteínas de membrana en una célula en crecimiento exponencial (Serrano, 1991).

La inhibición selectiva de las proteínas de la membrana plasmática encargadas del transporte de nutrientes esenciales para la viabilidad de los hongos, podría tener interés, siempre que resultara lo suficientemente específica. Estas proteínas, realizan el transporte de los diferentes nutrientes al interior celular, mediante mecanismos de difusión facilitada y de transporte activo, este último con utilización de la energía de un gradiente iónico.

La  $H^+$  ATPasa es una proteína integral de la membrana plasmática, esencial para el mantenimiento de un gradiente electroquímico de protones y la regulación del pH intracelular. Alteraciones en esta enzima originan modificaciones en el transporte de los compuestos que requieren la presencia de un gradiente de protones a través de la membrana. Las características diferenciales entre la  $H^+$  ATPasa de mamíferos y la de hongos, ha permitido el diseño de drogas que actúan sobre la enzima fúngica, aunque su eficacia y selectividad es desconocida hasta el momento (Monk y Perlin, 1994).

La  $H^+$  ATPasa vacuolar posee características diferentes de la localizada en la membrana plasmática del mismo organismo. Su inhibición, origina alteraciones en las vesículas transportadoras de proteínas, por lo que la síntesis y el transporte hasta su localización definitiva de algunas proteínas, como las glicoproteínas, sufre modificaciones. Como consecuencia, se produce una alteración de la estructura y metabolismo celular. Se conocen algunas sustancias capaces de inhibir esta enzima, como las bafilomicinas y la

folimicina (Muroi *et al.*, 1993), cuya selectividad frente a la enzima fúngica no ha sido evaluada hasta el momento.

#### (v) Sistemas de excreción

Los hongos poseen proteínas encargadas de la salida de diferentes compuestos desde el interior al exterior celular. Estos transportadores poseen un papel importante en la viabilidad, ya que permiten la eliminación de sustancias cuya acumulación resultaría tóxica para las células. Proteínas de este tipo han sido relacionadas con la resistencia de *C. albicans* a los azoles, y probablemente a otros compuestos antifúngicos cuyo mecanismo de resistencia no ha sido caracterizado por el momento (Balzi y Goffeau, 1994).

Las células de bacterias, parásitos y mamíferos, también poseen este tipo de enzimas, aunque parecen existir diferencias estructurales con las de los hongos. Por tanto, la alteración de estas proteínas fúngicas específicas, podría tener interés como diana, y ser utilizada para el aislamiento o diseño de nuevos agentes antifúngicos (Georgopapadakou y Walsh, 1996).

#### 5.1.1.3. Síntesis de proteínas

Se conocen muy pocas diferencias entre los procesos de síntesis de proteínas que tienen lugar en los hongos, y los que ocurren en las células de mamíferos, ya que se trata de procesos muy conservados durante la evolución. Sin embargo, ha sido posible identificar algunas enzimas y factores proteicos específicos de hongos, que han sido estudiados como posibles dianas de compuestos antifúngicos.

#### (i) Factores de elongación

Los factores de elongación, son proteínas solubles requeridas durante la síntesis de proteínas, que facilitan la translocación de los ribosomas a lo largo del RNA mensajero. Poseen motivos estructurales conservados, y se caracterizan por su capacidad para alternar entre conformaciones específicas, por unión a GTP o a GDP. Las conformaciones alternas asociadas con la unión e hidrólisis de GTP, les permite actuar como “interruptores moleculares” en la activación específica de otros componentes celulares.

Las células de mamíferos y las de los hongos requieren dos factores de elongación: el factor de elongación 1 (EF-1 $\alpha$ ) y el factor de elongación 2 (EF-2). Sin embargo, los hongos requieren un factor adicional para la correcta síntesis proteica, el factor de elongación 3 (EF-3) ausente en las células de mamíferos (Kamath y Chakraborty, 1989). Este factor es una proteína de 120 a 125 kDa presente en la mayoría de los hongos, incluida *C. albicans* (Di Domenico *et al.*, 1992), que resulta esencial para la viabilidad celular (Colthurst *et al.*, 1991). Posee actividad ATPasa y es requerido específicamente por la subunidad 40S ribosomal. No se conoce su función con exactitud, pero parece estar implicado en la translocación del péptido en crecimiento.

Los compuestos capaces de interaccionar con el EF-3, posiblemente actuarían de una manera selectiva sobre los hongos, sin producir toxicidad sobre las células de mamíferos. Sin embargo, hasta el momento, no se ha encontrado ninguna sustancia con esta actividad *in vitro*. Por otro lado, el diseño racional de compuestos que actúen a este nivel presenta dificultades, ya que supone el diseño de moléculas totalmente nuevas,

debido a la carencia de moléculas activas conocidas que puedan ser modificadas (Georgopapadakou y Walsh, 1996).

#### (ii) Enzimas implicadas en las modificaciones co- y postraduccionales de las proteínas

A pesar de que los procesos de síntesis de proteínas se diferencian muy poco en hongos y mamíferos, se conocen algunas reacciones enzimáticas diferenciales entre ambos, que han llevado a sugerir la posible utilidad de las enzimas implicadas como nuevas dianas antifúngicas (Georgopapadakou y Walsh, 1996).

Una de las enzimas estudiadas es la miristoil-CoA:proteína-N-miristoil transferasa que participa en la síntesis de un pequeño número de proteínas N-miristoiladas, mediante la transferencia cotraduccional del miristato, desde el miristoil-CoA a la glicina amino terminal de algunas proteínas. Esta reacción es esencial para *C. neoformans* y otros hongos patógenos (Duronio *et al.*, 1989). Si bien en los mamíferos también se producen este tipo de reacciones, la especificidad sobre las proteínas sustrato es diferente de la de los hongos, por lo que se especula sobre una posible inhibición selectiva de la enzima fúngica.

En la actualidad, sólo se conoce un análogo estructural del ácido mirístico capaz de inhibir la enzima, y que presenta actividad fungicida *in vitro* (Langner *et al.*, 1992).

Otra enzima implicada en la modificación postraducciona de las proteínas, es la que se encarga de la transferencia de las glicofosfatidilinositol manoproteínas, desde la membrana al 1,3- $\beta$ -glucano. Es una reacción que no posee homólogos en humanos, por lo que constituye una diana particularmente atractiva, si bien hasta el momento, no se han descrito compuestos capaces de actuar a este nivel (Georgopapadakou y Walsh, 1996).

#### 5.1.1.4. Ácidos nucleicos

El ácido desoxirribonucleico (DNA) y el ácido ribonucleico (RNA) son macromoléculas vitales para la célula, que actúan en el almacenamiento y en la transferencia de la información genética (Lehninger, 1981).

##### (i) Síntesis de ácidos nucleicos

Los procesos de síntesis de ácidos nucleicos, al igual que los de proteínas, son similares en hongos y mamíferos, ya que se han mantenido muy conservados durante la evolución. Por este motivo, resulta difícil la identificación de procesos diferenciales que pudieran servir como dianas antifúngicas.

Como ya se ha mencionado con anterioridad al describir los antifúngicos de uso actual, la 5-FC actúa como inhibidor de la síntesis de los ácidos nucleicos. Recientemente, otra de las enzimas implicadas en la ruta de síntesis de las purinas y codificada por el gen *ADE2*, ha sido propuesta como posible diana antifúngica, debido a las diferencias mostradas con su homólogo en mamíferos. La inhibición selectiva de esta enzima, alteraría la producción de las bases púricas necesarias para la biosíntesis de los ácidos nucleicos, y podría resultar letal para *C. neoformans*, agente etiológico frecuente de las meningitis en pacientes inmunodeprimidos, si los bajos niveles de adenina libre en el líquido cefalorraquídeo resultaran insuficientes para cubrir las necesidades biosintéticas del hongo

(Perfect *et al.*, 1993). Pero por el momento se desconoce si las diferencias existentes entre las enzimas fúngicas y las de mamíferos permiten el diseño de inhibidores específicos.

También las diferencias existentes entre las RNA polimerasas de humanos y de levaduras han dado lugar a ensayos de búsqueda de inhibidores con afinidad selectiva por las enzimas fúngicas (Young, 1991).

#### (ii) Conformación espacial del DNA

La disposición espacial del DNA, tanto en células procarióticas como eucarióticas, está determinada por unas enzimas denominadas topoisomerasas de tipo I y de tipo II. Su papel resulta fundamental para la proliferación y viabilidad celular, ya que participan en procesos esenciales para las células como son la replicación, reparación y transcripción del DNA, síntesis de RNA ribosómico, y segregación cromosómica. La actividad topoisomerasa se localiza principalmente en el núcleo de las células eucarióticas, aunque también ha sido localizada en mitocondria y cloroplastos (Campbell y Newlon, 1991).

El papel relevante de estas actividades enzimáticas en el correcto funcionamiento celular, junto con los éxitos obtenidos en la terapéutica antibacteriana y en la quimioterapia anticancerígena, con fármacos que actúan inhibiendo este tipo de enzimas, ha llevado a la consideración de las topoisomerasas como posibles dianas antifúngicas.

La esencialidad de la actividad de la topoisomerasa II para la supervivencia celular de las levaduras ha sido demostrada (Brill *et al.*, 1987), mientras que la topoisomerasa I ha resultado ser innecesaria, especialmente en presencia de elevados niveles de la enzima tipo II (Sutcliffe *et al.*, 1989). Sin embargo, la formación de complejos entre el DNA, la topoisomerasa I e inhibidores enzimáticos de ésta, sí originan efectos letales en las células.

A pesar de que las topoisomerasas de mamíferos y de hongos presentan homología considerable, se han identificado sustancias con alguna afinidad selectiva hacia la topoisomerasa fúngica de tipo I (Fostel y Montgomery, 1995) y de tipo II (Jackson y Dewick, 1984).

#### 5.1.1.5. Otras rutas metabólicas

Cualquier reacción enzimática, anabólica o catabólica esencial para el crecimiento del hongo, puede constituir una diana para fármacos antifúngicos, siempre que las drogas sean capaces de atravesar la envoltura celular y alcanzar la enzima sobre la que actúan. Los procesos implicados en la biosíntesis de compuestos esenciales para las células, como son los aminoácidos y las poliaminas, son algunos de los procesos considerados como posibles dianas antifúngicas.

#### (i) Aminoácidos

Se han descrito algunos procesos diferenciales entre las rutas biosintéticas de los aminoácidos de los hongos y de los mamíferos, que han permitido especular sobre su posible utilización como dianas antifúngicas. Por otro lado, la inhibición de estos procesos con análogos de aminoácidos, como la cispentacina (Konishi *et al.*, 1989), de actividad antifúngica demostrada *in vivo*, y capaz de actuar sobre múltiples dianas celulares (Capobianco *et al.*, 1993), ha suscitado el interés por estas rutas biosintéticas.

La homoserina deshidrogenasa, es una enzima que no ha sido identificada en células de mamíferos. Participa en la conversión del aspartato a homoserina, y podría ser una diana antifúngica, ya que su inhibición supone alteraciones en la biosíntesis de aminoácidos, como son la metionina, la isoleucina y la treonina. Se ha descrito una sustancia análoga de aminoácidos, denominada RI-331 (Yamaki *et al.*, 1990), capaz de interaccionar con esta enzima, y podría ser considerada como un agente antifúngico siempre que cumpliera las propiedades, todavía no evaluadas, de potencia y farmacocinética adecuadas. La biosíntesis de aminoácidos que poseen azufre en su molécula, también ha sido recientemente inhibida por compuestos análogos de aminoácidos (Aoki *et al.*, 1994), aunque la especificidad de su actividad frente a los hongos aún no está demostrada.

## (ii) Poliaminas

Las poliaminas son metabolitos esenciales de los microorganismos, cuya funcionalidad no ha sido totalmente definida. La inhibición de la síntesis de estos compuestos ha sido empleada en tratamientos antiparasitarios, debido a que las enzimas de los parásitos implicadas en estos procesos difieren de las de los mamíferos.

Las diferencias aparentes entre las enzimas que participan en la síntesis de poliaminas de los hongos y las de los mamíferos, han permitido que sean considerados como posibles dianas antifúngicas (Georgopapadakou y Walsh, 1996).

Se conocen algunos compuestos capaces de inhibir la enzima ornitina descarboxilasa, que es la enzima limitante del proceso biosintético de las poliaminas. La DL- $\alpha$ -difluorometil ornitina, es un inhibidor de la enzima, y presenta actividad antifúngica *in vitro* sobre especies de *Candida*, *Trichophyton* y *Microsporium* (Pfaller *et al.*, 1990). Aunque ha sido demostrada cierta toxicidad *in vivo* como consecuencia de los efectos producidos sobre las células de mamíferos, se considera la posibilidad de realizar modificaciones estructurales basadas en las diferencias moleculares entre las enzimas fúngicas y de mamíferos para incrementar la selectividad y disminuir los efectos secundarios (Georgopapadakou y Walsh, 1996).

### 5.1.1.6. Otras dianas celulares

El esqueleto celular, posee entre sus componentes, unos polímeros dinámicos constituidos por dímeros de  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina, cuyos procesos de polimerización y despolimerización son importantes para la morfología, crecimiento y división celular. A pesar de que las tubulinas son proteínas muy conservadas entre las células eucarióticas, parecen existir diferencias entre las tubulinas fúngicas y las de mamíferos, lo cual sugiere la posibilidad de identificar o diseñar compuestos con actividad selectiva sobre cualquiera de ellas. La griseofulvina, previamente comentada en este trabajo, es capaz de interaccionar con las  $\beta$ -tubulinas de las células de los hongos, y origina una inhibición de los procesos de agregación de los microtúbulos, deteniendo la división celular en metafase (Iwasaki, 1993).

Por último, la transmisión de señales y las enzimas implicadas en este proceso (quinasas y fosfatasas), constituyen uno de los campos de investigación más activos en *S. cerevisiae*. Los conocimientos básicos así obtenidos podrían incrementar el grupo de enzimas con posible utilidad como dianas antifúngicas (Georgopapadakou y Walsh, 1996).

### 5.1.2. Selección de dianas según criterios genéticos

El aumento de la diversidad de las dianas antifúngicas ensayadas, como consecuencia de la profundización en el conocimiento bioquímico sobre el metabolismo celular, se ha visto recientemente potenciado debido al gran desarrollo de la biología molecular y el análisis genético, que ha tenido lugar durante los últimos años. Así, la secuenciación de microorganismos como *S. cerevisiae*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Borrellia burgdorferi*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae*, , han permitido disponer de una gran cantidad de información. Mediante la utilización de las herramientas informáticas adecuadas, es posible, actualmente, analizar y comparar los genes identificados en los diferentes organismos, y conocer sus similitudes y diferencias. Por otro lado, el desarrollo de las técnicas genéticas que permiten alterar de forma dirigida cualquier gen del cromosoma de una célula, ha facilitado el análisis funcional de diversas proteínas, asignándoles un papel biológico concreto, y detectando aquellas proteínas esenciales para el hongo, con posible utilidad como dianas terapéuticas. Además, la caracterización de organismos mutantes, con diferentes comportamientos fenotípicos, ha contribuido al análisis funcional de proteínas desconocidas previamente, y en muchos casos esenciales para las células.

#### 5.1.2.1. *S. cerevisiae* como organismo modelo

La levadura *S. cerevisiae*, ha sido elegida como modelo de célula eucariótica para la búsqueda de agentes antifúngicos frente a hongos patógenos. A pesar de que las infecciones producidas por este organismo han sido muy escasas, comparte numerosas características con patógenos reconocidos, como *C. albicans*, incluso su capacidad para crecer formando pseudohifas, cuando se encuentra en estado diploide y sobre medios sólidos con una limitación de la fuente de nitrógeno (Gimeno *et al.*, 1992). También se han detectado algunas cepas de *S. cerevisiae* capaces de producir formaciones de aspecto pseudohifal, dando lugar a un crecimiento invasivo por penetración en el agar, incluso en medios ricos (Roberts y Fink, 1994). La identificación de numerosos genes homólogos entre ambas levaduras, ha permitido considerar comunes muchos de los procesos ocurridos en ambas células. La caracterización de estos procesos, puede llevarse a cabo en *S. cerevisiae*, con mayor rapidez y simplicidad, mediante las técnicas genéticas de transformación con vectores híbridos de replicación autónoma y el aislamiento de genes mediante la complementación de levaduras mutantes (Rose y Broach, 1991). Sin embargo, los resultados obtenidos, no pueden ser extrapolados a los hongos patógenos, sin una previa comprobación en dichos organismos.

*S. cerevisiae*, es una levadura capaz de crecer en medios definidos simples, lo que permite el completo control de su fisiología. Las características de su ciclo celular vegetativo, como es la coexistencia de los estados haploides y diploides, así como la existencia de dos tipos sexuales de células haploides,  $a$  y  $\alpha$  (figura 13), facilitan los estudios genéticos, y permiten determinar el efecto de la ploidía y del tipo celular en la acción génica. Además, el desarrollo de herramientas genéticas muy eficientes, que permiten que cualquier gen sea reemplazado por un alelo mutante o sea completamente escindido del genoma con gran exactitud (Rothstein, 1983; Guldener *et al.*, 1996), facilita los estudios genéticos en este organismo eucariótico.

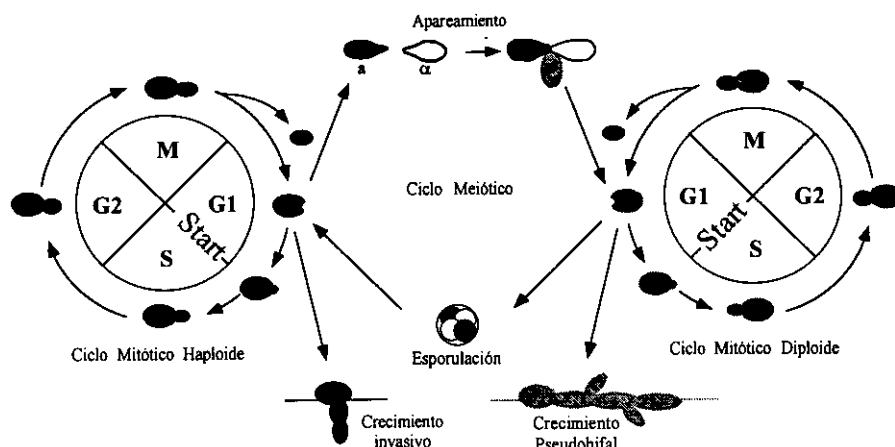


Figura 13: Ciclo celular de *S. cerevisiae*

La levadura *S. cerevisiae*, posee dos tipos de reproducción celular: la que tiene lugar durante el ciclo vegetativo, que se realiza por gemación, y la que ocurre en el ciclo sexual, mediante esporulación. En el ciclo vegetativo de *S. cerevisiae*, se diferencian cuatro estadios consecutivos, caracterizados por los procesos que tienen lugar en cada uno de ellos. Al final de la fase denominada G1, y como consecuencia del paso por el punto *START* del ciclo celular, la yema comienza a emerger. Este proceso va acompañado de una duplicación del cuerpo polar del huso mitótico (SPB), estructura equivalente al centrosoma de los eucariotas superiores. En la fase siguiente, denominada S, tiene lugar la replicación del material genético, al tiempo que los cuerpos polares del huso mitótico comienzan a separarse. La yema sigue creciendo durante las fases S, G2 y M, fase esta última en la que tiene lugar la separación de los núcleos, migrando uno de ellos al interior de la yema, y la formación del septo entre las células madre e hija. La célula hija posee menor tamaño que la célula madre, por lo que debe alcanzar un tamaño crítico, durante la fase G1, antes de poder iniciar un nuevo ciclo de división. Se origina, por tanto, una asincronía entre la división celular de las células madres e hijas, durante los sucesivos ciclos de división vegetativa.

La reproducción sexual de *S. cerevisiae*, tiene lugar mediante la fusión de dos células haploides de tipo sexual distinto,  $a$  y  $\alpha$ . Ambas células secretan una feromona peptídica característica capaz de inducir una parada del ciclo celular vegetativo en la célula de tipo sexual opuesto, y de desencadenar una serie de procesos celulares orientados a la fusión celular y nuclear, mediante la formación de una estructura característica con forma de pera, denominada *shmoo*. El núcleo diploide generado, se dirige hacia una yema que se forma en el puente de unión entre las dos células fusionadas, originando una estructura trilobulada característica de los cigotos. La nueva yema, se separa del resto de la estructura por gemación, en presencia de los nutrientes necesarios, y prosigue un ciclo celular vegetativo diploide. Por otro lado, en condiciones de limitación de nutrientes, la yema separada de la estructura trilobulada lleva a cabo un proceso de meiosis y esporulación, generando cuatro ascosporas o formas de resistencia haploides, dos de tipo sexual  $a$  y otras dos de tipo sexual  $\alpha$ . Las ascosporas son capaces de germinar, en presencia de nutrientes y condiciones ambientales adecuadas, comenzando un nuevo ciclo vegetativo.

### 5.1.2.2. Secuenciación del genoma de *S. cerevisiae*

La secuenciación del genoma completo de *S. cerevisiae*, ha sido posible mediante un esfuerzo internacional, en el que han participado unos 600 científicos de Europa, Norte América y Japón (Goffeau *et al.*, 1996; Oliver, 1996a). Es el primer genoma de una célula eucariótica que ha sido secuenciado completamente, identificándose 5.885 fases de lectura abiertas (Mewes *et al.*, 1997)<sup>1</sup>.

La información obtenida de dicho programa de secuenciación, a la que se puede acceder haciendo uso de las diferentes bases de datos públicas, permite identificar proteínas esenciales para el metabolismo celular de levaduras, en base a su homología con proteínas humanas o de otras especies caracterizadas previamente. Sin embargo, sólo el 50% de las proteínas de *S. cerevisiae* pueden ser clasificadas dependiendo de la similitud de su secuencia con otras proteínas de función conocida. En algunos casos la homología de sus secuencias permite predecir las funciones bioquímicas y fisiológicas de las proteínas con función desconocida. En otras ocasiones, la similitud entre proteínas permite, únicamente, definir su función bioquímica en el caso de que existan dominios proteicos característicos (Goffeau *et al.*, 1996; Johnston, 1996).

Más del 25% de las proteínas implicadas como responsables de enfermedades humanas hereditarias, han revelado una similitud aminoacídica con las proteínas de levaduras. Dado que el genoma humano codifica para un número elevado de proteínas, muchas de ellas desconocidas hasta el momento, se ha sugerido la posibilidad de que la mayoría de las proteínas de levaduras posean homólogos en humanos (Oliver, 1997).

El análisis informático de la predicción funcional del genoma de levaduras, tiene gran interés ya que orienta hacia nuevas vías de investigación y hacia posibles dianas de interés terapéutico. Sin embargo es necesario corroborar esta información mediante experimentación en el laboratorio.

### 5.1.2.3. Análisis funcional del genoma de *S. cerevisiae*

La secuenciación completa del genoma de *S. cerevisiae* ha revelado que el 50% de los genes identificados posee función desconocida, debido a la ausencia de similitud entre las secuencias encontradas y las incluidas en las bases de datos (Goffeau *et al.*, 1996; Johnston, 1996). Cualquiera de estos genes no identificados de *S. cerevisiae*, constituye una potencial diana antifúngica, por lo que el conocimiento tanto de la esencialidad como de la funcionalidad celular de las proteínas que codifican, presenta gran interés para la búsqueda de nuevos antifúngicos.

En la actualidad el estudio de aquellos genes cuya funcionalidad se desconoce se está llevando a cabo mediante dos estrategias fundamentales. Una de ellas consiste en la interrupción del gen y estudio del fenotipo generado, de manera que se pueda identificar si el gen es esencial para *S. cerevisiae*. La segunda estrategia consiste en la caracterización de mutantes condicionales alterados en los genes de funcionalidad desconocida.

La primera estrategia ha sido la adoptada en el proyecto EUROFAN (*European Functional Analysis Network*) (Oliver, 1996a), en el que participan 144 laboratorios de 14

---

<sup>1</sup> Las fases de lectura abierta han sido denominadas sistemáticamente, con un nombre que indica el cromosoma en el que está situado, su localización con respecto al centrómero de dicho cromosoma y la cadena de DNA en la que se encuentra ubicado

naciones europeas. Asimismo otros países, como Canadá y Japón, también realizan trabajos paralelos sobre el estudio de la funcionalidad del genoma de *S. cerevisiae*. Este proyecto tiene como primer objetivo realizar la interrupción de todos los genes de *S. cerevisiae* (Oliver, 1996b). Se lleva a cabo mediante el reemplazamiento génico con construcciones obtenidas por PCR y que poseen marcadores de resistencia. Las cepas con el gen inactivado son caracterizadas, obteniéndose información sobre los procesos que resultan alterados como consecuencia de la ausencia de la función de la proteína estudiada.

El principal problema que posee esta aproximación, consiste en la redundancia existente en el genoma de *S. cerevisiae*, que suele presentar varias secuencias nucleotídicas similares e incluso idénticas en el DNA cromosómico (Oliver, 1996b; Goffeau *et al.*, 1996). Así, los dos dominios terminales del cromosoma III muestran una secuencia con homología considerable entre ellos y con dominios terminales de otros cromosomas como son el V y el XI. También en el cromosoma II hay algunos genes que además de tener homologías con secuencias de otros cromosomas, son similares a genes del mismo cromosoma. De esta forma, la alteración celular producida como consecuencia de la inactivación o mutación génica realizada, puede quedar enmascarada mediante la substitución de la actividad desaparecida, por la de otra proteína idéntica o de función similar. Con el objetivo de solventar este problema se realiza la delección de varios genes en la misma cepa, mediante técnicas recientemente descritas (Guldener *et al.*, 1996).

La información obtenida mediante esta aproximación, es suministrada en la dirección opuesta a la tradicionalmente seguida, es decir, se trata de partir de un gen y llegar al conocimiento de su función biológica, en lugar de llegar al gen partiendo del fenotipo. Resulta una estrategia muy efectiva para el análisis de genes individuales, pero resulta muy trabajoso aplicarlo a los miles de genes que constituyen el genoma de *S. cerevisiae*. Recientemente, y con el propósito de agilizar la identificación de aquellos genes de función todavía desconocida pero implicados en procesos esenciales para la viabilidad y crecimiento celular, se ha desarrollado la técnica denominada de la “huella genética” (*Genetic Footprinting*). Esta técnica permite seleccionar aquellos genes, que tras ser mutados mediante la inserción del elemento transponible *Ty1*, generan una población incapaz de sobrevivir en determinadas condiciones (Smith *et al.*, 1995). De esta manera, es posible estudiar de manera económica, el papel biológico de miles de genes de *S. cerevisiae*. La información obtenida de esta forma, no puede substituir al estudio individual de los genes, pero resulta útil para dirigir la atención hacia aquellos genes implicados en procesos particulares de la levadura.

La segunda estrategia, que consiste en la caracterización de mutantes condicionales, ha sido la más utilizada para los estudios funcionales de diferentes proteínas de *S. cerevisiae* antes de que finalizara el proyecto Genoma de secuenciación de esta levadura. Así esta estrategia ha permitido identificar y caracterizar genes cuya secuencia no había sido descrita previamente. En el momento de iniciar el presente trabajo, que tiene como objetivo la búsqueda de genes esenciales de *S. cerevisiae* que pudieran constituir nuevas dianas antifúngicas, una parte del genoma de *S. cerevisiae* aún no había sido secuenciado. Estos genes desconocidos eran de especial interés, ya que ofrecían la posibilidad de descubrir alguna proteína que pudiera constituir una diana novedosa, y por tanto la estrategia adoptada en este trabajo debería facilitar y permitir su identificación. Los mutantes condicionales, que mueren o detienen su crecimiento en determinadas situaciones, están frecuentemente alterados en genes esenciales (Hampsey, 1997). Además estos mutantes son un arma muy útil para realizar un estudio funcional de proteínas esenciales, ya que son capaces de proliferar en condiciones concretas, a diferencia de los

mutantes interrumpidos en genes esenciales. Por ambos motivos en este trabajo se ha adoptado la segunda estrategia y se ha realizado una caracterización de diversos mutantes condicionales, obtenidos aleatoriamente con agentes mutagénicos variados, y seleccionados en función de sus diversas características fenotípicas.

#### **5.1.2.4. Mutantes condicionales**

Los mutantes condicionales más utilizados, son aquellos en los que la proteína alterada pierde su función normal a determinadas temperaturas. Se denominan mutantes sensibles a la temperatura, e incluyen cepas sensibles al calor, termosensibles, y al frío, criosensibles (Pringle, 1975). También existen otros tipos de mutantes condicionales de levaduras, cuyas proteínas alteradas pierden su funcionalidad normal en determinadas condiciones de fuerza osmótica del medio, y en presencia de compuestos como etanol, formamida, D<sub>2</sub>O, etc. (Hampsey, 1997). Si el mutante condicional es incapaz de mantener un crecimiento vegetativo prolongado en las condiciones restrictivas, se trata de una mutación letal condicional, y el gen y la función alterada son consideradas esenciales o indispensables para la célula.

#### **Obtención de mutantes condicionales**

A pesar de que en algunas situaciones, como es la selección de cepas resistentes a determinadas drogas, basta con el aislamiento de mutantes espontáneos, en general suele incrementarse la frecuencia de los mutantes mediante el uso de agentes mutagénicos variados. Numerosos mutágenos y procedimientos mutagénicos han sido empleados con éxito en levaduras, generando diversos tipos de mutantes condicionales (Pringle, 1975).

En el proceso de inducción de mutantes condicionales, deben considerarse los siguientes aspectos (Pringle, 1975):

- Las cepas utilizadas para la generación de mutantes deben ser cepas bien caracterizadas, que muestren buen crecimiento y ausencia de células morfológicamente aberrantes en las condiciones restrictivas en que se utilizan.

- Las proteínas codificadas por los genes mutados, deben conservar su funcionalidad en condiciones permisivas, por lo que las alteraciones génicas no deben ser demasiado drásticas. De este modo, son preferibles aquellos mutágenos que generan cambios de bases, en lugar de aquellos que producen grandes deleciones génicas o cambios en la lectura de los codones.

- La utilización de estos agentes mutagénicos, debe ser tal que origine mutaciones únicas en el genoma de las levaduras, ya que la presencia de mutaciones múltiples puede dificultar el análisis posterior.

- Los procesos mutagénicos y de aislamiento de los mutantes, deben asegurar que cada mutante posea un origen diferente, y no sean parte de la progenie de otro mutante.

#### **Agentes mutagénicos más empleados**

Los agentes mutagénicos se pueden clasificar según sea su naturaleza, en agentes químicos y en agentes físicos. Entre los agentes químicos, los agentes alquilantes como el etilmetano sulfonato, la nitrosoguanidina, y los desaminantes, como el ácido nitroso han

sido los más frecuentemente empleados para la obtención de mutantes condicionales. Entre los agentes físicos, la luz ultravioleta, es la que ha generado mejores resultados (Pringle, 1975).

(i) Agentes químicos:

El etilmetano sulfonato (EMS) induce mutaciones en el DNA, fundamentalmente mediante transiciones GC→AT. Actúa como un agente alquilante, transfiriendo espontáneamente, grupos alquílicos a los átomos de nitrógeno en el anillo de las bases del DNA. La reacción más frecuente de alquilación, tiene lugar en la guanina, originándose unas estructuras que generalmente aparean de manera diferente a la de la base original, o bien son incapaces de aparear. Se ha demostrado la presencia de zonas en el cromosoma de *S. cerevisiae*, especialmente sensibles y especialmente resistentes de ser alteradas por este agente mutagénico (Kohalmi y Kunz, 1988).

La nitrosoguanidina (NG) también es un agente alquilante, que actúa de manera similar al EMS. Se han detectado zonas en el cromosoma de *S. cerevisiae* que son modificadas con mayor frecuencia por este agente que el resto del genoma, así como regiones más resistentes a ser mutagenizadas, al igual que ocurre con el EMS. La NG induce más frecuentemente transiciones GC→AT en las guaninas que están precedidas en 5' por una purina. En *S. cerevisiae*, a diferencia de lo que ocurre en *E. coli*, no existe una tendencia a la mutación por NG, en la guanina de las cadenas de DNA no transcritas (Kohalmi y Kunz, 1988).

La distribución de las mutaciones inducidas por ambos agentes alquilantes, EMS y NG, a pesar de mostrar ciertas similitudes, no es idéntica, ya que existen diferencias en cuanto a la accesibilidad de los agentes a los lugares reactivos del DNA. Así, se han detectado mutaciones en determinadas localizaciones de una secuencia genómica, originadas exclusivamente por uno de estos agentes (Kohalmi y Kunz, 1988).

El ácido nitroso (NA) es un agente desaminante, capaz de inducir transiciones AT→GC mediante la desaminación de la adenina a hipoxantina, la cual apareará con citosina, en el siguiente ciclo de replicación, en lugar de hacerlo con timina. También origina transiciones GC→AT, mediante la desaminación de la citosina a uracilo, que apareará con adenina, en lugar de hacerlo con guanina (Stanier *et al.*, 1986).

(ii) Agentes físicos

La luz ultravioleta (UV) origina la formación de enlaces covalentes entre restos de pirimidinas adyacentes en una misma cadena de DNA, constituyendo los dímeros de pirimidinas. Estos dímeros, distorsionan la forma de la molécula de DNA e interfieren con el apareamiento normal de las bases. Los errores ocurridos durante los procesos de recombinación de las cadenas dañadas y de reparación del DNA alterado, son los responsables de los cambios de las bases originales del DNA, por otras diferentes. Las mutaciones más frecuentes son las transiciones GC→AT, que incluyen el 53-66% del total de las substituciones del DNA (Hampsey *et al.*, 1986; Kunz Haynes, 1981). También se han detectado transiciones AT→GC y transversiones en el DNA, como consecuencia de la mutación con luz UV (Kunz Haynes, 1981; Hampsey *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1988).

Se han identificado zonas del DNA especialmente susceptibles a ser mutadas por este agente físico. Estas zonas no son las mismas que las que se han detectado como más susceptibles de ser mutadas por EMS y NG (Harris y Pringle, 1991).

### **Aislamiento de mutantes condicionales**

La detección de aquellas cepas mutadas, capaces de crecer en unas condiciones permisivas y que son incapaces de hacerlo en las condiciones restrictivas, permite aislar mutantes interesantes, sin tener un conocimiento *a priori* de la naturaleza de sus funciones celulares alteradas. Éstas pueden, en principio, ser la consecuencia de una mutación en cualquier proteína que tenga un papel esencial en el crecimiento y viabilidad celular.

La detección de los mutantes condicionales, suele realizarse mediante la siembra directa del cultivo celular sometido a la mutación, y la comparación de los crecimientos de las colonias en las condiciones permisivas y restrictivas. Sin embargo, en los casos en los que se requieran mutantes condicionales alterados en procesos determinados, deben utilizarse sistemas selectivos, que incrementen la frecuencia de estos mutantes, y disminuir así el número de mutantes analizados (Pringle, 1975). Por otro lado, aquellos mutantes condicionales cuyos genes alterados no están directamente relacionados con el crecimiento vegetativo, no pueden ser detectados mediante la comparación exclusiva del crecimiento de las colonias en diferentes condiciones, sino que requieren unas condiciones específicas para poner de manifiesto su alteración proteica.

Sin embargo, se han detectado, ciertas limitaciones en el proceso de obtención de mutantes condicionales. Por un lado, se conoce la existencia en el genoma de *S. cerevisiae* de ciertos genes intrínsecamente resistentes a sufrir mutaciones que originen fenotipos condicionales. Diversos trabajos (Kaback *et al.*, 1984; Harris y Pringle, 1991; Harris *et al.*, 1992) han demostrado esta limitación en el cromosoma I de *S. cerevisiae*, cuya incapacidad de generar mutaciones condicionales se mantiene constante con independencia del agente mutagénico empleado. Por otro lado, resulta difícil obtener mutaciones letales en los genes que codifican para proteínas redundantes mediante las técnicas mutagénicas habituales, ya que la actividad de la proteína alterada se ve compensada por la proteína redundante no modificada. Además, existen ciertas proteínas cuyas características estructurales permiten modificaciones en alguno de sus aminoácidos sin sufrir cambios importantes en su actividad, o por el contrario, cualquier modificación de la secuencia provoca la inactivación proteica y la consiguiente muerte celular. Finalmente, la existencia de zonas en el genoma con susceptibilidad incrementada frente a la acción de ciertos agentes mutagénicos, así como la presencia de secuencias genómicas que son más eficientemente reparadas, provoca que los mutantes condicionales generados tras la utilización de los agentes mutagénicos de uso común, no posean una distribución aleatoria de los genes mutados. De este modo, predominarán los mutantes con alteraciones condicionales en unos genes determinados, especialmente susceptibles de ser mutagenizadas de este modo, mientras que otros genes no habrán mutado, o lo habrán hecho sin generar mutaciones condicionales.

Como solución para incrementar la diversidad de las mutaciones condicionales de los mutantes analizados, se ha propuesto la realización de una selección de los mutantes, tras haber sido sometidos a diferentes condiciones de cultivo. Así, la utilización de diversos criterios de selección, como son la ausencia de crecimiento a diversas temperaturas, y en presencia y ausencia de diferentes compuestos, como sales y otros estabilizadores

osmóticos, ha permitido la identificación de mutantes condicionales con alteraciones en genes distintos, a pesar de haber sido generados con los mismos agentes mutagénicos (Pringle, 1975).

### **Tipos de mutantes**

Dependiendo de las condiciones en las que las mutantes condicionales manifiestan su mutación, es posible clasificarlos en diferentes grupos. Los mutantes termosensibles, criosensibles y los que requieren medios de cultivo isoosmóticos, han sido algunos de los mutantes condicionales más frecuentemente estudiados. Por otra parte, nuevos fenotipos condicionales recientemente identificados, como la sensibilidad a formamida y a D<sub>2</sub>O, podrían aportar nueva información sobre la funcionalidad del genoma de *S. cerevisiae* (Hampsey, 1997).

#### **(i) Mutantes sensibles al calor o termosensibles**

Los mutantes termosensibles, son aquellos mutantes en los que la proteína codificada por el gen mutado se vuelve termolábil a temperaturas que se aproximan al extremo superior del margen fisiológico del microorganismo, pero mantiene su funcionalidad en el resto de las temperaturas (Hampsey, 1997). Estos mutantes, han sido los mutantes condicionales más utilizados, debido probablemente, a la facilidad de su manejo, y han permitido la identificación de gran parte de los genes esenciales descritos hasta el momento, mediante estudios de complementación genética.

La obtención de mutantes condicionales termosensibles como estrategia para el estudio de nuevos genes esenciales de *Neurospora* fue sugerida por primera vez por Horowitz y Leupold, en 1951. Estudios posteriores realizados con bacteriófagos mutantes (Campbell, 1961; Epstein *et al.*, 1963), incapaces de crecer en algunas bacterias, a determinadas temperaturas y pH extremos, confirmaron este abordaje como método útil para la obtención de información acerca de funciones génicas esenciales (Edgar y Lielausis, 1964).

Los primeros genes de *S. cerevisiae*, caracterizados a partir del estudio de numerosas colecciones de mutantes termosensibles, fueron los genes implicados en determinadas funciones específicas de una etapa del ciclo celular, es decir, los genes denominados *CDC* (*Cell Division Cycle*), (Hartwell *et al.*, 1970; Pringle y Hartwell, 1981). Posteriormente, la caracterización de mutantes termosensibles de *S. cerevisiae*, con fenotipos diversos en las diferentes condiciones restrictivas ensayadas, ha permitido la identificación de genes implicados en la mayoría de los procesos celulares.

La existencia de zonas en el genoma, especialmente sensibles a mutar generando productos génicos termosensibles, y por otro lado la incapacidad de generar proteínas con esta característica en todos los genes esenciales mutados (Kaback *et al.*, 1984; Harris y Pringle, 1991; Harris *et al.*, 1992), justifican el interés de la caracterización de otros tipos de mutantes condicionales para la identificación de nuevos genes esenciales.

#### **(ii) Mutantes sensibles al frío o criosensibles**

Las mutantes sensibles al frío, son aquellos en los que la proteína mutante no es activa en el mínimo margen de la temperatura fisiológica del microorganismo, pero

mantiene la funcionalidad a temperaturas más elevadas. En general la mutación suele provocar defectos en el ensamblaje de las diferentes subunidades que constituyen algunas proteínas, existiendo genes especialmente susceptibles de sufrir este tipo de mutaciones (Hampsey, 1997). Algunas de las proteínas mutadas, que poseen incluso una modificación en un único aminoácido, presentan sensibilidad al frío y al calor, a pesar de que los genes especialmente susceptibles de ser mutados de manera criosensible, suelen ser diferentes de los que presentan mayor sensibilidad a mutar como termosensibles (Pringle, 1975; Hampsey, 1997).

La caracterización de mutantes de *S. cerevisiae* sensibles al frío, ha permitido identificar genes esenciales desconocidos con anterioridad, y cuya mutación génica no había sido detectada en colecciones de mutantes sensibles al calor (Moir *et al.*, 1982; Strauss y Guthrie, 1991; Noble y Guthrie, 1996). De este modo, ha quedado demostrada la eficiencia del estudio de este tipo de mutantes, para la identificación de genes implicados en procesos celulares esenciales.

#### (iii) Mutantes que requieren protectores osmóticos

Los mutantes que requieren protectores osmóticos manifiestan su fenotipo alterado en todos los medios de cultivo que no son isoosmóticos con su interior celular. Se han descrito numerosos mutantes de este tipo en *S. cerevisiae*, cuyos genes mutados participan de una manera indirecta, en su mayoría, en la síntesis de la pared y membrana plasmática celular. Estos mutantes tienen alterada la barrera osmótica entre el citoplasma y el medio externo, y se lisan debido a fenómenos de turgencia, excepto en medios estabilizados con sorbitol, sacarosa, o con solutos iónicos, como cloruro potásico, que mantienen a la célula en un entorno isoosmótico.

Además de los mutantes de *S. cerevisiae*, cuyo fenotipo mutante se expresa en medios que carecen de estabilizadores osmóticos de manera independiente de la temperatura (Levin y Bartlett-Heubusch, 1992; Paravicini *et al.* 1992), también se han descrito frecuentemente mutantes, en los que este fenotipo está asociado a una sensibilidad al calor (Irie *et al.*, 1993; Martin *et al.* 1993).

#### (iv) Mutantes sensibles a etanol

Los mutantes sensibles a 6% de etanol en medios ricos como YPD presentan mutaciones en genes muy diversos. Aproximadamente un tercio de este tipo de mutantes son también termosensibles, por lo que la sensibilidad al etanol y al calor podría ser originada por el mismo mecanismo. Hasta el momento, los estudios realizados parecen indicar que estas mutaciones originan modificaciones en la estabilidad de las proteínas alteradas (Hampsey, 1997).

#### (v) Mutantes sensibles a formamida

Los mutantes sensibles a 3% de formamida en el medio rico YPD también son frecuentemente termosensibles, por lo que la causa de ambas sensibilidades podría ser parecida. Sin embargo, debido a que el 30% de este tipo de mutantes carece de otro fenotipo detectado hasta el momento, la sensibilidad a 3% de formamida es considerado como un fenotipo condicional nuevo (Hampsey, 1997).

#### (vi) Mutantes sensibles a D<sub>2</sub>O

Este tipo de mutantes son incapaces de crecer en un medio mínimo con 90% de D<sub>2</sub>O, como consecuencia de la alteración de la conformación de algunas proteínas. Estos mutantes son generados tan frecuentemente como los termosensibles, y en su mayoría carecen de otro fenotipo condicional (Hampsey, 1997).

### Caracterización de mutantes condicionales

La caracterización fenotípica de los mutantes condicionales permite obtener información acerca de los procesos metabólicos o estructuras alteradas como consecuencia de la mutación proteica, lo cual puede orientar sobre la funcionalidad de la proteína modificada. Además la clasificación de los mutantes en grupos de complementación, permite identificar mutantes defectivos en genes ya conocidos y que no habían sido detectados en una primera caracterización fenotípica, debido a que presencia de mutaciones adicionales en el genoma puede provocar cambios en el fenotipo del mutante, o a que la existencia de diferentes mutaciones en la misma proteína también puede provocar diferentes modificaciones de su actividad.

#### 5.1.3. Obtención de dianas

Para la realización de los ensayos de *screening* (búsqueda de inhibidores) es necesario disponer de cantidades grandes de las proteínas que constituyen las dianas antifúngicas. La utilización de la tecnología recombinante del DNA permite obtener estas proteínas de una manera relativamente sencilla y con una pureza suficiente para que puedan ser utilizadas en los ensayos *in vitro*. En la actualidad, gran parte de estas proteínas son expresadas en microorganismos como *E. coli* y *S. cerevisiae* en forma de proteínas de fusión, es decir, unidas a un epítipo que facilita su purificación. Diversos epítipos han sido utilizados para llevar a cabo la purificación de las proteínas obtenidas (Sassenfeld, 1990). Algunos de ellos, como los residuos de poliarginina, polilisina y polifenilamina permiten la purificación proteica mediante cromatografía de intercambio iónico. Otros, como la proteína A de *Staphilococcus*, la glutation-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum* y el dominio C-terminal de la enzima N-acetilmuramoil-L-alanil-amidasa (ClytA) de *Streptococcus pneumoniae* permiten la purificación de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. La utilización del dominio ClytA, permite la purificación en un único paso de las proteínas fusionadas a este marcador, de una manera económica y selectiva, mediante cromatografía a través de una columna de dietil-amino etanol (DEAE) (Sánchez-Puelles *et al.*, 1992).

La expresión en levaduras resulta de gran interés para la obtención de proteínas heterólogas, ya que estos microorganismos poseen la maquinaria subcelular capaz de realizar las modificaciones postraduccionales de las proteínas típicas de organismos eucariotas. Asimismo el avance tecnológico en cuanto a su manipulación genética ha posibilitado su empleo en aquellos casos donde la expresión en *E. coli* no está recomendada (Buckholz y Gleeson, 1991). *S. cerevisiae* ha sido la primera levadura utilizada con este propósito, sin embargo, recientemente han comenzado a utilizarse levaduras alternativas, como *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*, que presentan ventajas, ya que permiten introducir un grado menor de glicosilación en las proteínas y

poseen promotores fuertes inducibles que mejoran el nivel de expresión y regulación de la misma.

El epítipo que permite la purificación de la proteína de fusión, debe ser eliminado mediante la digestión con diferentes enzimas, que también son elegidas según las características proteicas con el fin de evitar hidrólisis inespecíficas.

El proceso de expresión y purificación de dianas, se realiza en primer lugar en volúmenes pequeños, que permitan establecer las condiciones óptimas para el proceso, y posteriormente el escalado a grandes volúmenes para obtener las cantidades necesarias de las proteínas.

## 5.2. Colecciones de compuestos

Otro de los elementos básicos en el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos antifúngicos, son las colecciones de compuestos cuya actividad frente a la diana elegida pueda ser evaluada *in vitro*. Las demandas actuales de la industria farmacéutica, que presionan para incrementar el número de fármacos y la rapidez de su salida al mercado, obligan a ensayar un número elevado de compuestos muy diversos con objeto de incrementar las posibilidades de encontrar alguno que presente actividad frente a la diana elegida.

Se han desarrollado diversas estrategias que permiten incrementar la diversidad y la cantidad de los compuestos a ensayar (Petsko, 1996). Por un lado, el aislamiento de compuestos naturales procedentes de microorganismos, plantas y animales poco estudiados, así como de microorganismos manipulados genéticamente, y que forman parte de las colecciones de productos naturales, tiene gran interés en cuanto a la biodiversidad de las moléculas que contienen. Por otro lado, la utilización de colecciones de productos puros, permite identificar nuevas actividades de compuestos ya conocidos, frente a dianas no ensayadas previamente. Además, las recientemente creadas colecciones de productos sintetizados mediante química combinatoria, aportan multitud de compuestos, en un periodo de tiempo menor al necesario para la obtención de productos naturales.

### 5.2.1. Colecciones de productos naturales

Las colecciones de productos naturales, constituidas por miles de extractos procedentes de la fermentación de microorganismos, así como de extractos de plantas y animales, han permitido la identificación de la mayoría de los productos que se encuentran actualmente en el mercado (Demain, 1998). Los compuestos que integran estas colecciones son muy variados, y poseen estructuras muy complejas y diferentes. Sin embargo, es necesario un incremento continuo de estas colecciones, que se está llevando a cabo mediante diversas aproximaciones, como son: (i) el aislamiento y estudio de organismos productores de compuestos naturales, que no hayan sido caracterizados previamente, (ii) la modificación de las condiciones de cultivo con el fin de incrementar la variabilidad de los metabolitos generados por los microorganismos y (iii) la manipulación genética de los organismos productores.

(i) El incremento de la biodiversidad de los organismos productores ha dirigido la búsqueda de nuevos microorganismos hacia hábitats no explorados, como son los acúmulos de algas, los sedimentos marinos, las profundidades de los océanos, así como en los animales marinos (Fenical, 1997). Se han buscado plantas desconocidas en regiones exóticas e inexploradas, y se han estudiado insectos e invertebrados marinos, como

posibles productores de nuevos productos naturales (Verdine, 1996). Por otro lado, tiene interés el aislamiento de organismos cuyos hábitats de crecimiento hayan sido sometidos a cambios bruscos, debido a que los procesos de estrés sufridos podrían haber originado mutaciones y recombinaciones genéticas que hayan generado nuevas enzimas biosintéticas, y por tanto, sintetizado compuestos orgánicos nuevos. Sin embargo, esta aproximación posee una limitación importante, ya que solamente el 1-5% de los microorganismos pueden ser cultivados en las condiciones habituales de laboratorio (Seow *et al.*, 1997).

(ii) La posibilidad de incrementar la diversidad metabólica mediante la utilización de diferentes condiciones de cultivo, es consecuencia de la extremada variabilidad de los productos naturales sintetizados por un mismo microorganismo según las características del medio en el que se encuentran. Por este motivo, se suele realizar el crecimiento de cada uno de los microorganismos ensayados en diversos medios de cultivo y en diferentes condiciones de fermentación, para aumentar así las moléculas sintetizadas (Yarbrough, 1993).

(iii) La aplicación de las técnicas genéticas y de biología molecular, ha generado expectativas sobre la posible utilización de las rutas metabólicas de los microorganismos que no pueden ser cultivados en el laboratorio. De este modo se han desarrollado sistemas que permiten clonar el DNA de los organismos no cultivables, o el DNA de muestras ambientales, en vectores que facilitan la transferencia y expresión de rutas metabólicas para la biosíntesis de productos naturales, en un organismo de utilización industrial bien caracterizado, como *Streptomyces lividans* (Chmurny, 1997; Sherman, 1997). Por otro lado, el proceso de recombinación del DNA de organismos cultivables con rutas biosintéticas caracterizadas y el DNA aislado de muestras ambientales y de organismos no cultivables, podría originar modificaciones en las rutas conocidas y generar moléculas nuevas (Chmurny, 1997).

Además, la clonación de grupos de genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de un producto natural determinado, denominados operones biosintéticos, permite la transferencia de una ruta biosintética del organismo productor natural a otro organismo de utilización industrial, con una posible modificación del producto final sintetizado que aumente la diversidad. Por otro lado, la manipulación de los genes del operón biosintético, mediante translocaciones y deleciones génicas, e incluso mediante la incorporación de genes que codifican para otras enzimas, permite generar productos finales distintos. Esta aproximación, concebida inicialmente para mejorar la actividad de compuestos conocidos, mediante la modificación de alguno de sus radicales, ha sido propuesta como vía posible para la obtención de compuestos naturales con estructuras nuevas (Verdine, 1996).

Por otro lado, las técnicas utilizadas para el aislamiento de los productos naturales pueden limitar la variabilidad de los compuestos obtenidos. Debido a la gran variabilidad en la naturaleza de los compuestos naturales, deberían utilizarse diversas técnicas conjuntamente con el objetivo de incrementar la diversidad de los compuestos aislados. Sin embargo, el elevado volumen de muestras procesadas hace que ésto no sea factible y quede limitado a la utilización de un número reducido de métodos, que son elegidos dependiendo de la naturaleza de la muestra y del ensayo a realizar (Yarbrough, 1993).

### 5.2.2. Colecciones de compuestos puros

Las colecciones de compuestos puros suelen ser colecciones privadas de laboratorios farmacéuticos, que están integradas por un número considerable de compuestos químicos de estructura conocida. La utilización de estas colecciones permite investigar actividades no descritas de compuestos conocidos. La limitación de estas colecciones viene determinada por el número de compuestos que la integran, y sin embargo presenta la ventaja de que en el caso de que alguno de sus componentes se comportara como activo frente a la diana ensayada, la identificación del compuesto resultaría inmediata.

### 5.2.3. Colecciones de compuestos obtenidos por química combinatoria

La utilización de la química combinatoria, permite disponer de un número elevado de compuestos sintéticos y semisintéticos de estructuras diferentes, en un tiempo más corto que los métodos basados en la extracción de sustancias naturales (Petsko, 1996), si bien, los compuestos sintetizados de esta forma, poseen estructuras más simples. La química combinatoria está basada en la combinación aleatoria, de un grupo de elementos estructurales básicos seleccionados, de manera que el número de compuestos obtenidos aumente exponencialmente, mientras que el número de los elementos requeridos se eleve sólo de manera aritmética (Hogan, 1996; Michelet y Hélène, 1997). La química combinatoria, además de generar compuestos de estructuras químicas novedosas para ensayar frente a una diana, permite modificar moléculas de actividad ya conocida, para mejorar su actividad y propiedades farmacocinéticas (Hogan, 1996).

Las aproximaciones para obtener librerías combinatorias han evolucionado en los últimos años, desde las primeras librerías peptídicas en fase sólida o solubles (Pinilla *et al.*, 1995; Blondelle y Houghten, 1996), en las que se obtenía una mezcla de compuestos opcionalmente asociados a un soporte sólido, a métodos que producen librerías de compuestos puros de estructuras químicas conocidas o desconocidas, dependiendo del sistema utilizado en su síntesis (Michelet y Hélène, 1997; Plunkett y Ellman, 1997).

La química combinatoria también presenta limitaciones, ya que las moléculas sintetizadas de esta forma poseen estructuras relativamente sencillas. Además, existen algunas reacciones químicas que solamente pueden ser llevadas a cabo por enzimas, resultando imposible su obtención mediante este sistema.

En la actualidad los laboratorios farmacéuticos tienden a utilizar en paralelo los tres tipos de colecciones, ya que aunque inicialmente parecía que la química combinatoria iba a desplazar a los compuestos naturales y a las colecciones de compuestos puros por su rapidez en la obtención de compuestos diversos, la limitación en cuanto a las estructuras generadas por este sistema ha resaltado la importancia de la utilización conjunta de otro tipo de compuestos (Whitehead, 1998). Los productos naturales procedentes de microorganismos, plantas y animales poco estudiados, así como de microorganismos manipulados genéticamente, son los que ofrecen una mayor biodiversidad en sus moléculas. Sin embargo, tanto los procesos de obtención de estos compuestos como la identificación del compuesto activo en las mezclas de compuestos ensayadas, son procesos largos y laboriosos. Por el contrario, la utilización de colecciones de productos puros permite la identificación inmediata del compuesto activo, resultando innecesarios los complicados procesos de aislamiento e identificación estructural de la molécula activa. Sin

embargo estas colecciones suelen resultar insuficientes por estar limitadas por el número de compuestos que las integran.

### 5.3. Compuestos diseñados de manera racional

Una nueva aproximación aplicada recientemente por la industria farmacéutica para la obtención de compuestos activos, consiste en el diseño racional de moléculas según los conocimientos obtenidos del estudio de la diana sobre la que deberían actuar (Blundell, 1996; Teutsch, 1997).

El conocimiento de la estructura tridimensional de más de 4.000 proteínas, ha sido posible gracias al rápido desarrollo durante la última década, de la cristalografía y de la resonancia magnética nuclear. Algunas de estas proteínas u otras con estructuras similares a las ya caracterizadas, podrían constituir dianas claves para drogas con actividad antifúngica, por lo que el diseño racional de moléculas que posean una estructura capaz de unirse a la supuesta diana, podría permitir el desarrollo de fármacos que nunca hubieran surgido de las técnicas convencionales. Sin embargo, aunque la unión teórica puede ser establecida mediante análisis estructurales, la actividad *in vitro* no puede ser asegurada mediante esta técnica (Blundell, 1996).

Además el conocimiento tridimensional de las dianas con las que interaccionan los compuestos de actividad conocida, permite diseñar diversas moléculas con pequeñas modificaciones estructurales para tratar de conseguir una mejora de su actividad (Blundell, 1996; Teutsch, 1997).

En la actualidad se encuentran en proceso de evaluación para conocer su posible uso terapéutico, algunos antifúngicos diseñados racionalmente capaces de inhibir la 2,3 escualeno óxido ciclasa (Jolidon et al., 1993), la  $\Delta^{24}$  esterol metil transferasa (Oehlschlager y Czyzewska, 1992), así como la  $H^+$  ATPasa de membrana plasmática (Monk y Perlin, 1994).

### 5.4. Ensayos utilizados en la búsqueda de compuestos activos

Los ensayos utilizados para la selección a gran escala de compuestos activos que presentan actividad frente a la diana de interés, son denominados ensayos de *high-throughput screening* (HTP) (Broach y Thorner, 1996).

Este tipo de ensayos deben cumplir las características indicadas a continuación. Por una parte, deben permitir el análisis de numerosas muestras de una forma simple y automatizada, con un gasto pequeño de muestras y reactivos. Los ensayos a gran escala presentan el inconveniente de requerir grandes cantidades de las dianas en estudio, que generalmente son poco abundantes de forma natural. Sin embargo, y como se ha comentado con anterioridad, la utilización de técnicas de ingeniería genética permite, en muchas ocasiones, obtener las cantidades necesarias de enzimas para la realización de estos ensayos. Por otra parte, los ensayos deben diseñarse y optimizarse de manera que permitan seleccionar los compuestos de interés, con una pérdida mínima de compuestos activos (falsos negativos) y evitando una selección excesiva de compuestos carentes de interés (falsos positivos) (Yarbrough *et al.*, 1993).

(i) Análisis de un número elevado de muestras

La posibilidad de encontrar compuestos activos frente a una diana, está directamente relacionada con el número de muestras ensayadas, por lo que tienen interés los ensayos que permiten analizar la actividad de un gran número de compuestos en el menor tiempo posible. La utilización de robots permite realizar miles de ensayos al día, siempre que éstos sean lo suficientemente sencillos para que puedan ser automatizados fácilmente. Los resultados obtenidos de los ensayos son analizados mediante programas informáticos adecuados (Broach y Thorner, 1996).

(ii) Sensibilidad de los ensayos

Los ensayos deben ser lo suficientemente sensibles para detectar sustancias activas que se encuentran en bajas concentraciones en los extractos crudos de la fermentación, así como compuestos con una actividad intrínseca baja. El grado de sensibilidad suele variar según las características del ensayo, resultando muy sensibles aquellos en los que se utilizan técnicas de unión a radioligandos, transducción de señales e incluso la mayoría de los ensayos de inhibición enzimática.

(iii) Selectividad de los ensayos

Los ensayos deben configurarse de tal manera que sea posible eliminar los falsos positivos, es decir, los compuestos no activos frente a la diana pero que muestran señal inespecífica en el ensayo, y disminuir al máximo los falsos negativos, que son los compuestos activos frente a la diana, pero que no son detectados en el ensayo.

Se pueden diferenciar dos tipos de ensayos de *screening* dependiendo de la utilización bien de dianas aisladas del resto de los componentes celulares, o bien de células completas. Los ensayos que utilizan dianas aisladas y purificadas son preferidos para realizar ensayos con un elevado número de muestras, ya que tanto la realización del ensayo como su interpretación, son más fácilmente automatizables que aquellos que utilizan células enteras. Se han diseñado muchos ensayos de elevado rendimiento, para la búsqueda de inhibidores de enzimas aisladas, como son la 1,3- $\beta$  glucano sintetasa, 2,3-escualeno óxido ciclasa,  $\Delta^{14}$  esterol reductasa y  $\Delta^8$ - $\Delta^7$  esterol isomerasa (Ryley y Barrett-Bee, 1992). Sin embargo, la actividad frente a una enzima aislada no es garantía de que presente actividad sobre las células intactas, ya que existen barreras de permeabilidad, mecanismos de transporte y metabolismo que pueden dificultar el acceso del compuesto activo hasta la diana localizada en una célula. Por este motivo, todos aquellos compuestos que muestran actividad frente a las enzimas aisladas, son posteriormente ensayados sobre células enteras para verificar su comportamiento.

Los ensayos con células enteras, requieren procesamientos e interpretaciones más minuciosas, por lo que su automatización resulta más complicada. Estos ensayos han sido tradicionalmente utilizados para la búsqueda de compuestos activos, y han permitido la identificación de algunos de los antifúngicos de uso terapéutico actual, como son la anfotericina B, la nistatina, y la griseofulvina. El material de partida para el ensayo son las células enteras, por lo que no es necesario realizar la extracción y la purificación de la diana, y además, el resultado obtenido, revela información sobre la capacidad del compuesto para penetrar en la célula y alcanzar su lugar de acción.

Tras una primera aproximación en la búsqueda de compuestos activos en las colecciones de compuestos disponibles, se seleccionan todos aquellos que hayan mostrado actividad en estos ensayos, denominados *screening* primario, mediante el empleo de un soporte informático adecuado. Estos compuestos deben confirmar su actividad en las repeticiones sucesivas del mismo ensayo, para que sean considerados como compuestos potencialmente activos. A continuación, se realizan unos ensayos para conocer la especificidad de la actividad de los compuestos seleccionados, mediante el estudio de su actividad frente a dianas homólogas, que suelen ser de mamíferos. Estos ensayos son denominados *screening* secundario y permiten eliminar aquellos compuestos cuya actividad no sea específica frente a la diana seleccionada.

En el caso de que los compuestos activos seleccionados formen parte de una colección de productos naturales, deben obtenerse nuevamente los compuestos, de la misma manera que los que se han mostrado activos, y valorar si reproduce su comportamiento inicial. La reconfirmación de la actividad, define el interés por esta sustancia, y se llevan a cabo unas mejoras en los procesos de obtención de estos compuestos.

### 5. 5. Identificación del compuesto activo

La elucidación de la estructura química de los compuestos activos permite averiguar, mediante búsquedas en las bases de datos existentes, si la molécula es novedosa o por el contrario ya había sido caracterizada, y si existe un conocimiento previo sobre su actividad frente a la diana ensayada. Además, el conocimiento de su estructura química aporta información sobre su posible utilización terapéutica, en cuanto a la posesión de radicales tóxicos o dominios fácilmente degradables en el organismo. La identificación del compuesto activo debe realizarse lo más rápidamente posible, siendo sencillo e inmediato en el caso de tratarse de compuestos puros, pero presenta mayor dificultad si se trata de mezclas de compuestos, como en el caso de los productos naturales procedentes de fermentaciones de microorganismos, de plantas y animales, o de los compuestos obtenidos por química combinatoria. En estos casos, es necesario un fraccionamiento previo de las muestras ensayadas para tratar de separar cada uno de los compuestos integrantes. Para ello se utilizan las técnicas de extracción, destilación, adsorción o ultracentrifugación para separar los compuestos según sus características. De esta manera, a partir de la muestra activa, se obtienen diversas fracciones que corresponden a mezclas de compuestos, y cuya actividad frente a la diana es nuevamente ensayada, para determinar cuál es la que presenta actividad (Yarbrough, 1993). El aislamiento del compuesto puro de la fracción activa, se consigue mediante la utilización de técnicas cromatográficas como son las de soporte sólido, cromatografías líquido-líquido y cromatografía líquida de alta presión (HPLC), o por precipitación, o con métodos eléctricos como electroforesis, electrodiálisis e isoelectroenfoque.

La elucidación estructural del compuesto activo se realiza mediante análisis espectroscópicos. Los espectros de absorción de luz ultravioleta y de infrarrojo, permiten la detección de los grupos cromóforos de la molécula y la identificación de algunos de sus grupos funcionales, respectivamente. El peso molecular del compuesto en estudio así como su fórmula empírica, son calculados mediante la espectrometría de masas. Finalmente, los datos obtenidos mediante la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) sobre las características de algunos de los elementos de la molécula, y la cristalización del compuesto activo para el estudio por difracción de rayos X, permiten elucidar su estructura.

## 5.6. Ensayos preclínicos

Los compuestos activos, que tras la elucidación de su estructura química son considerados de interés como posibles drogas antifúngicas de uso terapéutico, son sometidos a diversos estudios, denominados ensayos preclínicos, orientados a caracterizar la molécula activa y mejorar sus propiedades en cuanto a potencia, espectro de acción y selectividad. En estos ensayos, las moléculas activas identificadas, son sometidas a numerosas modificaciones estructurales para conseguir una mejora de la potencia y de la selectividad antifúngica. Estas modificaciones pueden realizarse de manera aleatoria o bien de manera dirigida, dependiendo del conocimiento que se posea sobre su mecanismo de acción y de la diana con la que interacciona directamente. La actividad de los compuestos activos identificados así como de sus derivados, es evaluada frente a una pequeña colección de hongos patógenos *in vitro* y en modelos animales, seleccionando únicamente aquellos que se muestren activos en ambos tipos de ensayos. Estudios adicionales de farmacocinética, biodisponibilidad y toxicidad del compuesto, así como la evaluación de su actividad fungicida o fungiestática, y la capacidad para desarrollar resistencias en los hongos patógenos, son necesarios para establecer las dosis que deben ser utilizadas en el tratamiento de las infecciones fúngicas en humanos.

### Espectro de acción del antifúngico

El espectro antifúngico de un compuesto es evaluado *in vitro* de la misma manera, tanto si se trata de un producto natural como sintético. Los tres métodos básicos utilizados en este tipo de ensayos son, dilución en agar, difusión en agar y dilución en caldo, en los que se analiza la actividad de los compuestos seleccionados frente a diversos hongos patógenos, como son *C. albicans*, *A. fumigatus*, *C. neoformans*, *H. capsulatum* y *B. dermatidis*. Muchos compuestos que se muestran activos en los ensayos con las dianas aisladas, no presentan actividad antifúngica sobre células enteras, debido a dificultades de penetración a través de la pared y membrana o degradación del compuesto antes de alcanzar la diana. Solamente aquellos compuestos, que en bajas concentraciones inhiben el crecimiento de uno o varios hongos, son seleccionados para ensayos en animales.

Las mismos hongos patógenos usados en los ensayos de actividad antifúngica *in vitro*, suelen ser utilizados para los ensayos en animales. El test de protección del ratón (Richardson *et al.*, 1985), permite relacionar los datos previamente obtenidos de actividad antifúngica *in vitro* frente a diferentes hongos y la eficacia del antifúngico en el tratamiento de infecciones producidas por los mismos agentes patógenos. Los ratones son inoculados por vía intravenosa con *C. albicans* en dosis letal para los animales, y los compuestos cuya actividad se desea conocer, son administrados en diferentes concentraciones por vía oral, subcutánea, intraperitoneal e intravenosa. La Dosis Efectiva  $50$  (dosis de producto capaz de prevenir la muerte en el 50% de los animales, expresada en mg de producto por kg de animal tratado), es calculada en aquellos compuestos capaces de alargar la supervivencia de los ratones de manera reproducible. El modelo es simple y requiere pequeñas cantidades del compuesto a ensayar según la ruta de administración, sin embargo es artificial ya que la actividad del compuesto se mide en función del balance entre la vida y la muerte en una infección muy aguda. Por otro lado, el uso de los animales en experimentos que finalizan con su muerte es muy controvertido.

La evaluación de la eficacia del compuesto en el tratamiento de infecciones fúngicas localizadas a nivel superficial, en determinados órganos, o diseminadas, se realiza mediante diferentes modelos animales. Los criterios utilizados para el diseño de estos modelos comprenden: (i) Selección de un patógeno virulento susceptible *in vitro* al compuesto analizado; (ii) Tratamiento de los animales con un agente antifúngico de eficacia clínica demostrada, que sirva como control positivo a la dosis en que resulta eficaz en humanos; (iii) Los criterios de eficacia no deben ser demasiado rígidos ni excesivamente permisivos; (iv) Los resultados deben ser reproducibles; (v) La eficacia debe ser verificada de manera estadística. Se han desarrollado los modelos animales de infecciones múltiples (Ryley 1990; Ryley 1992), en los que un mismo animal padece infecciones en distintas localizaciones de su cuerpo, producidas por agentes patógenos diferentes. Se han llegado a conseguir animales con cuatro infecciones distintas, como son los ratones con vaginitis e infección sistémica no letal por *C. albicans*, infección superficial por *Trichophyton quinckeanum*, e infección respiratoria por *C. neoformans*. Estos modelos permiten la evaluación de la actividad antifúngica de un compuesto frente a diversos hongos patógenos en un mismo lote de animales. Además, el seguimiento de la evolución de estas infecciones en animales tratados, permite obtener información acerca de la potencia antifúngica del compuesto analizado. Los ensayos son sencillos de realizar, y aunque requieren la utilización de mayores cantidades de compuestos, los resultados obtenidos son más realistas, ya que simulan infecciones crónicas. Además, el uso de infecciones no letales es éticamente más aceptable (Ryley, 1990).

En general, existe una pequeña correlación entre los resultados de sensibilidad *in vitro* y los resultados obtenidos en animales, ya que las características farmacocinéticas del compuesto pueden modificar considerablemente la proporción del compuesto que se mantiene activo en estos últimos modelos. Por este motivo, el conocimiento de la farmacocinética del compuesto, junto con otras características, como tipo de acción fungicida o fungiestática sobre los hongos, inducción de resistencias y toxicidad, son necesarias para poder relacionar ambos resultados, y establecer la posología adecuada para el tratamiento de las infecciones fúngicas (Debono y Gordee, 1990).

### **Características farmacocinéticas**

El antifúngico ideal, sería aquel compuesto que pudiera ser administrado de manera oral una vez al día, y fuera capaz de alcanzar niveles terapéuticos en sangre, en diversos tejidos y en sistema nervioso central, para poder actuar sobre infecciones fúngicas invasivas, o en orina y secreciones, para el tratamiento de las infecciones tópicas. Estas propiedades dependen directamente de las características farmacocinéticas del compuesto.

La absorción oral de un compuesto varía según su solubilidad en agua y peso molecular. Aquellos compuestos poco hidrosolubles y de elevado tamaño se absorben con dificultad, resultando eliminada una porción variable del compuesto administrado, como ocurre con la anfotericina B e itraconazol. La fracción absorbida y localizada en la sangre, puede ser degradada en el hígado de una manera parcial o total, como los primeros imidazoles descubiertos, con lo que disminuye la cantidad de compuesto activo. La afinidad por las proteínas plasmáticas sanguíneas y tisulares, debe tenerse en cuenta, ya que una elevada afinidad disminuye de manera importante la cantidad de droga disponible. Además, dependiendo de su afinidad por los lípidos, puede quedar retenida en membranas y tejidos que no sean los lugares donde está localizada la infección, con lo cual los niveles de droga circulante son mucho menores. Finalmente, puede que sea metabolizada en una

proporción importante o sea excretada por orina, por lo que la concentración de compuesto activo varíe con el tiempo, y deba ser administrado repetidas veces para mantener los niveles efectivos. Por este motivo, la potencia relativa de un agente antifúngico *in vitro* puede quedar anulada en los modelos animales, como consecuencia de su farmacocinética (Tarbit, 1990).

### **Acción fungicida y fungiestática**

Se prefieren los fármacos fungicidas, que sean capaces de eliminar la presencia del hongo, frente a los fungiestáticos, que solamente inhiben su crecimiento, ya que una vez que los hongos dejan de estar en contacto con agentes de este último tipo, podrían continuar su crecimiento, en el caso de no haber sido destruidos totalmente por el sistema inmunitario del huésped. En algunas ocasiones, como en el caso de la anfotericina B y de las morfolinas, la acción de un compuesto sobre el hongo está relacionado con la dosis utilizada, de manera que a dosis inferiores se comporta como fungiestático, y a dosis más elevadas actúa como fungicida (Polak, 1988; Reynolds, 1996).

### **Modo de acción**

La identificación de los mecanismos de interacción del compuesto con el hongo, permiten modificar su estructura química para mejorar la actividad antifúngica y aumentar su espectro de acción, y posiblemente asociarlo a otros antifúngicos que actúen de manera similar o diferente, para conseguir un efecto sinérgico sobre el agente patógeno (Debono y Gordee, 1990).

### **Desarrollo de resistencias**

El análisis del comportamiento de los hongos patógenos frente a concentraciones subinhibitorias del compuesto activo, y durante largos periodos de tiempo, permite evaluar la capacidad del compuesto antifúngico para generar resistencias. Debe evitarse la utilización de los compuestos frente a los cuales aparecen fácilmente resistencias, así como aquellos que presentan reacciones de resistencia cruzadas con otros ya conocidos (Debono y Gordee, 1990).

### **Formulación**

La formulación farmacéutica del compuesto activo, tiene un efecto importante en la eficacia final del compuesto. La mejora de su absorción oral, puede conseguirse mediante la modificación del excipiente, como en el caso de la griseofulvina, cuya eficacia depende de la formulación farmacéutica utilizada (Hanel y Ritter, 1990). También puede conseguirse una disminución de la toxicidad del compuesto sin modificar su actividad antifúngica, como en el caso de las nuevas formulaciones lipídicas de la anfotericina B, ya comentadas previamente en este trabajo.

### **Toxicidad**

La capacidad para producir efectos tóxicos sobre los animales ensayados, es un factor clave en el desarrollo de un fármaco. Todos aquellos compuestos que produzcan

toxicidad aguda, tras la administración de una sola dosis, o crónica, tras dosis repetidas durante tiempos prolongados, son eliminados del estudio. Los ensayos se realizan en dos especies de mamíferos diferentes, como son el perro y la rata, y se evalúan diversos efectos como son la toxicidad producida sobre los fetos, el poder carcinogénico en los diferentes tejidos, y alteraciones de la fertilidad del animal. Además de los ensayos clásicos con animales, se han diseñado ensayos *in vitro* que utilizan bacterias y cultivos celulares para detectar los efectos mutagénicos del compuesto analizado (Flint y Boyle, 1990; Tarbit *et al.*, 1990).

### 5.7. Ensayos clínicos

Los compuestos activos que han manifestado un comportamiento adecuado en los ensayos con animales, son sometidos a la evaluación de su actividad en humanos, mediante los denominados ensayos clínicos. Estos ensayos, se pueden definir de acuerdo con el artículo 59 de la Ley 25/1990 del Medicamento, como la evaluación experimental de una sustancia o medicamento a través de su aplicación a seres humanos, orientada hacia alguno de los siguientes fines:

- Poner de manifiesto sus efectos farmacodinámicos o recoger datos referentes a su absorción, distribución, metabolismo y excreción en el organismo humano.
- Establecer su eficacia para una indicación terapéutica, profiláctica o diagnóstica determinada.
- Conocer el perfil de sus reacciones adversas y establecer su seguridad.

Como resultado de estos ensayos, se eliminan aquellos compuestos que resulten ineficaces o peligrosos para los humanos, y se confirma que aquellos seleccionados, suponen una ventaja terapéutica frente a los fármacos existentes, y que cumplen todos los requisitos de seguridad y eficacia necesarios para que puedan ser comercializados.

Actualmente los estudios clínicos se encuentran regulados por el Real Decreto 561/1993 del 16 de abril. De acuerdo con los objetivos perseguidos, se distinguen cuatro tipos de ensayos clínicos, en fase I, fase II, fase III y fase IV, que varían en cuanto al número y tipo de individuos estudiados (Jones y Stern, 1990).

#### Ensayos clínicos en fase I

Los ensayos clínicos en fase I constituyen el primer paso en la investigación del comportamiento de una sustancia activa en el hombre. Se realizan en voluntarios sanos o en algunos casos en pacientes, y proporcionan información preliminar sobre las características farmacocinéticas y farmacodinámicas del compuesto en humanos, así como una posible intolerancia a la droga. Además orientan sobre la pauta de administración más apropiada para ensayos posteriores. En general, se realiza un ensayo en el que el compuesto es administrado una única vez a diferentes dosis, que son calculadas a partir de los ensayos toxicológicos y de las dosis requeridas para mostrar eficacia en animales, y un segundo ensayo, en el que se realizan múltiples administraciones de la droga, también a diferentes dosis.

## **Ensayos clínicos en fase II**

Los ensayos clínicos en fase II representan el segundo estudio en la evaluación de una sustancia activa en el ser humano. Se realizan en un pequeño grupo de pacientes que padecen la enfermedad o entidad clínica de interés. Su objetivo consiste en proporcionar información preliminar sobre la eficacia del producto, establecer la relación dosis-respuesta del mismo, duración del tratamiento, y ampliar los datos de seguridad obtenidos en la fase I. Por lo general, son ensayos clínicos controlados, es decir se comparan los resultados obtenidos en el grupo de pacientes tratados con la sustancia activa en estudio, con los de un grupo control o testigo, y con una asignación aleatoria a los tratamientos. Estos ensayos son especialmente interesantes en el caso de los antifúngicos, ya que dependiendo del agente patógeno que provoque la infección y de su localización, debe variarse la dosis y duración del tratamiento.

## **Ensayos clínicos en fase III**

Los ensayos clínicos en fase III están destinados a evaluar la eficacia y seguridad del tratamiento experimental, intentado reproducir las condiciones de uso habituales, y considerando las alternativas terapéuticas disponibles para la indicación estudiada. Se realizan en una muestra de pacientes más amplia que en la fase anterior, que es representativa de la población general a la que iría destinado el antifúngico. Estos ensayos son preferentemente controlados y la asignación de los tratamientos es aleatoria.

## **Ensayos clínicos en fase IV**

Los ensayos clínicos en fase IV, se realizan con posterioridad a la aprobación y comercialización del antifúngico. Estos ensayos pueden ser similares a los descritos en las fases I, II y III si estudian algún proceso aún no valorado o unas condiciones de uso distintas de las autorizadas, como podría ser una nueva indicación, y permiten reajustar la dosis y duración del tratamiento previamente recomendadas. En general, son ensayos controlados y con asignación aleatoria de los tratamientos.

### **5.8. Procedimientos legislativos y regulatorios**

Las drogas de actividad antifúngica, cuyo interés terapéutico ha sido demostrado mediante todos los estudios anteriores, deben ser sometidas a unos controles legislativos y regulatorios propios de cada país, previamente a su comercialización. Las compañías farmacéuticas deben elaborar un extenso informe con todos los datos obtenidos en los ensayos realizados (Eardley, 1990), que es evaluado por las autoridades responsables del registro y control del uso de la droga en el país. Con frecuencia, la aprobación y registro de los fármacos es un proceso lento, que requiere meses e incluso años, antes de que el nuevo fármaco se incorpore al arsenal terapéutico.

## OBJETIVOS

La carencia de fármacos con actividad antifúngica capaces de cubrir la demanda actual, ha despertado un interés especial de la industria farmacéutica por los compuestos de este tipo. Así, el presente trabajo ha formado parte de una línea de investigación llevada a cabo en *SmithKline Beecham*, centrada en la búsqueda de nuevas dianas. Se ha tratado de identificar proteínas esenciales de *S. cerevisiae*, frente a las cuales se pudieran desarrollar ensayos *in vitro* para buscar compuestos antifúngicos, o que permitieran realizar un diseño racional de nuevos fármacos. La competencia con otros laboratorios farmacéuticos que tienen líneas de investigación paralelas, ha motivado que se consideraran de especial interés aquellas proteínas de *S. cerevisiae* codificadas por genes esenciales cuya secuencia fuera desconocida en el momento de comenzar este trabajo, ya que ofrecían la posibilidad de constituir dianas novedosas.

Para llevar a cabo este trabajo se propusieron inicialmente tres objetivos:

1. Obtener una colección de mutantes condicionales de *S. cerevisiae* alterados en proteínas esenciales para la proliferación celular.
2. Identificar los genes responsables de la complementación del fenotipo condicional y seleccionar aquellos cuyas proteínas pudieran tener interés *a priori* como dianas antifúngicas.
3. Caracterizar algunas de las proteínas seleccionadas para establecer su utilidad como diana antifúngica.



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Las características genéticas de las cepas utilizadas en este trabajo así como su procedencia, se detallan a continuación en la tabla 3:

Tabla 3: Características de las cepas originales utilizadas en este trabajo.

Especie	Cepa	Genotipo	Procedencia
<i>S. cerevisiae</i>	S288C	<i>MATa gal2</i>	ATCC 26108
	TD28	<i>MATa ura3Δ52, inos1-151, can<sup>r</sup></i>	Dra. M. Molina
	Sx50-8A	<i>MATa trp1 ura3-52 his3Δ</i>	Dr. J. Livi
	Sx50-10A	<i>MATa trp1 ura3-52 his3Δ</i>	Dr. J. Livi
	Sx50-110A	<i>MATa trp1 leu2 ura3-52</i>	Dr. J. Livi
	DC6	<i>MATa leu2-3,112 his4 can1 gal2</i>	Dr. J. Livi
	SEY6210	<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his3Δ200 trp1Δ901 lys2-801 suc2-Δ9</i>	Dr. A. Mendoza
	SEY6211	<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his3Δ200 trp1Δ901 ade2-101 suc2-Δ9</i>	Dr. A. Mendoza
	Y190	<i>MATa ura3-52 his3-200 lys2-801 ade2-101 trp1-901 leu2-3, 112 gal4Δ gal80Δ cyh<sup>2</sup> LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-HIS3<sub>TATA</sub>-HIS3 URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	Clontech
	CG-1945	<i>MATa ura3-52 his3-200 lys2-801 ade2-101 trp1-901 leu2-3, 112 gal4-542 gal80-538 cyh<sup>2</sup> LYS2::GAL1<sub>UA</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>--HIS3 URA3::GAL417-mers(X3)-CYC1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	Clontech
<i>E. coli</i>	DH5α	<i>K-12Δ(lacZYA-argF)<sub>u169</sub> supE44 thi-1 recA1 endA1 hsdR17 gyrA relA1(φ80lacZΔM15)</i>	Dr. R. López
	BL21(DE3)	<i>E.coli B F dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-) galλ(DE3)</i>	Dr. R. López
	BL21(DE3)plysS	<i>E.coli B F dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-) galλ(DE3)[pLysS Cam<sup>r</sup>]</i>	Dr. R. López
	K514	<i>F recA r<sub>K12</sub> m<sup>+</sup><sub>K12</sub> Rif<sup>r</sup></i>	Dr. R. López
	HB101	<i>supE44 ara14 galK2 lacY1Δ(gpt-proA)62 rpsL20 (Str<sup>r</sup>) xyl-5 ml-1 recA13 Δ(mcrC-mrr) HsdS(r<sup>r</sup>m<sup>i</sup>)</i>	Dr. R. López
<i>C. albicans</i>	1001	silvestre, aislado clínico	ATCC 64385
<i>A. fumigatus</i>		silvestre, aislado clínico	ATCC 13073

#### 2. GENOTECAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS

Las características de las genotecas, así como las de los plásmidos originales y los aislados y generados durante este trabajo se muestran en las tablas 4, 5 y 6 respectivamente.

En la tabla 7 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de secuenciación y en ampliaciones por PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Tabla 4: Genotecas utilizadas en este trabajo

Genotecas	Características	Origen
CEN BANK	Genoteca genómica de la cepa de <i>S. cerevisiae</i> GRF38 digerida parcialmente con <i>Sau</i> 3AI y clonada en <i>Bam</i> HI en el vector centromérico YCp50. Los insertos tienen un tamaño de 10-20 kb.	ATCC 37415
pURSC1	Genoteca genómica de la cepa de <i>S. cerevisiae</i> S288C digerida parcialmente con <i>Sau</i> 3AI y clonada en <i>Sal</i> I en el vector replicativo pUR18. Los insertos tienen un tamaño de 3-10 kb.	ATCC 77295
MATCHMAKER Genomyc Library	Genoteca genómica de <i>S. cerevisiae</i> digerida parcialmente con <i>Mbo</i> I y clonada en <i>Bam</i> HI en tres vectores que difieren en la fase de lectura del sitio de clonación (pGAD1F, pGAD2F, pGAD3F). Los insertos tienen un tamaño de 0,7-2 kb.	Clontech, CAT# YL4000AF.
ATCC 37323	Genoteca genómica de la cepa de <i>S. cerevisiae</i> S288C digerida parcialmente con <i>Sau</i> 3AI y clonada en <i>Sau</i> 3AI en el vector YEp13. Los insertos tienen un tamaño de 5-20 kb.	ATCC 37323

Tabla 5: Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmidos	Características relevantes	Referencia/origen
pUC18/pUC19	ori <i>lacZ</i> (MCS) <i>bla</i>	Clontech
pBluescript II KS	ori <i>colE1 lacZ</i> (MCS) ori <i>fl(+)</i> <i>bla</i>	Clontech
pT7-.3	ori <i>colE1 pØ10 bla</i>	Dr. R. López
p34H	ori <i>ScURA3 bla</i>	Dra. M. Molina
pCUZ1	ori <i>bla lacZ</i> (MCS) <i>c-lytA</i>	Dr. J.M. Sánchez-Puelles
pCUZE	ori <i>bla lacZ</i> (MCS) <i>c-lytA-E</i> ( <i>E</i> : sitio de reconocimiento de la enteroquinasa)	Dra. A.M. Roa
YCp50	ori <i>ARS1 CEN4 ScURA3 tet bla</i>	Dr. Livi
YEp352	ori 2 $\mu$ <i>bla lacZ</i> (MCS) <i>ScURA3</i>	Dr. Livi
YEpPGK2	ori 2 $\mu$ <i>bla lacZ</i> (MCS) <i>ScURA3 pPGKtPGK</i>	Dr P. Álvarez
YIp5	ori <i>ColE1 bla ScURA3</i>	Dr. Livi
pAS2-1	ori <i>colE1 bla</i> ori 2 $\mu$ <i>ScTRP1</i> ori <i>fl ScCYH2 pADH1 GAL4 BD</i> (MCS) <i>tADH1</i>	Clontech

Tabla 6: Plásmidos aislados y generados en este trabajo

Plásmidos	Plásmidos originales	Modificaciones
p143.1	YCp50	inserción en <i>Bam</i> HI de un fragmento <i>Sau3A</i> de 13,5 kb que contiene el gen <i>HSP30</i>
p226.1	YCp50	inserción en <i>Bam</i> HI de un fragmento <i>Sau3A</i> de 14 kb que contiene el gen <i>HSP30</i>
p239.1	YCp50	inserción en <i>Bam</i> HI de un fragmento <i>Sau3A</i> de 10,6 kb que contiene el gen <i>CDC68</i>
p39.1	YCp50	inserción en <i>Bam</i> HI de un fragmento <i>Sau3A</i> de 9,1 kb que contiene el gen <i>TAF<sub>II</sub>145</i>
p69.8	YCp50	inserción en <i>Bam</i> HI de un fragmento <i>Sau3A</i> de 6,6 kb que contiene el gen <i>PRP19</i>
p202.1	YCp50	inserción en <i>Bam</i> HI de un fragmento <i>Sau3A</i> de 8,5 kb que contiene el gen <i>MTF1</i>
p41.1	YCp50	inserción en <i>Bam</i> HI de un fragmento <i>Sau3A</i> de 6,3 kb que contiene el gen <i>MPS1</i>
p103.1	YCp50	inserción en <i>Bam</i> HI de un fragmento <i>Sau3A</i> de 5,2 kb que contiene el gen <i>YPL007C</i>
pUCMPS1	pUC18	inserción en <i>Sma</i> I de la fase de lectura abierta del gen <i>MPS1</i> amplificado por PCR
pUCmps1	pUC18	inserción en <i>Sma</i> I de la fase de lectura abierta del gen mutante <i>mps1</i> amplificado por PCR
pUCYPL	pUC18	inserción en <i>Kpn</i> I- <i>Bgl</i> II del fragmento <i>Kpn</i> I- <i>Bam</i> HI correspondiente a la fase de lectura abierta del gen <i>YPL007C</i> amplificado por PCR
pUCypl	pUC18	inserción en <i>Sac</i> I- <i>Sma</i> I del fragmento <i>Sac</i> I- <i>Sma</i> I correspondiente a la fase de lectura abierta del gen <i>ypI007c</i> mutante amplificado por PCR
pACDB	pBluescript II KS	inserción en <i>Kpn</i> I- <i>Bam</i> HI del fragmento <i>Kpn</i> I- <i>Bgl</i> II amplificado por PCR y que corresponde a los 480 nucleótidos iniciales del gen <i>YPL007C</i> fusionado a los 592 nucleótidos finales del mismo gen
pACURADB	pACDB	inserción en <i>Sph</i> I de un fragmento <i>Sph</i> I procedente de p34H y que corresponde al gen <i>URA3</i>
YIpypl	YIp5	inserción en <i>Sal</i> I- <i>Bam</i> HI del fragmento <i>Sal</i> I- <i>Bgl</i> II procedente del pUCypl y que corresponde a la fase de lectura abierta del gen mutante <i>ypI007c</i>
pT7C	pT7-3	inserción en <i>Eco</i> RI- <i>Sac</i> I del fragmento <i>Eco</i> RI- <i>Sac</i> I procedente de pCUZE y que corresponde a <i>cltA-E</i>
pT7CMPS1	pT7C	inserción en <i>Nhe</i> I- <i>Not</i> I del fragmento <i>Nhe</i> I- <i>Not</i> I procedente de pUCMPS1 y que corresponde a la fase de lectura abierta del gen <i>MPS1</i>
pT7CYPL	pT7C	inserción en <i>Avr</i> I- <i>Not</i> I del fragmento <i>Avr</i> I- <i>Not</i> I procedente de pUCYPL y que corresponde a la fase de lectura abierta del gen <i>YPL007C</i>
YE <sub>p</sub> PGKC	YE <sub>p</sub> PGK2	inserción en <i>Bgl</i> II del fragmento <i>Bgl</i> II- <i>Bam</i> HI que corresponde a <i>cltA-E</i> amplificado por PCR

(Continuación de la tabla 6)

YE <sub>p</sub> PGKMPS1	YE <sub>p</sub> PGK2	inserción en <i>Bgl</i> II del fragmento <i>Bgl</i> II procedente del pUCMPS1 y que corresponde a la fase de lectura abierta del gen <i>MPS1</i>
YE <sub>p</sub> PGKCMPS1	pPGKC	inserción en <i>Nhe</i> I- <i>Not</i> I/ <i>Klenow</i> del fragmento <i>Nhe</i> I- <i>Sma</i> I del pUCMPS1 correspondiente a la fase de lectura abierta del gen <i>MPS1</i>
YE <sub>p</sub> PGKYPL	YE <sub>p</sub> PGK2	inserción en <i>Bgl</i> II del fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Bgl</i> II procedente del pUCYPL y que corresponde a la fase de lectura abierta del gen <i>YPL007C</i>
YE <sub>p</sub> PGKCYPL	pPGKC	inserción en <i>Avr</i> II- <i>Not</i> I del fragmento <i>Avr</i> II- <i>Not</i> I procedente del pUCYPL y que corresponde a la fase de lectura abierta del gen <i>YPL007C</i>
pASMPS1	pAS2-1	inserción en <i>Eco</i> RI- <i>Sal</i> I del fragmento <i>Eco</i> RI- <i>Sal</i> I procedente de pUCMPS1 correspondiente a la fase de lectura abierta del gen <i>MPS1</i>
pASYPL	pAS2-1	inserción en <i>Nco</i> I- <i>Bam</i> HI del fragmento <i>Nco</i> I- <i>Bam</i> HI correspondiente a la fase de lectura abierta del gen <i>YPL007C</i> amplificado por PCR

Tabla 7: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')
UNIVERSAL	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA
REVERSAL	GAATTGTGAGCGGATAACAATTC
H2B-A	CGAAAAGAAACCAGCCTCCAAAGC
H2B-B	GCTTCAGTAGAGGAAGAGTACTTGG
M226-A	CACGGTGCCTGACTGCGTTAG
MPS1-A	CGGAATTCAAAGATCTACCCGGGGCTAGCATGTCAACAAACTCATTCCATGATTATG
MPS1-B	TCCCCGGGAGATCTGTGACGCGGCCGCTTCTAAATTTGTAATCTGCAAATTTCC
MPS1-C	GGAATTCAAGCTTGCAGGACCCAGCTTCGTTGTCC
MPS1-D	GGAATTCAAGCTTCATCTGATATGTGGTCATGCGGTTG
MPS1-E	GAAAGGATAAGGAATTTGCGAC

(continuación de la tabla 7)

MPS1-F	ACAAGCAGCACTCCGAAAAC
MPS1-G	ATCGACCTGCTCCCAAACC
MPS1-H	AAGAAGCGGCATGCCACTG
MPS1-I	TAATAGCCAACAGCCTATTTTG
MPS1-K	TCTAGTAGTTGGATTACACGC
MPS1-L	ATTGGGCTGTTGAAATTGCTG
YPL007C-A	TCCCCGGGGATCCTAGGCCAGGTACCATGAAGCTTCTAAAGGACTTATTGGTAG
YPL007C-B	CGGGATCCCGGGAGATCTGCGGCCGCTTACATAACTTCCAGCGTTGTTCCACA
YPL007C-B2	TTACCCGGGAGCTCAGATCTGCGGCCGCTTACATAACTTCCAGCGTTGTTCCACA
YPL007C-C	CCGGGCATGCTTTTGCGAATGCTAAAGAATTGAAGCTC
YPL007C-C2	TACCATACTATATGAGTGACCCAG
YPL007C-D	GGCCGCATGCACCAAATTTACAACCAATCGCTGCCC
YPL007C-E	GTTCAAAGATAACAAAATGCTCAC
YPL007C-F1	TAACTTGTCCTCCGGATATGTGC
YPL007C-F2	GCCCCACTATATCATACTTGG
YPL007C-F3	CAACGGCACGTTATTGATGAAG
YPL007C-G	GCAAGCTAAATCAAACTATTCG
YPL007C-H	TCTTCTCTAAGTAAGGCGCG
YPL007C-I	TCCCCGGGCATATGGCCATGGAGATGAAGCTTCTAAAGGACTTATTGGTAG
THS103	TCATCGGAAGAGAGTAGT
PEX103	ATAGAGTACCATCCCCGAGCCC

### 3. MEDIOS DE CULTIVO Y OTRAS DISOLUCIONES UTILIZADAS

Los principales medios que han sido empleados para el cultivo de los microorganismos se indican a continuación.

#### 3.1. Medios de cultivo para *E.coli*

- Medio LB, utilizado como medio rico para el crecimiento bacteriano (bacto triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y cloruro sódico 5 g/l).

- Medio mínimo M9, utilizado en algunos experimentos de expresión de genes heterólogos (fosfato disódico 6 g/l, monofostato potásico 3 g/l, cloruro sódico 0,5 g/l, cloruro amónico 1 g/l, sulfato magnésico heptahidratado 0,24 g/l, cloruro cálcico 0,01 g/l, glucosa 4 g/l)

- Medio SOC, empleado para la expresión de la resistencia al antibiótico en cepas transformadas por electroporación (bacto-triptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, glucosa 3,5 g/l, cloruro sódico 0,6 g/l, cloruro potásico 0,03 g/l, cloruro magnésico 0,9 g/l, sulfato magnésico 1,2 g/l).

#### 3.2. Medios de cultivo para levaduras

- Medio YED, medio rico utilizado de rutina para el crecimiento de levaduras (glucosa 20 g/l y extracto de levadura 10 g/l).

- Medio YEPD, medio rico empleado de rutina en el cultivo de las estirpes mutantes, (glucosa 20 g/l, bacto-peptona 10 g/l, extracto de levadura 10 g/l).

- Medio YEPD-SORBITOL 0,9 M (YS), utilizado como medio rico estabilizado osmóticamente (medio YEPD al que se añade una concentración final de sorbitol 0,9 M).

- Medio MDL, medio sólido de selección de mutantes con requerimientos lipídicos nutricionales (glucosa 20 g/l, base nitrogenada de levadura sin aminoácidos 6,7 g/l, histidina 10 mg/l, metionina 20 mg/l, triptófano 20 mg/l, glucosa 20 g/l).

- Medio ML, medio sólido utilizado para el crecimiento de mutantes con requerimientos lipídicos (medio de selección de mutantes con requerimientos lipídicos nutricionales suplementado con 1,5 g/l de extracto lipídico, obtenido a partir de una extracción con alcohol/cloroformo de *S. cerevisiae*. El contenido en ergosterol del extracto lipídico era del 2,7% según cromatografía líquido-líquido).

- Medio MDA, utilizado en la selección y en el mantenimiento de transformantes de levadura, así como en la comprobación de las auxotrofías de una determinada cepa (glucosa 20 g/l, base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos ni sulfato amónico 1,7 g/l, sulfato amónico 5 g/l, uracilo 29 mg/l y adenina 40 mg/l, suplementado con la solución de aminoácidos requerida en cada caso). La concentración final de aminoácidos en el medio se indica a continuación:

sL-arginina (HCl)	20 mg/l
L-ácido aspártico	100 mg/l
L-ácido glutámico (sal monosódica)	100 mg/l
L-histidina	20 mg/l
L-leucina	60 mg/l
L-lisina (mono HCl)	30 mg/l
L- metionina	20 mg/l
L-fenilalanina	50 mg/l
L-serina	375 mg/l
L-treonina	200 mg/l
L-triptófano	40 mg/l
L-tirosina	30 mg/l
L-valina	150 mg/l

- Medio MPE, medio sólido rico utilizado para el crecimiento de diploides como paso previo a la inducción de su esporulación. Este medio estimula notablemente la formación de ascas (extracto de levadura 10 g/l, extracto de carne 30 g/l, glucosa 50 g/l).

- Medio ME, medio sólido inductor de la esporulación de cepas diploides, pobre en glucosa y nitrógeno, que utiliza acetato como fuente de energía (acetato potásico 9,8 g/l, extracto de levadura 2,5 g/l, glucosa 1 g/l). Como medio alternativo de esporulación se ha utilizado un medio más pobre constituido por acetato potásico al 1% suplementado con los aminoácidos requeridos en cada caso.

- Medios con otras fuentes de carbono, utilizados para la caracterización fenotípica de las cepas estudiadas. Son medios similares al YEPD en los que la glucosa está sustituida por otras fuentes de carbono fermentables (galactosa en YEPG y maltosa en YEPM, ambas al 2% p/v), y no fermentables por *S. cerevisiae* (etanol 2% (v/v) en YEPE, acetato potásico 2% (p/v) en YEPA y glicerol 2% (v/v) en YEPL).

- Medio YNB-N, medio deficiente en nitrógeno empleado en la caracterización fenotípica de las cepas estudiadas (glucosa 20 g/l y base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos y sin sulfato amónico 1,7 g/l).

- Medio YNB-C, medio deficiente en carbono empleado en el análisis del fenotipo de las cepas (glucosa 1 g/l y base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos 6,7 g/l).

Todos los medios sólidos llevaban agar bacteriológico americano como agente solidificante a una concentración de 20 g/l.

### 3.3. Otras disoluciones utilizadas

Las disoluciones de los antibióticos empleados en diversos ensayos con *E. coli*, han sido preparadas y utilizadas de la manera recomendada en Sambrook *et al.* (1989).

Las disoluciones de X-Gal e IPTG empleadas en el proceso de selección de los clones de *E. coli* portadores del gen de la  $\beta$ -galactosidasa han sido preparadas y utilizadas como recomienda Sambrook *et al.* (1989).

## 4. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

### 4.1. Condiciones de conservación y de crecimiento de las cepas

#### 4.1.1. Cepas de *E. coli*.

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo se han conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  en criotubos con glicerol al 20%.

Los cultivos en medio líquido se han realizado a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación virogosa a 250 rpm, y los cultivos en medio sólido se han llevado a cabo a la misma temperatura sobre placas de Petri.

#### 4.1.2. Cepas de *S. cerevisiae*

Las cepas de *S. cerevisiae* se han conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  en criotubos con glicerol al 20% en YEPD. Las cepas de uso frecuente se mantenían a  $4^{\circ}\text{C}$  en tubos con medio sólido YEPD inclinado.

Los cultivos en medio líquido se han realizado en matraces con agitación vigorosa, y los cultivos en medio sólido se han llevado a cabo sobre placas de Petri y sobre láminas de YEPD fabricadas sobre cubreobjetos estériles de 22 x 60 mm. Las células se incubaban en las condiciones de oxigenación y temperatura adecuadas en cada caso.

El crecimiento en fermentadores MBR BIO REACTOR AG de 42 l de volumen total, se ha realizado mediante la inoculación con un preinóculo crecido en matraz a  $28^{\circ}\text{C}$ . El medio de cultivo utilizado fue YEPD y las condiciones de aireación y agitación se han ajustado en cada ensayo.

### 4.2. Determinación del crecimiento celular

Se han utilizado diferentes técnicas para determinar el crecimiento celular según los requerimientos de cada ensayo.

#### 4.2.1. Turbidimetría

En algunas ocasiones el crecimiento de los cultivos de *E. coli* y de *S. cerevisiae* se ha determinado mediante la evaluación de la turbidez de los mismos, realizándose una lectura de sus absorbancias a 600 nm ( $A_{600\text{nm}}$ ) en un espectrofotómetro UNICAM 8620 UV/VIS utilizando cubetas de 1 ml con un paso óptico de 1 cm.. Las muestras se diluían

convenientemente hasta que su absorbancia se encontrara en un intervalo de 0,05-0,5, valores a los que existe una linealidad entre la lectura de la absorbancia y el número de células. Todas las medidas se han realizado por triplicado.

#### **4.2.2. Recuento de células en cámara de Neubauer**

En otras ocasiones se ha realizado la cuantificación de la concentración celular de *S. cerevisiae* mediante la observación directa en un microscopio de contraste de fases (Nikon Labophot) con una cámara cuentaglóbulos de Neubauer. Con objeto de que la muestra fuera estadísticamente significativa, el número de células por cuadrado era superior a 30.

#### **4.2.3. Observación microscópica directa de los cultivos en lámina**

Los experimentos en los que se ha realizado un seguimiento del comportamiento de células vegetativas o esporas de *S. cerevisiae*, han sido llevados a cabo mediante visualización directa en un microscopio óptico (Nikon Labophot). Las células se sembraban previamente sobre cultivos en láminas y se incubaban a la temperatura adecuada, en el interior de placas de Petri estériles con papel de filtro humedecido con agua estéril.

### **4.3. Determinación del número de viables**

Para llevar a cabo el recuento de células viables de un cultivo de *S. cerevisiae*, se han seguido los métodos indicados a continuación.

#### **4.3.1. Recuento de colonias**

Se sembraban en placas de Petri de 50 a 100 unidades formadoras de colonias (ufc) del cultivo analizado, y se incubaban a una temperatura permisiva para las células. La comparación entre el número de ufc sembradas y las colonias crecidas permitía calcular la mortalidad del cultivo.

#### **4.3.2. Observación directa al microscopio óptico**

Las células se teñían con una solución de yoduro de propidio 0,1 mg/ml y se visualizaban en un microscopio de fluorescencia (Leitz Laborlux S), que poseía el bloque de filtros para excitación azul. El yoduro de propidio es capaz de atravesar la pared de las células muertas y se une a los ácidos nucleicos de doble cadena, emitiendo fluorescencia roja como consecuencia de la excitación con luz ultravioleta (de la Fuente *et al.*, 1992)

#### **4.3.3. Citometría de flujo**

Se realizaba una tinción selectiva de las células estudiadas con yoduro de propidio, según el método descrito por de la Fuente *et al.* (1992). Su seguimiento se realizaba utilizando un citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson, Sunnyvalley, CA, modelo FACScan) del Centro de Citometría de Flujo de la UCM. Para el análisis de los datos se utilizaban los programas CELLQUEST de Becton-Dickinson (San José, CA).

#### **4.4. Determinación del comportamiento celular**

Para obtener información sobre las características fenotípicas de las cepas estudiadas, se ha evaluado su comportamiento a diferentes temperaturas y en diferentes medios de cultivo sólidos y líquidos, a los que en ocasiones se les había adicionado compuestos variados cuyo efecto sobre las cepas se quería analizar.

##### **4.4.1. Comportamiento en medio sólido**

El estudio del comportamiento de las cepas en medio sólido y en diferentes condiciones de cultivo, se realizaba mediante la siembra en forma de botón de  $1 \times 10^3$  células sobre medios de cultivo que poseían diferentes compuestos en distintas concentraciones, que son indicadas detalladamente en el apartado de Resultados correspondiente a cada ensayo. La incubación se realizaba a la temperatura y a la atmósfera adecuada para cada experimento, que también se indican en el apartado de Resultados. Las condiciones de anaerobiosis se conseguían en el interior de una jarra de anaerobiosis con un generador de esta atmósfera (bioMerieux).

##### **4.4.2. Comportamiento en medio líquido**

###### **4.4.2.1. Comportamiento de las cepa según su concentración celular**

Para conocer si el fenotipo condicional de los mutantes en medio líquido dependía de su concentración celular, se han realizado estudios en paralelo de evaluación del comportamiento fenotípico en medio líquido de la misma cepa a dos concentraciones celulares:  $5 \times 10^8$  y  $1 \times 10^4$  células/ml. Los matraces con medio YEPD y YEPD-S se inoculaban a estas concentraciones con células procedentes de cultivos de 24 horas en medio sólido YEPD-S o YEPD respectivamente, y se incubaban a 26 y a 37°C en agitación. Periódicamente durante el ensayo se evaluaba el crecimiento y la viabilidad celular, mediante alguna de las técnicas previamente descritas.

###### **4.4.2.2. Comportamiento en diversas condiciones de cultivo**

Con el objetivo de conocer el comportamiento de las cepas en presencia de diferentes compuestos, se inoculaban matraces a una absorbancia a 600 nm de 0,1 con células procedentes de un cultivo fase exponencial en medio líquido YEPD a 26°C. Los medios de cultivo eran diferentes dependiendo de las características fenotípicas que se deseaban analizar, de modo que se utilizaron medios con diferentes fuentes de carbono, medios modificados deficientes de algunos componentes y medios que habían sido suplementados con compuestos cuyo efecto sobre la cepa quería ser evaluado. La composición de los medios de cultivo empleados así como las condiciones de incubación se detallan en el apartado de Resultados correspondiente a cada experimento. Durante el ensayo se tomaban diversas alícuotas para analizar el crecimiento y la viabilidad celular.

###### **4.4.2.3. Sensibilidad a diferentes compuestos en medio líquido**

El estudio de la sensibilidad de una cepa de *S. cerevisiae* a los antifúngicos anfotericina B y miconazol, así como a etanol ha sido realizado mediante el método de la

microdilución en medio líquido YEPD. Para ello se han depositado  $1 \times 10^3$  células procedentes de cultivos en fase exponencial en YEPD a 26°C, en los pocillos de placas microtiter que poseían diluciones decrecientes del compuesto a ensayar, de modo que cada pocillo contenía la mitad de la concentración que el pocillo anterior. La anfotericina B fue preparada a concentración 10 mg/ml en dimetilsulfóxido, y el miconazol se preparó a 10 mg/ml en metanol. Las concentraciones en los pocillos oscilaron desde 0,002 a 5 µg/ml. Para evitar que el resultado obtenido estuviera influenciado por los disolventes utilizados, se analizaron de manera similar los efectos del dimetilsulfóxido y del metanol sobre el crecimiento de las cepas estudiadas. Del mismo modo se ha calculado la sensibilidad frente a concentraciones de etanol del 0,01 a 16% (v/v). Las incubaciones se realizaban a 26 y a 30°C durante 48 horas, evaluando el crecimiento cada 24 horas.

#### 4.5. Sincronización celular

La sincronización de las células de *S. cerevisiae* ha sido realizada mediante la adición del factor  $\alpha$  (7 µM.) a cultivos en fase exponencial en medio líquido YEPD a 26°C, que poseían una absorbancia a 600 nm de 1. La eficiencia de la parada del ciclo celular se determinaba mediante visualización microscópica, calculando el número de células en fase G0/G1 en muestras de 200 células. Se consideraba que la población celular estaba parada cuando el 95% de las células del cultivo carecían de yema o ésta era muy pequeña. A continuación se lavaban las células con el medio de cultivo YEPD precalentado a 37°C para eliminar el factor  $\alpha$ , y se inoculaban matraces con este medio a una absorbancia de 0,1. Los matraces se incubaban a 37°C en agitación, realizándose un seguimiento de la entrada en el ciclo celular y posterior detención del cultivo mediante la medida de su absorbancia, el recuento de células en cámara de Neubauer y el cálculo de las células en fase G0/G1.

#### 4.6. Estudio de la tasa de reversión de la mutación

Este estudio se ha realizado mediante la siembra de  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ , y  $5 \times 10^9$  células, procedentes de cultivos en fase exponencial en YEPD a 26°C de cada mutante, sobre placas de Petri con medio sólido YEPD. La incubación se realizaba a la temperatura restrictiva de 37°C, disponiendo siempre de un control de crecimiento a 26°C para cada una de las cepas analizadas.

#### 4.7. Técnicas genéticas

##### 4.7.1. Mutagénesis

Para llevar a cabo el proceso de mutagénesis se han utilizado diversos agentes mutagénicos físicos y químicos. Los protocolos utilizados se detallan a continuación.

##### 4.7.1.1. Mutación con luz ultravioleta

La mutación con luz ultravioleta (UV) se realizaba sobre células de *S. cerevisiae* S288C crecidas en matraces con YEPD en agitación a 26°C hasta una absorbancia a 600 nm de 1, que tras ser lavadas dos veces con agua estéril se resuspendían en 20 ml de sorbitol 0,9 M a una concentración de  $1 \times 10^4$  células/ml. Estas suspensiones celulares se

depositaban en placas de Petri, y eran irradiadas con una lámpara de luz UV situada a 24 cm de distancia, a 254 nm durante tiempos diferentes dependiendo del porcentaje de mortalidad deseado, (80-100 s para un rango de mortalidad entre 80-96%). Tras el proceso de mutagénesis se sembraban 100  $\mu$ l y se incubaban a 26 ó a 37°C según los mutantes que se trataban de seleccionar. En todos los experimentos se sembraba una alícuota del cultivo que no había sido sometida al proceso mutagénico y que era utilizada como control de la viabilidad inicial.

#### 4.7.1.2. Mutación con etilmetano sulfonato

Este agente mutagénico se utilizaba para mutar células de *S.cerevisiae* S288C del modo indicado a continuación. Las células procedentes de los cultivos celulares incubados en medio líquido YEPD con agitación a 26°C hasta una absorbancia a 600 nm de 1, eran lavadas con agua estéril dos veces.  $2 \times 10^8$  células se resuspendían en 1,5 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,0, y a continuación 700  $\mu$ l de esta suspensión eran diluidos con 1 ml de tampón en un tubo 13 x 100 mm, sobre el que se adicionaban etilmetano sulfonato (EMS) al 17-20%. El EMS se mantenía en agitación en contacto con las células a 26°C durante tiempos diferentes según la mortalidad deseada (20-30 min para obtener porcentajes de mortalidad comprendidos entre el 30 y el 98%). La inactivación de este agente se realizaba mediante la resuspensión de 0,2 ml de las células tratadas en 8 ml de tiosulfato sódico 5%. A continuación se realizaba una dilución 1/50 con sorbitol 0,9 M estéril y se sembraban 100  $\mu$ l en numerosas placas de Petri. En todos los experimentos se utilizaba como control de la viabilidad inicial una alícuota del cultivo que no había sido sometida al proceso mutagénico.

#### 4.7.1.3. Mutación con ácido nitroso

Las células de *S.cerevisiae* S288C mutagenizadas con este agente, procedían de cultivos crecidos en agitación a 26°C en medio YEPD hasta una absorbancia a 600 nm de 1, que tras ser lavadas con tampón acetato sódico 0,1 M pH 4,5, eran resuspendidas en el mismo tampón a una concentración de  $1 \times 10^8$  células/ml. A esta suspensión se adicionaba nitrito sódico hasta una concentración final de 0,06 M, y se mantenía en agitación a 26°C durante tiempos variables según la mortalidad que se deseaba conseguir (10, 20 y 30 min generaban mortalidades del 82, 95 y 99% respectivamente). La reacción se paraba con tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7,5. A continuación se realizaba una dilución de la suspensión celular en sorbitol 0,9M 1/10<sup>1</sup>, 1/10<sup>2</sup>, 1/10<sup>3</sup> respectivamente para los tiempos indicados anteriormente, y se sembraban 100  $\mu$ l en numerosas placas de Petri. El control de viabilidad se obtenía tras la siembra de una alícuota no sometida al proceso mutagénico, diluida 1/10<sup>5</sup>.

#### 4.7.1.4. Mutación con nitrosoguanidina

Para llevar a cabo la mutación con este agente, se crecía un cultivo de *S. cerevisiae* S288C durante una noche en medio líquido YEPD a 26°C. Las células eran lavadas y resuspendidas en agua estéril a una concentración de  $1 \times 10^8$  células/ml. La nitrosoguanidina (NG) adicionada a esta suspensión celular, así como el tiempo de actuación a 26°C y con agitación, variaban dependiendo de la mortalidad que se deseaba obtener en cada ensayo. Así se empleó 0,005 mg/ml de NG durante 90 min para conseguir una mortalidad del 80%,

y 0,015 mg/ml durante 30, 60 y 90 min para obtener mortalidades de 30, 70 y 95% respectivamente. La inactivación de la NG se realizaba mediante la dilución con tiosulfato sódico 6%: 1/100 para 0,005 mg/ml y 1/500 para 0,015 mg/ml de NG. A continuación se sembraban 100  $\mu$ l de la suspensión celular mutagenizada en diversas placas, así como una alícuota de la suspensión no mutagenizada diluída 1/10<sup>2</sup>.

#### 4.7.1.5. Mutación por congelación a -20°C y descongelación

Este tipo de mutación se realizaba sobre cultivos de *S.cerevisiae* S288C crecidos en YEPD a 26°C hasta una A<sub>600</sub> de 1, cuyas células eran lavadas dos veces con agua estéril y eran resuspendidas a una concentración de 1x10<sup>6</sup> células/ml también en agua. Las suspensiones celulares eran congeladas a -20°C y posteriormente descongeladas a temperatura ambiente. Este proceso se repetía sucesivamente un mínimo de 6 veces. Finalmente se sembraban alícuotas diluidas 1/20 sobre placas de Petri, así como una alícuota de las células no mutagenizadas diluída 1/10<sup>3</sup> que servía como control de la viabilidad celular. La mortalidad de este proceso era del 90-95%.

#### 4.7.1.6. Mutación por calentamiento

Para realizar este proceso mutagénico se crecía *S.cerevisiae* S288C en YEPD a 26°C hasta una absorbancia a 600 nm de 1. Las células se lavaban con agua estéril y se resuspendían en agua a una concentración de 1x10<sup>5</sup> células/ml. Posteriormente se incubaban a 48°C durante 60 minutos, y se sembraban alícuotas de 100  $\mu$ l en numerosas placas de Petri. Asimismo se sembraba una alícuota de las células no mutagenizadas, diluída 1/10<sup>3</sup>, que constituía el control de la viabilidad del cultivo. La mortalidad obtenida en este proceso era superior al 99%.

#### 4.7.2. Obtención de diploides: conjugación

La obtención de cepas diploides a partir de cepas haploides de tipo sexual opuesto, se ha realizado como se indica a continuación. En primer lugar se sembraba un número elevado de células de una de las cepas haploides en forma de botón sobre un medio sólido YEPD. A continuación se depositaba sobre el mismo botón un número similar de células procedentes de la cepa de tipo sexual opuesto, y se incubaban a 26°C. Durante la incubación se observaba la formación de los cigotos al microscopio de contraste de fases, y posteriormente se realizaba su aislamiento en láminas de agar fabricadas sobre cubreobjetos, con la ayuda de un micromanipulador acoplado a un microscopio Nikon Labophot. Estas láminas de agar eran depositadas sobre placas con medio YEPD e incubadas a 26°C.

#### 4.7.3. Esporulación y disección de ascas

La esporulación de los diploides se ha realizado mediante el cultivo previo de las cepas en el medio MPE durante 24 horas a 26°C, y un pase posterior al medio ME o al medio de acetato potásico 1%, dependiendo de la facilidad que tuvieran los diploides para esporular. Asimismo también ha variado el tiempo y la temperatura de incubación, oscilando entre 5-15 días a 20-26°C.

La existencia de ascas se ponía de manifiesto mediante observación microscópica. Cuando el porcentaje de células esporuladas era aproximadamente 80% se realizaba la separación de las esporas mediante la ayuda de un micromanipulador acoplado a un microscopio Nikon Labophot. Para ello se digería la pared con liticasa al 20% durante 10 min a 37°C y posteriormente se depositaban sobre láminas de agar en las que se realizaba la micromanipulación. Estas láminas eran depositadas sobre placas con medio YEPD e incubadas a 26°C durante 72 horas.

#### **4.8. Técnicas de citometría de flujo**

Los estudios de citometría de flujo han sido realizados en el Servicio de citometría de flujo de la UCM con el citómetro de flujo Becton-Dickinson, Sunnyvalley, CA, modelo FACScan, y con el citómetro de flujo BRYTE-HS (Bio-Rad, Hempstead, UK). Para el análisis de los datos se han empleado los programas CELLQUEST de Becton-Dickinson (San José, CA).

La citometría de flujo ha sido utilizada en este trabajo con cuatro finalidades diferentes. En primer lugar se ha empleado para conocer la viabilidad celular de *S. cerevisiae*, como ya se ha indicado anteriormente en el apartado de determinación del número de viables. Las otras tres aplicaciones de esta técnica se comentan a continuación.

##### **4.8.1. Determinación del contenido en DNA de un cultivo de *S. cerevisiae***

El estudio del contenido en DNA de las células que constituyen un mismo cultivo se ha realizado mediante citometría de flujo. Las células se crecían en YEPD hasta una absorbancia a 600 nm de 1-2 a 26°C y se diluían a una absorbancia de 0,2 en el mismo medio, manteniendo su incubación 4-6 horas a 26°C. Al cabo de este tiempo se tomaba una alícuota de este cultivo y se inoculaban dos matraces a una absorbancia de 0,1, que eran posteriormente incubados a 26 y a 37°C, durante 24 horas.

A lo largo del ensayo se recogían diversas alícuotas de aproximadamente  $3 \times 10^6$  células, que tras ser lavadas dos veces con tampón PBS (fosfato sódico 10 mM pH 7,4, NaCl 140 mM) se fijaban durante 1 min con etanol 70%. A continuación, las células se lavaban con tampón PBS dos veces y se sometían a un tratamiento con RNasa (1 mg/ml) durante 30 min a 37°C. Finalmente se eliminaba la enzima mediante otros dos lavados, y las células se incubaban con yoduro de propidio (0,05 mg/ml concentración final) durante 10 min antes de ser analizadas con el citómetro de flujo Becton-Dickinson, Sunnyvalley, CA, modelo FACScan. En cada muestra se estudiaban  $10^4$  células.

##### **4.8.2. Determinación de algunos parámetros celulares de *S. cerevisiae***

Para analizar algunos de los parámetros celulares de *S. cerevisiae* mediante citometría de flujo, se han cultivado las células del mismo modo que se ha comentado en el apartado anterior. Así el cultivo en fase exponencial era diluído en primer lugar a una absorbancia a 600 nm de 0,2, y tras 4-6 horas de incubación se diluía nuevamente a una absorbancia de 0,1. Estos matraces eran igualmente incubados a 26 y a 37°C durante 24 horas tomando diversas alícuotas a lo largo del ensayo. Las alícuotas estaban constituidas por  $3 \times 10^6$  células aproximadamente, que tras ser lavadas con tampón PBS eran incubadas

durante 30 min en las mismas condiciones de cultivo con los fluorocromos adecuados al proceso que se quería evaluar, y que se indican a continuación:

- Cantidad de proteínas : Rojo Nilo
- Cantidad de lípidos: Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
- Actividad de la superóxido dismutasa mitocondrial: Hidroetidio
- Actividad de la peroxidasa citoplasmática: Dihidrocloro fluoresceína (DCFH)
- Potencial de membrana mitocondrial: Rodamina 123

Posteriormente las células se lavaban dos veces con tampón PBS y se analizaban en el citómetro de flujo Becton-Dickinson, Sunnyvalley, CA, modelo FACScan. En cada muestra se estudiaban  $1 \times 10^4$  células.

#### **4.8.3. Estudio semicuantitativo de quitina**

Para tratar de conocer las posibles diferencias cuantitativas entre los niveles de quitina de distintas cepas de *S. cerevisiae*, se han realizado medidas semicuantitativas por citometría de flujo del polímero capaz de unirse al blanco calcoflúor. Las células han sido procesadas como en los apartados anteriores, diluyendo el cultivo celular en dos ocasiones e incubándolo a 26 y 37°C durante 24 horas. Las alícuotas tomadas a lo largo del cultivo se lavaban con el tampón PBS en dos ocasiones y se incubaban en presencia de blanco calcoflúor 2 µg/ml durante 15 min en las mismas condiciones de cultivo. A continuación eran analizadas en el citómetro de flujo BRYTE-HS (Bio-Rad, Hempstead, UK), equipado con una lámpara de xenon-mercurio para excitar con luz UV el calcoflúor. La señal fluorescente procedente de  $5 \times 10^3$  células se recogía mediante un filtro azul.

#### **4.9. Técnicas de microscopía**

A continuación se indican las diferentes técnicas microscópicas que han sido empleadas en este trabajo.

##### **4.9.1. Microscopía óptica**

Las muestras de levaduras han sido observadas en montajes húmedos, en un microscopio Nikon Labophot-2, empleando un objetivo de contraste de fases 40X y un ocular 10X.

Para los ensayos con fluorocromos (IP y calcoflúor) se han utilizado los microscopios de fluorescencia Leitz (Nikon Labophot) y Olympus IMT-2 equipados con lámpara de mercurio y filtros de excitación UV.

##### **4.9.2. Microscopía electrónica de barrido**

Esta técnica ha sido empleada en una de sus modalidades, denominada *Crioscanning*, para obtener información sobre la morfología externa e interna de algunas cepas de *S. cerevisiae*. La preparación y observación de las muestras se ha realizado en el Servicio de Microscopía del Centro de Ciencias Medioambientales del C.S.I.C. (Madrid), siguiendo el protocolo indicado a continuación.

Las células se resuspendían en un tampón PBS con 10% de glicerol y se congelaban en nitrógeno líquido al vacío. Algunas de las muestras se fracturaban para observar la morfología celular interna. A continuación el agua de congelación era sublimada y se realizaba un tratamiento con oro para incrementar los contrastes.

#### 4.9.3. Microscopía electrónica de transferencia

Esta técnica ha sido utilizada para obtener información sobre la ultraestructura de algunas cepas de *S. cerevisiae*. La preparación y la observación de las muestras se ha realizado en el Servicio de Microscopía del Centro de Ciencias Medioambientales del C.S.I.C., Madrid, siguiendo el protocolo indicado a continuación.

Las células eran inicialmente prefijadas con una solución de paraformaldehído 1%-glutaraldehído 1% durante 2 horas a 4°C. Pasado este tiempo se lavaban y se resuspendían en agar, troceándolo seguidamente. La postfijación se realizaba con permanganato potásico durante dos horas a 24°C, y a continuación se lavaban repetidamente en tampón PBS durante 3 horas. La deshidratación se realizaba en acetona de concentración creciente (30%, 50%, 70%, 90% y 100%) durante 15 min cada paso, excepto la etapa en acetona 70% que duraba toda la noche. Posteriormente eran incluidas en la resina Spurr de la manera siguiente:

- resina/propileno 1/3: 1 hora
- resina/propileno 2/2: 1 hora
- resina/propileno 3/1: 12 horas
- resina/propileno 3/3: 72 horas

Finalmente las muestras se incluían en resina Spurr durante 24 horas a 70°C.

El estudio de la ultraestructura de la membrana plasmática también ha sido realizada mediante microscopía de transmisión. Para ello las células estudiadas habían sido sometidas previamente a un proceso de criofijación y criofractura en el Servicio Científico-Técnico de la Universidad Autónoma de Barcelona, que permite obtener réplicas de la cara protoplásmica y exoplásmica de la membrana plasmática de células fracturadas. Los protocolos seguidos en los procesos de criofractura y criofijación se indican a continuación.

Las levaduras eran fijadas en presencia de paraformaldehído 5,7% durante 1 hora en agitación y en las mismas condiciones en que habían sido cultivadas, y posteriormente durante 72 horas a 4°C. La criofijación se realizaba mediante la inmersión del pellet en propano licuado en nitrógeno líquido a una temperatura de -189°C. A continuación se llevaban a cabo los procesos de criofractura y replicación, utilizando un equipo Balzers Freeze-etching system modelo BAF 060 en las condiciones siguientes:

- vacío:  $1 \times 10^{-6}$  mbar
- T<sup>a</sup> de fractura: -110°C
- tiempo y T<sup>a</sup> de sublimado del hielo después de la fractura: 5 min a -100°C
- sombreado Pt/C: espesor de 2 nm a un ángulo de 45°
- sombreado de C: espesor de 20 nm a un ángulo de 90°

Posteriormente las muestras eran digeridas en lejía durante una noche, y lavadas con agua destilada tres veces, con un periodo de duración de una hora en cada lavado. Las réplicas se recogían en rejillas de oro de 400 mesh y eran analizadas en un microscopio electrónico de transferencia.

#### 4.9.4. Microscopía confocal

Esta técnica que ha sido empleada en la inmunolocalización de la proteína de fusión CLYTA-Ypl007cp, se ha realizado en el Centro de Citometría de Flujo de la UCM, utilizando un microscopio confocal de barrido láser MRC-1000 (Bio-Rad, Hempstead, UK) equipado con láser de argón y 3 pmts. El análisis de las imágenes se realizó con el programa COMOS (Bio-Rad).

Las células se cultivaban durante 24-30 horas a 26°C en un medio MDA carente de uracilo que asegurara la presencia de la fusión génica. Cuando la absorbancia a 600 nm era aproximadamente de 1, se inoculaban matraces con medio YEPD a una absorbancia de 0,1 y se incubaban durante una noche a 26°C. Posteriormente se recogían  $2 \times 10^8$  células, se comprobaba mediante tinción con yoduro de propidio 0,1 mg/ml que su mortalidad era pequeña, y se fijaban en presencia de paraformaldehído 5,7% durante 1 hora en agitación y en las mismas condiciones en que habían sido cultivadas. A continuación las células eran lavadas con tampón PBS tres veces, resuspendidas en 10 ml del mismo tampón, y mantenidas a 4°C durante 18-48 horas. Transcurrido este tiempo se recogían  $2 \times 10^7$  células y se resuspendían en 1 ml de tampón PBS-sorbitol 1 M. Estas células eran tratadas con zimoliasa (2 mg/ml) a 37°C en agitación durante 3-6 min dependiendo de la cepa. Seguidamente se lavaban tres veces con el tampón PBS-sorbitol 1 M y se incubaban en primer lugar con un anticuerpo policlonal de conejo obtenido frente al dominio CLYTA, cedido por el Dr. Sánchez-Puelles, y previamente inmunoabsorbido durante una noche a 37°C frente a un cultivo lisado de *S. cerevisiae* para evitar inmunofluorescencia inespecífica. Tras la incubación con el anticuerpo policlonal, y dos lavados sucesivos con tampón PBS, las células se incubaron con un segundo anticuerpo monoclonal anti IgG de conejo marcado con el fluorocromo Cy3. La fluorescencia emitida por el fluorocromo, permitió la localización de la proteína de fusión en el interior celular.

## 5. TECNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR: MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Las técnicas básicas de biología molecular se han realizado según las indicaciones clásicas de Sambrook *et al.* 1989.

### 5.1. Manipulación del DNA

#### 5.1.1. Aislamiento del DNA plasmídico de *E. coli*

El aislamiento del DNA plasmídico de *E. coli* en minipreparaciones se ha realizado siguiendo una modificación del método de lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989), en el que se han eliminado las fenolicaciones.

En los casos en los que se necesitó un DNA plasmídico de mayor pureza para que pudiera ser secuenciado, se siguieron dos protocolos diferentes dependiendo del servicio de secuenciación utilizado. Para la secuenciación en el Servicio de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, se purificaba el DNA plasmídico utilizando el sistema comercial de *Quiagen* de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la secuenciación en los servicios del Centro Nacional de Biotecnología y en el del Instituto de Investigaciones Biológicas, se extraía el DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina y se precipitaba de la manera indicada en Sambrook *et al.*, (1989). A continuación el DNA precipitado se resuspendía en 16,8 µl de agua destilada, 3,2 µl de cloruro sódico 5 M y 20 µl de polietilenglicol de 6000 u 8000 al 13 %, y se incubaba en hielo durante 30 minutos. La recuperación del DNA plasmídico se realizaba mediante centrifugación durante 10 min a 12000 xg a 4°C. Posteriormente el sedimento era lavado con etanol 70%, secado a vacío y resuspendido en 100 µl de agua destilada. A continuación se realizaba una extracción con fenol:cloroformo (1:1) y una última precipitación con acetato amónico 4 M y etanol absoluto.

### 5.1.2. Aislamiento del DNA plasmídico de *S.cerevisiae*

La extracción del DNA plasmídico se ha realizado siguiendo dos métodos diferentes durante el desarrollo de este trabajo:

- Lisis de *S. cerevisiae* con bolitas de vidrio (Hoffman y Winston, 1987). Las células se crecían en el medio adecuado hasta una absorbancia a 600 nm de 1-2 a 26°C y eran posteriormente lisadas con bolitas de vidrio de 0,425 mm de diámetro (SIGMA) en presencia de una solución de ruptura constituida por Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM. Una vez que el 90% de la población celular había sido lisada, se realizaba una extracción del DNA plasmídico con fenol:cloroformo (1:1). Posteriormente el DNA extraído se precipitaba con acetato sódico 0,3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. El DNA obtenido era seguidamente amplificado en *E. coli*, para lo que se realizaba una transformación de este microorganismo por electroporación y una extracción del DNA plasmídico mediante la realización de minipreparaciones.

La cantidad de DNA plasmídico extraído por este método era pequeña, especialmente en los vectores centroméricos, por lo que se adoptó el protocolo alternativo que se indica a continuación.

- Electroporación de *S. cerevisiae*. Se resuspendían en 100 µl de agua estéril las células procedentes de 1 cm<sup>2</sup> de una placa de Petri que habían sido incubadas durante una noche. A continuación las células se lavaban tres veces con agua estéril y se resuspendían en 100 µl de agua. La electroporación se realizaba en cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad) en un electroporador Gene Pulser (Bio-Rad), en condiciones de 2500 voltios, 200 ohmios y 25 µF de capacitancia. Tras la adición de 10 µl de SDS 10%, se realizaba una primera extracción con fenol y una segunda con cloroformo. El sobrenadante se precipitaba con etanol absoluto en presencia de acetato sódico 0,3 M y se lavaba con etanol 70%. El DNA precipitado se secaba y se resuspendía en 10 µl de agua. La amplificación de este DNA se realizaba mediante la transformación de células electrocompetentes de *E. coli* en las mismas condiciones, y una posterior extracción del DNA plasmídico mediante la lisis alcalina de minipreparaciones.

### 5.1.3. Aislamiento del DNA total de *S.cerevisiae* y de *C. albicans*

Para la obtención de DNA total de *S.cerevisiae*, se ha seguido básicamente uno de los métodos recomendados por Johnston (1988) para obtener un DNA de elevada pureza. En primer lugar se obtenían protoplastos mediante la incubación con zimoliasa (2 mg/ml) y posteriormente se lisaban para recuperar el DNA. Se realizaban sucesivas extracciones con fenol:cloroformo (1:1) y finalmente el DNA se precipitaba con etanol absoluto.

### 5.1.4. Aislamiento del DNA total de *A. fumigatus*

La extracción del DNA total de *A. fumigatus* se ha realizado siguiendo un método basado en el protocolo recomendado por Lee y Taylor (1990). En este método se realizaba la lisis de un cultivo muy esporulado de *A. fumigatus*, crecido en YEPD a 26°C durante una semana. Las esporas se recuperaban por centrifugación, se liofilizaban a vacío y se congelaban a -80°C. La lisis de las esporas se realizaba mediante trituración en nitrógeno líquido. El homogeneizado se alicuotaba y se mezclaba bien con 500 µl de tampón de lisis (Tris HCl 50 mM pH 7,2, EDTA 50 mM y SDS 3%). Se calentaba a 65°C durante 1 hora en un baño de agua y a continuación se realizaba una primera extracción con fenol:cloroformo (1:1). El sobrenadante era tratado con RNAsa (50 µg/ml) durante 30 min a 37°C, y a continuación se realizaban dos nuevas extracciones con fenol:cloroformo (1:1) pH 7,8. El DNA se precipitaba con 0,6 volúmenes de isopropanol en presencia de acetato sódico 0,3 M. El precipitado se lavaba dos veces con etanol 70% y se resuspendía en TE.

### 5.1.5. Aislamiento del DNA total de linfocitos humanos

Este proceso se ha llevado a cabo a partir de células de linfocitos humanos (linfocitos T) que procedían de la línea Jurkat (ATCC CRL 8163). Las células se crecían durante 12 horas en el medio RPMI 1640 (PAA Lab. Inc.) suplementado con suero fetal de ternera (10% v/v, PAA Lab. Inc.), con 100 U/ml de penicilina-estreptomina y con glutamina 4 mM, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C. El suero fetal se inactivaba previamente a 56°C durante media hora. Las células se lavaban con tampón PBS, recogiendo las células con centrifugaciones suaves. A continuación se resuspendían en 4 ml de la solución de lisis (Tris HCl 10 mM pH 7,5, cloruro sódico 400 mM y EDTA 2 mM) y se trataban con 0,1 mg/ml de Proteinasa K y 110 µl de SDS 10%. La mezcla se mantenía a 60°C durante una hora. A continuación se adicionaban 350 µl de cloruro sódico 6 M y tras agitar fuertemente durante 15 s se centrifugaba a 1500 xg durante 15 min a 20°C. El DNA disuelto en el sobrenadante se recuperaba mediante precipitación con etanol absoluto. A continuación se lavaba dos veces con etanol 70% y se resuspendía en tampón TE.

### 5.1.6. Amplificación de genotecas en *E.coli*

En este trabajo se han amplificado las genotecas de *S. cerevisiae* CEN BANK, pURSC1, MATCHMAKER y la 37323 de la ATCC (tabla 4), siguiendo las indicaciones de Sambrook *et al.* (1989) para la obtención de grandes cantidades de DNA plasmídico. Para ello las células de *E. coli*, que tenían clonada las genotecas, se crecían en el medio LB líquido suplementado con ampicilina, del modo recomendado. A continuación las células eran sembradas en numerosas placas del mismo medio, de manera que fuera posible obtener tres colonias para cada uno de los clones de la genoteca. A continuación se

recogían las células crecidas en las placas, se lisaban con lisozima y se continuaba el procesamiento del DNA plasmídico siguiendo las indicaciones de Sambrook *et al.* (1989).

#### **5.1.7. Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

Los geles de agarosa utilizados han sido preparados, siguiendo las instrucciones de Sambrook *et al.* (1989), a diferentes concentraciones (0,7-1,2%) según el tamaño del DNA que se quería analizar. Asimismo la preparación de las muestras de DNA y la electroforesis también se ha realizado como indica la misma referencia. La tinción con bromuro de etidio 5µg/ml permitía visualizar los fragmentos de DNA al ser iluminados con radiación ultravioleta.

#### **5.1.8. Extracción del DNA a partir de geles de agarosa**

El aislamiento del DNA de los geles de agarosa se ha realizado mediante la utilización del *kit* comercial *GeneClean* (BIO 101, La Jolla, California), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

#### **5.1.9. Determinación del tamaño, pureza y concentración del DNA**

Para conocer el tamaño de los fragmentos lineales de DNA se han utilizado diferentes patrones de peso molecular suministrados por casas comerciales o contruidos a partir de la digestión de plásmidos conocidos.

La pureza del DNA ha sido determinada mediante el cálculo del cociente de las absorbancias a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro UNICAM 8620 UV/VIS.

La concentración del DNA ha sido determinada mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm, considerando que un valor de 1 equivale a una concentración de 50 µg/ml para DNA de doble cadena, de 40 µg/ml para DNA de cadena sencilla y de 20 µg/ml para oligonucleótidos.

#### **5.1.10. Digestión del DNA**

La digestión del DNA con enzimas de actividad endonucleásica y exonucleásica se ha realizado según especifica Sambrook *et al.* (1989).

#### **5.1.11. Desfosforilación del extremo 5' del DNA**

Para evitar la recircularización del vector cuando éste había sido digerido con una única enzima de restricción, se han desfosforilado los extremos 5' del DNA mediante el tratamiento con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP), siguiendo el procedimiento descrito por Sambrook *et al.* (1989). La fosfatasa alcalina era posteriormente eliminada mediante extracción con fenol:cloroformo, o mediante inactivación durante 20 min a 70°C.

### 5.1.12. Ligación del DNA

Este proceso se ha realizado siguiendo las indicaciones generales de Sambrook *et al.* (1989); utilizando la DNA ligasa del fago T4.

### 5.1.13. Transferencia del material genético

#### 5.1.13.1. Transformación de *E. coli*

La transferencia del material genético a *E. coli* se ha realizado siguiendo dos métodos diferentes según la eficiencia de transformación que se deseaba conseguir.

- Transformación química. Se ha seguido el método de Chung *et al.* (1989), que consiste en una transformación en frío de células competentes preparadas mediante un tratamiento con polietilenglicol (PEG), dimetil sulfóxido (DMSO) y sales de magnesio.

- Electroporación. Se ha utilizado en los casos en los que se requería una mayor eficiencia de transformación. La preparación de las células de *E. coli* electrocompetentes en las que se introducía el DNA plasmídico, se realizaba mediante lavados sucesivos con agua y glicerol 10% enfriados en hielo, de un cultivo con absorbancia a 600 nm de 0,5 a 0,8. Las células eran dispensadas en alícuotas de 40  $\mu$ l y se almacenaban a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La electroporación se realizaba con un electroporador Gene Pulser (Bio-Rad), en cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad) y en las condiciones de 2500 voltios, 200 ohmios y 25  $\mu$ F de capacitancia, utilizando un volumen máximo de 5  $\mu$ l de DNA plasmídico resuspendido en agua. Las células transformadas se incubaban en medio SOC durante una hora a  $37^{\circ}\text{C}$  y posteriormente eran sembradas en el medio adecuado.

#### 5.1.13.2. Transformación de levaduras

La transformación de *S. cerevisiae* se ha realizado mediante el tratamiento de las células con acetato de litio siguiendo básicamente las directrices indicadas en Ausubel *et al.* (1985-1997), modificando las condiciones de incubación de las células durante la transformación. Así las células se incubaban en agitación fuerte durante 15 min a  $45^{\circ}\text{C}$  en presencia del DNA, PEG, esperma de salmón y acetato de litio, y posteriormente se sembraban e incubaban en las condiciones adecuadas. En todos los ensayos se utilizaba como control negativo del proceso una alícuota tratada de manera similar pero sin DNA plasmídico, que permitía detectar contaminantes o células revertientes. Además se realizaba una transformación con un plásmido control para conocer la eficiencia del proceso.

### 5.1.14. Secuenciación del DNA

La secuenciación de la mayoría de los fragmentos de DNA estudiados en este trabajo ha sido realizada en el Centro de Secuenciación de la Facultad de Farmacia de la UCM, en el Centro de Secuenciación del Centro Nacional de Biotecnología y en el Centro de Secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas, los dos últimos pertenecientes al C.S.I.C.

Las reacciones de secuenciación realizadas en nuestro laboratorio se han llevado a cabo con el *kit Themosequenase* (Amersham) y ( $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ) ATP como nucleótido marcado radiactivamente, siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

La preparación de los DNA moldes se ha descrito previamente en el apartado de aislamiento del DNA plasmídico de *E. coli* y los oligonucleótidos utilizados en la secuenciación se indican en la tabla 6.

#### 5.1.15. Hibridación DNA-DNA, *Southern blot*

Esta técnica ha sido realizada siguiendo las indicaciones básicas de Sambrook *et al.* (1989).

En primer lugar se marcaba radiactivamente el fragmento de DNA utilizado como sonda con ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ) dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham) mediante el *kit Multiprime DNA labelling system* (Amersham), que permite sintetizar pequeñas cadenas de nucleótidos marcadas.

Los procesos de desnaturalización, neutralización y transferencia capilar del DNA de los geles de agarosa a membranas de nitrocelulosa (Amersham), fueron realizadas de acuerdo a Sambrook *et al.* (1989), adaptadas a las indicaciones específicas de la membrana.

La prehibridación e hibridación de sondas radiactivas con DNA fijado a las membranas se realizaba con la solución *Rapid Hybrid Buffer* (Amersham) en un horno de hibridación (Hybaid). La temperatura de hibridación oscilaba entre 45 y 65°C según el ensayo, y el tiempo de hibridación era de dos horas. Las membranas se lavaban con SSC 3X SDS 0,1% dos veces durante 10 min a la misma temperatura de hibridación, y con SSC 0,5X SDS 0,1% en idénticas condiciones. El revelado se realizaba mediante autorradiografía utilizando películas *Hyperfilm<sup>TM</sup>-Mp* (Amersham).

#### 5.1.16. Amplificación de DNA mediante PCR

La amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se ha realizado en un aparato Perkin-Elmer Cetus, DNA Thermal Cycler. Los oligonucleótidos se utilizaban en concentración final de 0,9  $\mu\text{M}$ , los desoxinucleótidos (Boehringer-Mannheim) a 0,25 mM y el DNA molde a 1 ng/ $\mu\text{l}$ . La polimerasa utilizada variaba según la fidelidad de la amplificación que se quería obtener, de manera que se han empleado *Taq* polimerasa (Promega), *Pfu* polimerasa (Stratagene) o una mezcla de *Taq* DNA y *Pwo* DNA polimerasas (Boehringer).

En general, las condiciones de desnaturalización del DNA eran de 94°C durante 1 min. La hibridación se llevaba a cabo durante 2 min a una temperatura variable según el caso, y la extensión se mantenía 2 min a 72°C. El número de ciclos era de 30 cuando el DNA molde era DNA plasmídico, y ascendía a 40 cuando se trataba de DNA cromosómico. Para terminar el proceso se realizaba una extensión final durante 10 min a 72°C.

Las variaciones de estas condiciones generales son comentadas en el apartado de Resultados correspondiente.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se indican en la tabla 6.

#### 5.1.17. Determinación de los sitios de iniciación de la transcripción mediante el empleo de la técnica de extensión con un iniciador (*primer extension*)

Para localizar el sitio de iniciación de la transcripción del gen *YPL007C*, se ha seguido un protocolo basado en el método de Chandry *et al.* (1994), que se describe a continuación. En primer lugar, se realizaba una desnaturalización a 90°C de 1,5 µg de mRNA que había sido extraído de células en fase exponencial en medio líquido YEPD a 26°C, y 0,3 µg de oligonucleótido PEX103. A continuación tenía lugar su anillamiento a 45°C durante 5 min. La síntesis de cDNA se realizaba en un volumen de reacción de 10 µl que contenía 30 U de la transcriptasa inversa (M-MuLV, Promega), 15 µCi ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P) dCTP, dATP 100 µM, dGTP 100 µM, dCTP 10 µM, dTTP 100 µM, Tris-HCl 50 mM pH 8,5, cloruro potásico 50 mM, cloruro magnésico 20 mM y DTT 10 mM. La reacción se incubaba a 45°C durante 60 min y se detenía con hidróxido sódico a una concentración final de 0,4 M, manteniéndose 12 horas a temperatura ambiente para desnaturalizar los ácidos nucleicos. Posteriormente se neutralizaba la mezcla con ácido acético 0,4 M y se precipitaba con dos volúmenes de etanol absoluto, disolviéndose en una solución 1:1 (v/v) de agua y solución de colorante (azul de bromofenol 0,3%, xilencianol 0,3%, EDTA 10 mM pH 7,5 y formamida desionizada 97,5%). Para analizar la longitud de los productos de la extensión, y por tanto, el punto de iniciación de la transcripción, se realizó una electroforesis cargando las muestras en un gel de poliacrilamida al 6% con urea 9 M, y detectándose el resultado por autorradiografía. La secuenciación del plásmido pUC18 con el oligonucleótido universal se utilizó como referencia para localizar el punto de iniciación de la transcripción en el genoma.

## 5.2. Estudio del RNA

### 5.2.1. Extracción de RNA total y purificación del mRNA

La extracción del RNA total se ha realizado a partir de muestras de 0,2-0,3 g de células de *S. cerevisiae*, mediante lisis mecánica con bolitas de vidrio 0,425 mm en presencia de los inhibidores de RNAsas tiocianato de guanidina y  $\beta$ -mercaptoetanol. El RNA se purificaba con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25/24/1) a pH ácido y se precipitaba con isopropanol. Los reactivos utilizados procedían del *kit RNAGents, Total RNA Isolation System* (Promega).

El aislamiento del mRNA a partir del RNA total se ha realizado con el *kit* comercial *PolyA Tract, mRNA Isolation System III* (Promega) que permite la hibridación del mRNA con el oligo(dT)-biotina y una posterior captura del híbrido con estreptavidina unida a partículas magnéticas.

### 5.2.2. Determinación del tamaño, pureza y concentración del RNA

Para conocer el tamaño del mRNA se ha utilizado un patrón comercial de peso molecular.

La pureza del RNA ha sido determinado mediante el cálculo del cociente de las absorbancias a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro UNICAM 8620 UV/VIS.

La concentración del RNA ha sido determinada mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm, considerando que una unidad equivale a una concentración de 40 µg/ml.

### 5.2.3. Hibridación RNA-DNA, *Northern blot*

Esta técnica ha sido realizada siguiendo las indicaciones básicas de Sambrook *et al.* (1989).

La sonda de DNA empleada en esta técnica ha sido marcada radiactivamente con ( $\alpha$ - $^{32}$ P) dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham) mediante el *kit* comercial *Multiprime DNA labelling system* (Amersham), al igual que en los ensayos de hibridación DNA-DNA.

La transferencia del RNA a membranas de nylon (*Hybond<sup>TM</sup>N*, Amersham) se realizaba mediante capilaridad, siguiendo las indicaciones de Sambrook *et al.* (1989), aplicando las modificaciones indicadas por el fabricante de la membrana. Posteriormente se comprobaba el estado del RNA mediante la tinción de la membrana con una solución de azul de metileno 0,04% en acetato sódico 0,5 M pH 5,2 durante 5 a 10 min.

La hibridación RNA-DNA se realizaba a 65°C, en las mismas condiciones en que se realizaba la hibridación DNA-DNA comentada anteriormente, aunque se modificaban las condiciones de lavado, de manera que se realizaban 2 lavados de 10 min con SSC 2X, SDS 0,1% a temperatura ambiente y 2 lavados de 15 min con SSC 0,1X, SDS 0,1% a 65°C.

Las bandas de hibridación se analizaban por autorradiografía utilizando películas de alta sensibilidad (*Biomax MS*, Kodak) y pantallas intensificadoras.

## 6. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

### 6.1. Obtención de proteínas heterólogas

#### 6.1.1. Expresión en *E. coli*

La expresión de genes heterólogos ha sido realizada en la cepa de *E. coli* BL21(DE3)plysS. Para ello se preparaba un preinóculo durante 18 horas a 37°C en 2 ml de medio LB suplementado con ampicilina y cloranfenicol. Posteriormente se utilizaba este cultivo para inocular un matraz con medio LB y otro con medio M9, de manera que el preinóculo quedara diluido 100 veces. Los matraces inoculados se incubaban a 37°C hasta que la absorbancia a 600 nm fuera de 0,3 a 0,5. A continuación inducía la expresión mediante la adición de IPTG a concentración final de 1 mM, tomando alícuotas durante las 5 horas posteriores. Las células se centrifugaban y se lisaban mediante congelación a -20°C y descongelación rápida a 37°C. El pLysS es un plásmido que tiene clonado el gen de la lisozima del fago T7 que infecta *E. coli*, el cual, tras la congelación y descongelación de las células provoca la lisis de las mismas. A continuación se resuspendían en 250  $\mu$ l del tampón de lisis (Tris HCl 62 mM pH 6,8, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0,005%), se sonicaban durante 15 s para romper el DNA y se mantenían a 100°C durante 5 min. Finalmente se realizaba una centrifugación a 12000 xg durante 5 min para eliminar las envueltas celulares y precipitar el DNA. Los extractos celulares se analizaban por SDS-PAGE y por *Western blot*.

#### 6.1.2. Expresión en *S. cerevisiae*

Para llevar a cabo la expresión de las fusiones génicas en *S. cerevisiae*, se ha partido de un cultivo a 28°C en medio MDA, que carecía de los aminoácidos adecuados para asegurar el mantenimiento del plásmido en el que estaba clonada la construcción a

expresar. Este cultivo se incubaba durante el tiempo necesario hasta que su absorbancia a 600 nm fuera de 1 y posteriormente se utilizaba para inocular un matraz con medio YEPD a una absorbancia de 0,1. Este matraz se incubaba a 28°C durante una noche. Las células se recogían por centrifugación 10 min a 1500 xg, se resuspendían en el tampón de lisis (Tris HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 2 mM pH 8, NaCl 100 mM) a una absorbancia equivalente a 250 y se lisaban con bolitas de vidrio de 0,425 mm de diámetro mediante sucesivas agitaciones en vortex con pulsos de 20 s intercalados con enfriamiento en hielo. Finalmente se separaban los restos celulares de la fase acuosa mediante centrifugación a 12000 xg durante 15 min a 4°C. Las proteínas se valoraban con el método de Bradford y se analizaban 10 µg en geles de SDS-PAGE y por *Western blot*.

## 6.2. Cuantificación de proteínas

Se ha utilizado el método de Bradford (1976), mediante la extrapolación de los valores obtenidos en una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (2,5-25 µg/ml). El reactivo de Bradford era suministrado por Bio-Rad, y el espectrofotómetro utilizado era un Unicam 8620 UV/VIS.

## 6.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS

La electroforesis monodimensional de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se ha realizado en geles de poliacrilamida según el método descrito por Laemmli (1970). Los geles de poliacrilamida se preparaban a concentración variable del 10-15% el gel separador, según el tamaño de la proteína estudiada, y una parte de gel concentrante al 3 ó 5%. Las muestras se hervían durante 5 min en presencia del tampón de lisis (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0,005%). Las electroforesis se realizaban en un equipo Miniprotean de Hoeffler a temperatura ambiente y corriente constante (50 mA, utilizando un electrolito que contenía Tris HCl 0,025 M, glicina 0,192 M y SDS 0,1%).

La detección de las proteínas en geles de poliacrilamida se ha llevado a cabo mediante la tinción con Azul Brillante de Coomassie R-250 y posterior decoloración según Sambrook *et al.* (1989). La determinación del tamaño molecular de las proteínas se ha realizado mediante su comparación con marcadores de tamaño (Bio-Rad).

## 6.4. Inmunodetección de proteínas: *Western blot*

Esta técnica se ha realizado mediante una separación de las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y una transferencia a membranas de nitrocelulosa de 0,45 micron (Bio-Rad), en una cubeta de transferencia (Hoeffler) a un voltaje constante de 50 v durante 150 min, o bien a 30 v durante toda la noche a 4°C. La correcta transferencia de las proteínas se visualizaba mediante tinción con una solución de rojo Ponceau 0,5% y ácido tris-cloro acético 1%.

La membrana se saturaba con leche desnatada al 5% (p/v), en tampón PBS mediante incubación a 37°C durante una noche en agitación suave. A continuación, se incubaba con un anticuerpo policlonal anti-ClytA (cedido por el Dr. Sánchez-Puelles), en dilución 1:10000, en una solución compuesta por PBS y Tween 20 al 0,1% (v/v). La incubación se realizaba durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. A

continuación, la membrana se lavaba 3 veces con la solución anterior, realizando un primer lavado de 15 min, y un segundo y tercero de 5 min. Posteriormente la membrana se incubaba con un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo, conjugados con peroxidasa, diluidos 1:1000 en la solución descrita durante una hora. Finalmente, tras un lavado de 15 min y 4 lavados de 5 min con la solución PBS y Tween al 0,1% (v/v), las bandas de reacción se visualizaban con los reactivos comercializados por Amersham para la detección de proteínas *ECL Western blotting*.

### 6.5. “Sistema dos híbridos”

La búsqueda de interacciones proteína-proteína se ha realizado mediante el “sistema dos híbridos” siguiendo las recomendaciones del fabricante (MATCHMAKER Two-Hybrid System 2, Cat # K1604-1, Clontech).

Los genes *MPS1* e *YPL007C* se clonaron en el vector pAS2-1 (tabla 5), obteniendo las construcciones pASMPS1 y pASYPL, respectivamente (tabla 6). En primer lugar, se transformaron las cepas Y190 y CG-1945 con dichas construcciones, siguiendo el protocolo de transformación a pequeña escala sugerido por el fabricante y que está basado en el método del acetato de litio (Ausubel *et al.*, 1985-1997). Se analizó la capacidad de activación transcripcional inespecífica de los genes en estudio ensayando la actividad  $\beta$ -galactosidasa de clones obtenidos con ambas cepas. En segundo lugar, tras seleccionar los clones pASYPL:Y190 y pASYPL:CG-1945, se transformaron con la genoteca MATCHMAKER Genomyc Library (tabla 4), seleccionándose los clones His<sup>+</sup>. Posteriormente se ensayaba su actividad  $\beta$ -galactosidasa con objeto de verificar la existencia de interacciones proteína-proteína. El ensayo de  $\beta$ -galactosidasa se realizó sobre filtros Whatman #5 previamente impregnados con las colonias a ensayar, utilizando como substrato X-gal (0,33 mg/ml).

## 7. ANALISIS CROMATOGRÁFICOS

El estudio de la producción y consumo de algunos metabolitos por diferentes cepas de *S. cerevisiae* durante su crecimiento en fermentadores, se ha llevado a cabo mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en un cromatógrafo Beckman System Gold. Estos análisis se han realizado en colaboración con el grupo de Fermentación del Centro de Investigación Básica de SmithKline-Beecham.

Los caldos estudiados procedían de la centrifugación de las alícuotas tomadas en diferentes momentos del cultivo en fermentador de *S. cerevisiae* en condiciones controladas. Para analizar los azúcares, los alcoholes y los ácidos orgánicos se utilizaba una columna Aminex HPX-87H (300mmX 7,8 mm) de Bio-Rad siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizaba un detector de índice de refracción para analizar los azúcares y los alcoholes, y un detector de UV 220nm para los ácidos orgánicos.

El análisis de los aminoácidos requería un tratamiento previo del caldo a analizar, con el objetivo de derivatizar los aminoácidos. Para ello se utilizaba el *kit* comercial *Waters AccQ-Fluor Reagent Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación la muestra tratada era inyectada en una columna AccQ-Tag Aminoacid Analysis Column

4 $\mu$  C<sub>18</sub> (3,9 mmX150 mm) Waters, utilizando un detector de luz UV y otro de fluorescencia.

## **8. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS DE DNA Y DE PROTEÍNAS**

La comparación de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas con las incluidas en la base de datos Gene Bank/EMBL se ha realizado mediante la utilización del programa BLAST del *National Center of Biotechnology Information* (Altschul *et al.*, 1990)

La búsqueda de motivos o dominios conservados de las proteínas estudiadas se ha realizado mediante la comparación con la base de datos PROSITE (Bairoch, 1991).

Para realizar las predicciones de la estructura secundaria de las secuencias peptídicas se han utilizado los programas PEPTIDESTRUCTURE y PEPLOT del *Wisconsin Package del Genetics Computer Group Inc.*



## IV. RESULTADOS

### 1. OBTENCIÓN DE UNA COLECCIÓN DE MUTANTES CONDICIONALES

El principal objetivo de este trabajo ha consistido en la búsqueda de genes esenciales desconocidos o poco caracterizados de *S. cerevisiae* que pudieran constituir nuevas dianas antifúngicas. Para ello se adoptó la estrategia de caracterización de mutantes condicionales e identificación de sus genes mutados, ya que esta técnica permitía dirigir el estudio hacia genes esenciales de *S. cerevisiae* (Hampsey, 1997), y además ofrecía la posibilidad de identificar proteínas cuya secuencia fuera desconocida en el momento de iniciarse este estudio.

El éxito del trabajo dependía directamente de la diversidad y del número de los mutantes condicionales caracterizados, por lo que la primera parte del presente trabajo estuvo dedicada a la obtención de una colección de mutantes condicionales, que fue caracterizada con posterioridad.

#### 1.1 Mutagénesis

Con la finalidad de obtener una colección de mutantes condicionales numerosa y variada, se procedió a la mutagénesis de la cepa de *S. cerevisiae* S288C con diversos agentes mutagénicos. Esta cepa fue elegida como cepa parental porque carecía de auxotrofías y alteraciones que pudieran enmascarar o potenciar las modificaciones originadas como consecuencia de la(s) mutación(es).

Para intentar obtener mutantes alterados en genes diferentes, se utilizaron agentes mutagénicos de distinta naturaleza. Los agentes físicos utilizados fueron luz UV, calentamiento a 48°C y ciclos consecutivos de congelación a -20°C y descongelación. Los agentes químicos empleados fueron etilmetano sulfonato (EMS), nitrosoguanidina (NG) y ácido nitroso (AN). Todos estos agentes suelen provocar mutaciones puntuales en el DNA cromosómico, excepto el calentamiento a 48°C y la congelación, que pueden originar la ruptura del material genético (Stanier *et al.*, 1986; Nunes *et al.*, 1993). En general, los agentes mutagénicos fueron empleados de manera que se intentaba mutar un sólo gen del genoma de cada cepa, para lo cual se establecieron las condiciones apropiadas para que la mortalidad en la mayoría de los procesos oscilara entre el 85-90% según el agente mutagénico empleado (ver materiales y métodos).

#### 1.2. Aislamiento de mutantes condicionales

Las células mutadas se sembraron en diversos medios de cultivo y se incubaron a distintas temperaturas, para tratar de recuperar mutantes con fenotipos distintos e incrementar así las posibilidades de que sus genes alterados también fueran diferentes. Se buscaron mutantes termosensibles y termodependientes, que frecuentemente están alterados en genes esenciales para la viabilidad celular (Hampsey, 1997). También se intentaron recuperar cepas mutadas en genes implicados en rutas metabólicas concretas, de especial interés como dianas antifúngicas, por ser rutas diferentes a las de mamíferos, como

son la síntesis de la pared celular y la síntesis de ergosterol. Así las células mutadas fueron sembradas e incubadas en diferentes condiciones permisivas, y posteriormente replicadas e incubadas en condiciones restrictivas, según se indica en la figura 13.

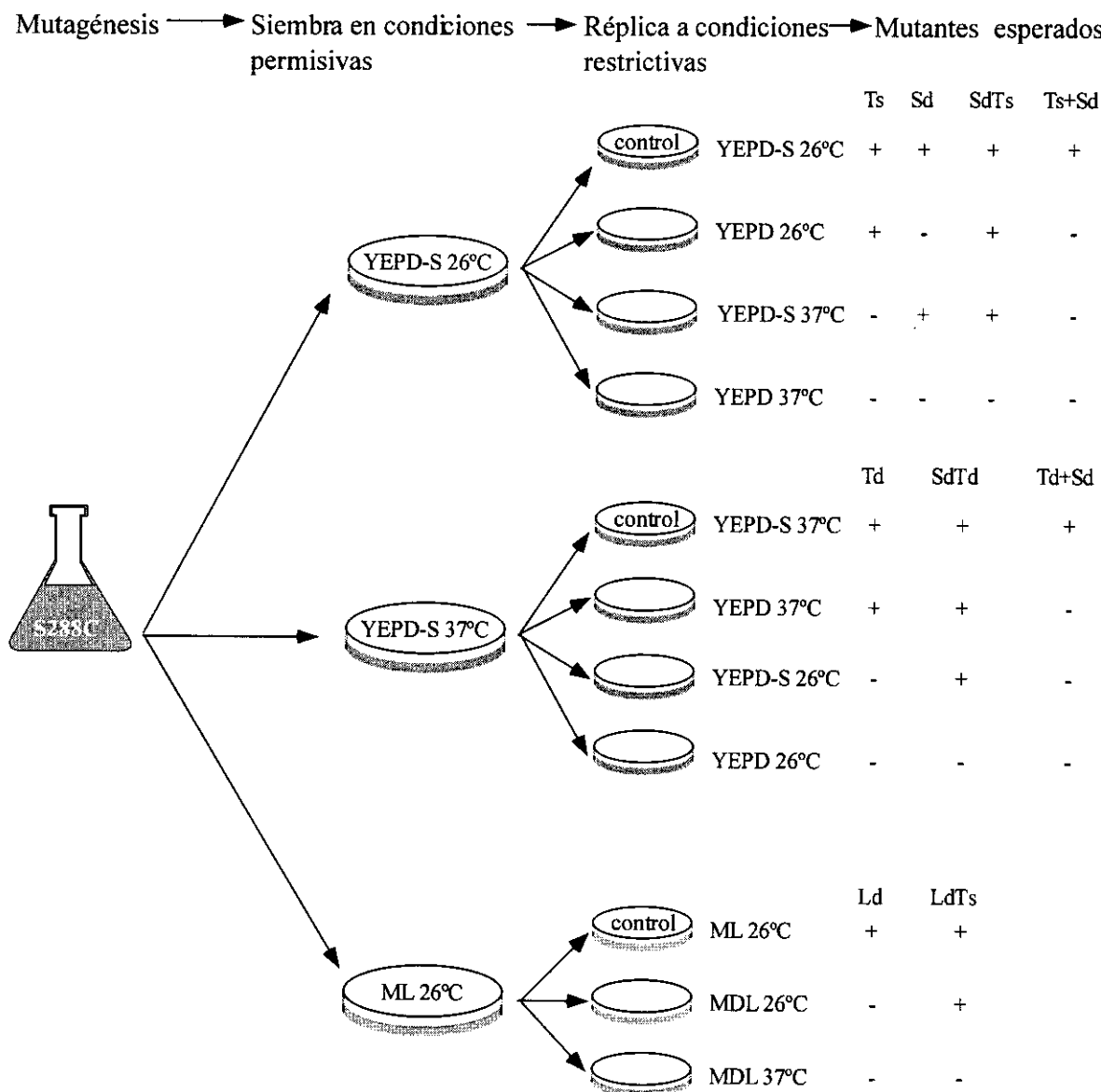


Figura 13: Aislamiento de los mutantes condicionales.

Cultivos de la cepa de *S. cerevisiae* S288C fueron mutagenizados con diferentes agentes y sembrados en diversas condiciones permisivas. Las colonias crecidas en estas placas se replicaron a medios restrictivos y también al mismo medio permisivo en el que habían sido cultivadas, para tener un control positivo de crecimiento. YEPD-S: medio YEPD suplementado con sorbitol 0,9 M; ML: medio suplementado con un extracto lipídico; MDL: ML carente del suplemento lipídico.

A la derecha de la figura se indica el fenotipo de los mutantes condicionales esperados. Ts: mutantes termosensibles; Sd: mutantes dependientes de sorbitol; SdTs: mutantes con dependencia termosensible de sorbitol; Ts+Sd: mutantes termosensibles y dependientes de sorbitol; Td: mutantes termodependientes; SdTd: mutantes con dependencia termodependiente de sorbitol; Td+Sd: mutantes termodependientes y dependientes de sorbitol; Ld: mutantes dependientes de suplemento lipídico; LdTs: mutantes con dependencia termosensible de suplemento lipídico.

El análisis comparativo del crecimiento de 168.541 colonias en las diferentes condiciones en las que habían sido replicadas, y una posterior verificación del fenotipo observado en medio sólido, permitió identificar 297 mutantes que mostraron ausencia de crecimiento en una o varias de las condiciones analizadas. En algunas ocasiones se observó una falta de repetitividad del comportamiento del mutante en determinadas condiciones de cultivo, como en el medio YEPD-S tanto a 26 como a 37°C.

El comportamiento fenotípico mostrado por los mutantes en medio sólido, fue utilizado como un primer criterio de clasificación de los mutantes (tabla 8). Aquellos mutantes que mostraron un comportamiento variable en determinadas condiciones no pudieron ser incluidos en esta clasificación preliminar. Ninguno de los mutantes condicionales identificados mostró un requerimiento del suplemento lipídico para proliferar a 26°C ni a 37°C.

Tabla 8: Clasificación de los mutantes aislados según su fenotipo en medio sólido

Crecimiento de los mutantes en las condiciones indicadas				Fenotipo	Grupo
YEPD-S 26°C	YEPD 26°C	YEPD-S 37°C	YEPD 37°C		
+	+	-	-	Ts	G1
+	+	+	-	SdTs	G2
+	-	-	-	Ts+Sd	G3
+	-	+	-	Sd	G4
-	+	-	+	Ss	G5
-	-	+	+	Td	G6

La capacidad de crecimiento de los mutantes en las diferentes condiciones analizadas se indica como + en el caso de que el mutante origine colonias visibles y - en el caso de que no aparezcan colonias o éstas sean escasas y de tamaño muy pequeño. Los seis grupos identificados según las características de crecimiento analizadas estaban integrados por mutantes termosensibles (Ts), mutantes con dependencia termosensible de sorbitol 0,9 M (SdTs), mutantes termosensibles y dependientes de sorbitol (Ts+Sd), mutantes dependientes de sorbitol 0,9 M (Sd), mutantes sensibles a sorbitol 0,9 M (Ss) y mutantes termodependientes (Td).

Como resultado final de los procesos mutagénicos utilizados, el 0,1% de las células estudiadas se comportaron como mutantes condicionales, mostrando incapacidad de proliferación en una o varias de las condiciones estudiadas. Como se indica en la tabla 9, la luz UV resultó ser el agente mutagénico más eficiente en las condiciones empleadas, permitiendo la obtención de más de la mitad de los mutantes de la colección. También se aislaron mutantes condicionales procedentes de procesos mutagénicos con NG, EMS, AN y congelación y descongelación, que permitieron obtener un porcentaje similar de mutantes. Sin embargo, los procesos mutagénicos realizados mediante calentamiento a 48°C no dieron lugar a ningún mutante condicional que mostrara ausencia de crecimiento en las condiciones ensayadas.

Tabla 9: Distribución de los mutantes condicionales obtenidos, según los diferentes agentes mutagénicos empleados:

Agentes mutagénicos	Nº de colonias estudiadas	Nº de mutantes condicionales	% Mutantes condicionales
Etilmetano Sulfonato	66.617	77	0,11
Luz UV	40.970	158	0,38
Nitrosoguanidina	28.136	46	0,16
Acido nitroso	15.630	14	0,09
Calentamiento a 48°C	15.400	0	0
Congelación/descongelación	1.788	2	0,11
<b>Total</b>	<b>168.541</b>	<b>297</b>	

Los 297 mutantes aislados (figura 14-A y B) integraron la colección que sirvió de base para el presente trabajo, y que aún posee interés para el desarrollo de estudios posteriores para la búsqueda de nuevas dianas y la caracterización funcional de genes de *S. cerevisiae*. La mayoría de los mutantes identificados procedieron de tratamientos mutagénicos en los que la mortalidad celular estuvo comprendida entre el 85-90%, por lo que existe una gran probabilidad de que la mayoría de estos mutantes posean una mutación única.

## 2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES CONDICIONALES

Con objeto de confirmar el fenotipo de los mutantes previamente clasificados según su comportamiento en medio sólido, y de confirmar el fenotipo de aquellos que habían mostrado un comportamiento variable, se llevaron a cabo estudios en medio líquido en las mismas condiciones que habían sido evaluadas previamente en medio sólido. Los estudios en medio líquido son más precisos tanto por las condiciones experimentales de trabajo como por los procesos de cuantificación que permiten realizar.

### 2.1. Estudio del crecimiento en medio líquido

Se seleccionaron 118 mutantes de los 297 aislados (figura 14-C), elegidos al azar entre los diferentes fenotipos encontrados, para ser caracterizados en medio líquido. En estos ensayos se evaluó el crecimiento de los mutantes en cultivos inoculados con el mismo número de células en las diferentes condiciones analizadas, con la finalidad de eliminar posibles variaciones del comportamiento como consecuencia de un efecto inóculo. Además, en estos ensayos se aseguraban las mismas condiciones restrictivas para todas las células del cultivo.

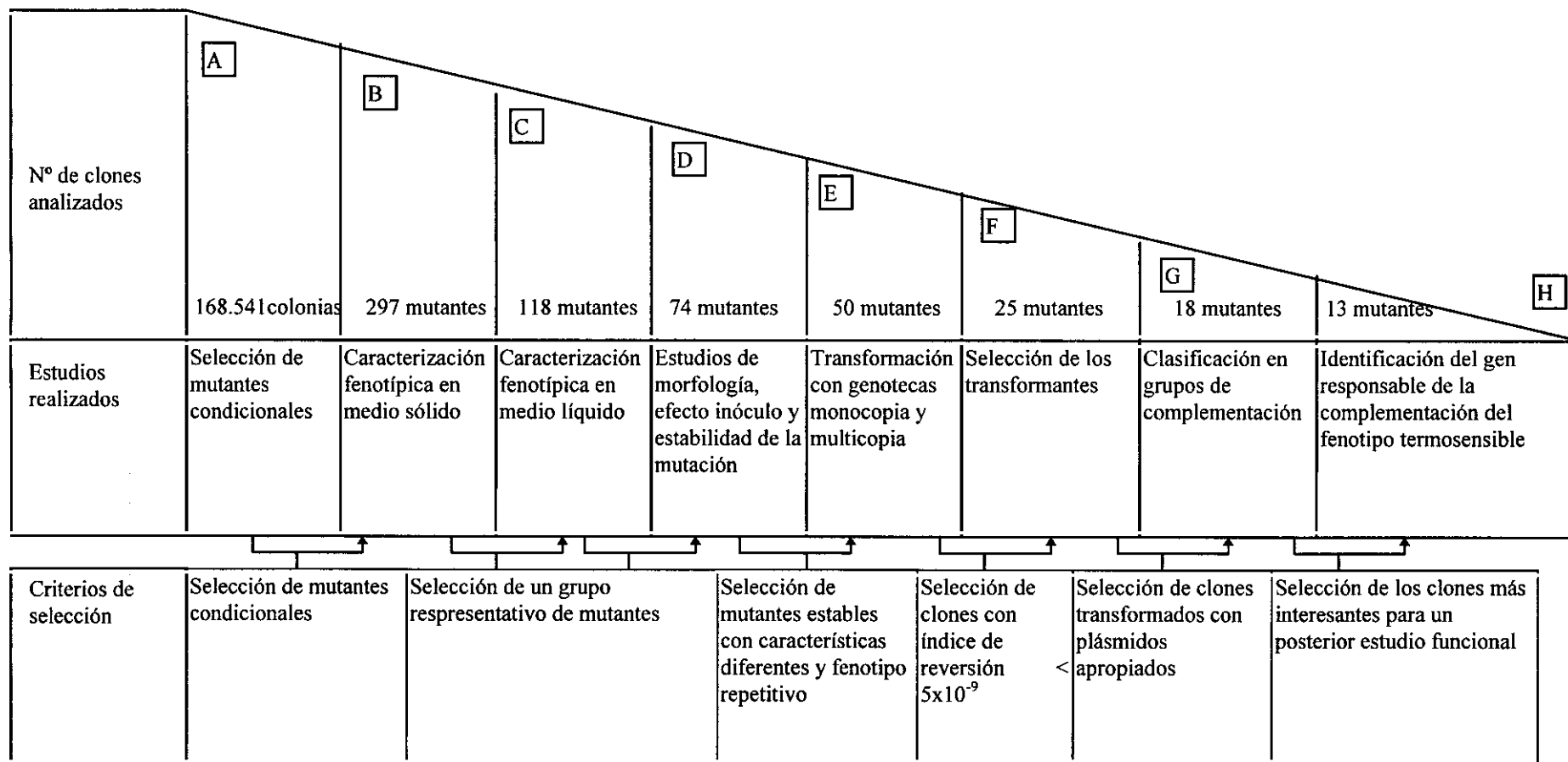


Figura 14: Esquema general del estudio de la colección de mutantes

Como resultado de estos ensayos fue posible identificar 7 fenotipos diferentes entre los 118 mutantes caracterizados (tabla 10), uno de los cuales, el G7, no había sido identificado previamente en los estudios realizados en medio sólido. Este nuevo fenotipo identificado estuvo constituido por mutantes condicionales termosensibles a 37°C y sensibles a sorbitol a 26°C, que en medio sólido se habían comportado únicamente como termosensibles. La mayoría de los mutantes reprodujeron en medio líquido su comportamiento en medio sólido, y aquellos que habían mostrado variabilidad fenotípica en los estudios previos, fueron clasificados definitivamente en uno de estos grupos. Así, la casi totalidad de los mutantes que habían mostrado un crecimiento poco repetitivo en medios sólidos con sorbitol, fueron incapaces de crecer en medio líquido en estas condiciones.

Al estudiar la distribución de los 118 mutantes condicionales analizados según su fenotipo en medio líquido y el agente mutagénico empleado en su obtención, se observó que la mayoría de los mutantes caracterizados pertenecían al grupo G1 de los mutantes termosensibles, como se indica en la figura 15. Asimismo, estos mutantes habían sido obtenidos con mayor frecuencia por todos los agentes mutagénicos utilizados. En número mucho más escaso que los anteriores, se aislaron los mutantes del grupo G3 que crecían únicamente a 26°C en presencia de sorbitol y que habían sido obtenidos con EMS, NG y luz UV. También fueron recuperados en un número similar a los anteriores, los que necesitaron sorbitol para crecer (G4), los mutantes que mostraron dependencia termosensible de sorbitol (G2) y los mutantes termosensibles y sensibles a sorbitol (G7), procedentes de mutagénesis con luz UV y con EMS. Finalmente, los mutantes aislados en menor número fueron los mutantes termodependientes (G6) y los mutantes incapaces de crecer en presencia de sorbitol (G5), obtenidos con luz UV.

Por otra parte, el análisis fenotípico de los mutantes en medio líquido permitió establecer diferencias entre el comportamiento mostrado por los mutantes en las condiciones permisivas. Así se detectaron mutantes cuyo comportamiento se asemejaba al de la cepa control en las condiciones permisivas, mientras que otros crecían más despacio y/o presentaban una mortalidad superior. Estas características permitieron clasificar a los 79 mutantes termosensibles caracterizados (G1) en 3 grupos dependiendo del crecimiento ( $A_{600nm}$ ) mostrado por el cultivo en condiciones permisivas a las 48 horas de incubación. El primer grupo incluyó a 15 mutantes termosensibles que presentaron un crecimiento similar al de la cepa parental. El segundo grupo estuvo constituido por 20 mutantes que tuvieron una tasa de crecimiento menor con unos niveles de absorbancia a 600 nm comprendidos entre el 70 y el 90% con respecto al grupo anterior, y el tercero incluyó a 31 mutantes que mostraron un crecimiento inferior. Además se detectaron 13 cepas que fueron capaces de iniciar un crecimiento lento a 37°C después de ser incubadas durante 48 horas en estas condiciones. Se consideró que posiblemente estas cepas habían revertido la mutación y por tanto, fueron excluidas del grupo de mutantes seleccionados para la realización de estudios posteriores.

Tabla 10: Clasificación de los 118 mutantes condicionales analizados en siete grupos, según el fenotipo mostrado en medio líquido

Crecimiento de los mutantes				Fenotipo	Grupo	N° mutantes
YEPD-S 26°C	YEPD 26°C	YEPD-S 37°C	YEPD 37°C			
+	+	-	-	Ts	G1	79
+	+	+	-	SdTs	G2	8
+	-	-	-	Ts+Sd	G3	12
+	-	+	-	Sd	G4	8
-	+	-	+	Ss	G5	1
-	-	+	+	Td	G6	3
-	+	-	-	Ts+Ss	G7	7

La capacidad de crecimiento de los mutantes en las diferentes condiciones analizadas se indica como + en el caso de que el mutante origine colonias visibles y - en el caso de que no aparezcan colonias o éstas sean escasas y de tamaño muy pequeño. Los siete grupos identificados en función de las características de crecimiento analizadas estaban integrados por mutantes termosensibles (Ts), mutantes con dependencia termosensible de sorbitol 0,9 M (SdTs), mutantes termosensibles y dependientes de sorbitol (Ts+Sd), mutantes dependientes de sorbitol 0,9 M (Sd), mutantes sensibles a sorbitol 0,9 M (Ss), mutantes termodependientes (Td) y mutantes termosensibles y sensibles a sorbitol 0,9 M (Ts+Ss).

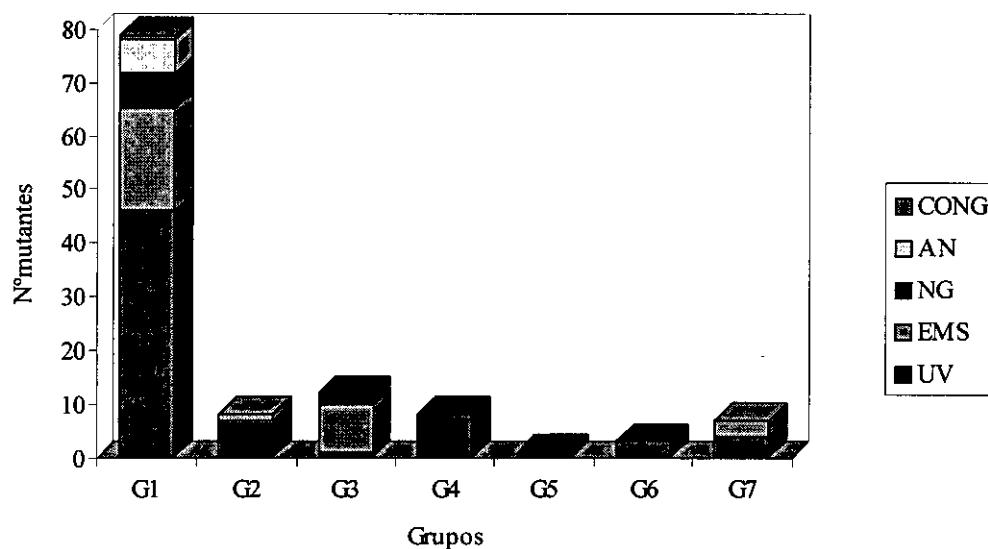


Figura 15: Distribución de los mutantes condicionales caracterizados según su fenotipo en medio líquido y el agente mutagénico empleado en su obtención.

## 2.2. Estudio de la viabilidad, la morfología, la reversión del fenotipo y el efecto inóculo

En paralelo con el estudio del crecimiento de los mutantes en medio líquido, se analizó su viabilidad con la intención de diferenciar entre las cepas que tenían una tasa de muerte más elevada en las condiciones restrictivas, y las que no morían o lo hacían lentamente, a pesar de que fueran incapaces de proliferar. Estos resultados permitieron establecer una preferencia hacia el estudio de los mutantes que morían en condiciones restrictivas.

También se analizó la morfología de las células en las condiciones permisivas y restrictivas ensayadas, considerándose estos datos como una característica propia de cada mutante.

Así se seleccionaron 74 de los 118 mutantes representativos de todos los grupos fenotípicos (figura 14-D), por ser los que morían más rápidamente y por tener una morfología poco alterada. El estudio de la estabilidad de la mutación condicional fue realizada en estos mutantes mediante la determinación de la tasa de reversión de la mutación (TR) desde valores de  $1 \times 10^{-6}$  hasta  $5 \times 10^{-9}$ , considerando que sólo aquellos que mostraran valores inferiores a  $1 \times 10^{-7}$  podían ser caracterizados genéticamente. Los únicos mutantes que cumplieron esta característica fueron algunos mutantes termosensibles del grupo G1 (47 mutantes) y los mutantes termodependientes del grupo G6 (3 mutantes), que fueron clasificados en dos grupos según su TR fuera inferior a  $5 \times 10^{-9}$  ó estuviera comprendida entre  $5 \times 10^{-9}$  y  $1 \times 10^{-7}$ , como se indica más adelante en la tabla 11. Los 24 mutantes restantes presentaron TR superiores a  $1 \times 10^{-7}$ .

También se analizó la posible existencia de variaciones fenotípicas relacionadas con un efecto inóculo, de manera que aquellos mutantes en los que la letalidad condicional dependiera del inóculo no debían ser caracterizados genéticamente. Para ello se compararon los fenotipos mostrados por cada mutante utilizando dos inóculos diferentes, y en las mismas condiciones en que había sido caracterizados previamente en medio líquido (ver materiales y métodos). En ningún caso se observaron diferencias fenotípicas dependientes del inóculo utilizado.

## 3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS MUTANTES

Con objeto de identificar el gen mutado en cada uno de los 50 mutantes seleccionados para ser caracterizados a nivel genético (figura 14-E), que poseían una mutación estable y su fenotipo era independiente del inóculo, se realizaron ensayos de complementación fenotípica y análisis posterior de los transformantes obtenidos.

### 3.1. Estudios de complementación

Para intentar complementar los fenotipos condicionales de los 50 mutantes seleccionados, se utilizaron dos genotecas genómicas de *S. cerevisiae* denominadas pURSC1 y CEN BANK (tabla 4).

Ninguno de los mutantes ensayados pudo ser complementado fenotípicamente con la genoteca pURSC1, posiblemente por el bajo número de vectores con inserto que poseía, a diferencia de lo ocurrido con la genoteca CEN BANK con la que se consiguió complementar fenotípicamente a 43 de los 50 mutantes ensayados. Todos los mutantes complementados fueron termosensibles, ya que ninguno de los 3 mutantes termodependientes pudo ser complementado fenotípicamente (tabla 11).

Tabla 11: Resultados obtenidos en los ensayos de complementación fenotípica de los mutantes termosensibles, agrupados según el agente mutagénico empleado en su obtención.

Agentes mutagénicos	Nº de mutantes complementados con TR $<5 \times 10^{-9}$	Nº de mutantes complementados con TR ( $1 \times 10^{-7}$ - $5 \times 10^{-9}$ )	Nº de mutantes no complementados con TR $<5 \times 10^{-9}$
Luz UV	13	12	5
Etilmetano sulfonato	6	3	2
Nitrosoguanidina	2	3	
Ácido nitroso	3		
Congelación/Descongelación	1		
TOTAL	25	18	7

La tasa de reversión (TR) fue calculada dependiendo del número de colonias que habían crecido a 37°C en la placa sembrada con  $5 \times 10^9$  células del cultivo de cada mutante, que no habían sido transformadas con la genoteca.

El elevado número de mutantes complementados fenotípicamente obligó a establecer un orden de prioridades entre ellos antes de llevar a cabo su estudio genético, ya que resultaba imposible realizar el análisis de todos ellos. Por este motivo se seleccionaron los 25 mutantes termosensibles (tabla 11, figura 14-F) que habían mostrado una TR inferior a  $5 \times 10^{-9}$ , y que por haber sido obtenidos con agentes mutagénicos diversos posiblemente estaban alterados en genes diferentes. Además, se estableció un orden de prioridad entre ellos, de manera que aquellos mutantes que habían presentado un comportamiento fenotípico similar al de la cepa silvestre en condiciones permisivas y que morían rápidamente en condiciones restrictivas, fueron los primeros seleccionados para realizar su estudio genético.

El estudio de los plásmidos obtenidos de diferentes transformantes de los 25 mutantes seleccionados mostró que solamente 18 clones cumplían las características adecuadas, ya que los plásmidos que complementaban a 4 de los mutantes no tenían los patrones de restricción adecuados, y en otros 3 casos, los plásmidos no eran capaces de complementar nuevamente la mutación.

### 3.2. Clasificación de los mutantes en “grupos de complementación”

Para conocer si alguno de los 18 mutantes seleccionados (figura 14-G) poseían una mutación en el mismo gen, se realizaron estudios de complementación de cada uno de ellos con todos los plásmidos previamente aislados. Como resultado de estos ensayos, se establecieron 12 “grupos de complementación” diferentes. Uno de ellos estaba constituido por 7 mutantes, y el resto de los grupos poseían un único representante. Las 7 cepas del

mismo grupo habían presentado un comportamiento similar en los ensayos de caracterización fenotípica, con un crecimiento comprendido entre el 70 y el 90% del mostrado por la cepa silvestre en condiciones permisivas. Sin embargo, estas 7 cepas habían sido obtenidas con agentes mutagénicos diferentes, ya que 3 de ellas procedían de tratamientos con luz UV y las 4 restantes con EMS, NG, AN y procesos repetidos de congelación y descongelación. El origen variado de los mutantes hacía poco probable que todas las cepas tuvieran la misma mutación, por lo que se sospechó la existencia de mutaciones diferentes que fueran suprimidas por el mismo gen.

Con objeto de intentar conocer si los genes que complementaban fenotípicamente a los 7 mutantes del grupo eran el mismo, se analizaron los patrones de restricción de los 7 plásmidos digeridos con las enzimas *ClaI*, *HindIII*, *SphI*, *EcoRI* y *SalI*. Los resultados obtenidos mostraron que los mutantes MJ25, MJ35, MJ226 y MJ258 eran complementados por el mismo gen ya que tenían un patrón de restricción muy similar. Por otro lado, los mutantes MJ45, MJ143 y MJ241 mostraron un patrón de restricción con bandas comunes, pero éste patrón fue diferente del obtenido en los 4 mutantes anteriores, por lo que podía tratarse bien de genes distintos o de fragmentos diferentes que incluyeran el mismo gen. Por este motivo se seleccionó un plásmido de cada tipo para ser analizado y secuenciado, con objeto de identificar el gen responsable de la complementación fenotípica.

Asímismo, se procedió al análisis de los plásmidos que complementaban los otros 6 grupos de complementación (figura 14-H), realizando diferentes ensayos que se describen más adelante en este trabajo.

#### 4. CLONACIÓN DEL GEN *HSP30*

El único “grupo de complementación” obtenido que estaba integrado por más de una cepa, lo constituían los mutantes MJ25, MJ35, MJ45, MJ143, MJ226, MJ241 y MJ258. Estos mutantes procedían del tratamiento de la cepa silvestre S288C con diversos agentes mutagénicos. El análisis de su comportamiento en medios ricos sólidos y líquidos, en presencia y ausencia de sorbitol 0,9 M reveló que todos ellos mostraban un comportamiento termosensible a 37°C y su crecimiento poseía unos valores de absorbancia a 600 nm comprendidos entre el 70 y el 90% con respecto a la cepa silvestre, tras 48 horas de incubación. La viabilidad a 26°C, evaluada con yoduro de propidio, fue similar a la de la cepa silvestre presentando el 95-98% de células viables tras 24 horas de incubación. A 37°C la viabilidad de la mayoría de los mutantes osciló entre el 20-35% a las 24 horas de incubación, a excepción de los mutantes MJ45 y MJ143 que mostraron el 65 y 90% de células viables respectivamente. En estas condiciones la cepa silvestre presentaba un 95% de viabilidad. La morfología de los 7 mutantes fue similar en todos los casos, y no se observaron cambios significativos con respecto a la de la cepa silvestre.

La transformación de estos mutantes termosensibles con la genoteca CEN BANK generó varios clones capaces de crecer a 37°C. La selección de uno de estos clones procedentes de cada mutante se realizó según sus características genotípicas, de modo que su plásmido debía poseer el patrón de restricción esperado y además debía ser capaz de complementar nuevamente a los mutantes. El estudio fenotípico de los clones seleccionados fue realizado en medio líquido y en las mismas condiciones que habían sido utilizadas para la caracterización fenotípica de los mutantes (ver materiales y métodos). Su

comportamiento fue comparado con el mostrado por las cepas mutantes correspondientes y la cepa silvestre S288C en las mismas condiciones. Los resultados obtenidos mostraron una complementación casi total del fenotipo termosensible en 4 de los mutantes (MJ25, MJ35, MJ45, MJ143), que presentaron unos niveles de crecimiento ( $A_{600nm}$ ) entre el 70-90% con respecto a los del silvestre, y una complementación fenotípica total en 3 mutantes (MJ226, MJ241y MJ258), cuyo crecimiento fue similar al de la cepa S288C a la temperatura restrictiva. Por otra parte, todos los clones analizados presentaron un crecimiento a 26°C del 70-90% con respecto al silvestre, al igual que ocurría con sus correspondientes mutantes. Los transformantes presentaron una viabilidad similar a la de la cepa silvestre, y mantuvieron también sus mismas características morfológicas (tabla 12).

Como ya se ha comentado anteriormente, estos 7 mutantes fueron incluidos en el mismo "grupo de complementación", ya que su fenotipo termosensible era complementado por los mismos plásmidos. El análisis de restricción de éstos mostró dos patrones diferentes, por lo que se seleccionó un plásmido de cada tipo para identificar el gen responsable de la complementación fenotípica. Los plásmidos seleccionados procedían de los clones T143.1 y T226.3. El análisis del comportamiento de estos clones en medio líquido mostró una complementación casi total del fenotipo termosensible del mutante MJ143, y una complementación total del fenotipo termosensible del mutante MJ226. Por otra parte, el crecimiento ( $A_{600nm}$ ) del T143.1 y del T226.1 a 26°C fue del 75 y 85% respectivamente con respecto al control, y similar al de sus correspondientes mutantes.

Tabla 12: Estudio comparativo del comportamiento en medio líquido de los mutantes MJ143 y MJ226, de sus transformantes T143.1 y T226.3 y de la cepa S288C.

CEPAS	YEPD 26°C			YEPD 37°C		
	Crecimiento	Viabilidad (%)	Morfología	Crecimiento	Viabilidad (%)	Morfología
MJ143	++	95/90	S	-	90/50	S
T143.1	++	95/89	S	++	95/80	S
MJ226	++	99/90	S	-	25/6	S
T226.3	++	99/90	S	+++	96/88	S
S288C	+++	99/96	S	+++	95/90	S

El crecimiento en el medio líquido YEPD fue estudiado durante 48 horas mediante la determinación de la absorbancia a 600 nm mostrada por los cultivos. El signo +++ significa que los valores obtenidos fueron similares a los de la cepa silvestre. El signo ++ indica un crecimiento comprendido entre el 70-90% del silvestre. El signo - indica ausencia de crecimiento. Los valores de viabilidad indican el porcentaje de células no teñidas con yoduro de propidio a las 24/48 horas de comenzar el ensayo. La morfología fue analizada mediante microscopía óptica y se indica como S en el caso de que no se apreciaran diferencias significativas con respecto a la morfología de la cepa silvestre S288C. Los valores de crecimiento a 26 y a 37°C están referidos a los valores de crecimiento de la cepa S288C en las mismas condiciones.

El análisis funcional de los plásmidos se realizó del modo indicado en las figuras 16 y 17, y la secuenciación de un fragmento de éstos permitió identificar al gen *HSP30* como el único gen responsable de la complementación de todos los mutantes.

**Plásmido**      **Complementación del**  
**crecimiento de MJ143 a 37°C**

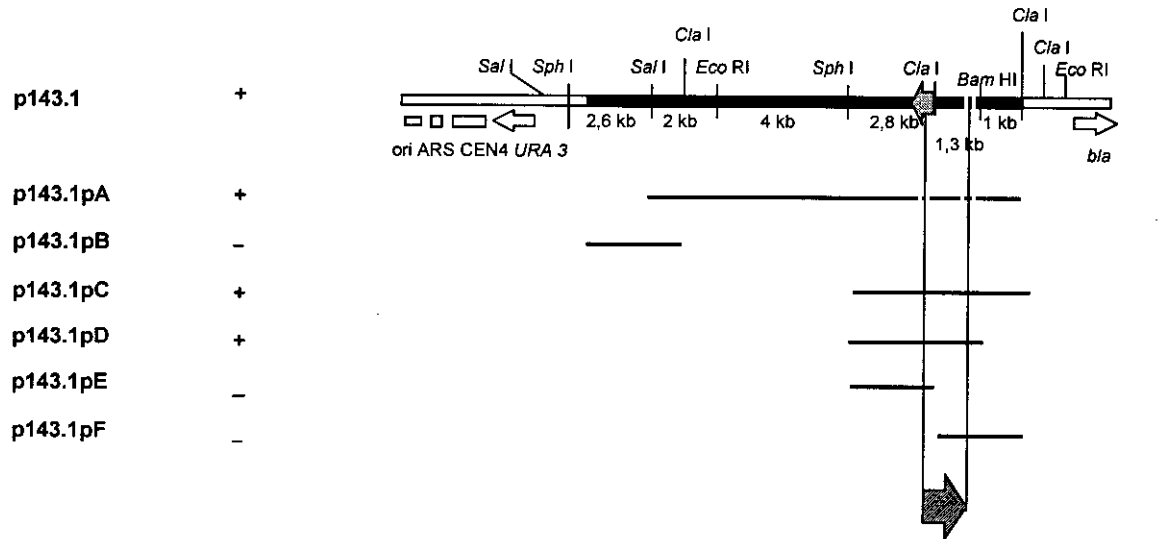


Figura 16: Análisis funcional del inserto clonado en p143.1 e identificación del gen *HSP30*. La capacidad que poseen los diferentes plásmidos de complementar el fenotipo termosensible del mutante MJ143, se indica con los signos + en caso de complementación, y - en ausencia de ésta. Los plásmidos p143.1pA, p143.1pB y p143.1pC, fueron obtenidos a partir de la digestión de p143.1 con *SalI*, *ClaI* y *SphI* respectivamente, y una posterior religación del DNA plasmídico restante. Los plásmidos p143.1pD, p143.1pE y p143.1pF, se obtuvieron mediante la clonación en el vector YCp50 de las fracciones del inserto de p143.1, obtenidas mediante la digestión con *SphI* y *BamHI*, con *SphI* y *ClaI*, y sólo con *ClaI*, respectivamente. La zona en blanco del plásmido p143.1 corresponde al vector YCp50, y la zona en negro al fragmento clonado. La flecha gris muestra el fragmento secuenciado, y la flecha rayada indica la localización del gen *HSP30* en el fragmento clonado.

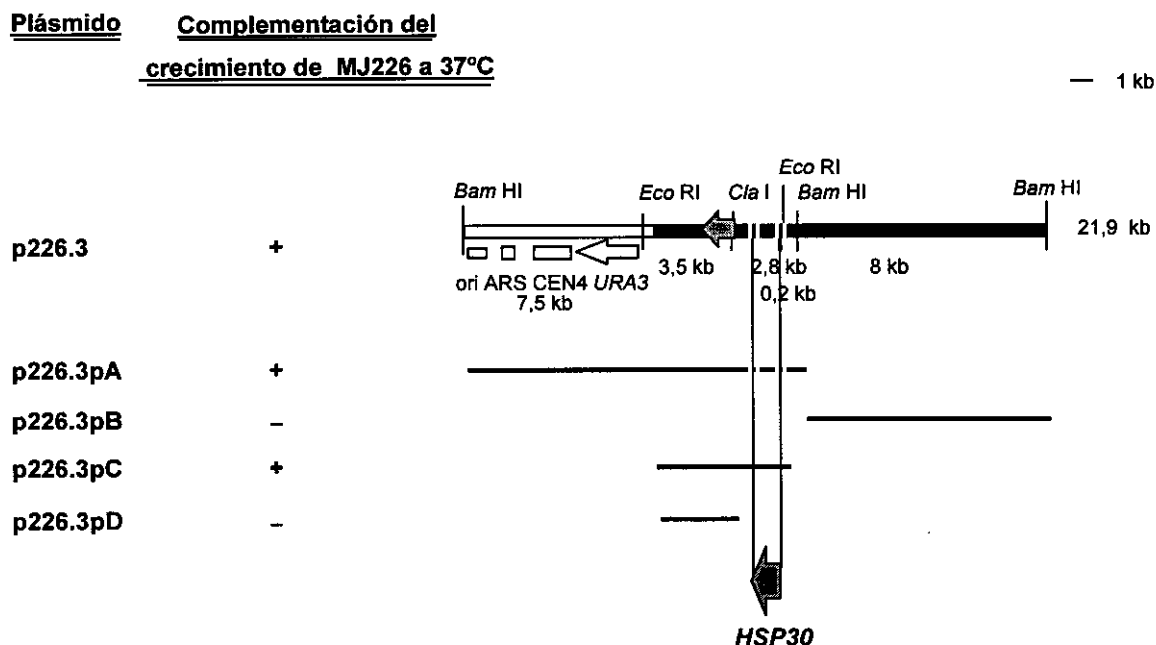


Figura 17: Análisis funcional del inserto clonado en p226.3 e identificación del gen *HSP30*.

La capacidad que poseen los diferentes plásmidos de complementar el fenotipo termosensible del mutante MJ226, se indica con los signos + y -. Los plásmidos p226.3pA y p226.3pB fueron obtenidos a partir de la digestión del p226.3 con *Bam*HI y la posterior religación de cada uno de los dos fragmentos generados. Los plásmidos p226.3pC y p226.3pD procedieron de la clonación en YCp50 de los fragmentos obtenidos a partir de la digestión de p226.3pA con *Eco*RI y con *Eco*RI y *Cla*I respectivamente. La zona del plásmido p226.3 de color blanco corresponde al vector YCp50, y la zona en negro al fragmento clonado. La flecha gris muestra el fragmento secuenciado, y la flecha rayada indica la localización del gen *HSP30* en el fragmento clonado.

El gen *HSP30*, también denominado *YR01* e *YCR021C*, se localiza en el cromosoma III de *S. cerevisiae*. Este gen codifica la proteína Hsp30p, que está constituida por 332 aminoácidos y que se localiza fundamentalmente en la membrana plasmática celular. La esencialidad de esta proteína para la célula aún no ha sido establecida, ya que se carecen de datos referentes al comportamiento de los mutantes que posean este gen interrumpido. La Hsp30p es hiperexpresada en situaciones de estrés térmico y nutricional, en presencia de niveles elevados de etanol, así como en la entrada en fase estacionaria (Regnacq y Boucherie, 1993; Parantou y Piper, 1992; Piper *et al.*, 1994). Posee siete dominios transmembranales, y ha sido implicada funcionalmente en procesos de translocación de péptidos a través de la membrana, así como en la contrarrestación de posibles alteraciones originadas a este nivel.

Con la intención de conocer si existían proteínas homólogas a Hsp30p en otros hongos y/o en mamíferos, y evaluar así su interés como diana antifúngica, se realizaron búsquedas en las bases de datos del Gene Bank/EMBL. Se trataron de identificar secuencias homólogas a la proteína Hsp30p y al gen *HSP30*, pero no se encontraron similitudes significativas con ninguna secuencia.

## 5. CLONACIÓN DEL GEN *CDC68*

El mutante MJ239 fue obtenido mediante la mutación de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* S288C con AN. Los ensayos de caracterización fenotípica realizados en medios ricos sólidos y líquidos, en presencia y ausencia de sorbitol 0,9 M a 26 y a 37°C, permitieron detectar un comportamiento termosensible de esta cepa a 37°C (tabla 13), y unas características fenotípicas similares a las de la cepa control a 26°C. La cepa MJ239 no fue capaz de proliferar a la temperatura restrictiva. Su viabilidad disminuyó de modo que tras 24 y 48 horas de incubación el 75 y el 10% de las células respectivamente, permanecían viables. El estudio de la morfología celular en todas las condiciones analizadas, no permitió detectar alteraciones significativas con respecto a la cepa silvestre.

La transformación del mutante termosensible MJ239 con la genoteca CEN BANK, generó varios clones capaces de crecer a 37°C. El estudio fenotípico de uno de estos clones, T239.1, cuyo plásmido correspondía al patrón de restricción esperado, fue realizado en medio líquido y en las mismas condiciones que se habían empleado en la caracterización fenotípica de los mutantes (ver materiales y métodos). Su comportamiento fue comparado con los que mostraron las cepas mutante MJ239 y silvestre S288C en las mismas condiciones, y los resultados obtenidos mostraron que el clon T239.1 presentaba una complementación total del fenotipo termosensible (tabla 13).

Tabla 13: Estudio comparativo del comportamiento en medio líquido del mutante MJ239, del transformante T239.1 y de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* S288C.

CEPAS	YEPD 26°C			YEPD 37°C		
	Crecimiento	Viabilidad (%)	Morfología	Crecimiento	Viabilidad (%)	Morfología
MJ239	+++	99/95	S	-	75/10	S
T239.1	+++	99/98	S	+++	95/90	S
S288C	+++	99/96	S	+++	95/90	S

El crecimiento en medio líquido YEPD fue estudiado durante 48 horas mediante la determinación de la absorbancia a 600 nm mostrada por los cultivos. El signo +++ significa que los valores obtenidos fueron similares a los de la cepa silvestre. El signo - indica ausencia de crecimiento. Los valores de viabilidad indican el porcentaje de células no teñidas con yoduro de propidio a las 24/48 horas de comenzar el ensayo. La morfología fue analizada mediante microscopía óptica, y se indica como S en el caso de que no presentara diferencias significativas con respecto a la silvestre S288C. Los valores de crecimiento a 26 y a 37°C están referidos a los valores de crecimiento de la cepa S288C en las mismas condiciones

A continuación se procedió al estudio funcional del plásmido p239.1 de la manera indicada en la figura 18. La secuenciación posterior de un fragmento plasmídico permitió identificar el gen *CDC68* como el responsable de la complementación fenotípica del mutante MJ239.

**Plásmido**      **Complementación del**  
**crecimiento de MJ239 a 37°C**

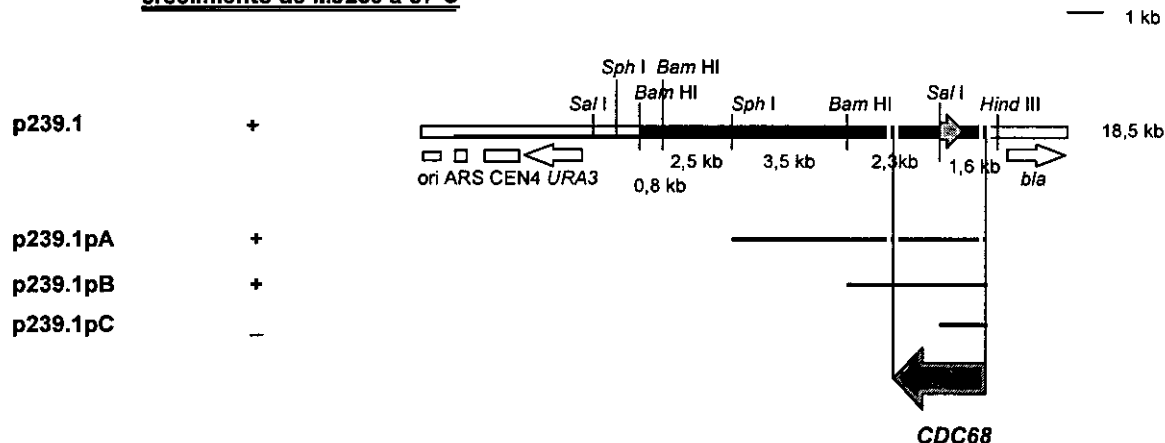


Figura 18: Análisis funcional del inserto clonado en p239.1 e identificación del gen *CDC68*. La capacidad que poseen los diferentes plásmidos de complementar el fenotipo termosensible del mutante MJ239, se indica con los signos + y -. Los plásmidos p239.1pA, p239.1pB y p239.1p se obtuvieron mediante la digestión del plásmido p239.1 con *Sph*I, *Bam*HI y *Sal*I respectivamente, y una posterior religación del fragmento resultante. La zona en blanco del plásmido p239.1 corresponde al vector YCp50, y la zona en negro al fragmento clonado. La flecha gris señala el fragmento secuenciado, y la flecha rayada indica la localización del gen *CDC68* en el fragmento clonado.

El gen *CDC68* (*SPT16/G1160/YGL207W*), fue descrito por primera vez por Prendergast *et. al* en 1990 y se localiza en el cromosoma VII de *S. cerevisiae*. Este gen codifica una proteína esencial de 1035 aminoácidos, que actúa como activador transcripcional de unos genes y represor transcripcional de otros (Malone *et al.*, 1991; Rowley *et al.*, 1991). También ha sido relacionada con el proceso de replicación del material genético (Wittmeyer y Formosa, 1997).

Se realizaron búsquedas en las bases de datos Gene Bank/EMBL encaminadas a encontrar secuencias aminoacídicas homólogas a la proteína Cdc68p, o secuencias nucleotídicas similares al gen *CDC68*, ya que esta información podía determinar el interés de esta proteína como diana antifúngica. Sin embargo, no se encontraron secuencias con homología significativa entre todas las almacenadas en la base de datos.

## 6. CLONACIÓN DEL GEN *TAF<sub>II</sub>145*

El mutante MJ39 fue obtenido mediante mutación de la cepa silvestre S288C con luz UV. El análisis de sus características fenotípicas en medios ricos sólidos y líquidos, en presencia y en ausencia de sorbitol 0,9 M, permitió confirmar su termosensibilidad a 37°C (ver tabla 14). El crecimiento mostrado a 26°C fue más lento que el del silvestre, alcanzando los mismos valores ( $A_{600nm}$ ) después de 72 horas de incubación. La viabilidad a la temperatura restrictiva fue del 45% tras 24 horas de incubación, mientras que a 26°C fue

similar a la de la cepa silvestre. El estudio de sus características morfológicas reveló ciertas diferencias con la cepa silvestre, adquiriendo una forma alargada y un tamaño ligeramente superior en todas las condiciones analizadas.

La transformación del mutante termosensible MJ39, con la genoteca CEN BANK generó varios clones capaces de crecer a 37°C. El estudio fenotípico de uno de estos clones, T39.1, que poseía un plásmido con un patrón de restricción esperado, fue realizado en medio líquido y en las mismas condiciones que se habían empleado en la caracterización fenotípica de los mutantes (ver materiales y métodos). Su comportamiento fue comparado con los mostrados por la cepa mutante MJ39 y la cepa silvestre S288C. Los resultados obtenidos (tabla 14) mostraron que T39.1 presentaba una complementación casi total del fenotipo termosensible, mostrando un crecimiento a 37°C del 80% respecto al silvestre. Además, el T39.1 había recuperado la morfología de la cepa silvestre S288C, al igual que su viabilidad.

Tabla 14: Estudio comparativo del comportamiento en medio líquido del mutante MJ39, del transformante T39.1 y de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* S288C.

CEPAS	YEPD 26°C			YEPD 37°C		
	Crecimiento	Viabilidad (%)	Morfología	Crecimiento	Viabilidad (%)	Morfología
MJ39	+++	95/95	A	-	45/7	A
T39.1	++	94/82	S	++	90/85	S
S288C	+++	99/96	S	+++	95/90	S

El crecimiento en el medio líquido YEPD fue estudiado durante 48 horas mediante la determinación de la absorbancia a 600 nm mostrada por los cultivos. El signo +++ significa que los valores obtenidos fueron similares a los de la cepa silvestre. El signo ++ indica un crecimiento de 70-90% respecto a la cepa silvestre. El signo - indica ausencia de crecimiento. Los valores de viabilidad indican el porcentaje de células no teñidas con yoduro de propidio a las 24/48 horas de comenzar el ensayo. La morfología fue analizada mediante microscopía óptica y se indica como S cuando no se encontraron diferencias significativas con la cepa silvestre y A cuando se observó una morfología alargada. Los valores de crecimiento a 26 y a 37°C están referidos a los valores de crecimiento de la cepa S288C en las mismas condiciones.

Posteriormente se procedió a realizar el estudio funcional del plásmido p39.1, que había sido extraído del clon complementado T39.1, del modo indicado en la figura 19. La secuenciación de un fragmento plasmídico permitió identificar al gen *TAF<sub>II</sub>145* como el responsable de la complementación de la termosensibilidad del mutante MJ69.

El gen *TAF<sub>II</sub>145* (*TAF130/G9374/YGR274C*) se localiza en el cromosoma VII de *S. cerevisiae* y codifica una proteína de 1066 aminoácidos que forma parte, junto con otros polipéptidos, del factor general de transcripción TFIID. Esta proteína es un factor requerido para la transcripción activada por la RNA polimerasa II (Reese *et al.*, 1994), y presenta una elevada homología con los factores de transcripción de otras especies, como el TAF<sub>II</sub>250 humano y el TAF<sub>II</sub>230/250 de *Drosophila* (Poon *et al.*, 1995).

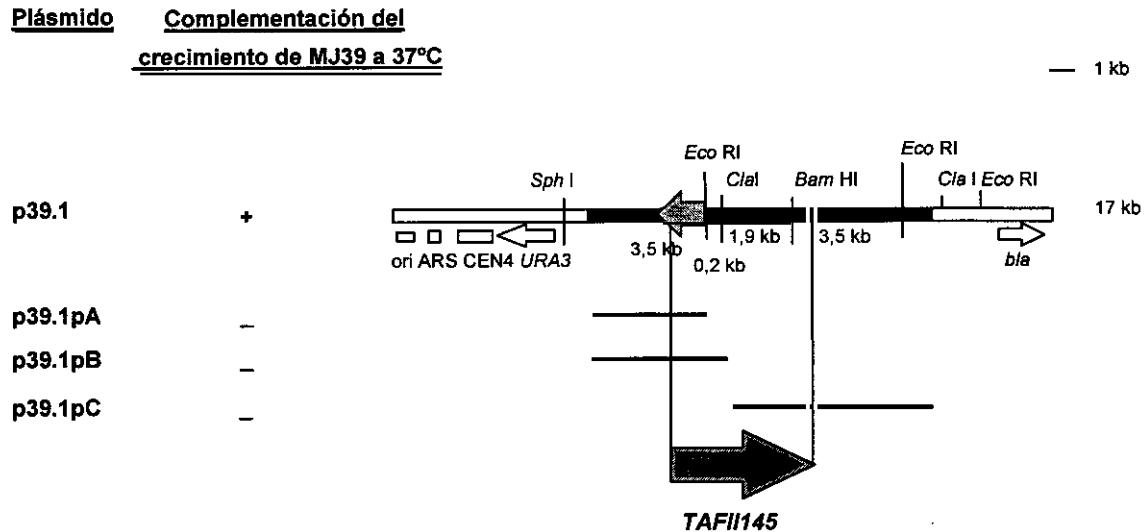


Figura 19: Análisis funcional del inserto clonado en p39.1 e identificación del gen *TAFII145*. La capacidad que poseen los diferentes plásmidos de complementar el fenotipo termosensible del mutante MJ39, se indica con los signos + y -. Los plásmidos p39.1pA y p39.1pB se obtuvieron mediante la digestión de p39.1 con *EcoRI* y *ClaI*, respectivamente, y posterior religación del DNA plasmídico restante. El plásmido p39.1pC se obtuvo tras la digestión de p39.1 con *ClaI*, y posterior subclonación del inserto en el vector YCp50. La flecha gris señala el fragmento secuenciado, y la flecha rayada indica la localización del gen *TAFII145* en el fragmento clonado.

## 7. CLONACIÓN DEL GEN *PRP19*

El mutante MJ69 fue obtenido mediante mutación de la cepa silvestre *S. cerevisiae* S288C con EMS. El análisis de sus características fenotípicas fue realizado en medios ricos sólidos y líquidos, en presencia y en ausencia de sorbitol 0,9 M, y permitió confirmar su termosensibilidad a 37°C y un crecimiento ligeramente menor a 26°C con respecto al silvestre. La viabilidad a 26°C resultó ser ligeramente inferior a la de la cepa silvestre, mientras que a 37°C fue mucho menor, mostrando sólo un 25% de células viables tras 24 horas de incubación. Las características morfológicas observadas fueron similares a las del silvestre en todas las condiciones analizadas (tabla 15).

La transformación del mutante termosensible MJ69 con la genoteca CEN BANK, generó varios clones capaces de crecer a 37°C. El estudio fenotípico de uno de estos clones, T69.8, cuyo plásmido poseía el patrón de restricción adecuado, fue realizado en medio líquido y en las mismas condiciones que se habían empleado en la caracterización fenotípica de los mutantes (ver materiales y métodos). Su comportamiento fue comparado con el mostrado por la cepa mutante MJ69 y por la cepa silvestre S288C en las mismas condiciones. Los resultados obtenidos (tabla 15) mostraron la complementación casi total del fenotipo termosensible del clon T69.8, que presentó un crecimiento a 37°C del 80%

respecto al silvestre. Su viabilidad y su morfología también fueron similares a las de la cepa S288C.

Tabla 15: Estudio comparativo del comportamiento en medio líquido del mutante MJ69, del transformante T69.8 y de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* S288C.

CEPAS	YEPD 26°C			YEPD 37°C		
	Crecimiento	Viabilidad (%)	Morfología	Crecimiento	Viabilidad (%)	Morfología
MJ69	++	80/70	S	-	25/10	S
T69.8	+++	95/90	S	++	95/90	S
S288C	+++	99/96	S	+++	95/90	S

El crecimiento en el medio líquido YEPD fue estudiado durante 48 horas mediante la determinación de la absorbancia a 600 nm mostrada por los cultivos. El signo +++ significa que los valores obtenidos fueron similares a los de la cepa silvestre. El signo ++ indica un crecimiento del 70-90% respecto a la cepa silvestre. El signo - indica ausencia de crecimiento. Los valores de viabilidad indican el porcentaje de células no teñidas con yoduro de propidio a las 24/48 horas de comenzar el ensayo. La morfología fue analizada mediante microscopía óptica, y se indica como S en el caso de no encontrarse diferencias significativas con la cepa control. Los valores de crecimiento a 26 y a 37°C están referidos a los valores de crecimiento de la cepa S288C en las mismas condiciones.

Posteriormente, se realizó el estudio funcional del plásmido p69.8 que había sido extraído del clon complementado T69.8, según se indica en la figura 20. La secuenciación de un fragmento plasmídico permitió identificar al gen *PRP19* como el responsable de la complementación de la termosensibilidad del mutante MJ69.

**Plásmido**    **Complementación del**  
**crecimiento de MJ69 a 37°C**

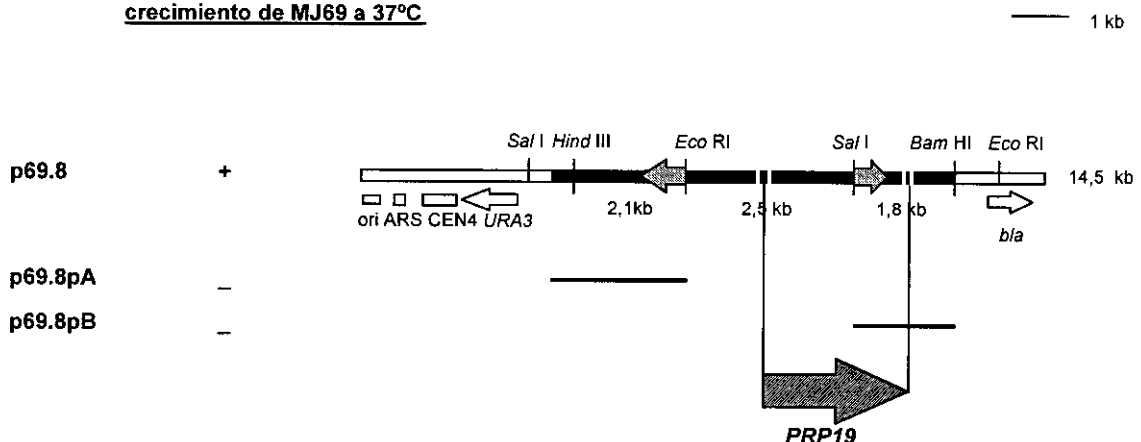


Figura 20: Análisis funcional del inserto clonado en p69.8 e identificación del gen *PRP19*.

La capacidad que poseen los diferentes plásmidos de complementar el fenotipo termosensible del mutante MJ69, se indica con los signos + y -. El plásmido p69.8p1A se obtuvo tras la digestión de p69.8 con *EcoRI* y una posterior religación del DNA plasmídico restante. El plásmido p69.8p1B se obtuvo mediante la digestión con *SalI* de p69.8 y religación del fragmento plasmídico restante. Las flechas grises señalan los fragmentos secuenciados, y la flecha rayada indica la localización del gen *PRP19* en el fragmento clonado.

El gen *PRP19* (*PS04/LO913/YLL036C*) se encuentra localizado en el cromosoma XII de *S. cerevisiae* y codifica una proteína de 503 aminoácidos. La proteína Prp19p es esencial para *S. cerevisiae* (Cheng *et al.*, 1993), y ha sido relacionada con los procesos de maduración del mRNA (*splicing*). Se encuentra asociada fuertemente al complejo de proteínas y RNA, al que se acopla el pre-mRNA durante el proceso de eliminación de los intrones. Recientemente, también ha sido implicada en procesos de recombinación genética y reparación del DNA (Grey *et al.*, 1996).

Las búsquedas realizadas en las bases de datos del Gene Bank/EMBL revelaron la ausencia de secuencias aminoacídicas y nucleotídicas que presentaran una homología significativa con la proteína Prp19p y con el gen *PRP19* respectivamente.

## 8. CLONACIÓN DEL GEN *MTF1*

El mutante MJ202 fue obtenido tras la mutación de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* S288C con EMS. Los ensayos de caracterización fenotípica realizados en medios ricos sólidos y líquidos, en presencia y ausencia de sorbitol 0,9 M a 26 y a 37°C, mostraron un comportamiento termosensible de esta cepa a 37°C y un crecimiento del 85% respecto de la cepa silvestre S288C a 26°C. La viabilidad a 37°C fue del 65% tras 24 horas de incubación. Su morfología no mostró diferencias significativas con la de la cepa S288C en las condiciones analizadas (tabla 16).

La transformación del mutante termosensible MJ202 con la genoteca CEN BANK generó varios clones capaces de crecer a 37°C. Uno de ellos, el clon T202.1, fue seleccionado por tener un plásmido con el patrón de restricción esperado, y fue caracterizado en las mismas condiciones que se habían empleado en el estudio fenotípico de los mutantes (ver materiales y métodos). Su comportamiento fue comparado con los mostrados por la cepa mutante MJ202 y la silvestre S288C en las mismas condiciones. Los resultados obtenidos a 37°C mostraron la complementación casi total del fenotipo termosensible del clon T103.1, ya que tuvo un crecimiento del 77% con respecto a la cepa silvestre, y además consiguió recuperar la viabilidad de dicha cepa. Sin embargo, a 26°C su crecimiento fue únicamente del 61% respecto al silvestre, aunque su viabilidad y morfología en todas las condiciones analizadas, no difirieron significativamente de la cepa control (tabla 16).

A continuación se realizó el estudio funcional del plásmido p202.1 para identificar el gen responsable de la complementación fenotípica (figura 21), y se secuenció un fragmento plasmídico directamente implicado en dicha complementación. El resultado obtenido permitió identificar al gen *MTF1* como el gen responsable de la complementación del fenotipo termosensible del mutante MJ202.

Tabla 16: Estudio comparativo del comportamiento en medio líquido del mutante MJ202, del transformante T202.1 y de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* S288C.

CEPAS	YEPD 26°C			YEPD 37°C		
	Crecimiento	Viabilidad (%)	Morfología	Crecimiento	Viabilidad (%)	Morfología
MJ202	++	90/80	S	-	65/50	S
T202.1	+	95/80	S	++	90/80	S
S288C	+++	99/96	S	+++	95/90	S

El crecimiento en el medio líquido YEPD fue estudiado durante 48 horas mediante la determinación de la absorbancia a 600 nm ( $A_{600nm}$ ) mostrado por los cultivos. El signo +++ significa que los valores obtenidos fueron similares a los de la cepa silvestre. El signo ++ indica un crecimiento del 70-90% respecto a la cepa silvestre. El signo + indica un crecimiento menor del 70% respecto a la cepa silvestre. El signo - indica ausencia de crecimiento. Los valores de viabilidad indican el porcentaje de células no teñidas con yoduro de propidio a las 24/48 horas de comenzar el ensayo. La morfología fue analizada mediante microscopía óptica, y se indica como S en el caso de no mostrar diferencias significativas con la cepa control. Los valores de crecimiento a 26 y a 37°C están referidos a los valores de crecimiento de la cepa S288C en las mismas condiciones.

**Plásmido**      **Complementación del crecimiento de MJ202 a 37°C**

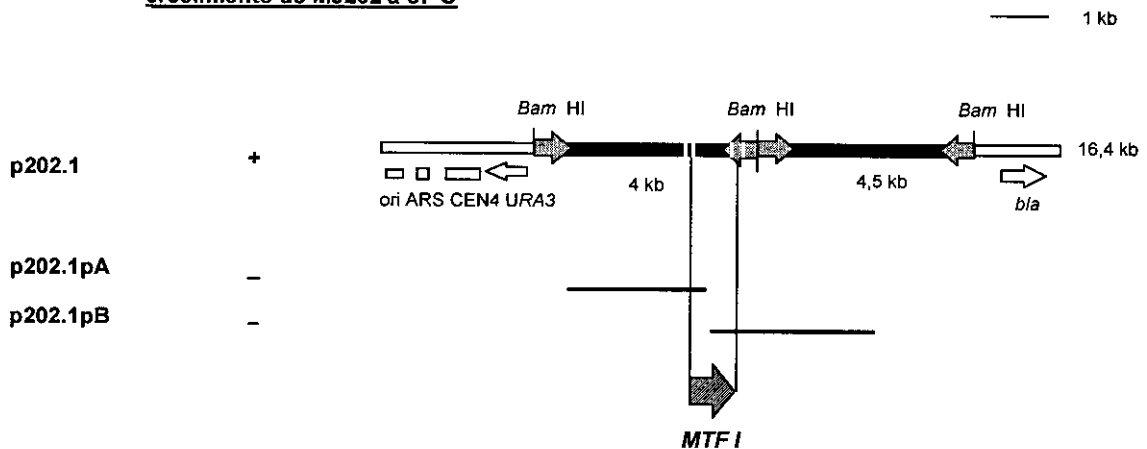


Figura 21: Análisis funcional del inserto clonado en p202.1 e identificación del gen *MTF1*.

La capacidad que poseen los diferentes plásmidos de complementar el fenotipo termosensible del mutante MJ202, se indica con los signos + y -. Los plásmidos p202.1A y p202.1B se obtuvieron a partir de la digestión del fragmento clonado en el plásmido p202.1 con *Bam*HI, y la subclonación de los fragmentos obtenidos de 4 y 4,5 kb respectivamente, en el vector YCp50. La zona del plásmido p202.1 de color blanco corresponde al vector YCp50, y la zona en negro, al fragmento clonado. Las flechas grises muestran los fragmentos secuenciados, y la flecha rayada indica la localización del gen *MTF1* en el fragmento clonado.

El gen *MTF1* (RF1023/YM9959.10/YMR228W) se encuentra situado en el cromosoma XIII de *S. cerevisiae*. Este gen codifica una proteína no esencial, Mtf1p, de 340 aminoácidos que se localiza en la mitocondria. La función de esta proteína consiste en conferir especificidad a la RNA polimerasa mitocondrial mediando el reconocimiento del promotor (Jang y Jaehning, 1991). El gen *MTF1* fue clonado por Lisowsky y Michaelis (1988) como un supresor de una mutación termosensible en el gen *RPO41*, que codifica para la subunidad catalítica de la RNA polimerasa mitocondrial.

Las búsquedas en la base de datos Gene Bank/EMBL mostraron la ausencia de secuencias aminoácidas y nucleotídicas con una homología significativa a la proteína Mtf1p o al gen *MTF1*.

La información acerca del fenotipo mostrado por las células carentes de esta proteína indicaba que se trataban de mutantes *petite*, que es el fenotipo característico de mutantes que poseen alteraciones mitocondriales (Lisowsky y Michaelis, 1988). Por este motivo y para conocer si el mutante MJ202 era un mutante de este tipo, se realizaron ensayos orientados a caracterizar su comportamiento en medios de cultivo sólidos y líquidos con glucosa, como fuente de carbono fermentable, y glicerol, como fuente de carbono no fermentable. Los resultados obtenidos mostraron que el mutante era capaz de crecer a la temperatura permisiva de 26°C en presencia de glucosa y de glicerol, aunque en este último caso lo hacía de una manera más lenta, al igual que la cepa control S288C. Por otra parte, la ausencia de crecimiento a 37°C en ambos medios demostró que la termosensibilidad del mutante no dependía de la ruta metabólica utilizada para la degradación de la fuente de carbono. Este ensayo permitió confirmar que MJ202 no se comportaba como mutante *petite* ni a 26 ni a 37°C, y por tanto se consideraron varias hipótesis que pudieran justificar los resultados obtenidos. Estas hipótesis son comentadas con detalle en la discusión de este trabajo, y en líneas generales consisten en: la posibilidad de que el gen *MTF1* hubiera mutado de manera que la proteína alterada resultara tóxica, directa o indirectamente, para la célula a 37°C, en la posibilidad de que existieran otros genes mutados además de *MTF1*, que en conjunto provocaran la muerte celular, o la posible existencia de otro gen mutado cuya alteración letal pudiera ser suprimida por el gen *MTF1* en bajo número de copias.

## 9. CLONACIÓN DEL GEN *MPS1*

El mutante MJ41 fue obtenido mediante la mutación de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* S288C con luz UV. El análisis de sus características fenotípicas en medios ricos sólidos y líquidos, en presencia y en ausencia de sorbitol 0,9 M, permitió confirmar su termosensibilidad a 37°C y su crecimiento y viabilidad similar al de la cepa silvestre a la temperatura permisiva (tabla 17). La viabilidad celular a la temperatura restrictiva fue analizada con yoduro de propidio, observándose un 40% de las células viables tras 24 horas de incubación. Por otra parte, el estudio de sus características morfológicas permitió identificar células similares a la silvestre a 26°C, pero que formaban grupos de un número variable de células a 37°C.

La transformación del mutante termosensible MJ41 con la genoteca CEN BANK generó varios clones capaces de crecer a 37°C. El estudio fenotípico de uno de estos clones, T41.1, cuyo plásmido poseía el patrón de restricción esperado y además era capaz de

complementar nuevamente al mutante, fue realizado en medio líquido y en las mismas condiciones que se habían empleado en la caracterización fenotípica de los mutantes (ver materiales y métodos). Su comportamiento fue comparado con los mostrados por la cepa mutante MJ41 y la cepa silvestre S288C en las mismas condiciones. Los resultados obtenidos (tabla 17), mostraron que en T41.1 existía una complementación total del fenotipo termosensible, ya que su crecimiento y su viabilidad fueron similares a los de la cepa silvestre, a pesar de que sus características morfológicas se mantuvieron alteradas.

Tabla 17: Estudio comparativo del comportamiento en medio líquido del mutante MJ41, del transformante T41.1 y de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* S288C.

CEPAS	YEPD 26°C			YEPD 37°C		
	Crecimiento	Viabilidad (%)	Morfología	Crecimiento	Viabilidad (%)	Morfología
MJ41	+++	99/90	S	-	40/30	G
T41.1	+++	99/90	S	+++	96/88	G
S288C	+++	99/96	S	+++	95/90	S

El crecimiento en el medio líquido YEPD fue estudiado durante 48 horas mediante la determinación de la absorbancia a 600 nm ( $A_{600nm}$ ) de los cultivos. El signo +++ significa que los valores obtenidos fueron similares a los de la cepa silvestre. El signo ++ indica un crecimiento del 70-90% con respecto a la cepa silvestre. El signo - indica ausencia de crecimiento. Los valores de viabilidad indican el porcentaje de células no teñidas con yoduro de propidio a las 24/48 horas de comenzar el ensayo. La morfología fue analizada mediante microscopía óptica, y se indica como S en el caso de ser similares a las silvestres y G cuando existían células en grupos. Los valores de crecimiento a 26 y a 37°C están referidos a los valores de crecimiento de la cepa S288C en las mismas condiciones.

Por este motivo se procedió al análisis funcional del plásmido p41.1, que había sido extraído del clon complementado T41.1, según se indica en la figura 22. La secuenciación de un fragmento plasmídico permitió identificar al gen *MPS1* como el responsable de la complementación de la termosensibilidad del mutante MJ41.

El gen *MPS1* (*RPK1/D2785/YDL028C*) se localiza en el cromosoma IV de *S. cerevisiae* y codifica una proteína, Mps1p, constituida por 764 aminoácidos. Esta proteína es esencial para *S. cerevisiae* y posee una actividad serín-treonín-tirosín quinasa. Participa en la duplicación del cuerpo polar del huso mitótico (Winey *et al.*, 1991) y podría constituir el punto de control de este proceso (*check point*) (Weiss y Winey, 1996). Además, participa también en los procesos de meiosis celular (Lauze *et al.*, 1995). La interrupción de *MPS1* provoca un comienzo precoz de la mitosis, anterior a la duplicación completa del DNA genómico, por lo que las células hijas adquieren una dotación genética inferior a la necesaria, y mueren rápidamente (Poch *et al.*, 1994).

La búsqueda de proteínas homólogas a Mps1p, ha permitido identificar cierta similitud a nivel del dominio catalítico con las proteínas de mamíferos PYT, TTK, *esk1* y *esk2*, que han sido implicadas en el control del ciclo mitótico y meiótico (Poch *et al.*, 1994; Letwin *et al.*, 1992).

**Plásmido**      **Complementación del**  
**crecimiento de MJ41 a 37°C**

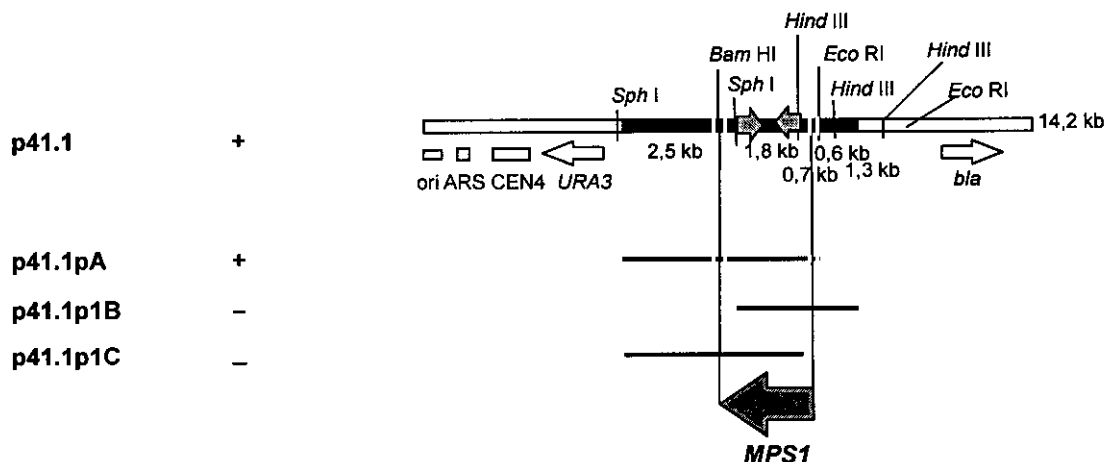


Figura 22: Análisis funcional del inserto clonado en p41.1 e identificación del gen *MPS1*.

La capacidad que poseen los diferentes plásmidos de complementar el fenotipo termosensible del mutante MJ41, se indica con los signos + y -. Los plásmidos p41.1pA, p41.1pB y p41.1pC fueron obtenidos mediante la digestión de p41.1 con *EcoRI*, *SphI* y *HindIII* respectivamente, y la posterior religación del DNA plasmídico restante. La zona en blanco del plásmido p41.1 corresponde al vector YCp50, y la zona en negro, al fragmento clonado. Las flechas grises muestran los fragmentos secuenciados, y la flecha rayada indica la localización del gen *MPS1* en el fragmento clonado.

## 10. CLONACIÓN DEL GEN *YPL007C*

El mutante MJ103 fue obtenido mediante la mutación de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* S288C con luz UV. Los ensayos de caracterización fenotípica realizados en medios ricos sólidos y líquidos, en presencia y ausencia de sorbitol 0,9 M a 26 y a 37°C, permitieron detectar un comportamiento termosensible de esta cepa a 37°C y unas características fenotípicas similares a las de la cepa control a 26°C (tabla 18), aunque el crecimiento inicial del mutante fue más lento. La cepa mutante MJ103 no fue capaz de proliferar a la temperatura restrictiva, y además, tras 24 horas de incubación, presentó el 66% de las células viables. El estudio morfológico mostró que las células del mutante eran ligeramente más redondas que las del silvestre.

La transformación del mutante termosensible MJ103, con la genoteca CEN BANK generó varios clones capaces de crecer a 37°C. El clon T103.1, seleccionado entre ellos por poseer un plásmido con un patrón de restricción esperado y ser capaz de complementar nuevamente al mutante, fue caracterizado fenotípicamente. Este estudio se realizó en medio líquido y en las mismas condiciones que se habían empleado en la caracterización fenotípica de los mutantes, y que ya han sido comentadas con anterioridad. Su comportamiento fue comparado con el de la cepa mutante MJ103 y la cepa silvestre S288C en las mismas condiciones. Los resultados obtenidos a 37°C mostraron que se había

producido una complementación del fenotipo termosensible, ya que el T103.1 creció de manera similar a la cepa silvestre, aunque con una viabilidad ligeramente inferior (tabla 18). Sin embargo, las características morfológicas se mantuvieron alteradas.

Tabla 18: Estudio comparativo del comportamiento en medio líquido del mutante MJ103, del transformante T103.1 y de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* S288C.

CEPAS	YEPD 26°C			YEPD 37°C		
	Crecimiento	Viabilidad (%)	Morfología	Crecimiento	Viabilidad (%)	Morfología
MJ103	+++	90/90	R	-	66/22	R
T103.1	+++	95/90	R	+++	83/70	R
S288C	+++	99/96	S	+++	95/90	S

El crecimiento en el medio líquido YEPD fue estudiado durante 48 horas mediante la determinación de la absorbancia a 600 nm mostrada por los cultivos. El signo +++ significa que los valores obtenidos fueron similares a los de la cepa silvestre. El signo - indica ausencia de crecimiento. Los valores de viabilidad muestran el porcentaje de células no teñidas con yoduro de propidio tras 24/48 horas de comenzar el ensayo. La morfología fue analizada mediante microscopía óptica, y se indica como S en el caso de ser similar a la del silvestre S288C y R cuando las células eran más redondas. Los valores de crecimiento a 26 y a 37°C están referidos a los valores de crecimiento de la cepa S288C en las mismas condiciones.

**Plásmido**      **Complementación del**  
**crecimiento de MJ103 a 37°C**

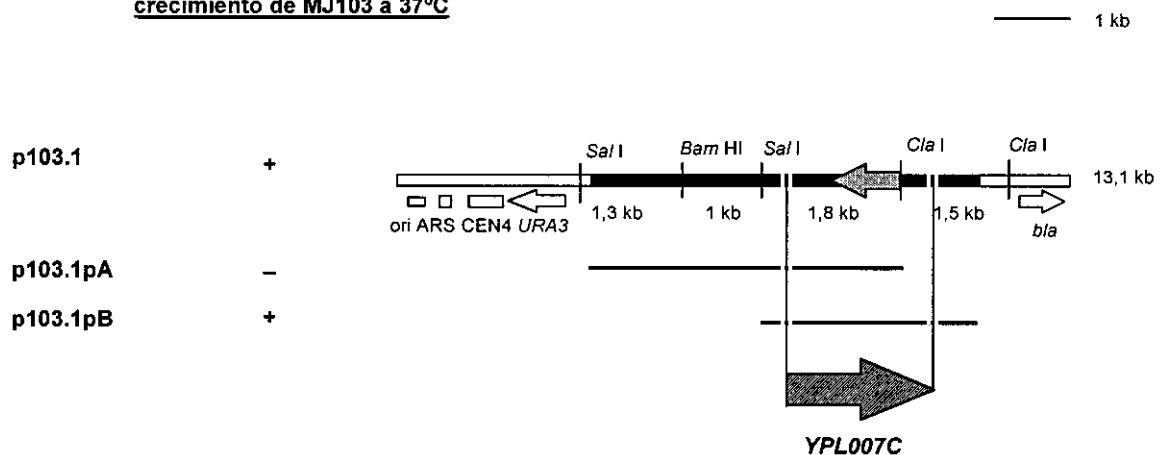


Figura 23: Análisis funcional del inserto clonado en p103.1 e identificación del gen *YPL007C*. La capacidad que poseen los diferentes plásmidos para complementar el fenotipo termosensible del mutante MJ103, se indica con los signos + y -. Los plásmidos p103.1pA y p103.1pB derivan de la digestión de p103.1 con *Cla*I y *Sal*I respectivamente, y una posterior religación de los fragmentos plasmídicos restantes. La zona en blanco del plásmido corresponde al vector YCp50 y la zona en negro, al fragmento clonado. La flecha gris señala el fragmento secuenciado, y la flecha rayada indica la localización del gen *YPL007C* en el fragmento clonado.

Posteriormente, se realizó el estudio funcional del plásmido p103.1, que había sido extraído del clon complementado T103.1, para identificar el gen responsable de la complementación fenotípica (figura 24). La secuenciación de un fragmento plasmídico permitió identificar la fase abierta de lectura *YPL007C* como la responsable de la complementación de la termosensibilidad del mutante MJ103.

El gen *YPL007C* está constituido por un marco abierto de lectura de 1763 pares de bases y se localiza en el cromosoma XVI de *S. cerevisiae*. Su papel biológico era desconocido en el momento de su identificación como gen responsable de la complementación del fenotipo termosensible del mutante MJ103, y en el momento de finalizar este trabajo aún no había sido descrito.

Se realizaron diversas búsquedas en diferentes bases de datos públicas y privadas, con el objeto de investigar la existencia de secuencias homólogas al gen *YPL007C* o a la proteína Ypl007cp, en mamíferos o en hongos patógenos. Además con estas búsquedas, también se trató de identificar dominios conservados con otras proteínas que pudieran aportar información sobre su funcionalidad celular. Sin embargo, ninguna de las secuencias recogidas en las bases de datos en el momento en que se finalizó este trabajo, mostró homología significativa con las secuencias estudiadas.

## 11. SELECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CON MAYOR INTERÉS COMO DIANAS ANTIFÚNGICAS

Como resultado final del estudio de los mutantes condicionales, se identificaron 7 genes como los responsables de complementar la termosensibilidad de los 13 mutantes analizados, que previamente habían sido clasificados en 7 “grupos de complementación” (tabla 19).

Todas estas proteínas fueron evaluadas individualmente para conocer si poseían las características deseables para ser dianas antifúngicas, determinando en cada caso si la proteína tenía suficiente interés como para continuar su estudio, o por el contrario éste debía finalizarse o posponerse.

En todas las proteínas se identificaron algunas características que sugerían su posible utilidad como diana. Sin embargo tuvo que realizarse una selección entre ellas, ya que no era factible trabajar con todas. Para ello se siguieron los criterios deseables para las proteínas utilizadas como dianas antifúngicas, que ya han sido comentados con anterioridad en este trabajo, y los intereses de la compañía farmacéutica en la que se realizaba esta investigación. Se consideró prioritario el estudio de las proteínas esenciales para *S. cerevisiae* frente a las no esenciales, como Mtf1p, que aunque podrían en algún caso constituir dianas antifúngicas, su evaluación es mucho más compleja. También se consideraron de mayor interés aquellas proteínas que carecían de homólogos en humanos, ya que ofrecían mayores posibilidades de una inhibición selectiva, desestimando el estudio del TAF<sub>II</sub>145 frente a otras proteínas que no tenían homólogos descritos. Por otra parte, resultaron interesantes las proteínas que no hubieran sido caracterizadas anteriormente, ya que ofrecían la posibilidad de constituir dianas novedosas no estudiadas por ninguna otra compañía farmacéutica. Así, la proteína Ypl007cp, fue considerada especialmente atractiva y seleccionada, por ser una proteína esencial no caracterizada previamente. También la proteína Mps1p fue elegida entre el resto de las proteínas identificadas, por ser esencial y por no existir posiblemente, proteínas muy similares en mamíferos, ya que participa en la

duplicación del cuerpo polar del huso mitótico, que posee una estructura diferente de la de su homólogo en mamíferos. Además, la actividad quinasa de esta proteína estaba bien caracterizada y se disponía de un ensayo de actividad *in vitro*.

Tabla 19: Genes responsables de la complementación de los mutantes termosensibles analizados, indicando su comportamiento fenotípico en medio líquido y el agente mutagénico utilizado para su obtención.

Mutantes	Genes identificados	Comportamiento en medio líquido	Agentes mutagénicos
MJ25*	<i>HSP30</i>	B	Luz UV
MJ35*	<i>HSP30</i>	B	EMS
MJ45*	<i>HSP30</i>	B	Luz UV
MJ143*	<i>HSP30</i>	B	Luz UV
MJ226*	<i>HSP30</i>	B	NG
MJ241*	<i>HSP30</i>	B	AN
MJ258*	<i>HSP30</i>	B	Cong/Descongelación
MJ239	<i>CDC68</i>	A	AN
MJ39	<i>TAF<sub>II</sub>145</i>	C	Luz UV
MJ69	<i>PRP19</i>	B	EMS
MJ202	<i>MTF1</i>	A	EMS
MJ41	<i>MPS1</i>	A	Luz UV
MJ103	<i>YPL007C</i>	A	Luz UV

\* Mutantes que pertenecen al mismo grupo de complementación. Cong: congelación.

El comportamiento en medio líquido de los mutantes caracterizados en condiciones permisivas fue diferente: (A) crecimiento similar al control, (B) crecimiento con una absorbancia a 600 nm del 70 al 90% respecto al grupo anterior y (C) crecimiento con absorbancia a 600 nm inferior al 70% respecto al control.

## 12. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA Mps1p COMO DIANA ANTIFÚNGICA

La proteína Mps1p fue considerada una buena candidata para ser utilizada como diana antifúngica después de analizar la información disponible sobre ella (Winey *et al.* 1991; Poch *et al.* 1994; Lauzé *et al.*, 1995). Se trataba de una proteína posiblemente diferente a las proteínas de mamíferos, a pesar de poseer los elementos característicos conservados de las serín-treonín-tirosín quinasa, con un mecanismo de acción caracterizado y una actividad enzimática conocida, por lo que se decidió continuar su estudio para confirmar su utilidad como diana. Por este motivo, se realizaron diversos estudios orientados a conocer la especificidad fúngica de Mps1p, mediante la búsqueda de homologías en otras especies, así como intentar llevar a cabo su purificación con objeto de diseñar ensayos de inhibición *in vitro*.

### 12.1. Búsqueda de homologías

La identificación de secuencias similares a Mps1p fue abordada por una parte de manera experimental, mediante una hibridación DNA-DNA (*Southern blot*), y por otra parte, mediante la realización de búsquedas en las bases de datos. Con la primera aproximación se trataba de identificar secuencias nucleotídicas similares a *MPS1* en el genoma de hongos patógenos y de mamíferos que no hubieran sido secuenciados y que por tanto, no se encontraran en las bases de datos. Mediante la segunda aproximación, se trataban de buscar similitudes nucleotídicas pequeñas con las secuencias de la base de datos del Gene Bank/EMBL, que posiblemente no fueran detectables mediante la técnica de hibridación DNA-DNA, o similitudes aminoacídicas entre Mps1p y las proteínas secuenciadas.

El interés por encontrar proteínas de *S. cerevisiae* conservadas entre las especies patógenas de los hongos, y carentes de proteínas parecidas en células de mamíferos, y concretamente en humanos, motivó que se eligieran dos hongos patógenos, uno levaduriforme, *C. albicans*, y otro filamentoso, *A. fumigatus*, junto con los linfocitos humanos, para realizar los estudios de hibridación DNA-DNA. Como se observa en la figura 24 no se detectó ninguna hibridación con el DNA de las especies estudiadas en los ensayos realizados a 65, 60, 55, 50 y 42°C, visualizándose únicamente las bandas correspondientes al gen *MPS1* en el DNA de *S. cerevisiae*.

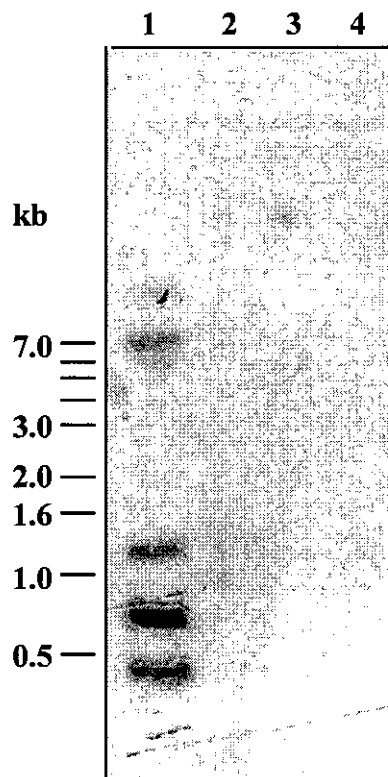


Figura 24: Búsqueda de genes homólogos a *MPS1* en otras especies mediante la técnica de *Southern*. El DNA genómico de *S. cerevisiae* S288C (carril 1), de linfocitos humanos (carril 2), de *A. fumigatus* (carril 3) y de *C. albicans* (carril 4), fue extraído y digerido con *Cla* I. 5 µg de cada DNA fueron sometidos a una electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se hibridó a 50°C con una sonda del gen *MPS1* marcada radioactivamente y se expuso a una película fotográfica durante 18 horas. Los marcadores de peso molecular se indican en kb.

El análisis comparativo de la secuencia de la proteína Mps1p con las existentes en las bases de datos del Gene Bank/EMBL, permitió detectar una homología a nivel del dominio catalítico con proteínas serín-treonín-tirosín quinazas de mamíferos como PYT/TTK, *esk1*, y *esk2*, coincidiendo con trabajos previos (Poch *et al.*, 1994). Sin embargo, ninguna secuencia de los hongos patógenos que estuviera incluida en las bases de datos mostró una similitud significativa con Mps1p.

La existencia de una homología con proteínas de mamíferos podría haber supuesto el abandono del estudio de esta proteína como posible diana antifúngica. Sin embargo, el hecho de que dicha homología se detectara sólo a nivel del dominio C-terminal dejaba abierta la posibilidad de encontrar inhibidores selectivos que actuasen a nivel del dominio N-terminal, por lo que se mantuvo el interés por esta proteína.

## 12.2. Caracterización de la proteína mutada *Mps1p*

Con la intención de obtener información sobre el centro activo u otras zonas funcionalmente importantes de la proteína Mps1p, se procedió a la secuenciación del gen mutante y a la localización de la mutación responsable de su termosensibilidad.

Para ello, se obtuvo el gen *mps1* mediante PCR utilizando como molde el DNA genómico del mutante M41, y se clonó en pUC18, generando los plásmidos pUCmps1 (tabla 6). A continuación se secuenció el gen correspondiente en tres clones procedentes de tres amplificaciones diferentes, por las dos cadenas. De este modo se pudo identificar una mutación puntual que consistía en la transición G→A en el nucleótido 1549 de la fase de lectura abierta, que originaba un cambio en el aminoácido 517 de glutámico (E) por lisina (K). Este cambio de aminoácidos podría originar modificaciones en la estructura secundaria de la proteína ya que supone la substitución de un aminoácido ácido por otro básico. La predicción de estructura secundaria de la zona donde se localiza el aminoácido 517 (figura 25) muestra como la substitución de E por K parece extender la lámina β donde se encuentra dicho residuo, desencadenando la ruptura de una estructura en α-hélice situada a continuación, mediante un giro β. Este cambio podría alterar la estructura terciaria de la proteína *Mps1p* de modo termodependiente, originando su inactivación a 37°C.

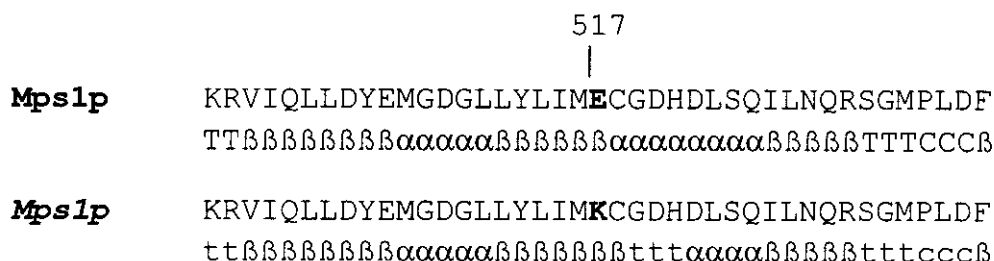


Figura 25: Predicción de estructura secundaria de la proteína Mps1p nativa y *Mps1p* mutante. α, hélice alfa; β, estructura beta; t, giro beta ;c, estructura no ordenada. Se indica la posición del residuo mutado.

## 12.3. Expresión y purificación de la proteína Mps1p

Para poder realizar un estudio comparativo de las características físicas y químicas de la proteína mutada en relación con las de la proteína nativa era necesario disponer de cantidad suficiente de ambas proteínas. Por otro lado, la realización de ensayos de

inhibición *in vitro* de la actividad proteica para la búsqueda de antifúngicos también requiere, en la mayoría de los casos, disponer de la diana purificada. Por este motivo se realizó la fusión de las proteínas Mps1p silvestre y *Mps1p* mutada al dominio de C-terminal de la enzima N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa de *Streptococcus pneumoniae* (LYTA), que es capaz de unirse a DEAE celulosa y por tanto facilitar la purificación de las quimeras (Sánchez-Puelles *et al.*, 1992).

La funcionalidad de la proteína de fusión fue comprobada mediante un ensayo de complementación fenotípica. Para ello, se transformó la cepa mutante MJ41 con los plásmidos YEpPGKCMPS1 y YEpPGKMPS1 (tabla 6), en los que la expresión de la fusión o de la proteína silvestre Mps1p respectivamente, está bajo el control del promotor PGK. Se observó que la fusión era incapaz de complementar el fenotipo termosensible del mutante, lo cual indicaba una alteración estructural o un cambio en la localización de la proteína de fusión. Sin embargo, considerando que esta modificación podría ser reversible una vez que la proteína purificada fuera separada del dominio C-LYTA, se procedió a la expresión de la fusión génica en *S. cerevisiae* (figura 26 panel 2). Paralelamente se construyó el plásmido pT7CMPS1 (tabla 6), en el que la fusión está bajo el control del promotor del fago T7, y se realizó su expresión en *E. coli* BL21 (DE3)plysS (figura 26 panel 1). Los resultados mostraron unos bajos niveles de expresión en ambos casos, así como una elevada inestabilidad de la proteína que aparece parcialmente degradada, dificultando su purificación a gran escala.

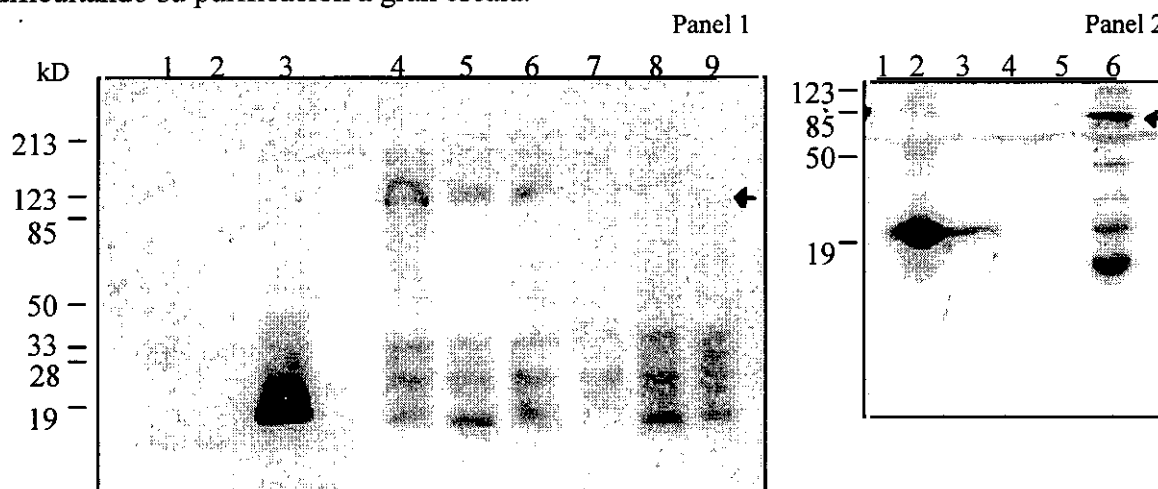


Figura 26: Análisis mediante *Western blot* de la producción de la proteína de fusión C-LYTA-Mps1p en *E. coli* y en *S. cerevisiae*. Muestras equivalentes de extractos celulares obtenidos a partir de cultivos de *E. coli* (panel 1) y *S. cerevisiae* (panel 2) se fraccionaron en un gel de poliacrilamida del 10%, se transfirieron a nitrocelulosa y revelaron con anticuerpos policlonales frente al dominio C-LYTA. La flecha indica la localización de la proteína de fusión de 103,7 kD. Panel 1: Carriles 1 y 2: controles negativos (*E. coli* transformado con pT7-3 crecido en medio M9 y LB respectivamente). Carril 3: control positivo (*E. coli* transformado con pT7C crecido en M9). Carriles 4 y 5: *E. coli* transformado con pT7CMPS1 crecido en M9 y LB, respectivamente, tras 150 min de la inducción con IPTG. Carriles 6 y 7: dos clones de *E. coli* transformados con pT7CMPS1 crecido en M9 tras 240 min de la inducción con IPTG. Carriles 8 y 9: dos clones de *E. coli* transformados con pT7CMPS1 crecidos en LB tras 240 min de la inducción con IPTG. Panel 2: Carril 1: control negativo (*S. cerevisiae* transformada con el vector YEpPGK2). Carril 2: control positivo (*S. cerevisiae* transformada con el vector YEpPGKC). Carriles 3 a 5: tres clones de *S. cerevisiae* transformados con el vector de expresión YEpPGKCMPS1. En todos los casos las muestras procedían de cultivos en YEPD a 28°C en fase exponencial, inoculados a partir de cultivos exponenciales en medio selectivo.

El interés de la proteína Mps1p como diana antifúngica ha llevado a investigar nuevos sistemas de expresión en organismos como *P. pastoris*, que pudieran permitir la purificación de la proteína no degradada. Estos estudios están siendo realizados en colaboración con el departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia (U.C.M.).

#### **12.4. Búsqueda de interacciones con otras proteínas mediante el “sistema dos híbridos”**

Por otra parte, se buscaron otras proteínas que interaccionaran con Mps1p, de manera que en el caso de que una inhibición de estas proteínas pudiera provocar la alteración de Mps1p o una modificación en otro lugar de su misma ruta metabólica, posiblemente también tendrían interés como dianas.

La búsqueda de estas interacciones se realizó mediante el “sistema dos híbridos”. Este sistema permite detectar la interacción de dos proteínas expresadas de manera conjunta en una misma célula. Se basa en la fusión de cada una de las proteínas a un dominio diferente del activador transcripcional de levaduras GAL4, (de unión al DNA o de activación), de modo que sólo es funcional la unión de ambos dominios (Fields y Sternglanz, 1994). Las interacciones son detectadas mediante un doble proceso de selección, aislando en primer lugar los clones His<sup>+</sup>, y ensayando su actividad  $\beta$ -galactosidasa en segundo lugar.

Se clonó el gen *MPS1* en el vector pAS2-1 (tabla 5), portador del dominio de unión a DNA (GBD4) del activador transcripcional, generándose el plásmido pASMPS1 (tabla 6). Este plásmido fue utilizado para transformar las cepas comerciales de *S. cerevisiae* Y190 y CG-1945 (tabla 3). Se detectó una activación transcripcional inespecífica del gen estudiado, ya que todos los clones transformados presentaron una actividad  $\beta$ -galactosidasa. Por tanto, la capacidad de la proteína de fusión GBD4-Mps1p para activar inespecíficamente la transcripción del gen  $\beta$ -gal, impidió continuar esta estrategia.

### **13. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA Ypl007cp COMO DIANA ANTIFÚNGICA**

La proteína Ypl007cp fue una de las proteínas identificadas que presentó mayor interés, ya que al no haber sido estudiada anteriormente, ofrecía la posibilidad de constituir una diana antifúngica nueva. Además, la demostración de su esencialidad para *S. cerevisiae*, realizada en nuestro laboratorio y que se comenta a continuación detalladamente, aumentó su interés como diana. Sin embargo, la ausencia de datos acerca de su actividad y mecanismo de acción, así como de su estructura y de su localización celular, requerían un estudio en profundidad sobre ella.

#### **13.1. Estudio del gen *YPL007C***

##### **13.1.1. Interrupción del gen *YPL007C***

El primer ensayo realizado para conocer la importancia del gen *YPL007C* para *S. cerevisiae* consistió en su disrupción génica y la evaluación del fenotipo originado. Esta disrupción génica fue realizada en la cepa haploide TD28 y en las cepas diploides SX508A/SX50110A y SEY610/SEY611. La estrategia de interrupción utilizada se basó en el trabajo de Gustin y Burk (1993), y se realizó de la manera indicada en la figura 27.

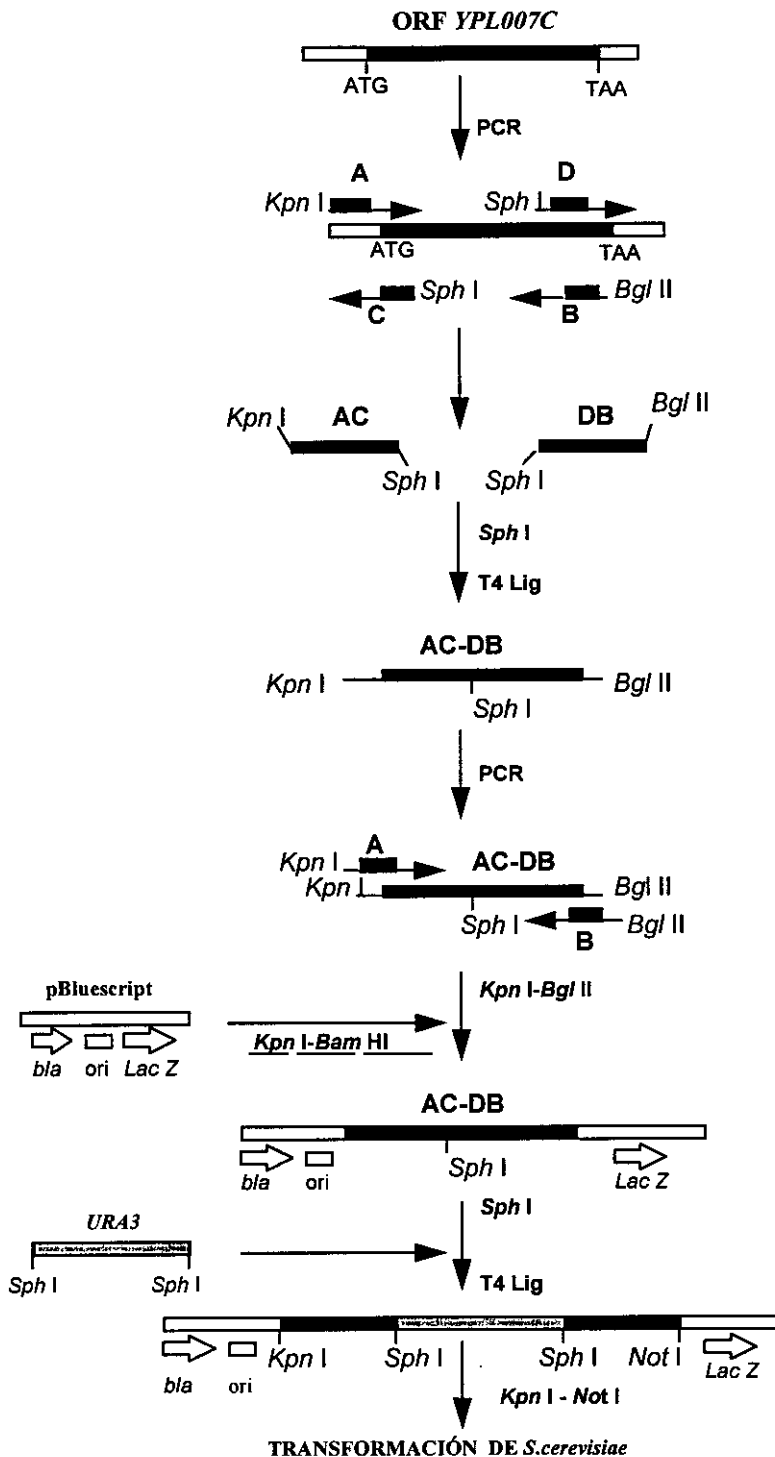


Figura 27: Interrupción del gen *YPL007C*. Dos fragmentos de 480 pb y 592 pb correspondientes a las regiones 5' y 3' del gen *YPL007C* se amplificaron mediante PCR con la DNA Polimerasa *Pfu*, utilizando las parejas de oligonucleótidos A/C y B/D (tabla 7) durante 55 ciclos de amplificación, a una temperatura de anillamiento de 55°C. El fragmento AC-DB se obtuvo mediante la ligación por el extremo cohesivo *Sph*I de los fragmentos AC y DB, y fue posteriormente amplificado por PCR durante 35 ciclos a una temperatura de anillamiento de 58°C antes de ser clonado en el vector pBluescript II KS (tabla 6). A continuación se clonó el marcador *URA3* en la diana central *Sph*I, y finalmente el fragmento *Kpn*I-*Not*I se utilizó para transformar la cepa de *S. cerevisiae* S288C.

Las cepas anteriormente mencionadas fueron transformadas con la construcción obtenida, sembradas en placas con medio definido carente de uracilo, e incubadas a 26°C.

El estudio de los transformantes obtenidos mediante hibridación DNA-DNA (*Southern blot*), mostró la correcta integración del gen *URA3* en los diploides analizados. Como sonda se utilizó un fragmento de 592 pares de bases del extremo 3' de la fase de lectura abierta del gen. La aparición de dos bandas (figura 28) que poseían el tamaño esperado para el gen *YPL007C* y para el gen interrumpido, confirmaron que los diploides con una sola copia del gen eran viables. Por el contrario, no se obtuvo ningún diploide con los dos alelos interrumpidos, mostrando así la esencialidad del gen. Además, el resultado obtenido del análisis de las escasas cepas haploides *Ura*<sup>+</sup>, demostró que la disrupción génica no se había producido de manera correcta, y por tanto, también mostraba la esencialidad de *YPL007C*. Los resultados anteriores se confirmaron mediante PCR.

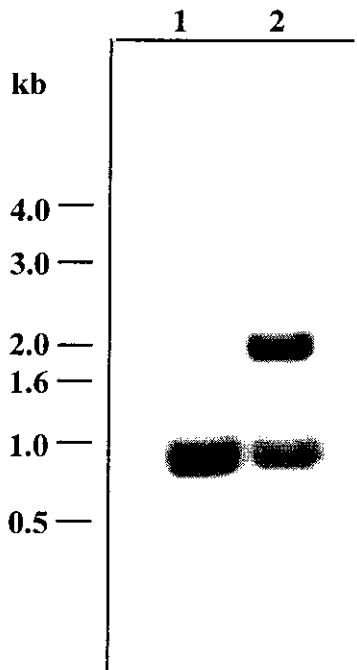


Figura 28: Verificación de la disrupción del gen *YPL007C* mediante la técnica de *Southern*. El DNA genómico de la cepa de *S. cerevisiae* S288C (carril 1) y del diploide SEY610/SEY611 *YPL007C::URA3* (carril 2), fue extraído y digerido con *Eco* RI. 5 µg de cada DNA fueron sometidos a una electroforesis en un gel de agarosa al 1% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se hibridó a 60°C con una sonda del gen *YPL007C* marcada radioactivamente, y se expuso a una película fotográfica durante 5 horas en presencia de una pantalla amplificadora.

Los diploides interrumpidos en un alelo, SX508A/SX50110A *YPL007C::URA3* y SEY610/SEY611 *YPL007C::URA3*, fueron esporulados y tras un proceso de disección de tétradas, las esporas fueron incubadas en medio YEPD a 26°C durante 96 horas. Sólomente dos esporas de cada tétrada analizada formaron colonias visibles. Estas colonias fueron incapaces de crecer en un medio deficiente de uracilo, demostrando el efecto letal de la interrupción del gen *YPL007C*. La esporas que no dieron lugar a colonias visibles, germinaron y llevaron a cabo unas 6 divisiones celulares aproximadamente, generando unas microcolonias cuyo aspecto microscópico se muestra en la figura 29.

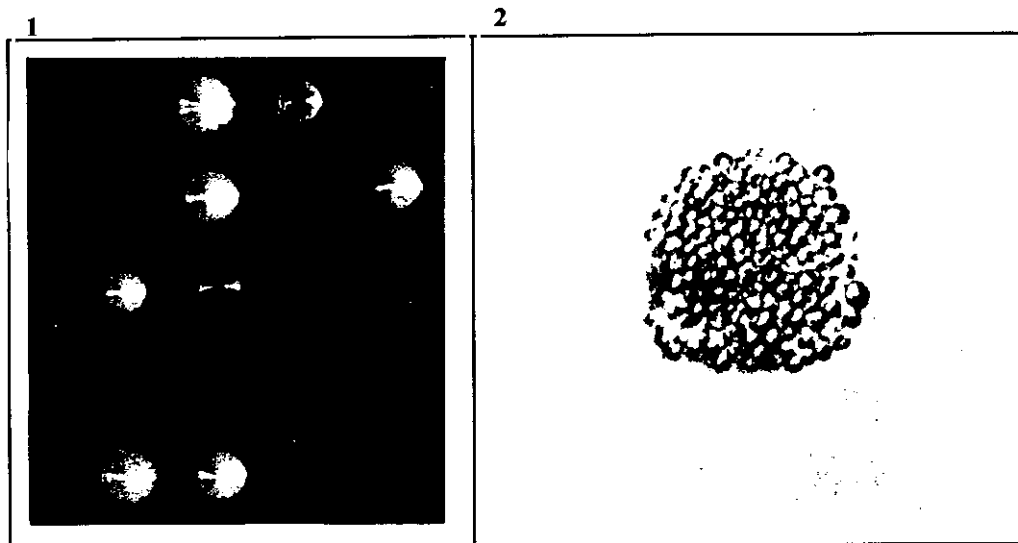


Figura 29: Disección de las ascas del diploide SEY611/SEY610 *YPL007C::URA3*. La cepa diploide interrumpida SEY611/SEY610 *YPL007C::URA3* fue esporulada y sus ascas fueron diseccionadas e incubadas en medio YEPD a 26°C. Panel 1: ascas diseccionadas e incubadas a 26°C durante 5 días. Panel 2: microcolonia formada por una de las dos esporas que no dieron lugar a colonias viables, visualizada al microscopio óptico a 400X tras cinco días de incubación.

### 13.1.2. Búsqueda de homologías

Posteriormente a la verificación de la esencialidad del gen *YPL007C* de *S. cerevisiae*, se investigó la posible existencia de secuencias homólogas a *Ypl007cp* en otras especies. Para ello se llevó a cabo, en primer lugar, una búsqueda en bases de datos públicas y privadas, tratando de encontrar secuencias nucleotídicas o peptídicas similares a la proteína en estudio. Sin embargo, no fue posible encontrar similitud con ninguna secuencia de esta base de datos. Asimismo, otros procedimientos como búsqueda de patrones de secuencia similares, o similitudes estructurales con otras proteínas han sido insuficientes para caracterizar la proteína. Tampoco se encontraron homólogos en las búsquedas realizadas por patrones de expresión en otros organismos, de modo que no parecía existir un homólogo en *Caenorhabditis elegans* a pesar de que sus librerías de expresión cubrían más del 80% de los genes esperados. Por este motivo, se procedió a un estudio de hibridación DNA-DNA, *Southern blot*, con el DNA genómico de *C. albicans*, *A. fumigatus* y linfocitos humanos, similar al realizado previamente con *MPS1*. Con este ensayo se trataba de encontrar similitudes con genes de estas especies que no estuvieran secuenciados, y que por tanto, no formaran parte de las bases de datos. Sin embargo, como se muestra en la figura 30, tampoco en este caso fue posible identificar ninguna banda de hibridación a las temperaturas de 60, 58, 50 y 42°C a las que se realizaron los ensayos, ya que únicamente se visualizaron las bandas correspondientes al gen *YPL007C* en *S. cerevisiae*.

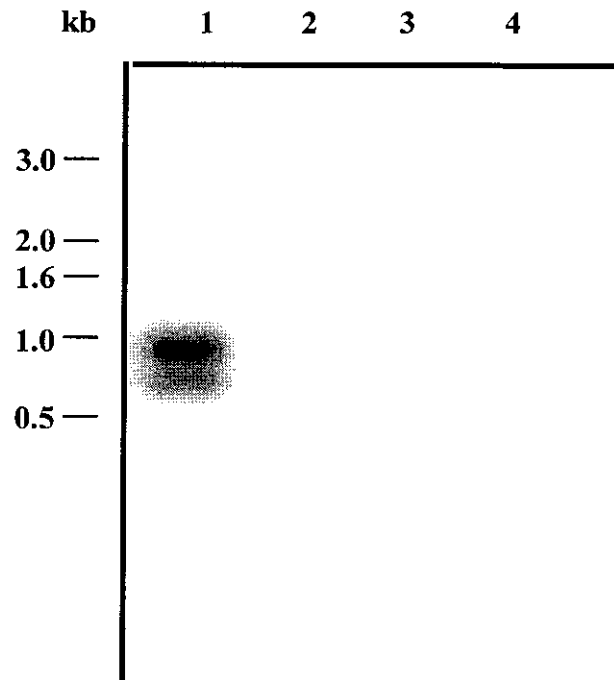


Figura 30: Búsqueda de genes homólogos a *YPL007C* en otras especies mediante la técnica de *Southern*. El DNA genómico procedente de *S. cerevisiae* S288C (carril 1), de *C. albicans* (carril 2), de *A. fumigatus* (carril 3) y de linfocitos humanos (carril 4), fue extraído y digerido con *Eco* RI. 5  $\mu$ g de cada DNA fueron sometidos a una electroforesis en un gel de agarosa al 1% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se hibridó a 60°C con una sonda del gen *YPL007C* marcada radioactivamente y se expuso a una película fotográfica durante 5 horas en presencia de una pantalla amplificadora. Los marcadores de peso molecular se indican en kb.

Los resultados de ambas aproximaciones indicaban una posible ausencia de proteínas homólogas en humanos, por lo que se mantenía el interés por la proteína Ypl007cp como posible diana antifúngica.

### 12.1.3. Análisis de la secuencia

Para obtener información acerca de la proteína Ypl007cp se realizó un análisis de su secuencia peptídica, tratando de encontrar regiones correspondientes a dominios conservados y comunes con otras proteínas, que pudieran aportar alguna información acerca de su posible funcionalidad. Únicamente se detectó un posible dominio transmembrana (figura 31), que carecía de homología con los dominios transmembrana de otras proteínas. Así, la ausencia de similitud de la secuencia Ypl007cp con algún dominio conservado o característico de alguna familia de proteínas, no permitió obtener datos orientativos acerca de su actividad o de su función en *S. cerevisiae*.

Por otro lado, se realizó un estudio detallado de la fase abierta de lectura del gen *YPL007C* mediante la búsqueda de secuencias similares en la base de datos PROSITE (Bairoch, 1991). De este modo fue posible identificar diversas regiones que habían sido previamente descritas como zonas susceptibles de modificación enzimática. Así, como se muestra en la figura 31, se detectaron zonas de fosforilación por diversas quinasas, como son la proteína quinasa C, la caseína quinasa II, tirosín quinasas, y quinasas dependientes de

cAMP y cGMP. Además, se identificaron posibles zonas de N-glicosilación y miristoilización.

También se llevó a cabo un análisis teórico de la región no codificante situada en el extremo 3' y 5' de la fase abierta de lectura, con el objetivo de identificar las secuencias que pudieran regular la transcripción génica y obtener de este modo alguna información acerca de la funcionalidad de la proteína Ypl007cp. Para ello, en primer lugar y de manera previa, se definió el sitio de comienzo de la transcripción con el objetivo de delimitar la secuencia promotora que debía ser analizada. Así se llevaron a cabo experimentos de extensión por cebador (*primer extension*) (figura 32), que permitieron detectar dos posibles sitios de comienzo de la transcripción (TS), cada uno con su correspondiente caja TATA (figura 31). A continuación, se trataron de identificar en la región 5' de la secuencia algunos dominios de regulación de la transcripción. De esta manera, fue posible identificar diferentes elementos que había sido implicados previamente en la regulación de diversos genes como son MAT-a1, que regula la represión de algunos genes específicos de cepas haploides (Miller *et al.*, 1985); STRE y HSE, que participan en la regulación de determinados genes en situaciones de estrés (Ruis y Schüller, 1995); UAS2, que está implicado en la expresión de genes relacionados con el metabolismo respiratorio (Dang *et al.*, 1994); CT box que es un regulador positivo de genes glicolíticos al que se une la proteína GCR1 (Tornow *et al.*, 1993); UAS<sub>NTR</sub>, que regula la represión catabólica por nitrógeno de diferentes genes (Coffman *et al.*, 1994); y MCB que es una secuencia responsable de la expresión temporal en G1/S de algunos genes (Aldea *et al.*, 1994). La localización de todas estas regiones se señala también en la figura 31.

#### 13.1.4. Regulación transcripcional del gen *YPL007C*.

La información obtenida del análisis teórico de la región promotora mostró algunas de las posibles formas de regulación del gen *YPL007C*, que podrían orientarnos acerca de su papel en *S. cerevisiae*. Por este motivo se intentaron determinar de manera experimental las condiciones que regulaban la transcripción génica, y conocer la implicación real de las regiones previamente descritas. Para ello se llevó a cabo el estudio comparativo de los niveles del transcrito de *YPL007C* en células de *S. cerevisiae* mediante hibridación RNA-DNA (*Northern blot*), tratando de identificar posibles variaciones en los niveles de mRNA dependiendo de:

- Distintas etapas del ciclo celular vegetativo: Se analizaron muestras de un cultivo sincronizado de la cepa termosensible *S. cerevisiae* CDC15 en cada una de las etapas del ciclo celular vegetativo (figura 33).
- Haplotipo celular: Se analizó el nivel de transcrito en cepas haploides tipo a (TD28 y SEY611), y tipo  $\alpha$  (SEY610 y S288C), y en cepas diploides (SEY611/SEY610 y SX508A/SX50110A) (figura 34 panel 1).
- Fase de crecimiento: Se analizaron muestras de un cultivo de la cepa TD28 en diferentes momentos de su fase exponencial y estacionaria (figura 34 panel 2).
- Fuente de carbono metabolizada: Se analizaron muestras de un cultivo en fase exponencial de la cepa TD28 creciendo en diferentes fuentes de carbono: glucosa, galactosa, glicerol y acetato potásico (figura 34 panel 3).

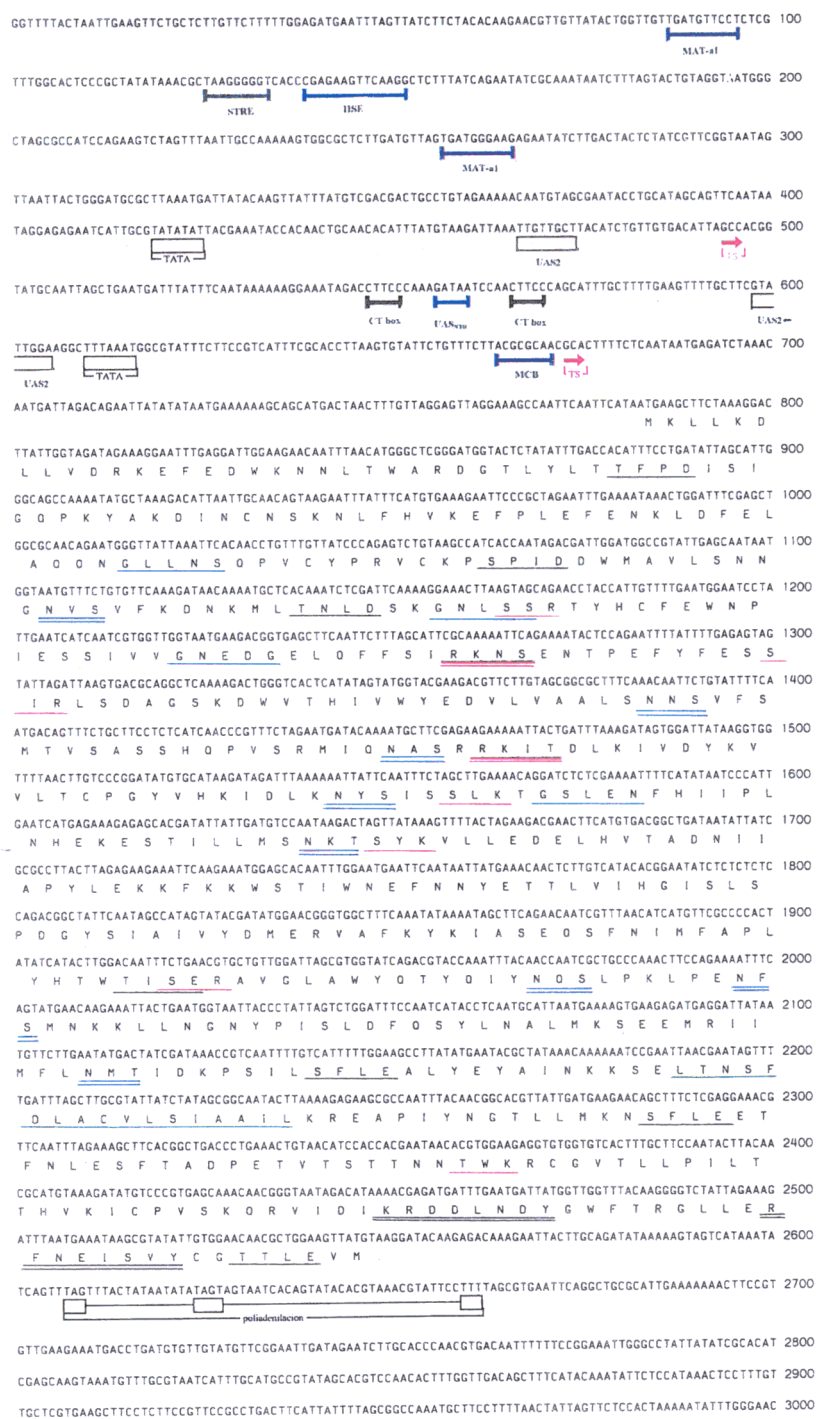


Figura 31: Secuencia del gen *YPL007C*. La secuencia nucleotídica de la región 5' no codificante posee dos posibles cajas TATA a -172 y -363, indicadas en la figura, así como los dos potenciales sitios de iniciación de la transcripción (TS). También se muestran otros posibles elementos de regulación: MAT-a1, STRE, HSE, UAS2, CT box, UAS<sub>NTR</sub>, y MCB. En la región 3' se resalta la posible señal de terminación de la transcripción/poliadenilación. La secuencia de aminoácidos se muestra en código de una letra. Las potenciales zonas de modificación postraduccional aparecen subrayadas, mostrándose zonas de fosforilación por diversas quinasas, como son la proteína quinasa C (→), la caseína quinasa II (⇐), tirosina quinasas (⇌), y quinasas dependientes de cAMP (⇔) y cGMP (⇔), así como las posibles zonas de N-glicosilación (⇐) y miristoilización (⇐). Además se resalta un potencial segmento transmembrana (⇐).

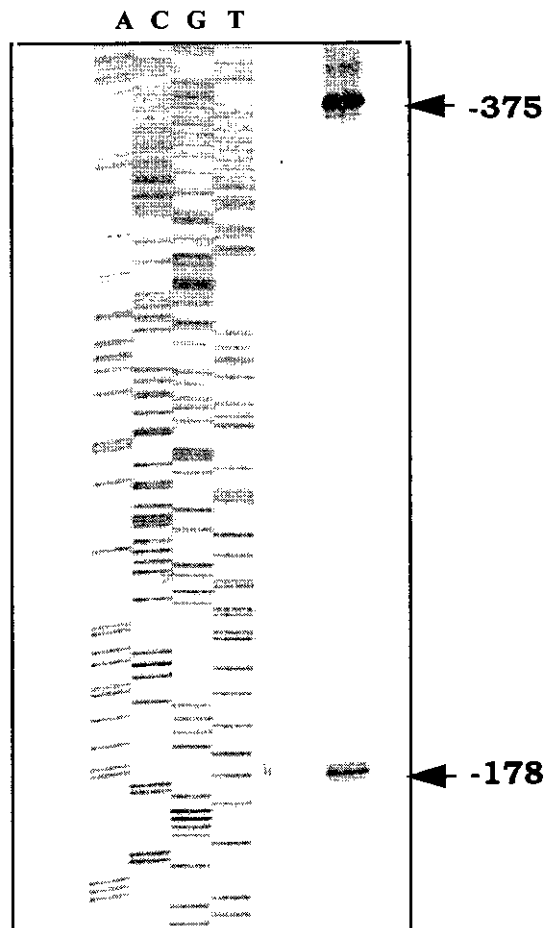


Figura 32: Determinación del sitio de comienzo de la transcripción del gen *YPL007C*. A la izquierda de la figura se muestra la secuencia del plásmido pUC19 realizada con el oligonucleótido Universal. A la derecha se muestra la migración de las bandas correspondientes a los dos potenciales sitios de iniciación de la transcripción. Se ha indicado la posición relativa al plásmido utilizado, como control de tamaño.

- Situaciones de estrés térmico y osmótico: Se analizaron varias muestras de un cultivo en fase exponencial de la cepa TD28 creciendo en YEPD a 26°C después de ser sometidas de manera independiente a estrés térmico (37°C) (figura 34 panel 4), y a estrés osmótico (NaCl 0,5M) (figura 34 panel 5).

- Meiosis y esporulación: Se analizaron las muestras de un cultivo en fase exponencial del diploide SEY6211/SEY6210 al ser transferido a un medio pobre, deficiente en nitrógeno (figura 34 panel 6).

Un primer análisis de los resultados mostrados en la figura 33 indicó que la expresión del gen *YPL007C* era siempre detectable, y los niveles de mRNA parecían prácticamente constantes. No se apreciaron diferencias entre los niveles de mRNA durante las distintas etapas del ciclo mitótico (figura 33). Tampoco los niveles de transcrito mostraron diferencias significativas entre las células crecidas en distintas fuentes de carbono (figura 34 panel 3), entre las células diploides y haploides analizadas, ni entre las levaduras de tipo *a* y  $\alpha$  estudiadas (figura 28 panel 1). Se observó una reducción de la expresión del gen *YPL007C* a medida que el cultivo se acercaba a la fase estacionaria (figura 28 panel 2), y durante el proceso de esporulación (figura 43 panel 6). También se detectó una débil inducción en las células que habían sido sometidas a estrés térmico (figura 28 panel 4) y salino (figura 28 panel 5) durante 40 y 60 min.

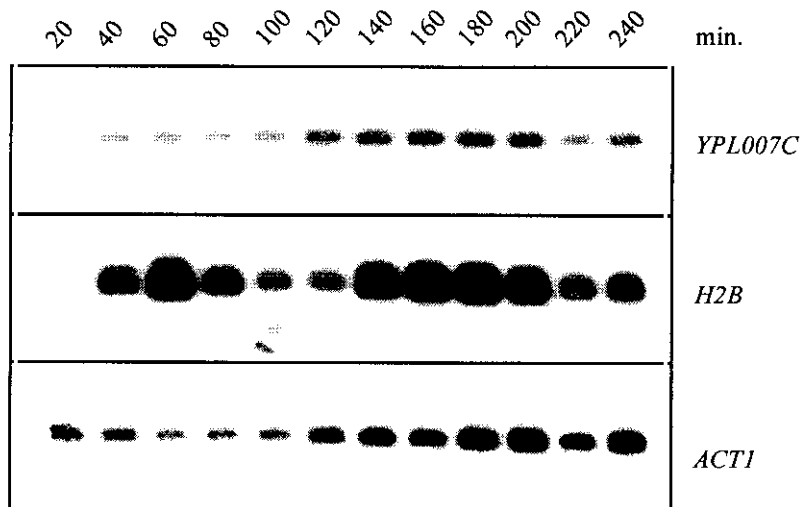


Figura 33: Análisis de los niveles de expresión del gen *YPL007C* a lo largo del ciclo celular. 1-2  $\mu$ g de mRNA fueron extraídos a partir de las muestras tomadas cada 20 minutos de un cultivo de la cepa CDC15 previamente sincronizado en anafase a 37°C y liberado del bloqueo a 24°C. El mRNA fue sometido a una electroforesis en un gel desnaturalizante de agarosa-formaldehído al 1% y transferido a una membrana de nylon. La membrana fue hibridada sucesivamente con las sondas radioactivas correspondientes al gen *YPL007C*, al gen control de la actina *ACT1* y al gen de la histona *H2B* como marcador del progreso a lo largo del ciclo celular.

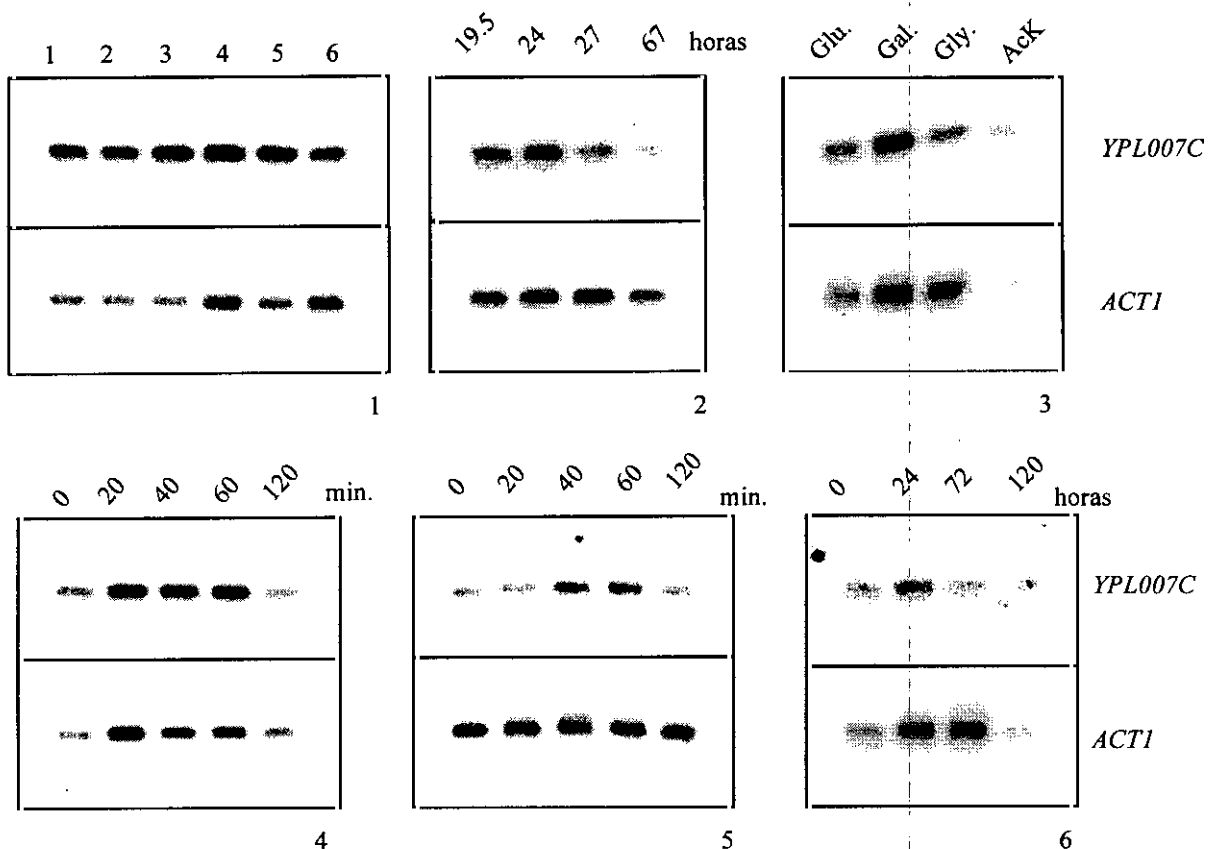


Figura 34: Análisis de los niveles de expresión del gen *YPL007C*. 1-2  $\mu$ g del mRNA fueron extraídos a partir de diferentes cepas de *S. cerevisiae* en diversas condiciones de cultivo y sometidos a una electroforesis en un gel desnaturalizante de agarosa-formaldehído al 1% antes de ser transferidos a una membrana de nylon. La membrana fue hibridada sucesivamente con las sondas radioactivas correspondientes al gen *YPL007C* y al gen control *ACT1*. Los tiempos de exposición oscilaron entre 16-24 horas para el gen *YPL007C*, utilizando una película de alta sensibilidad y pantalla intensificadora, y de 1-2 horas para el gen *ACT1*. **Panel 1:** mRNA procedente de cultivos en fase exponencial en YEPD a 26°C de las cepas haploides a: TD28(1) y SEY612 (2),  $\alpha$ :SEY610(3) y S288C (4), y de los diploides SEY611/SEY610 (5) y SX508A/SX50110A (6). **Panel 2:** mRNA procedente de un cultivo de la cepa TD28 en YEPD a 26°C tomado a las 19,5, 24, 27 y 67 horas, correspondientes a las fases exponencial y estacionaria (ver figura 45). **Panel 3:** mRNA procedente de un cultivo en fase exponencial de la cepa TD28 creciendo en medio rico con diferentes fuentes de carbono: glucosa (Glu), galactosa (Gal), glicerol (Gly) y acetato potásico (AcK). **Panel 4:** mRNA procedente de un cultivo en fase exponencial de TD28 en YEPD a 26°C tras ser sometido a un estrés térmico de 37°C. Las muestras fueron tomadas a los 0, 20, 40, 60 y 120 minutos del cambio de temperatura. **Panel 5:** mRNA procedente de un cultivo en fase exponencial de TD28 en YEPD a 26°C tras ser sometido a un estrés osmótico de 0,5M de NaCl. Las muestras se tomaron a los 0, 20, 40, 60 y 120 minutos del aumento de la salinidad. **Panel 6:** mRNA procedente de un cultivo en fase exponencial del diploide SEY6211/SEY6210 tras ser transferido al medio ME para inducir su esporulación. Las muestras se tomaron a las 0, 24, 72 y 120 horas del cambio de medio.

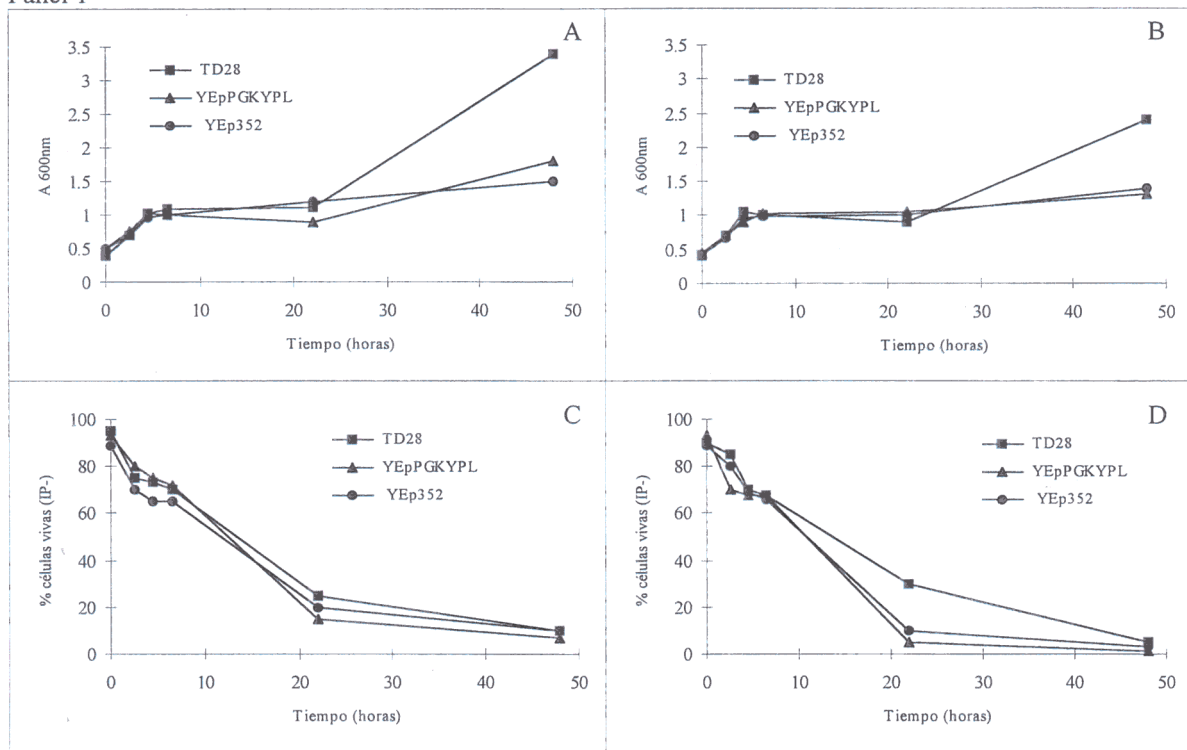
### 13.1.5. Efecto de alteraciones en el nivel de expresión del gen *YPL007C*

Tras observar que el gen *YPL007C* poseía unos niveles de expresión bastante constantes, se estudió si modificaciones provocadas en sus niveles de expresión, bien mediante una sobreexpresión o una delección en uno de los dos alelos del diploide, originaban algún efecto sobre el crecimiento y/o la morfología celular.

Para sobreexpresar el gen *YPL007C* se clonó su fase abierta de lectura en el vector episómico YEp352 bajo el control del promotor PGK, generando el plásmido YEpPGKYPL (tabla 6). Esta construcción fue utilizada para transformar la cepa de *S. cerevisiae* TD28, así como la cepa mutante MJ103, obteniendo los transformantes correspondientes. Una vez confirmado que la construcción complementaba el fenotipo termosensible del mutante, y por lo tanto era funcional, se pasó al estudio de los clones TD28 transformantes. Tres clones fueron caracterizados fenotípicamente en el medio MDA determinando su crecimiento, morfología y viabilidad a 26 y 37°C. Los resultados obtenidos fueron comparados con los procedentes del estudio en paralelo de la cepa control TD28YEp352, transformada únicamente con el vector YEp352, y la cepa silvestre TD28. Como se indica en la figura 35 no se detectaron diferencias importantes en el comportamiento de las cepas analizadas. Este resultado mostró que la sobreexpresión del gen *YPL007C* en las condiciones ensayadas, no presentaba efectos tóxicos apreciables, ya que no originaba alteraciones detectables de ninguna de las características fenotípicas analizadas.

Con la intención de conocer si la disminución de los niveles proteicos de Ypl007cp provocaba alteraciones fácilmente detectables *in vitro*, se realizó un estudio fenotípico de tres clones de cada cepa diploide SX508A/SX50110A *YPL007C::URA3* y SEY610/SEY611 *YPL007C::URA3*, que poseían un alelo del gen *YPL007C* interrumpido. Su comportamiento en YEPD y MDA a 26 y a 37°C fue comparado con el de sus correspondientes diploides silvestres cultivados en las mismas condiciones, excepto el MDA que estaba suplementado con el uracilo necesario para permitir su crecimiento. Los cultivos se incubaron durante 50 horas y se analizaron sus características morfológicas, su crecimiento y su viabilidad. También se cuantificó el DNA de la población en crecimiento mediante citometría de flujo. Todos los clones Ura<sup>+</sup> caracterizados mostraron un comportamiento similar, y en ningún caso fue posible identificar diferencias significativas con sus correspondientes diploides silvestres, en ninguna de las condiciones analizadas (figura 36). La presencia del gen *URA3* en los diploides interrumpidos podría ser la responsable de que estas cepas mostraran mayor crecimiento en YEPD a partir de las 10 horas de incubación.

## Panel 1



## Panel 2

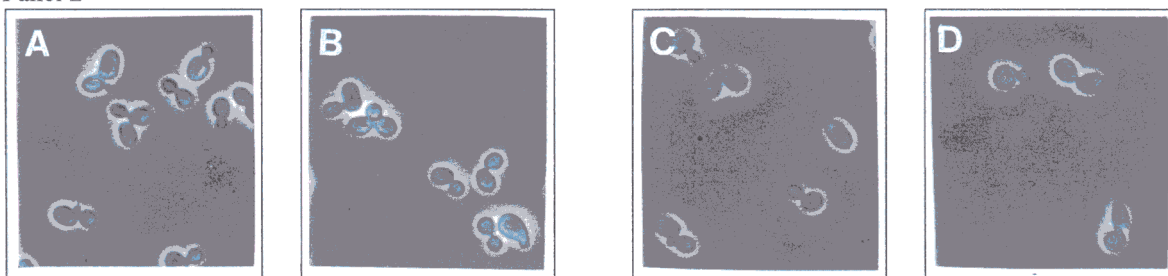
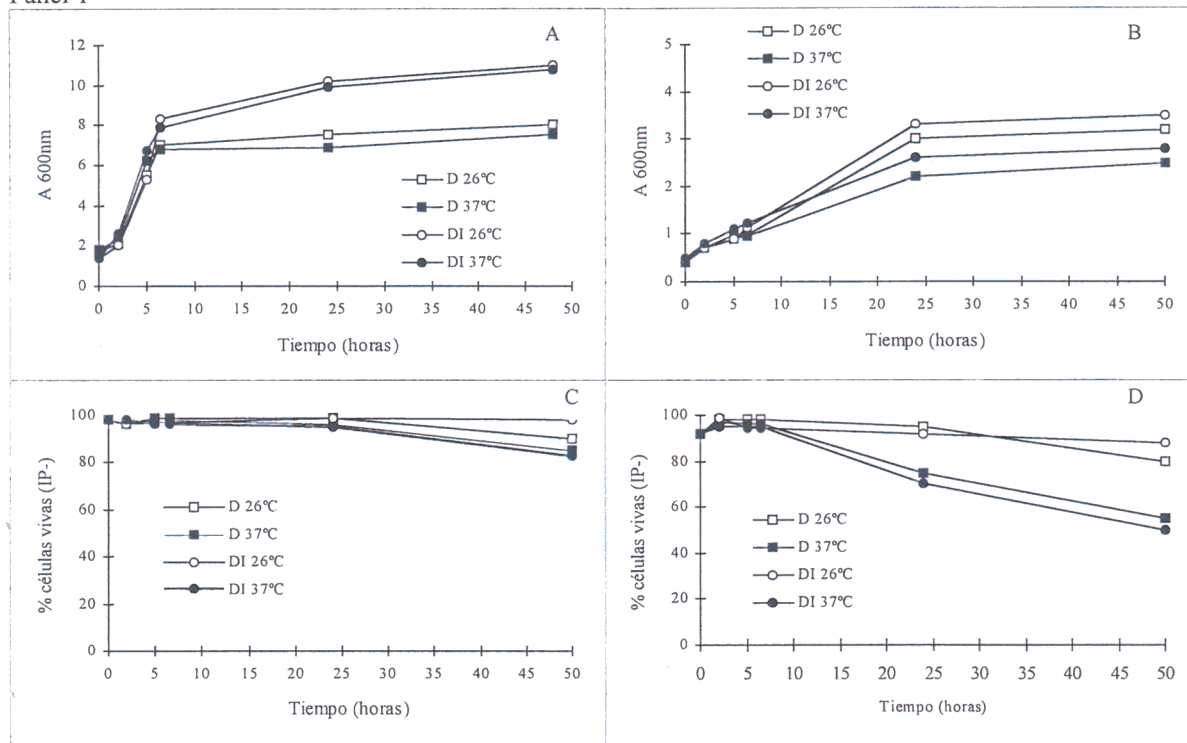


Figura 35. Comportamiento y morfología de la cepa TD28 transformada con YEpPGKYPL, de la cepa TD28 transformada con el vector YEp352 y de la cepa silvestre TD28, en el medio líquido MDA a 26 y a 37°C. **Panel 1:** (A) Crecimiento en MDA a 26°C. (B) Crecimiento en MDA a 37°C. (C) Viabilidad en MDA a 26°C. (D) Viabilidad en el MDA a 37°C. El medio de cultivo de la cepa TD28 estaba suplementado con uracilo. El crecimiento fue determinado por la absorbancia a 600 nm de diferentes alícuotas tomadas a lo largo del ensayo. La viabilidad fue calculada mediante tinción con yoduro de propidio. Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes. **Panel 2:** (A) TD28 transformado con YEpPGKYPL a 26°C. (B) TD28 transformado con YEpPGKYPL a 37°C. (C) TD28 transformado con YEp352 a 26°C. (D) TD28 transformado con YEp352 a 37°C. La figura muestra la morfología celular tras 6 horas de incubación, visualizada en un microscopio de contraste de fases a 400X.

Panel 1



Panel 2

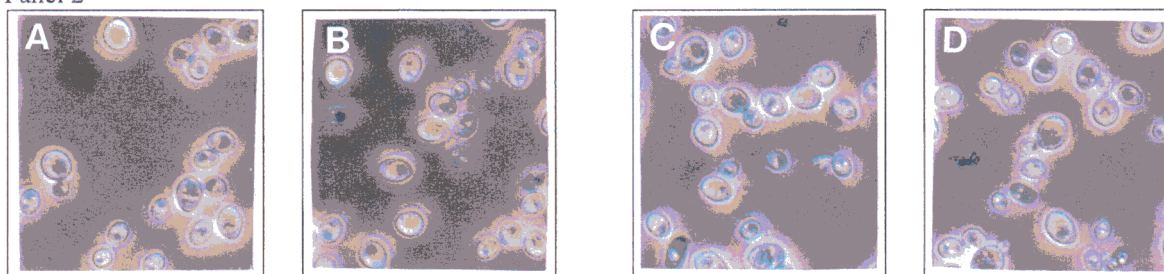


Figura 36. Comportamiento y morfología de la cepa diploide interrumpida SEY610/SEY611 *YPL007C::URA3* y de la silvestre SEY610/SEY611 en los medios líquidos YEPD y medio MDA, a 26 y a 37°C. **Panel 1:** (A) Crecimiento en YEPD. (B) Crecimiento en medio MDA. (C) Viabilidad en YEPD. (D) Viabilidad en el medio MDA. Las cepas diploides SEY610/SEY611 *YPL007C::URA3* (DI), y silvestre SEY610/SEY611 (D), fueron crecidas en matraces con medio de cultivo líquido YEPD y medio MDA, a 26 y a 37°C. El crecimiento fue determinado por la absorbancia a 600 nm de las diferentes alícuotas tomadas a lo largo del ensayo. La viabilidad fue calculada mediante tinción con yoduro de propidio. **Panel 2:** (A) DI en YEPD a 26°C. (B) DI en YEPD a 37°C. (C) D en YEPD a 26°C. (D) D en YEPD a 37°C. La figura muestra la morfología celular tras 24 horas de incubación, visualizada en un microscopio de contraste de fases a 400X.

### 13.1.6. Inmunolocalización de la proteína de fusión C-LYTA-Ypl007cp mediante microscopía confocal.

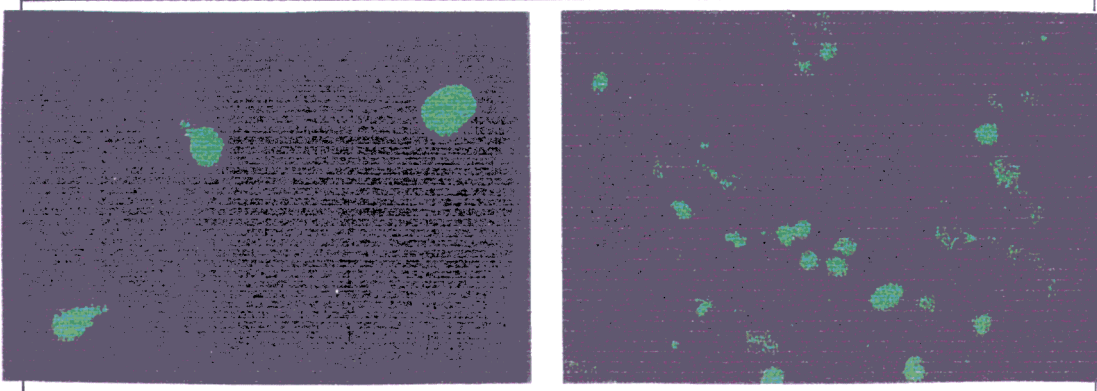
Para intentar obtener más información sobre la funcionalidad de la proteína Ypl007cp, se realizaron estudios orientados a determinar su localización celular. Al carecer de anticuerpos frente a esta proteína, se decidió construir una proteína de fusión con Ycp007cp y el dominio C-LYTA procedente de la enzima N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa de *S. pneumoniae* (Sánchez-Puelles *et al.*, 1992), frente al que sí se disponían de anticuerpos policlonales. Por otra parte, y como consecuencia de los bajos niveles de expresión del gen *YPL007C*, previamente determinados mediante la técnica de *Northern blot* (figuras 33 y 34) y *Western blot* (figura 59), se decidió hiperexpresar la fusión génica para asegurar de este modo la obtención de una señal detectable. La hiperexpresión se realizó mediante la utilización de un plásmido episómico YEpPGKCYPL (tabla 6), en el que el dominio ClytA estaba fusionado al extremo 5' del gen *YPL007C*, y cuya expresión estaba regulada por el promotor constitutivo PGK.

En primer lugar, se comprobó la funcionalidad de la proteína de fusión mediante un ensayo de complementación fenotípica, en el cual se transformó la cepa mutante MJ103 con los plásmidos YEpPGKCYPL y YEpPGKYPL (tabla 6). En ambos casos se consiguió complementar el fenotipo termosensible del mutante, lo que confirmó que la proteína de fusión C-LYTA-Ypl007cp se localizaba, al menos, en el lugar donde se encuentra la proteína Ypl007cp nativa.

A continuación, se realizaron los ensayos de inmunolocalización en las cepas de *S. cerevisiae* TD28 que hiperexpresaban la fusión génica. Las cepas controles utilizadas en este estudio fueron los clones de la cepa TD28 transformados con el plásmido YEpPGKC (tabla 6) que hiperexpresaban el dominio ClytA, control positivo, y los transformados con el plásmido YEpPGKYPL (tabla 6) que hiperexpresaban la proteína Ypl007cp, control negativo. Se analizaron los niveles de expresión de diferentes clones mediante la técnica de *Western blot*, sin observar diferencias significativas entre ellos, por lo que la selección de los clones para los ensayos de inmunolocalización se realizó al azar. Las células fueron procesadas del modo adecuado (ver materiales y métodos) para llevar a cabo una inmunofluorescencia indirecta con un primer anticuerpo policlonal frente al dominio C-LYTA, y un segundo anticuerpo monoclonal marcado con el fluorocromo Cy-3.

Los resultados obtenidos mostraron una señal fluorescente similar en los clones que hiperexpresaban la fusión génica y los que hiperexpresaban el dominio ClytA (figura 37 panel 1), observándose una ausencia de señal en los controles negativos. La proteína de fusión parecía estar distribuida por toda la célula, según mostró el estudio de diferentes secciones transversales de las células (figura 37 panel 2). No puede eliminarse la posibilidad de que la proteína de fusión se encuentre distribuida de modo inespecífico por algunos lugares donde habitualmente no se localiza, ya que se que presenta en unos niveles superiores a los normales. Sin embargo, la capacidad de complementar el fenotipo termosensible del mutante demuestra que, al menos, está presente en el lugar adecuado para llevar a cabo su función celular.

Panel 1



Panel 2

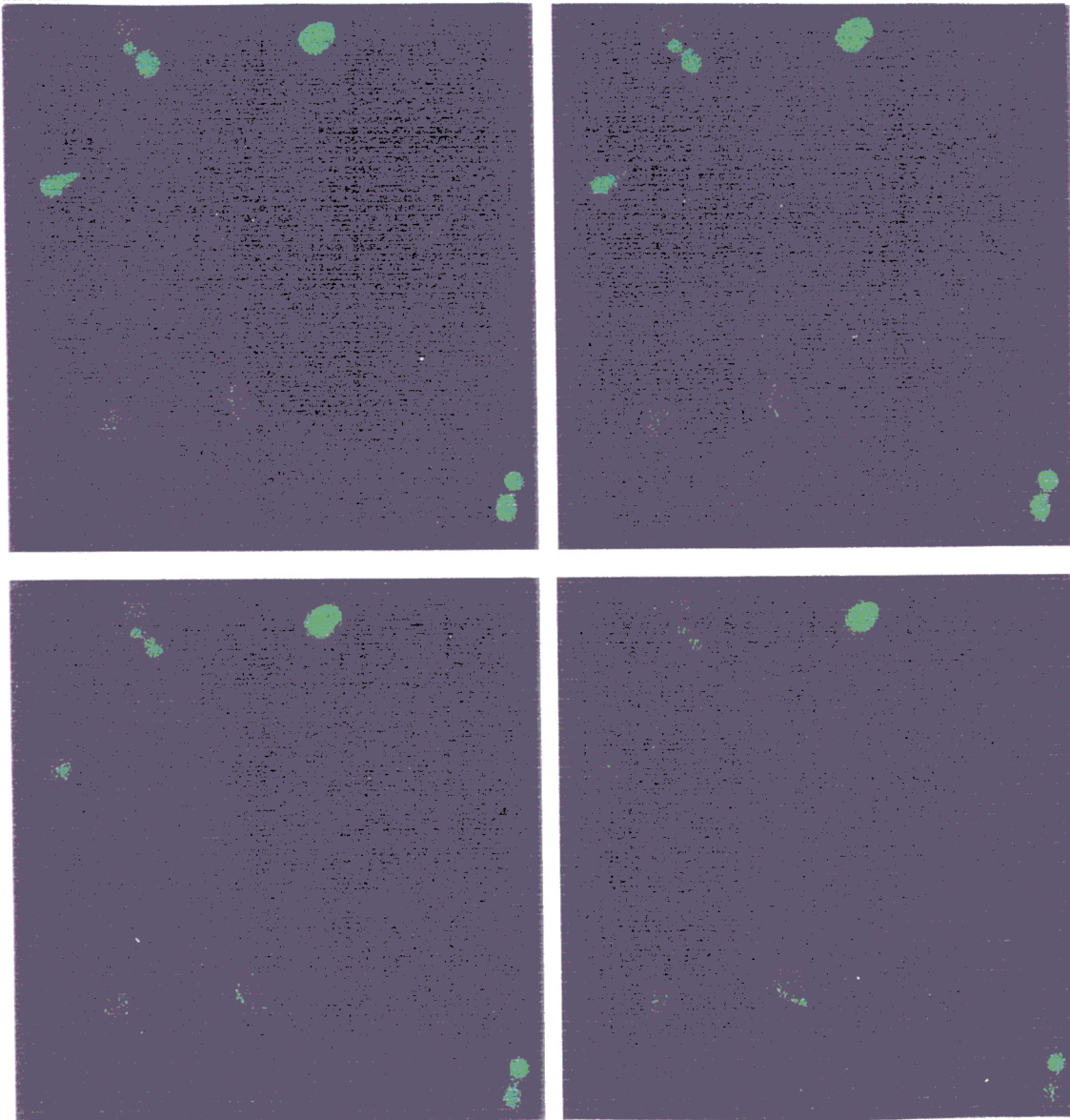


Figura 37. Inmunolocalización de la proteína de fusión CLYTA-Ypl007cp mediante microscopía confocal. Panel 1: (A) Células de *S. cerevisiae* transformadas con el plásmido YEpPGKCYPL. (B) Células de *S. cerevisiae* transformadas con el plásmido YEpPGKC (control positivo). Las células en crecimiento exponencial a 26°C en el medio líquido YEPD, fueron fijadas, tratadas con un primer anticuerpo policlonal frente al dominio CLYTA, y un segundo anticuerpo monoclonal marcado con el fluorocromo Cy-3. La fluorescencia total emitida fue detectada mediante microscopía confocal. Panel 2: Cuatro secciones diferentes de las células transformadas con YEpPGKCYPL.

### 13.1.7. Búsqueda de interacciones con otras proteínas mediante el “sistema dos híbridos”

La identificación de proteínas que fueran capaces de interactuar con la Ypl007cp podía aportar información acerca de la funcionalidad de la proteína en estudio. Para llevar a cabo esta identificación se utilizó el “sistema dos híbridos”, que ha sido comentado con anterioridad.

En primer lugar, se clonó el marco abierto de lectura del gen *YPL007C* en el vector pAS2-1 (tabla 5), que codifica para el dominio de unión a DNA (GBD4) del activador transcripcional GAL4. Se transformaron las cepas comerciales de *S. cerevisiae* Y190 y CG-1945 (tabla 3) y se analizó el comportamiento de los clones obtenidos en el ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados mostraron que la proteína de fusión GBD4-Ypl007cp no presentaba capacidad de activación transcripcional inespecífica, y por lo tanto, se podían continuar los estudios de búsqueda de interacciones con otras proteínas. Tras seleccionar un clon de cada cepa, se transformaron con una librería genómica de *S. cerevisiae* que utiliza un vector que lleva clonado el dominio de activación transcripcional (GAD4). La primera etapa de selección permitió recuperar un elevado número de clones His<sup>+</sup> a los que se analizó su actividad  $\beta$ -galactosidasa, utilizando como sustrato X-gal.

Aunque el proceso de transformación con la genoteca se repitió sucesivas veces, y siempre se recuperaron clones His<sup>+</sup>, no fue posible identificar alguno de ellos que mostrara también actividad  $\beta$ -galactosidasa.

El resultado obtenido no permite descartar la existencia de proteínas que interactúen con Ypl007cp, ya que la ausencia de actividad  $\beta$ -galactosidasa en todos los clones estudiados, podría ser debida a alguna de las limitaciones del sistema de los dos híbridos, que sólo permite identificar interacciones proteicas relativamente estables ocurridas a nivel del núcleo.

## 13.2. Estudio funcional mediante la caracterización del mutante TD28mj103

Los resultados obtenidos en los ensayos comentados con anterioridad no aportaban información suficiente para poder atribuir a la proteína Ypl007cp una función. Por este motivo se adoptó una nueva estrategia que permitiera obtener información sobre los procesos en los que la proteína podría estar implicada, que consistía en el estudio de las características diferenciales de un mutante alterado en el gen *YPL007C* y la cepa silvestre. El mutante MJ103 poseía un fenotipo termosensible complementado por el gen *YPL007C*, por lo que probablemente poseía una alteración en este gen. Sin embargo no podía eliminarse la posibilidad de que también existieran mutaciones en otros genes que contribuyeran a generar las características fenotípicas de la cepa, por lo que era necesario obtener una cepa mutada exclusivamente en el gen *YPL007C*, que permitieran asegurar que las modificaciones de su fenotipo eran debidas a esta mutación.

### 13.2.1. Obtención del mutante TD28mj103

En primer lugar, se procedió a la identificación de la mutación en el gen *YPL007C* de la cepa termosensible MJ103 obtenida a partir de la cepa S288C mediante mutación con luz UV. Para ello se amplificó este gen mediante PCR, utilizando como molde el DNA genómico del mutante MJ103. El *YPL007C* se clonó en el vector pBluescript, generando el

plásmido pBLypl (tabla 6), y se secuenció el gen en tres clones procedentes de tres amplificaciones diferentes, por las dos cadenas. Así se pudo identificar una transversión A→T en el nucleótido 442 de la fase de lectura abierta, que originaba un cambio en el aminoácido 148 de asparragina (N) por tirosina (Y). Este cambio N148Y entre aminoácidos que carecen de carga a pH neutro, parecía ser el responsable del fenotipo termosensible del mutante MJ103. Esta mutación podría tener una repercusión estructural significativa, sobre todo a 37°C, como se deduce de la predicción de estructura secundaria de la zona donde se localiza (figura 38). La sustitución de N por Y parece provocar un cambio estructural en la región donde se localiza dicho residuo, que pasa de estar en una zona poco estructurada a localizarse en una estructura tipo  $\beta$ .

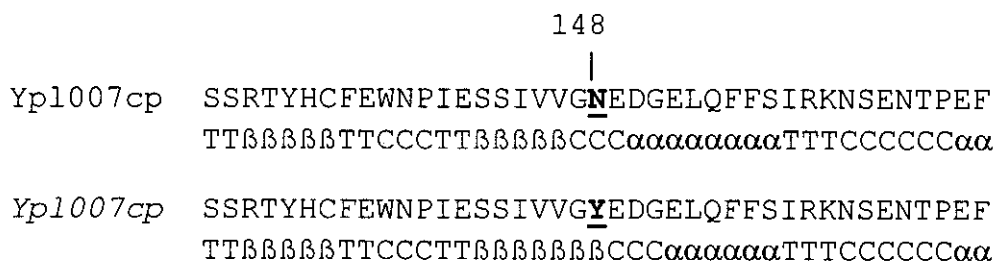


Figura 10: Predicción de estructura secundaria de las proteínas *Yp1007cp* nativa e *Yp1007cp* mutante.  $\alpha$ , hélice alfa;  $\beta$ , estructura beta; t., giro beta ; c, estructura no ordenada. Se indica la posición del residuo mutado.

A continuación se procedió a la obtención de un mutante que poseyera la mutación identificada previamente, mediante una técnica de recombinación genética. La cepa de *S. cerevisiae* elegida para ser mutagenizada fue la TD28 (tabla 3). En esta cepa se introdujo la mutación puntual A442T, generando el mutante TD28mj103 mediante recombinación homóloga (figura 39) (Scherer y Davies, 1979). Se confirmó el fenotipo termosensible de los clones recuperados tanto en medio sólido como en medio líquido, así como la capacidad del gen *YPL007C* para complementar su fenotipo termosensible. El clon transformante mostró un crecimiento, una viabilidad, y una morfología similar a la del silvestre (tabla 20). Asimismo, y como se indica más adelante en la figura 40, la distribución de la población según su contenido en DNA del transformante también fue parecida a la de la cepa control. Por último, la secuenciación del gen *yp1007c* verificó la presencia de la mutación A442T y por lo tanto, se confirmó que esta mutación era la causante del fenotipo termosensible del mutante original MJ103.

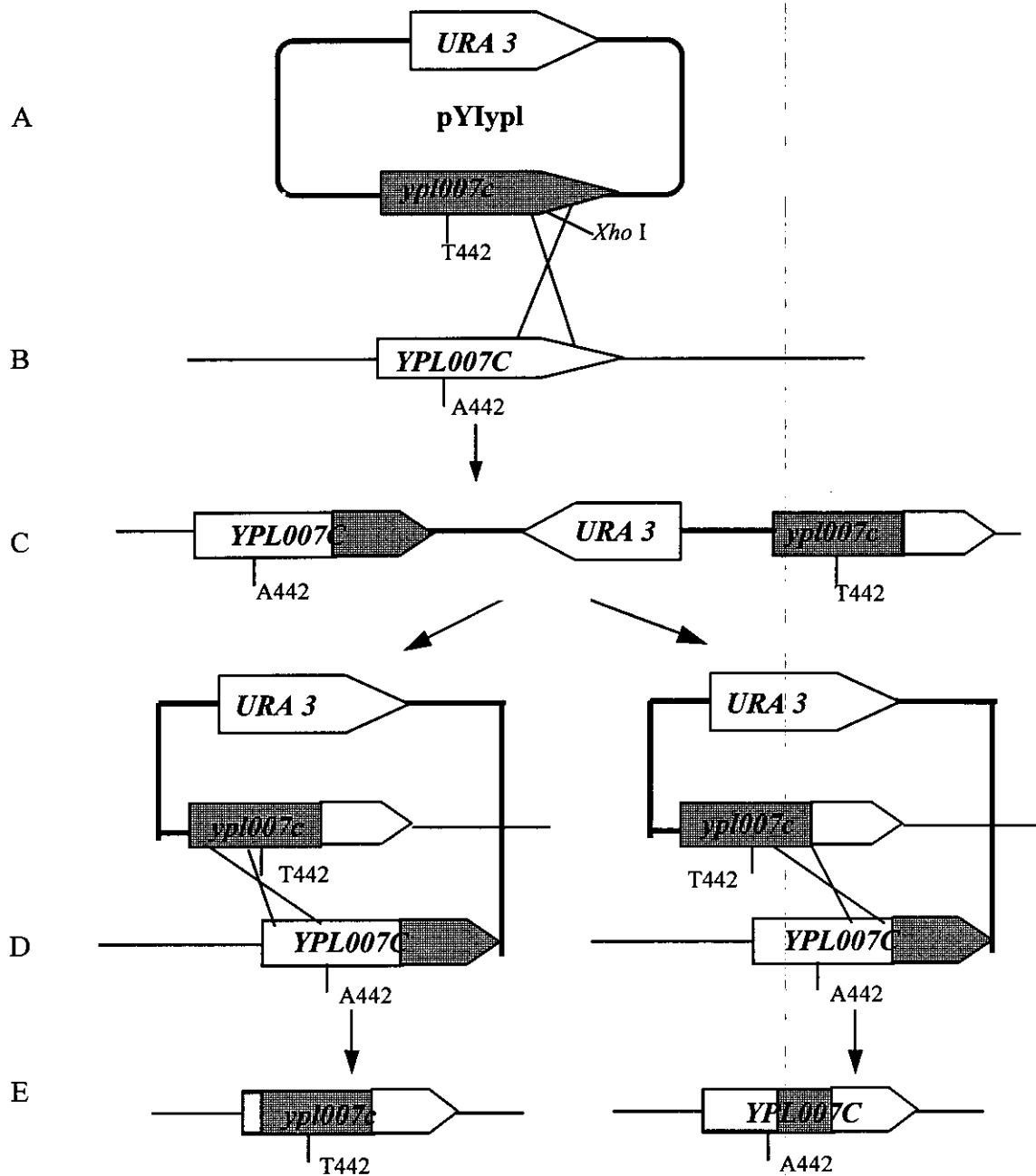


Figura 39: Reemplazamiento génico del alelo silvestre *YPL007C* por el alelo mutado *ypl007c*. (A) El alelo mutado *ypl007c* fue clonado en el vector integrativo YIp5 generando el plásmido YIpyl con *URA3* como marcador de selección. (B) La cepa silvestre de *S. cerevisiae* TD28, fue transformada con esta construcción, previamente digerida con *Xho*I, para facilitar la recombinación homóloga entre el alelo silvestre y el mutado. (C) Como resultado de la recombinación, el YIpyl se integró en el genoma, permitiendo la presencia conjunta de *YPL007C* e *ypl007c* en los clones *Ura*<sup>+</sup>. (D) La recombinación entre las zonas homólogas de los genes dió lugar a la pérdida del marcador *URA3* junto con uno de los dos genes *YPL007C* o *ypl007c*. (E) Tres cepas *Ura*<sup>-</sup> termosensibles fueron secuenciadas para verificar la presencia de la mutación A442T en el gen *ypl007c*.

Tabla 20: Estudio comparativo del comportamiento en medio líquido del mutante TD28mj103, del transformante T-TD28mj103 y de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* TD28.

CEPAS	YEPD 26°C			YEPD 37°C		
	Crecimiento	Viabilidad (%)	Morfología	Crecimiento	Viabilidad (%)	Morfología
TD28mj103	+++	95/90	R	-	70/40	R
T-TD28mj103	+++	99/98	S	+++	90/85	S
TD28	+++	95/90	S	+++	85/70	S

El clon T-TD28mj103 procedía de la transformación del mutante TD28mj103 con el plásmido p103.1, que había sido obtenido a partir del clon T103.1 como se ha comentado con anterioridad. El crecimiento en el medio líquido YEPD fue estudiado durante 48 horas mediante la determinación de la absorbancia a 600 nm. El signo +++ significa que los valores obtenidos a las 24 horas de incubación fueron similares a los de la cepa silvestre. El signo - indica ausencia de crecimiento. Los valores de viabilidad fueron calculados mediante tinción con yoduro de propidio tras 24/48 horas de incubación. La morfología fue analizada mediante microscopía óptica y se indica como S en el caso de no mostrar diferencias significativas con la cepa TD28, y como R en el caso de mostrar una morfología más redondeada. Los valores de crecimiento a 26 y a 37°C están referidos a los valores de crecimiento de la cepa S288C en las mismas condiciones.

### 13.2.2. Caracterización fisiológica del mutante

Con la finalidad de averiguar el papel fisiológico de la proteína Ypl007cp en *S. cerevisiae*, se realizaron diversos estudios de caracterización fenotípica del mutante TD28mj103.

#### 13.2.2.1. Estudio del fenotipo termosensible

Se analizaron las características fenotípicas del mutante TD28mj103, estudiando su crecimiento, viabilidad, contenido en DNA y morfología en medio líquido YEPD en condiciones permisivas (26°C) y restrictivas (37°C). Los resultados obtenidos fueron comparados con los procedentes del estudio en paralelo de la cepa control TD28. Los matraces con medio YEPD fueron inoculados con cultivos en fase exponencial en YEPD a 26°C, de modo que su absorbancia a 600 nm fuera de 0,1 y se incubaron durante 24 horas a 26 y a 37°C. El estudio de las diversas alícuotas tomadas durante este periodo mostró una tasa de crecimiento menor del mutante TD28mj103 respecto de TD28, aunque tras 24 horas de incubación sus valores de absorbancia a 600 nm fueron similares (figura 40 panel 1). El mutante fue incapaz de proliferar a 37°C a pesar del ligero incremento de su absorbancia a 600 nm durante las primeras horas de incubación (figura 40 panel 1).

El porcentaje de células viables, calculado mediante el recuento de colonias crecidas en placas de YEPD e incubadas a 26°C fue similar al de la cepa TD28 a 26°C, pero mostró una viabilidad inferior a 37°C (figura 40 panel 1).

Se realizó el estudio del contenido en DNA mediante citometría de flujo. Esta técnica permite cuantificar la cantidad de DNA de las células durante todo el ciclo mitótico. En general, el contenido en DNA de una célula durante la fase G0/G1 se denomina n, y en las fases de síntesis, en las que dicho contenido se duplica, es 2n. Los análisis realizados mostraron que la población con un contenido n de DNA era más numerosa en la cepa mutante que en la silvestre, tanto a 26 como a 37°C, y tanto en fase

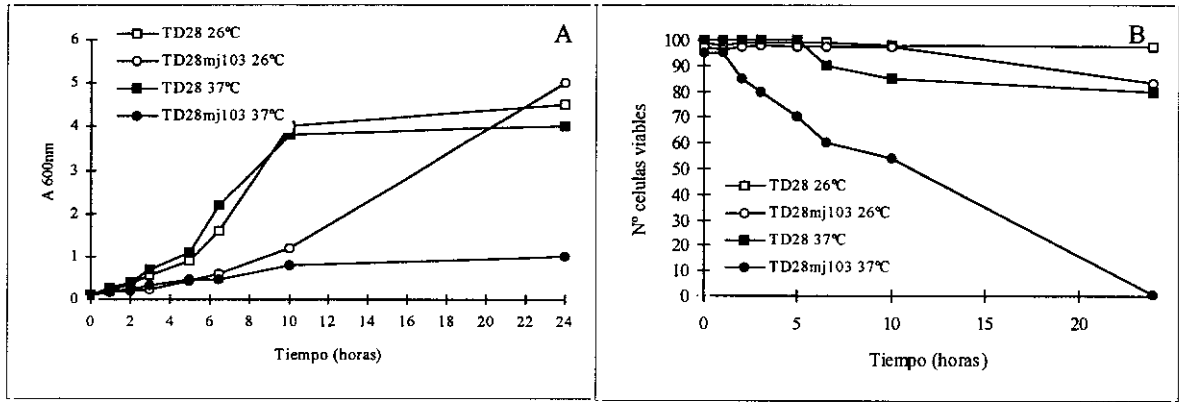
exponencial como al comienzo de la fase estacionaria (figura 40 panel 2). La cepa mutante poseía una población con contenido en DNA  $n$  similar a la  $2n$  durante su crecimiento a  $26^{\circ}\text{C}$ , aunque tras 22 horas de incubación la población  $n$  era mayoritaria. A  $37^{\circ}\text{C}$  el incremento de la población  $n$  frente a la  $2n$  se realizaba de un modo más rápido, de modo que tras 8 horas de incubación el cultivo presentaba la mayoría de las células con contenido en DNA  $n$  y su crecimiento estaba prácticamente detenido. Por el contrario, la cepa silvestre mostró una población predominante  $2n$  en todas las condiciones analizadas. Estas características del mutante sugerían que un posible alargamiento de su fase G0/G1 podría ser la causa de la disminución de su tasa de crecimiento y el incremento de la población  $n$ .

Por otra parte, el estudio morfológico de TD28mj103 mostró que las células mutantes eran más redondas que las silvestres, tanto a  $26$  como a  $37^{\circ}\text{C}$  (figura 41).

Para caracterizar con mayor detalle el comportamiento del mutante TD28mj103 observado en matraz y comprobar que era repetitivo, se realizaron ensayos similares en biorreactores con 20 litros de medio YEPD (ver materiales y métodos): La inoculación de los biorreactores se realizó con células en crecimiento exponencial en YEPD a  $26^{\circ}\text{C}$ . Las células fueron incubadas en unos casos a  $26^{\circ}\text{C}$ , y en otros se elevó la temperatura a  $37^{\circ}\text{C}$  una vez que los cultivos habían alcanzado una absorbancia a  $600\text{ nm}$  adecuada. Durante el ensayo se analizó la evolución del comportamiento de la cepa mutante y de la cepa silvestre mediante la toma de alícuotas y determinación de su absorbancia a  $600\text{ nm}$ , de su viabilidad, morfología y contenido en DNA. Los resultados obtenidos fueron similares a los de los experimentos anteriores en matraces, confirmándose así el fenotipo previamente descrito.

El análisis de las células mutantes detenidas a  $37^{\circ}\text{C}$  mostró que el 60% de éstas carecían de yema. Este resultado, junto al obtenido por citometría de flujo sobre el contenido en DNA de las células detenidas a  $37^{\circ}\text{C}$ , parecía indicar que la mutación no originaba la detención del ciclo vegetativo en un momento concreto, y por tanto *YPL007C* parecía no ser un gen responsable de la progresión del ciclo celular. Para verificar esta posibilidad, se realizaron unos ensayos con células mutantes TD28mj103 y silvestre TD28 sincronizadas por el factor alfa (ver materiales y métodos). Una vez eliminado este factor se incubaron las células a  $37^{\circ}\text{C}$ , analizando su morfología y crecimiento. Los resultados obtenidos mostraron que tras 8 horas de incubación el mutante detenía su crecimiento presentando el 60% de las células sin yema y por tanto en la etapa G0/G1, mientras que las células silvestres continuaban su crecimiento con un 5% de las células con esta característica. Este resultado indicaba que la detención celular no ocurría en todas las células en un momento determinado del ciclo.

Panel 1



Panel 2

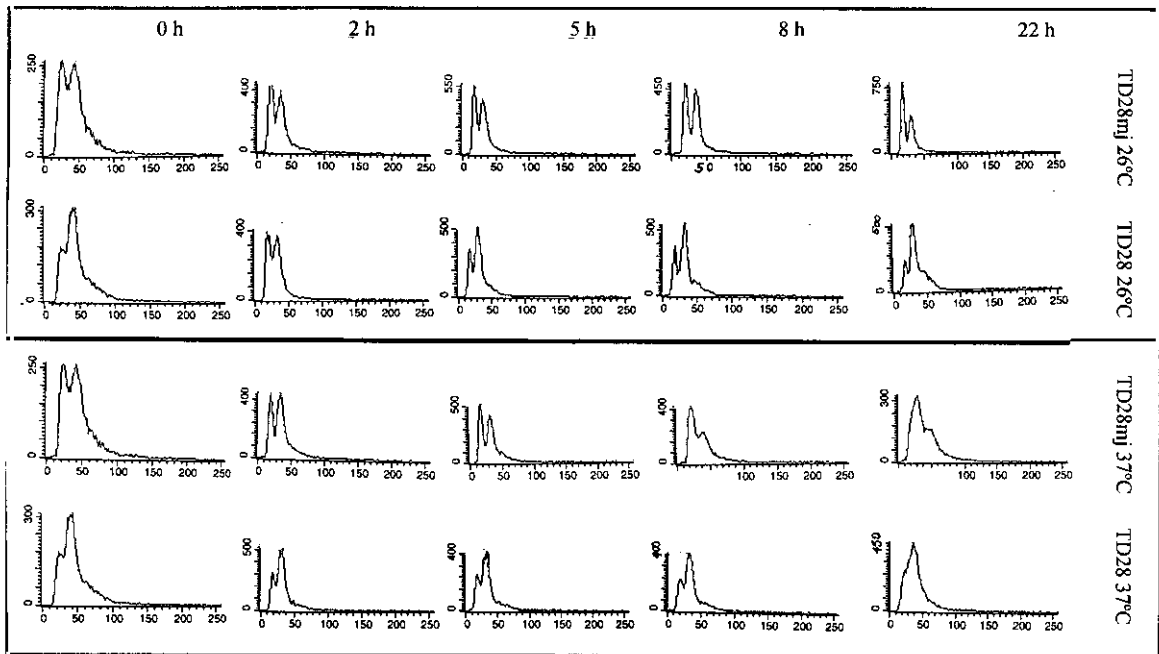


Figura 40: Comportamiento y contenido en DNA de la cepa mutante TD28mj103 y de la silvestre TD28, en el medio líquido YEPD a 26 y a 37°C. **Panel 1:** (A) Crecimiento en YEPD a 26 y a 37°C. (B) Viabilidad en YEPD a 26 y a 37°C. El crecimiento fue determinado por la absorbancia a 600 nm de diferentes alícuotas tomadas a lo largo del ensayo. La viabilidad fue calculada mediante el recuento de colonias en medio sólido YEPD a 26°C. **Panel 2:** Contenido en DNA de las células, determinado mediante citometría de flujo. El eje X representa el contenido de DNA según la señal fluorescente del yoduro de propidio, y el eje Y indica el número de células. Cada muestra está constituida por  $10^4$  células. El primer pico corresponde a la población n y el segundo pico corresponde a la población 2n.

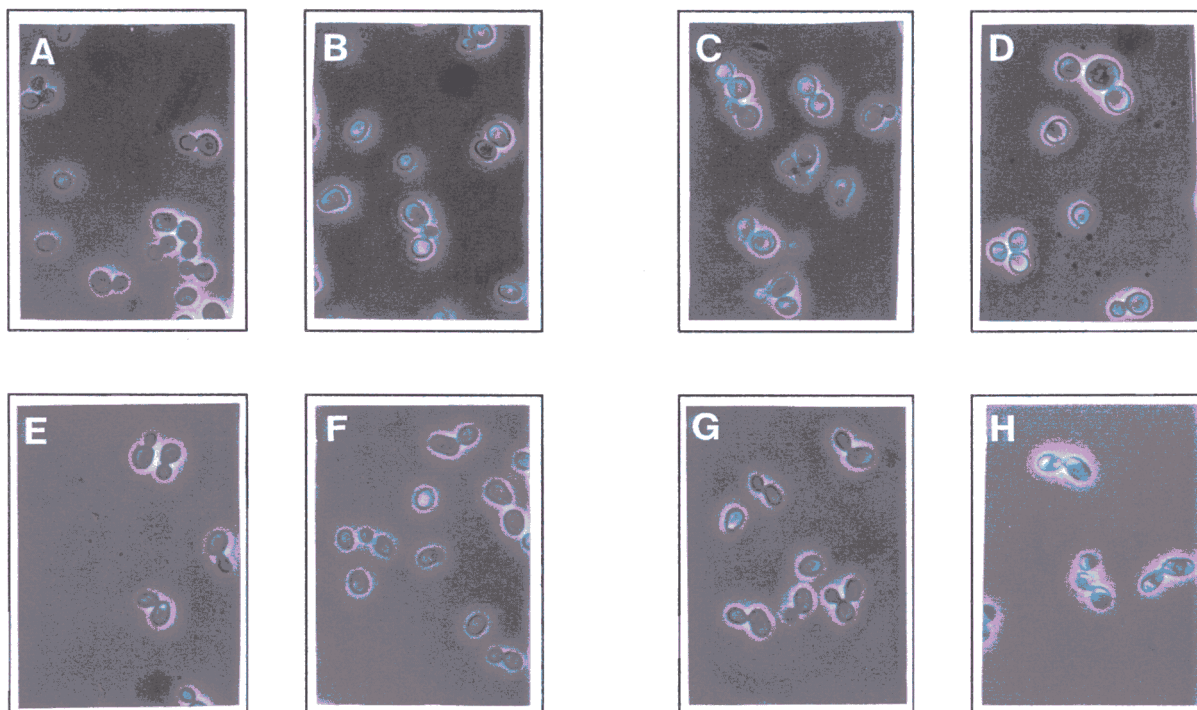


Figura 41: Morfología de la cepa mutante TD28mj103 y de la silvestre TD28, en el medio líquido YEPD a 26 y a 37°C. TD28mj103 a 26°C tras 6 horas (A) y 24 horas (B) de incubación. TD28mj103 a 37°C tras 6 horas (C) y 24 horas (D) de incubación. TD28 a 26°C tras 6 horas (E) y 24 horas (F) de incubación. TD28 a 37°C tras 6 horas (G) y 24 horas (H) de incubación. La morfología celular fue visualizada en un microscopio de contraste de fases.

Para tratar de investigar si la detención del crecimiento del mutante a 37°C podría depender de las características de cada célula, se realizó el seguimiento al microscopio óptico del comportamiento de diversas células durante 72 horas. Para ello se sembraron células mutantes TD28mj103 y silvestres TD28 sobre láminas de YEPD (ver materiales y métodos), y se incubaron a 26 y a 37°C durante 72 horas. Así fue posible detectar que ambas cepas se multiplicaban a 26°C, y aunque las células mutantes lo hacían más lentamente que la silvestre, ambas generaban colonias macroscópicas de tamaño parecido tras 72 horas de incubación. Sin embargo, a 37°C, las células mutantes mostraron un comportamiento diferente al del silvestre, y llevaron a cabo un número menor y variable de divisiones, de modo que unas no se dividían ninguna vez y otras lo hacían pocas veces generando microcolonias constituidas por 4 a 8 células (figura 42). Las células silvestres en estas condiciones fueron capaces de proliferar y dar lugar a colonias macroscópicas. Este experimento mostró que el efecto de la mutación no se manifestaba de igual manera en toda la población celular mutante, y podía depender, posiblemente, del estado fisiológico de cada célula.

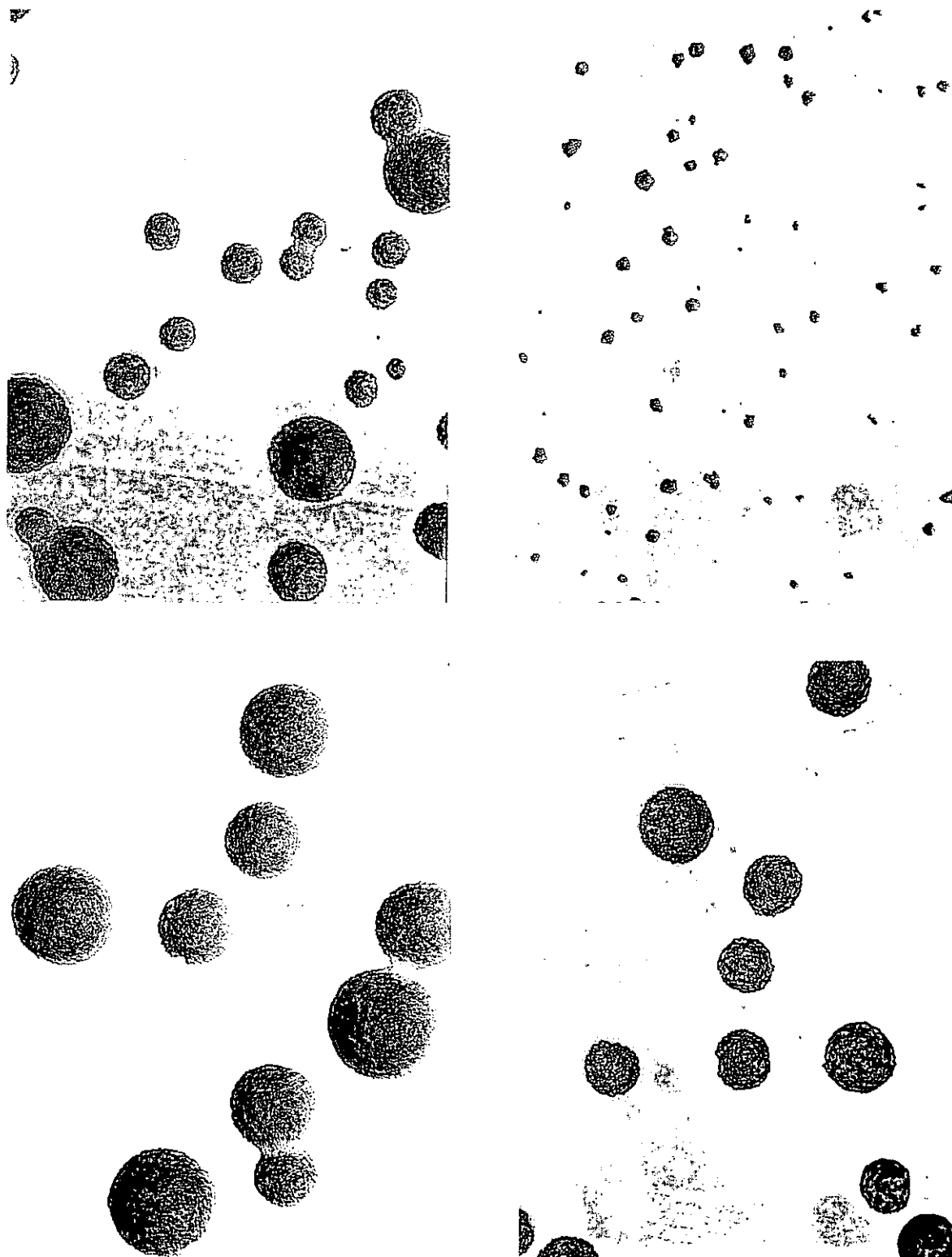


Figura 42: Crecimiento del mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre TD28 sobre láminas de agar YEPD a 26 y a 37°C. (A) TD28mj103 a 26°C. (B) TD28mj103 a 37°C. (C) TD28 a 26°C. (D) TD28 a 37°C.  $1 \times 10^2$  células procedentes de cultivos en fase exponencial en YEPD a 26°C se sembraron sobre láminas de agar YEPD y se incubaron a 26 y a 37°C durante 72 h. La evolución del cultivo fue seguida en un microscopio de contraste de fases a 400x. La fotografía muestra el aspecto de los cultivos tras 24 h de incubación.

Con el objetivo de conocer si el comportamiento termosensible del mutante variaba según la fase de crecimiento en la que se encontraba, se procedió a estudiar el fenotipo termosensible mostrado por células de TD28mj103 que se encontraban en crecimiento exponencial y en fase estacionaria. Estos estudios se realizaron de manera similar a los llevados a cabo para la caracterización del fenotipo termosensible del mutante, y que han sido explicados previamente. Los inóculos utilizados procedieron de cultivos en distintos momentos de la fase exponencial y cultivos en fase estacionaria. Los resultados de este ensayo mostraron que los cultivos a 37°C de células mutantes procedentes de la primera etapa del crecimiento exponencial eran capaces de proliferar en estas condiciones durante más tiempo que los cultivos que habían sido inoculados con células que se encontraban al final de la fase exponencial y en fase estacionaria.

Por otra parte, una vez conocido el comportamiento del mutante a 26 y a 37°C se trató de conocer su comportamiento a otras temperaturas intermedias para intentar delimitar la mínima temperatura a la que se manifestaba la mutación. Para ello se sembraron  $1 \times 10^3$  células procedentes de cultivos en fase exponencial de las cepas mutante TD28mj103 y silvestre TD28, sobre placas de Petri con medio YEPD. Las placas inoculadas fueron incubadas a 15, 24, 30, 32 y 35°C durante 120 horas, examinando su evolución cada 24 horas. Como se observa en la figura 43, la cepa mutante mostró un crecimiento similar al de la cepa silvestre a 15 y a 24°C. Su crecimiento fue inferior a 30 y a 32°C, resultando incapaz de generar colonias visibles a 35°C.

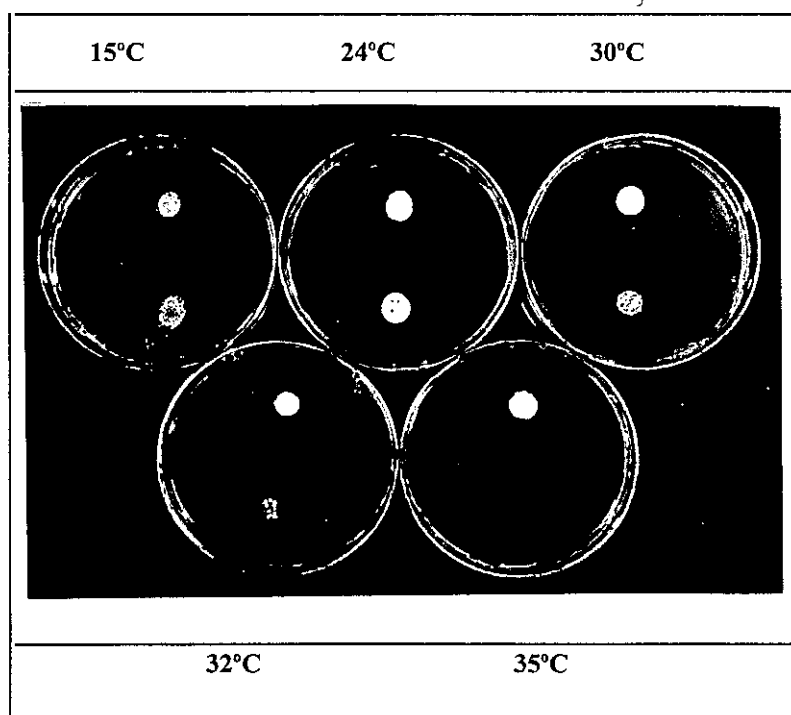


Figura 43: Crecimiento de la cepa mutante TD28mj103 y silvestre TD28 en el medio sólido YEPD a diferentes temperaturas.  $1 \times 10^3$  células de la cepa mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre TD28, procedentes de cultivos en fase exponencial en YEPD a 26°C, fueron sembradas en forma de "botón" en placas de Petri con medio YEPD. El botón superior corresponde a la cepa silvestre y el botón inferior a la cepa mutante. La velocidad de crecimiento fue diferente dependiendo de la temperatura de incubación, por lo que en la figura se muestra el aspecto de la placa incubada a 15°C después de 10 días de ser sembrada, de las placas incubadas a 24, 30 y 32°C después de 3 días, y de la placa incubada a 35°C tras permanecer 4 días a esta temperatura.

### 13.2.2.2. Crecimiento en diferentes fuentes de carbono

Con la finalidad de conocer si el mutante TD28mj103 era capaz de utilizar diferentes fuentes de carbono a temperatura permisiva y evaluar su capacidad para crecer a temperatura restrictiva en alguno de ellos, se analizó su comportamiento en medios sólidos con glucosa, galactosa y maltosa, como fuentes de carbono fermentables, y con glicerol, etanol y acetato potásico como fuentes de carbono no fermentables. En todos los medios se sembraron  $1 \times 10^3$  células de los cultivos en fase exponencial a 26°C de las cepas mutante TD28mj103 y silvestre TD28. Las placas inoculadas fueron incubadas a 15, 24, 30 y 35°C durante 120 horas, excepto la de 15°C que se incubó durante 10 días, anotando su evolución cada 24 horas. Los resultados obtenidos (figura 44) mostraron un crecimiento a temperatura permisiva del mutante TD28mj103 en todos los medios utilizados, y por tanto, su capacidad para metabolizar las diferentes fuentes de carbono ensayadas. Sin embargo, existían diferencias entre ambas cepas en cuanto a la velocidad de crecimiento y tamaño de las colonias formadas, dependiendo de la temperatura de incubación. Así, el comportamiento a 24°C del mutante TD28mj103 fue muy similar al de la cepa silvestre en todos los medios utilizados. A 30°C el crecimiento del mutante en los medios con glicerol y acetato potásico resultó más lento que el de la cepa silvestre, siendo incapaz de proliferar en el medio con etanol. Finalmente, a 35°C la cepa mutante no pudo crecer en ninguno de los medios de cultivo, al contrario de la cepa control TD28, que lo hizo en todos ellos.

Para conocer si la ausencia de crecimiento del mutante sobre el medio de cultivo con etanol a 30°C, era la consecuencia de un efecto tóxico del etanol sobre las células mutantes, o era debido a que este sustrato no podía ser degradado por el mutante, se evaluó el crecimiento de dicha cepa a 30°C en un medio de cultivo que poseía etanol 2% y glucosa 2% como fuentes de carbono. La ausencia de crecimiento en este medio de cultivo confirmó que el etanol producía a 30°C un efecto tóxico sobre el mutante que impedía su proliferación.

Por tanto, los resultados obtenidos permitieron concluir que la termosensibilidad del mutante era independiente de la fuente de carbono utilizada, ya que no se obtuvo crecimiento en ninguna de las condiciones ensayadas a temperatura restrictiva.

### 13.2.2.3. Crecimiento en presencia y ausencia de oxígeno

Para conocer si el oxígeno participaba en la manifestación del fenotipo termosensible, se analizó el comportamiento del mutante TD28mj103 en aerobiosis y en anaerobiosis, en medio sólido y en medio líquido.

Los experimentos en medio sólido se realizaron mediante la siembra de  $1 \times 10^3$  células procedentes de un cultivo en fase exponencial en YEPD a 26°C, en cuatro placas de Petri con medio sólido YEPD. Dos de las placas fueron incubadas durante 72 horas en presencia de oxígeno a 26 y a 37°C respectivamente. Las otras dos placas fueron incubadas en las mismas condiciones de temperatura en una atmósfera carente de oxígeno (ver materiales y métodos). Los resultados obtenidos mostraron una ausencia de crecimiento del mutante en todas las placas incubadas a 37°C, a diferencia de la cepa silvestre que fue capaz de crecer en las mismas condiciones. Por otra parte, el mutante se comportó de manera similar al silvestre a 26°C en las condiciones ensayadas.

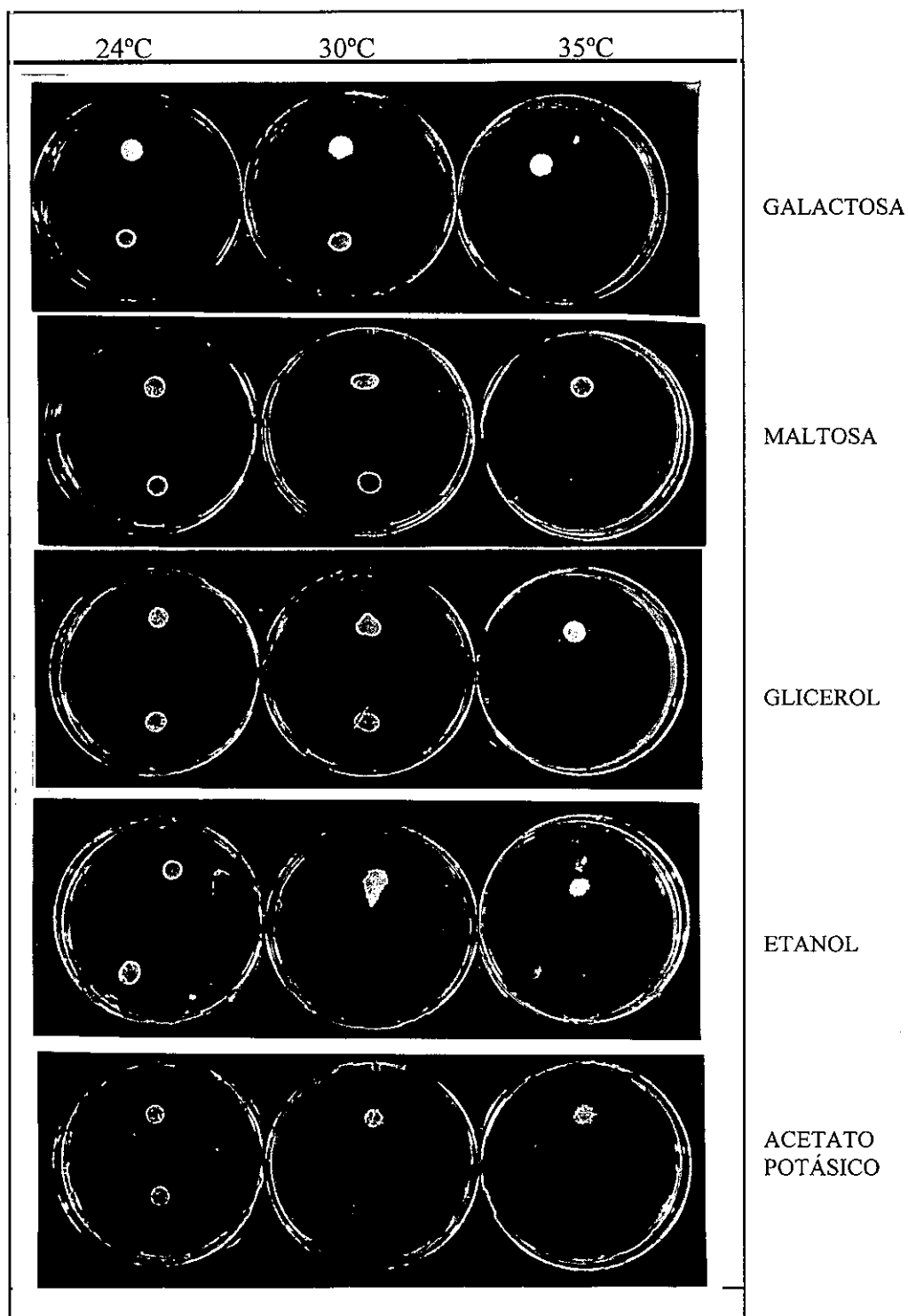
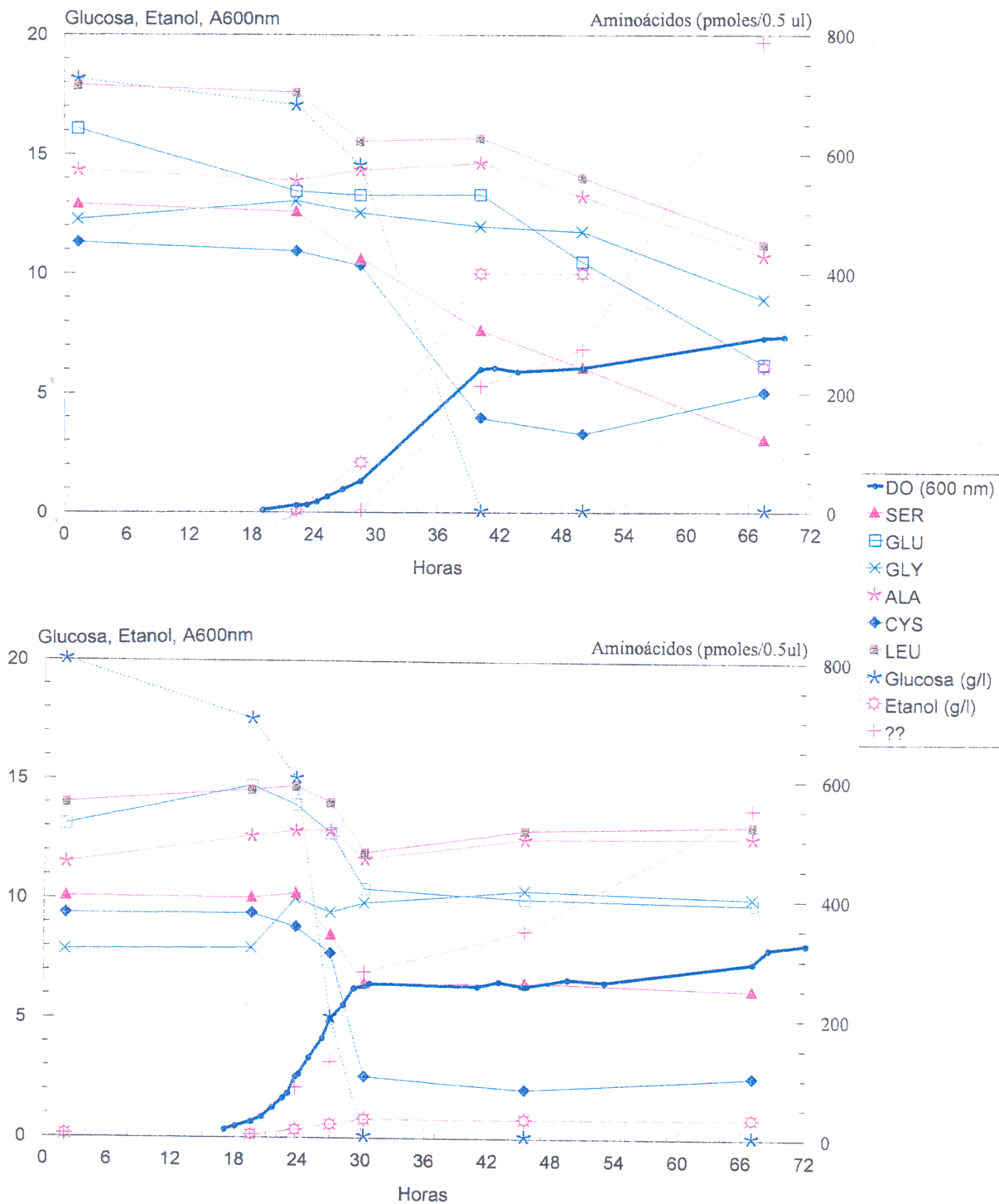


Figura 44: Crecimiento de la cepa mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre TD28 en medios sólidos con diferentes fuentes de carbono.  $1 \times 10^3$  células de la cepa mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre TD28, procedentes de cultivos en fase exponencial en YEPD a 26°C, fueron sembradas en forma de “botón” en placas de Petri con medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono. El botón superior corresponde a la cepa silvestre y el botón inferior a la cepa mutante. La fotografía muestra el aspecto de las placas tras 72 horas de incubación a las temperaturas indicadas. Debe señalarse que las escasas colonias de la cepa mutante que aparecen en la placa de acetato potásico incubada a 30°C siguieron creciendo, a diferencia de las células inoculadas sobre el medio de etanol e incubadas a la misma temperatura, que no mostraron ningún crecimiento tras 120 horas de incubación.

Los experimentos en medio líquido se realizaron en biorreactores con 20 litros de medio YEPD. Los inóculos procedían de células en fase exponencial en YEPD a 26°C. El estudio de la cepa mutante y de la silvestre fue realizado de manera similar al utilizado en la caracterización del fenotipo termosensible, explicado previamente, aunque en este caso se evitó la entrada de oxígeno en el biorreactor. Las temperaturas de incubación fueron 26 y 37°C. Los comportamientos de ambas cepas en las condiciones analizadas fueron similares a los observados con anterioridad en condiciones aerobias, de modo que a 26°C la cepa mutante creció más despacio que la silvestre, aunque a tras 24 horas de incubación los valores de absorbancia a 600 nm fueron similares. A 37°C la cepa mutante detuvo su crecimiento tras 8 horas de incubación, mientras que la cepa silvestre continuó proliferando. Los resultados obtenidos mostraron que el fenotipo termosensible de TD28mj103 era independiente de la presencia o ausencia de oxígeno.

#### 13.2.2.4. Análisis de metabolitos

Con el objetivo de conocer si la mutación N148Y en la proteína Ypl007cp provocaba una alteración en los mecanismos de consumo y producción de algunos metabolitos, se realizaron experimentos en los que la cepa mutante TD28mj103 y la cepa silvestre TD28 fueron cultivadas en condiciones controladas. En este estudio se trabajó con cultivos más crecidos que en los experimentos anteriores, ya que se trataba de detectar modificaciones en la composición del caldo de cultivo como consecuencia de la actividad metabólica de las células, y por lo tanto se requería un crecimiento abundante para que estas modificaciones pudieran ser detectadas por técnicas cromatográficas. El cultivo de ambas cepas se llevó a cabo en biorreactores con 20 litros de medio YEPD inoculados con cultivos en fase exponencial crecido en este mismo medio a 26°C. La incubación se realizó en unos casos a 26°C durante todo el proceso, mientras que en otros se inició el crecimiento a 26°C y al alcanzar la absorbancia a 600 nm de 1 se realizó un cambio térmico a 37°C. Las muestras tomadas a lo largo del ensayo fueron analizadas, evaluando su crecimiento (absorbancia a 600 nm), su viabilidad y su morfología. Además, el caldo de estas muestras se analizó mediante HPLC, que permite determinar las variaciones en los niveles de 16 aminoácidos (ácido aspártico, serina, ácido glutámico, glicocola, histidina, arginina, treonina, alanina, prolina, tirosina, metionina, valina, lisina, isoleucina, leucina y fenilalanina), así como el consumo de glucosa y la producción de diversos ácidos orgánicos (pirúvico, mevalónico, cítrico, succínico fórmico y acético) y alcoholes (etanol, metanol y propanol). Las diferencias más relevantes entre ambas cepas se muestran en las figuras 45 y 46. Fueron especialmente destacables la mayor producción de etanol por el mutante y de un compuesto aún sin identificar a 26°C (figura 45). Por otro lado, la cepa TD28mj103 continuó el consumo de aminoácidos una vez agotada la glucosa del medio a 26°C, a diferencia de la cepa TD28 que detuvo su consumo en condiciones de agotamiento de glucosa (figura 45). Este último comportamiento fue mostrado también a 37°C por ambas cepas (figura 46). El seguimiento del crecimiento celular permitió detectar una proliferación del mutante TD28mj103 tras el cambio térmico, llegando a alcanzar unos valores similares a los de la cepa silvestre. Este resultado fue la consecuencia de su capacidad, demostrada anteriormente, para realizar varias divisiones celulares previamente a la detención del crecimiento en condiciones restrictivas. En este experimento las divisiones previas fueron suficientes para agotar la glucosa del medio y por tanto, la detención del crecimiento fue consecuencia de la falta de nutrientes además de ser consecuencia de la manifestación del fenotipo termosensible.



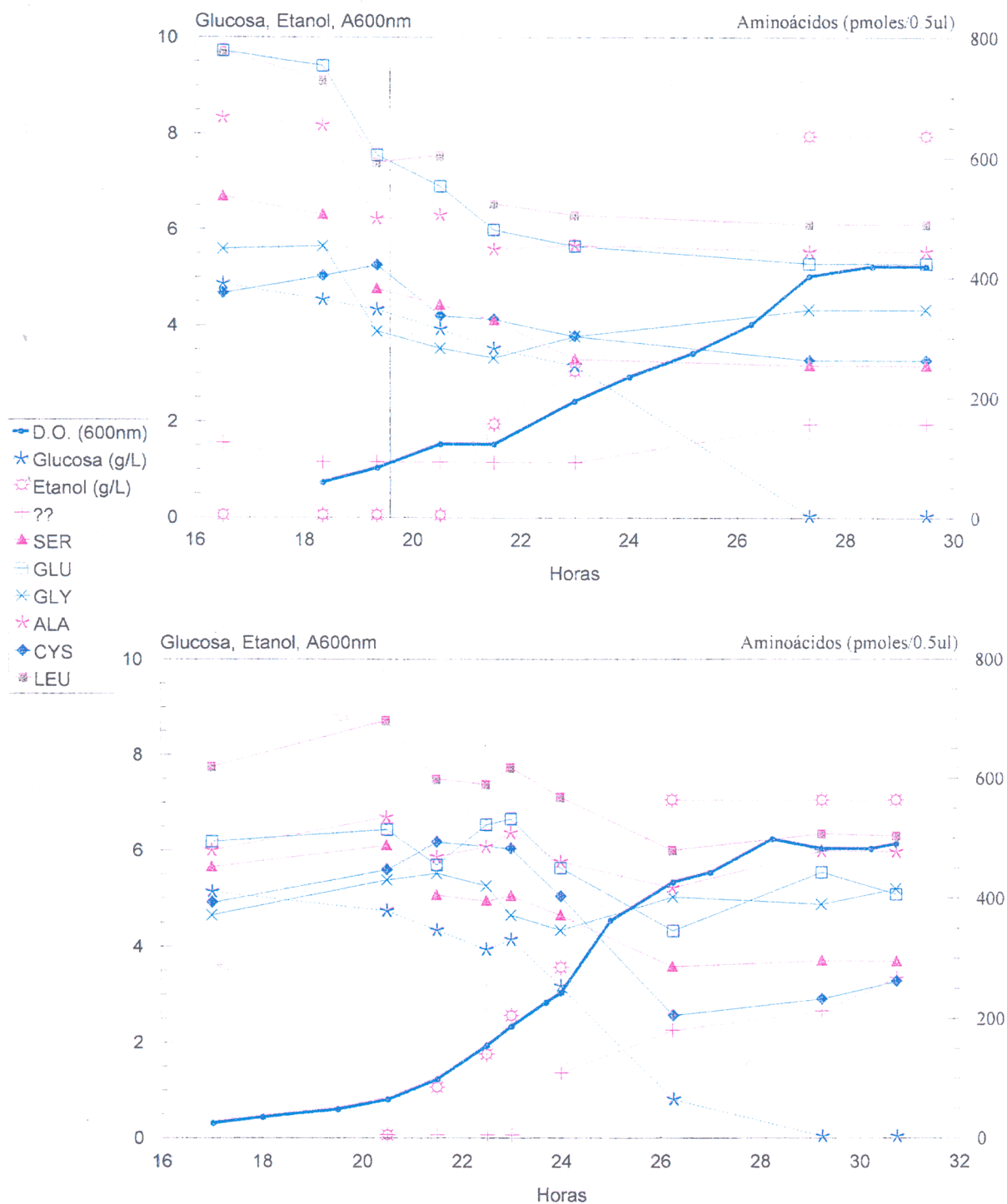


Figura 46: Análisis del consumo y producción de metabolitos en fermentaciones de las cepas mutante TD28mj103 y silvestre TD28.

(A) Cepa mutante TD28mj103 a 37°C. (C) Cepa silvestre TD28 a 37°C. Ambas cepas fueron cultivadas en biorreactores con 20 l de medio YEPD a 37°C. El crecimiento de los cultivos fue determinado por la densidad óptica (DO) a 600 nm de las alícuotas tomadas durante el ensayo. Los caldos procedentes de la centrifugación de las diferentes alícuotas fueron analizados mediante HPLC.

### 13.2.2.5. Efecto de la sobreexpresión del gen *YPL007C*

Como ya se ha comentado anteriormente, los ensayos de sobreexpresión del gen *YPL007C* en la cepa TD28 no mostraron diferencias significativas entre el crecimiento, viabilidad y morfología del clon que sobreexpresaba este gen y la cepa silvestre TD28 (figura 35). Sin embargo y como consecuencia de que el medio de cultivo mínimo MDA utilizado para asegurar la hiperexpresión, había provocado una disminución de la tasa de crecimiento de la cepa TD28 con respecto a la mostrada en medio rico, así como una modificación de su morfología, se decidió repetir el experimento en unas condiciones de cultivo mejores, que permitieran detectar ligeros cambios en su comportamiento como consecuencia del efecto de la sobreexpresión. Por este motivo se analizó el comportamiento de 3 clones procedentes de la transformación del mutante TD28mj103 con el plásmido episómico YEpPGKYPL (tabla 6), en medio rico YEPD a 37°C. Los matraces fueron inoculados con cultivos en MDA a 26°C en fase exponencial y se incubaron en YEPD a 37°C para asegurar la hiperexpresión génica y evitar la pérdida de plásmido. Con objeto de poder analizar las posibles variaciones en el comportamiento, se compararon los resultados obtenidos con los procedentes del ensayo paralelo de otros tres clones mutantes transformados con el plásmido centromérico p103.1, con la cepa mutante TD28mj103 y con la silvestre TD28. Durante las 24 horas de duración del experimento se tomaron diversas alícuotas, en las que se analizó el crecimiento, la viabilidad y la morfología celular, así como la distribución de la población en cuanto a su contenido en DNA. Los resultados obtenidos (figura 47 panel1) mostraron un comportamiento similar de los clones transformados con ambos tipos de plásmidos, que, a diferencia de la cepa mutante, proliferaron a 37°C, aunque con una tasa de crecimiento menor que la cepa silvestre. La viabilidad de todos los clones transformantes analizados, no presentó diferencias con la cepa silvestre (figura 47 panel1). Asimismo la morfología observada fue similar a la del silvestre. Por otra parte, la distribución de la población celular en cuanto a su contenido en DNA fue similar en los transformantes y en la cepa silvestre TD28, con un claro predominio de la población 2n, a diferencia de la cepa mutante que presentó una parte importante de su población con un contenido n en DNA durante el tiempo en que tuvieron lugar las divisiones celulares previas a que su crecimiento se detuviera a 37°C (figura 47 panel 2). Este estudio mostró que el gen *YPL007C* en monocopia y en multicopia era capaz de complementar otra de las alteraciones fenotípicas del mutante, que es el incremento de la población en la fase G0/G1.

Estos resultados confirmaron que el incremento de los niveles de expresión del gen *YPL007C* en la cepa mutante TD28mj103 no provocaba cambios detectables en ninguna de las características analizadas, coincidiendo así con los resultados obtenidos previamente en los ensayos de sobreexpresión del gen en la cepa silvestre TD28.

### 13.2.2.6. Capacidad y eficiencia de apareamiento

Para conocer si la mutación N148Y de la proteína Ypl007cp provocaba una alteración del proceso de apareamiento de *S. cerevisiae*, se realizaron ensayos comparativos entre el mutante TD28mj103 y el silvestre TD28 en medio sólido (ver materiales y métodos).

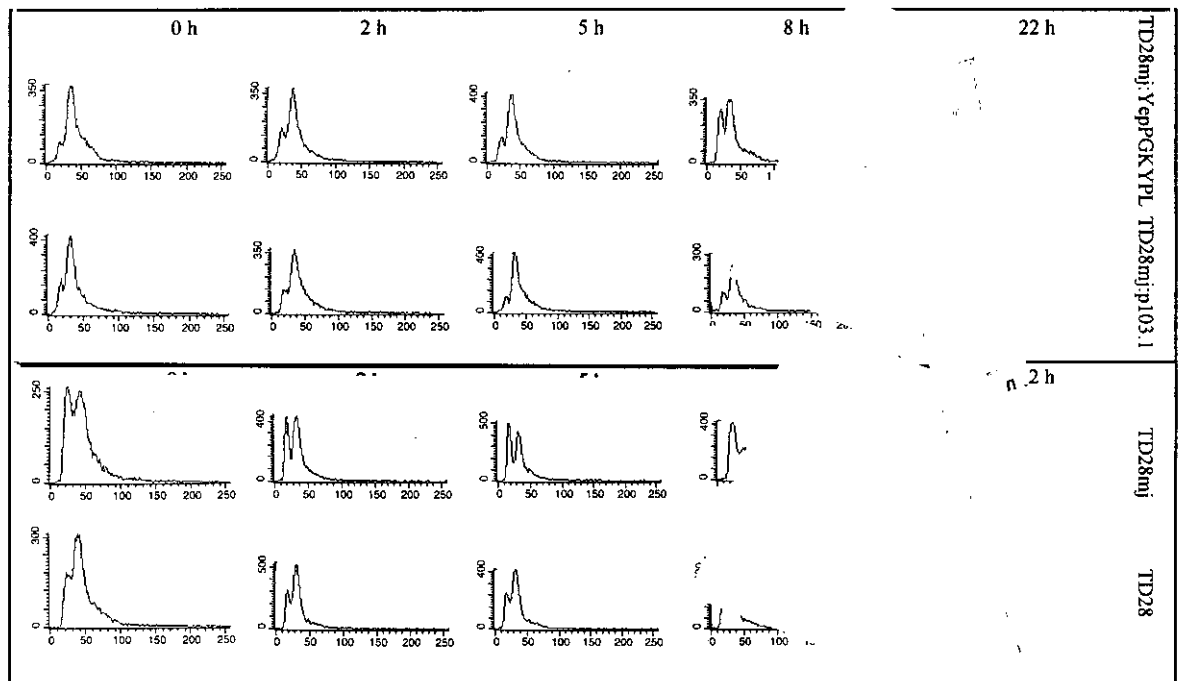
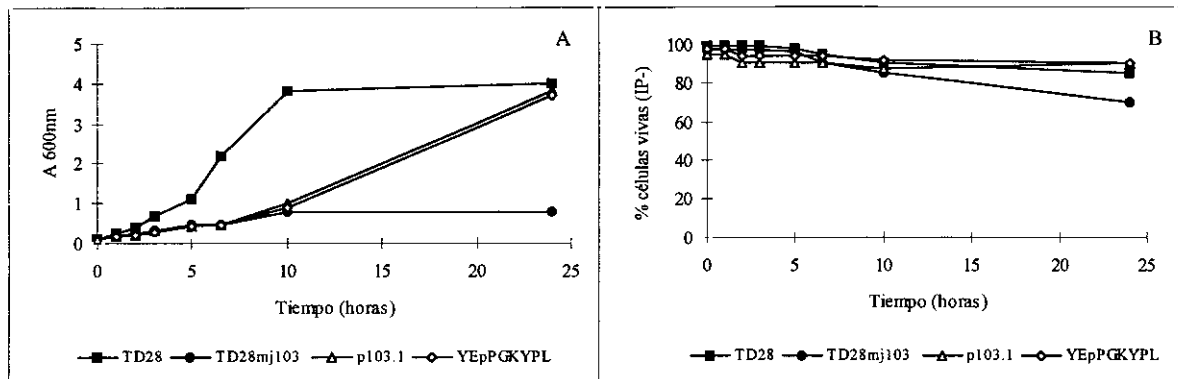


Figura 47: Comportamiento y contenido en DNA de la cepa mutante TD28mj103, de sus clones transformados con YEpPGKYPL y con p103.1 y de la cepa silvestre TD28, en el medio líquido YEPD a 37°C. **Panel 1:** (A) Crecimiento en YEPD a 37°C. (B) Viabilidad en YEPD a 37°C. El crecimiento fue determinado por la absorbancia a 600 nm de las diferentes alícuotas tomadas a lo largo del ensayo. La viabilidad fue calculada mediante tinción con yoduro de propidio. El comportamiento del clon transformado con YEpPGKYPL y el comportamiento del clon transformado con p103.1 corresponden a la media de tres experimentos independientes. **Panel 2:** Contenido en DNA de las células, determinado mediante citometría de flujo. El eje X representa el contenido de DNA según la señal fluorescente del yoduro de propidio, y el eje Y indica el número de células. Cada muestra está constituida por  $10^4$  células. El primer pico corresponde a la población n y el segundo pico corresponde a la población 2n.

El apareamiento de ambas células ocurrió con una eficiencia similar a 26°C, aunque las células mutantes tardaron más tiempo. A 37°C también se produjo el apareamiento de ambas cepas, demostrando que además de tener capacidad para dividirse varias veces antes de detener su crecimiento a temperatura restrictiva, también era capaz de conjugar. Por otra parte, las células mutantes fueron incubadas a 37°C durante periodos de 8 horas previamente a ser sometidas a los procesos de apareamiento a 37°C y también a 26°C como control del experimento. Con esta incubación previa se trataba de detener el ciclo vegetativo de las células mutantes y posteriormente analizar si el ciclo sexual también quedaba detenido a esta temperatura, o por el contrario las cepas podían aparearse. Los resultados mostraron que las células mutantes preincubadas a 37°C no apareaban a la temperatura restrictiva de 37°C aunque sí lo hacían a 26°C, por lo que se dedujo que el mutante TD28mj103 detenía su ciclo vegetativo y sexual a 37°C.

Los resultados de ambos ensayos parecían indicar que el gen *YPL007C* no estaba directamente relacionado con ninguno de los procesos analizados.

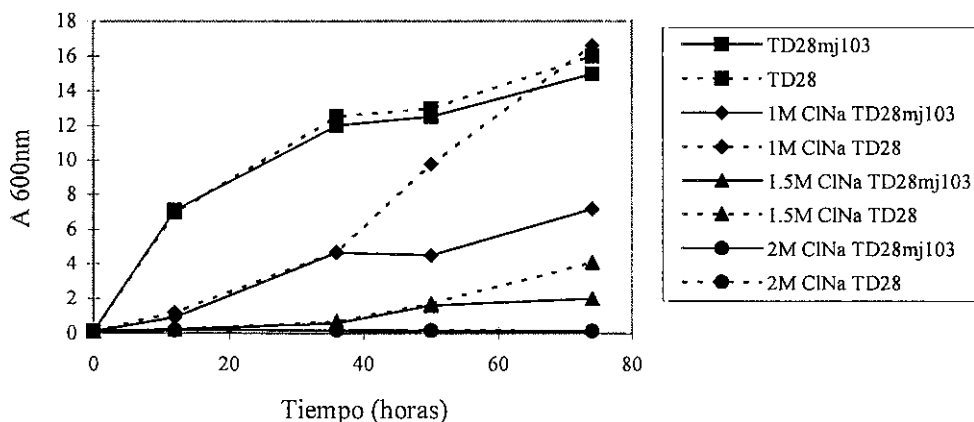
### 13.2.2.7. Sensibilidad a diferentes tipos de estrés

Como se ha comentado con anterioridad en este trabajo, el análisis de la secuencia promotora del gen *YPL007C* reveló la presencia de secuencias correspondientes a lugares de activación de la transcripción de algunos genes en condiciones de estrés, como son STRE y HSE (figura 31). Por otro lado, también se han mostrado los resultados obtenidos en el estudio de la regulación génica, en los que se detectó un ligero incremento del mRNA en las células crecidas en presencia de NaCl 0,5 M (figura 34 panel 4), así como en las células incubadas a 37°C (figura 34 panel 5). Ambas características sugirieron una posible implicación de la proteína Ypl007cp en la respuesta celular desencadenada ante situaciones de estrés. Por este motivo, y con el objetivo de conocer si la mutación en *yp1007c* podía modificar la capacidad de respuesta de la cepa frente a estas situaciones, se analizó el comportamiento de la cepa mutante TD28mj103 y de la silvestre TD28 en diferentes condiciones de estrés a 26°C, ya que a esta Tª, como se ha comentado con anterioridad, existía un cierto grado de expresión de la mutación (figura 40).

#### - Sensibilidad al estrés salino.

El comportamiento de ambas cepas en condiciones de estrés salino fue evaluado en medios líquidos y sólidos suplementados con diferentes concentraciones de NaCl. El estudio en medio líquido se realizó en matraces con medio YEPD suplementado con NaCl 1, 1,5 y 2 M, que fueron inoculados a una absorbancia a 600 nm de 0,1 con cultivos en fase exponencial en YEPD a 26°C. Durante las 74 horas de incubación se tomaron diversas alícuotas a las que se analizó su crecimiento ( $A_{600nm}$ ) y su morfología. Los resultados obtenidos mostraron un crecimiento menor de la cepa mutante TD28mj103 en presencia de NaCl con respecto a la silvestre TD28 (figura 48 panel 1). Ambas cepas modificaron su morfología al crecer en condiciones de estrés salino, de modo que la cepa mutante aumentó ligeramente su tamaño, a diferencia de la cepa silvestre cuyas células se mostraron más pequeñas (figura 48 panel 2). Estas observaciones indicaban que los mecanismos de respuesta a estrés salino podrían estar dañados en el mutante.

Panel 1



Panel 2



Figura 48: Sensibilidad de las cepas mutante TD28mj103 y silvestre TD28 al estrés salino. **Panel 1:** Crecimiento de la cepa mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre TD28.  $1 \times 10^3$  células de ambas cepas procedentes de cultivos en fase exponencial en YEPD a  $26^\circ\text{C}$ , fueron sembradas en matraces con medio líquido YEPD y con medio líquido YEPD suplementado con 1, 1,5 y 2 M de NaCl. Los cultivos se incubaron a  $26^\circ\text{C}$ , y su crecimiento fue determinado por la absorbancia a 600 nm de diferentes alícuotas tomadas a lo largo del ensayo. **Panel 2:** (A) Cepa mutante TD28mj103 en YEPD suplementado con 1M de NaCl. (B) Cepa silvestre TD28 en YEPD suplementado con 1M de NaCl. La figura muestra la morfología celular tras 50 horas de incubación, visualizada en un microscopio de contraste de fases a 400X.

Para conocer si el efecto del NaCl a  $26^\circ\text{C}$  se acentuaba a medida que se elevaba la temperatura, o por el contrario, se mantenía constante, se realizaron ensayos de respuesta a estrés salino a 26, 30 y  $35^\circ\text{C}$ . Para ello se sembraron  $1 \times 10^3$  células, que procedían de los cultivos en fase exponencial en YEPD a  $26^\circ\text{C}$ , de las cepas mutante TD28mj103 y silvestre TD28 en el medio sólido YEPD suplementado con 0,5, 1 y 1,5 M de NaCl. La incubación se realizó durante 74 horas, observándose un menor crecimiento a medida que se elevaba la concentración salina. Este efecto ya se había observado previamente en los experimentos en medio líquido, pero en este caso ninguna de las cepas estudiadas fue capaz de crecer en presencia de NaCl 1,5 M (tabla 21), a diferencia de lo ocurrido en medio líquido (figura 34). En este experimento no se pudo apreciar un efecto significativo en cuanto al incremento de la temperatura, ya que aunque el crecimiento disminuía a 0,5 M de NaCl a  $30^\circ\text{C}$  respecto al mostrado a  $26^\circ\text{C}$ , esta disminución no existía a 1 M (tabla 21).

Tabla 21: Crecimiento de la cepa mutante TD28mj103 y silvestre TD28 en medio sólido suplementado con NaCl y a diferentes temperaturas.

Tª incubación	Estirpe celular	Concentración de NaCl en el medio YEPD			
		sin NaCl	0,5 M	1,0 M	1,5 M
26°C	TD28mj103	5+	4+	1+	-
	TD28	5+	4+	3+	-
30°C	TD28mj103	5+	3+	1+	-
	TD28	5+	4+	3+	-
35°C	TD28mj103	-	-	-	-
	TD28	5+	4+	3+	-

El crecimiento fue valorado de una manera semicuantitativa, atribuyendo el valor 5+ al crecimiento mostrado por la cepa silvestre en condiciones óptimas (sin NaCl a 26°C). Para cuantificar el crecimiento de ambas cepas en el resto de las condiciones se realizó una comparación con la anterior y se atribuyeron los valores 4+, 3+, 2+ y 1+ a medida que el crecimiento fue menor. El signo - indica ausencia de crecimiento.

### - Sensibilidad al estrés osmótico.

Con el objetivo de comprobar si el mutante era también sensible a un incremento de la osmolaridad del medio de cultivo, se analizó su comportamiento de manera comparativa con el de la cepa silvestre TD28 en medio YEPD sólido y líquido, suplementado con diferentes concentraciones de sorbitol. El estudio del comportamiento en medio líquido se realizó de manera similar al llevado a cabo en la valoración de la sensibilidad al estrés salino, utilizando medios de cultivo suplementados con sorbitol 1, 1,5 y 2 M. Las alícuotas tomadas en diferentes momentos del cultivo fueron analizadas mediante la determinación de su crecimiento ( $A_{600nm}$ ) y el estudio de su morfología al microscopio óptico. Los resultados mostraron una disminución del crecimiento de las dos cepas a medida que se incrementaba la osmolaridad del medio (figura 49), sin detectar diferencias significativas entre ambas. Asimismo, tampoco se observaron diferencias en la morfología de ambas estirpes en ninguna de los medios de cultivo empleados.

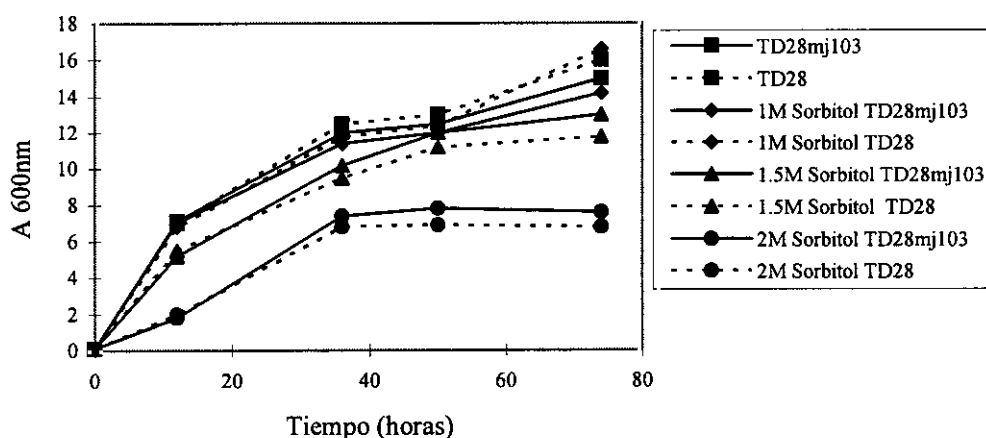


Figura 49: Sensibilidad de las cepas mutante TD28mj103 y silvestre TD28 al estrés osmótico.  $1 \times 10^3$  células de la cepa mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre TD28 procedentes de cultivos en fase exponencial en YEPD a 26°C, fueron sembradas en matraces con medio líquido YEPD y en medio líquido YEPD suplementado con 1, 1,5 y 2 M de sorbitol. Los cultivos se incubaron a 26°C, y su crecimiento fue determinado por la absorbancia a 600 nm de diferentes alícuotas tomadas a lo largo del ensayo.

Para conocer si el comportamiento del mutante en situaciones de estrés osmótico seguía siendo similar al del silvestre con independencia de la temperatura de incubación, se realizaron ensayos a 26, 30 y 35°C. En estos ensayos se evaluó el crecimiento de  $1 \times 10^3$  células, que procedían de cultivos en fase exponencial en YEPD a 26°C, de las cepas mutante TD28mj103 y silvestre TD28, en el medio YEPD sólido suplementado con sorbitol 0,6 y 1,2 M. La incubación se realizó a las temperaturas indicadas durante 74 horas. Los resultados obtenidos confirmaron que el comportamiento del mutante era igual al del silvestre tanto a 26 como a 30°C en presencia de diferentes concentraciones de sorbitol (tabla 22). Además este experimento permitió confirmar los resultados obtenidos en medio líquido, ya que la disminución del crecimiento en el medio suplementado con sorbitol 1,2 M a 26°C y a 30°C ocurrió de modo similar en las dos cepas.

Tabla 22: Crecimiento de la cepa mutante TD28mj103 y silvestre TD28 en medio sólido suplementado con diferentes concentraciones de sorbitol y a diferentes temperaturas.

Tª incubación	Estirpe celular	Concentración de sorbitol en el medio YEPD		
		Sin sorbitol	0,6 M	1,2 M
26°C	TD28mj103	+++	+++	++
	TD28	+++	+++	++
30°C	TD28mj103	+++	+++	++
	TD28	+++	+++	++
35°C	TD28mj103	-	-	-
	TD28	++	++	++

El crecimiento fue valorado de una manera semicuantitativa, atribuyendo el valor +++ al crecimiento mostrado por la cepa silvestre en condiciones óptimas (sin sorbitol a 26°C). Para cuantificar el crecimiento de ambas cepas en el resto de las condiciones se realizó una comparación con la anterior y se atribuyeron los valores ++ y + a medida que el crecimiento fue menor. El signo - indica ausencia de crecimiento.

#### - Sensibilidad al ayuno de nitrógeno

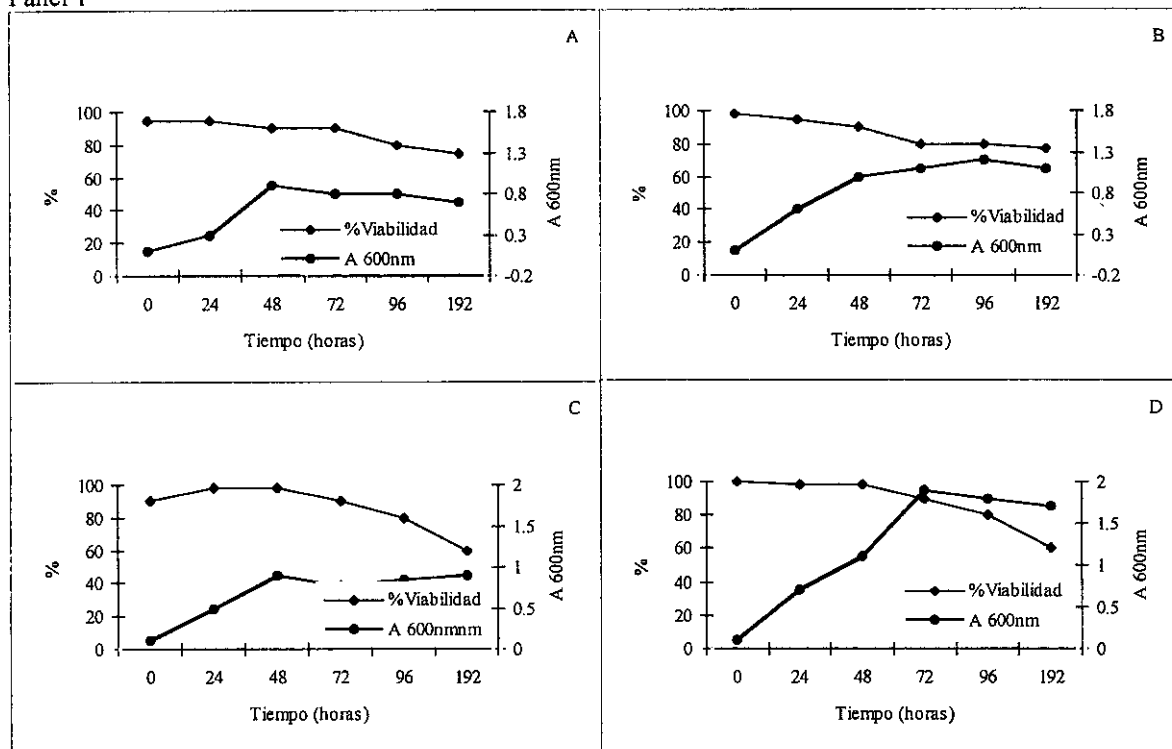
Para conocer si la proteína Ypl007cp era una de las proteínas que permitían la supervivencia celular durante una incubación prolongada en un medio de cultivo deficiente en nitrógeno, se realizaron estudios orientados a caracterizar el crecimiento y la viabilidad de la cepa TD28mj103 en esta situación. Los matraces con medio líquido YNB-N fueron inoculados con cultivos en fase exponencial en YEPD a 26°C del mutante TD28mj103 y del silvestre TD28, de manera que la absorbancia a 600 nm fuera de 0,1. Los matraces se incubaron a 26°C durante 192 horas. Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron una viabilidad celular similar en las dos cepas (figura 50 panel 1), y no se observaron diferencias morfológicas significativas entre ellas (figura 50 panel 2). Así, parecía probable que el mutante no tuviera alterados los mecanismos que permiten la supervivencia celular en condiciones de ayuno de nitrógeno.

#### - Sensibilidad al ayuno de carbono

De modo similar al estudio anterior, se analizó el comportamiento de las cepas mutante TD28mj103 y silvestre TD28 en un medio líquido deficiente en carbono YNB-C.

También en estas condiciones la viabilidad de las dos cepas se mantuvo similar a lo largo de todo el experimento (figura 50 panel 1), así como su morfología (figura 50 panel 2). Ambas observaciones parecían indicar que los mecanismos de respuesta a este tipo de estrés no estaban alterados.

Panel 1



Panel 2

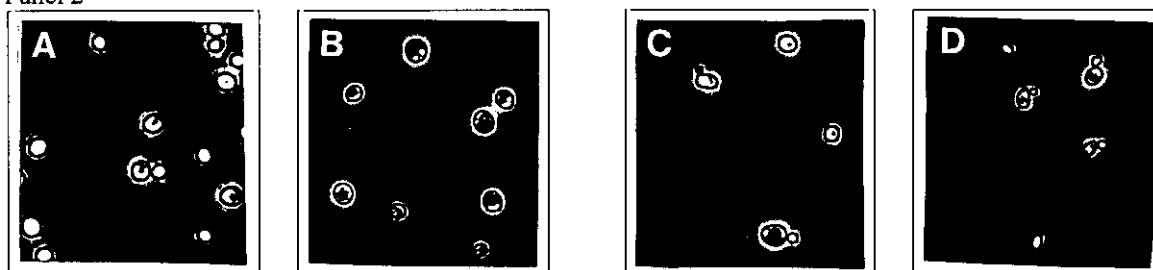


Figura 50: Sensibilidad de las cepas mutante TD28mj103 y silvestre TD28 al ayuno de nitrógeno y de carbono. **Panel 1:** (A) Comportamiento de la cepa mutante TD28mj103 en un medio deficiente de nitrógeno. (B) Comportamiento de la cepa silvestre TD28 en un medio deficiente de nitrógeno. (C) Comportamiento de la cepa mutante TD28mj103 en un medio deficiente de carbono. (D) Comportamiento de la cepa silvestre TD28 en un medio deficiente de carbono.  $1 \times 10^3$  células de la cepa mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre TD28, procedentes de cultivos en fase exponencial en YEPD a 26°C, fueron sembradas en matraces con medio líquido YNB-N (carente de nitrógeno) y YNB-C (carente de carbono). Los cultivos se incubaron a 26°C y su crecimiento fue determinado por la absorbancia a 600 nm de las diferentes alícuotas tomadas a lo largo del ensayo. La viabilidad fue calculada mediante el recuento de colonias en el medio YEPD a 26°C. **Panel 2:** (A) TD28mj103 en YNB-N. (B) TD28 en YNB-N. (C) TD28mj103 en YNB-C. (D) TD28 en YNB-C. La figura muestra la morfología celular tras 96 horas de incubación, visualizada en un microscopio de contraste de fases a 400X.

**- Viabilidad en fase estacionaria.**

Para conocer la posible implicación de la proteína Ypl007cp en el mantenimiento de la viabilidad celular durante la fase estacionaria, se realizó el cultivo de la cepa mutante TD28mj103 y la silvestre TD28 en medio líquido YEPD a 26°C durante 15 días. Al cabo de este tiempo se determinó el número de células viables mediante el recuento de colonias crecidas en YEPD a 26°C. Los resultados mostraron la existencia de un número similar de células viables para ambas estirpes, por lo que los mecanismos del mutante TD28mj103 implicados en el mantenimiento de la viabilidad celular en fase estacionaria no parecían estar alteradas.

**13.2.2.8. Comportamiento en presencia de diferentes compuestos**

Con el objetivo de obtener mayor información sobre los procesos metabólicos alterados como consecuencia de la mutación N148Y en la proteína Ypl007cp, se analizó el comportamiento del mutante en presencia de diferentes compuestos que suplementaban el medio de cultivo. Se intentaron detectar modificaciones del comportamiento habitual de las cepas en estas condiciones, que permitieran indicar una alteración en un proceso metabólico determinado. Los experimentos fueron realizados a la temperatura permisiva de 26°C y a la temperatura restrictiva de 37°C. Los resultados obtenidos a 26°C aportaron una información orientativa sobre las alteraciones metabólicas originadas como consecuencia de la mutación, ya que a esta temperatura el mutante mostraba un cierto grado de expresión de la mutación, como un crecimiento mas lento que el silvestre y un incremento de la población con contenido n en DNA (figura 40). Por otro lado, también se empleó la temperatura de 37°C para conocer si la adición de algunos compuestos al medio de cultivo podía restaurar el crecimiento del mutante TD28mj103 a esta temperatura limitante.

**- Crecimiento en presencia de un aporte exógeno de cAMP**

Para investigar la posible alteración de la síntesis del cAMP como consecuencia de la mutación, se analizó el comportamiento del mutante TD28mj103 en medios de cultivo suplementados con este compuesto. El cAMP actúa como segundo mensajero en la transmisión de diferentes señales, como por ejemplo en la vía Ras/cAMP (Thevelein, 1994). Por este motivo su carencia podría provocar alteraciones en numerosas rutas metabólicas necesarias para la proliferación y viabilidad celular.

Las células mutantes de *S. cerevisiae* incapaces de sintetizar cAMP, pueden elevar sus concentraciones intracelulares cuando son cultivadas en medios suplementados por este compuesto (Baroni *et al* 1992; Baroni *et al.*, 1994). Por este motivo se investigó el comportamiento del mutante TD28mj103 en medios de cultivo líquidos de YEPD suplementados con concentraciones de cAMP 1, 3 y 5 mM, a 26 y a 37°C. Los matraces fueron inoculados a una absorbancia a 600 nm de 0,1 con cultivos de la cepa mutante TD28mj103 y de la silvestre TD28 en fase exponencial en YEPD a 26°C. En unos casos el suplemento de cAMP fue añadido inmediatamente antes de someter a los cultivos a la temperatura restrictiva, mientras que en otros casos, la adición de cAMP se realizó a los cultivos incubados durante un tiempo a 37°C y una vez que el cultivo se había detenido. En ninguno de los experimentos realizados fue posible detectar diferencias en el comportamiento de la cepa mutante en presencia de cAMP con respecto al mostrado en los medios sin dicho suplemento.

### - Crecimiento en presencia de cafeína

Para conocer si el mutante TD28mj103 poseía una modificación de la sensibilidad a la cafeína, se analizó su comportamiento en presencia de diferentes concentraciones de este compuesto. El incremento de la sensibilidad a cafeína ha sido frecuentemente asociado a alteraciones en la ruta de las MAP quinasas (Hampsey, 1997).

El experimento se realizó mediante la siembra en forma de botón de  $1 \times 10^3$  células del mutante TD28mj103 y de  $1 \times 10^3$  células de la cepa silvestre TD28 en los medios sólidos YEPD y YED suplementados con cafeína 5, 15 y 25 mM. Las células sembradas procedían de un cultivo en fase exponencial en YEPD a 26°C. La incubación se realizó durante cinco días a 26°C y los resultados obtenidos fueron similares en ambas cepas, siendo capaces de crecer únicamente en los medios con cafeína 5 y 15 mM.

### - Crecimiento en presencia de ergosterol

Para conocer si el mutante TD28mj103 presentaba alguna alteración metabólica relacionada con el metabolismo del ergosterol, se analizó su comportamiento en medios de cultivo suplementados con este compuesto. El ergosterol es uno de los componentes mayoritarios de la membrana plasmática y de la membrana interna mitocondrial de levaduras, por lo que un defecto en su biosíntesis provoca alteraciones en el crecimiento y en la morfología celular (Vanden Bossche, 1985).

Las células mutantes de *S. cerevisiae* incapaces de sintetizar ergosterol, pueden adquirirlo del medio de cultivo (Youings y Rose, 1989; Lorenz *et al.*, 1989). Por este motivo se analizó el comportamiento del mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre TD28 sobre los medios de cultivo sólidos YEPD suplementados con 1 mg/ml de ergosterol disueltos en etanol. Como control del medio de cultivo utilizado se empleó un medio YEPD que poseía la misma cantidad de etanol que las placas suplementadas con ergosterol. Se sembraron  $1 \times 10^3$  células procedentes de cultivos en fase exponencial en YEPD a 26°C, y se incubaron a 26 y a 37°C durante 72 horas. Los resultados obtenidos mostraron que la cepa mutante mantenía su fenotipo termosensible en presencia de ergosterol, por lo que no parecía probable que una alteración en el metabolismo de este compuesto fuera el responsable del fenotipo termosensible de TD28mj103.

### - Crecimiento en presencia de etanol

Con el objetivo de verificar si el mutante TD28mj103 presentaba una mayor sensibilidad a etanol, como parecían indicar los ensayos realizados en medios sólidos con diferentes fuentes de carbono comentados anteriormente (figura 44), se evaluó su comportamiento en medio líquido en presencia de este alcohol. El etanol produce un daño oxidativo en la célula, por lo que mutantes alterados en los mecanismos de compensación de este efecto son más sensibles a este compuesto (Costa *et al.*, 1993). También es capaz de romper los enlaces de puentes de hidrógeno que mantienen la estructura tridimensional activa de numerosas proteínas, por lo que las células con mutaciones que alteran la estabilidad de algunas proteínas son también más sensibles (Hampsey, 1997). Además algunos mutantes alterados en la composición de la membrana plasmática también poseen una sensibilidad incrementada frente a este alcohol (Alexandre, 1994).

El ensayo se realizó mediante la siembra de  $1 \times 10^3$  células del mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre TD28, procedentes de cultivos en fase exponencial a 26°C, en placas

multipocillo con medio YEPD suplementado con etanol en concentraciones que oscilaban desde 0,01% a 16% (v/v). Las temperaturas de incubación utilizadas en el experimento fueron 26°C, que es la temperatura permisiva, y 30°C, que es la temperatura a la cual se había observado una sensibilidad al 2% etanol en el ensayo en medio sólido (figura 44). La incubación se realizó durante 48 horas y los resultados obtenidos (figura 51) corroboraron que el mutante tenía una mayor sensibilidad a etanol que el silvestre. Así TD28mj103 fue sensible al 4% de etanol a 26°C y al 1% de etanol a 30°C, a diferencia de la cepa silvestre cuyo crecimiento fue inhibido por 16% de etanol a ambas temperaturas.

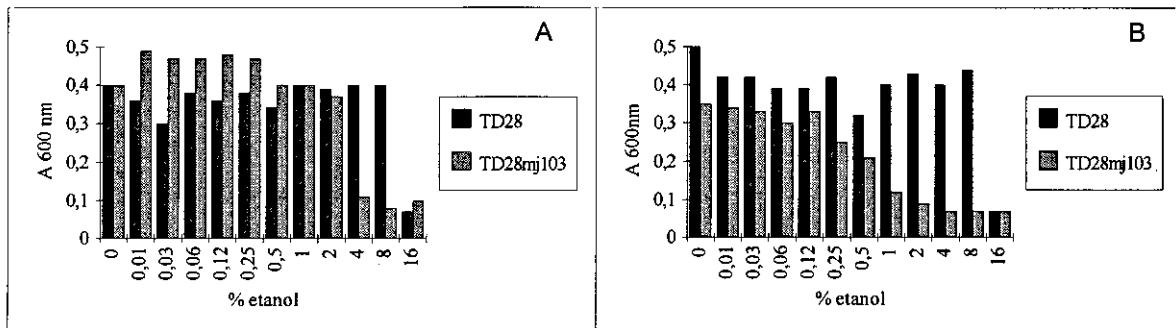


Figura 51: Sensibilidad a etanol de la cepa mutante TD28mj103 y cepa silvestre TD28 en medio líquido. El estudio de sensibilidad a etanol fue realizado a 26°C (A) y a 30°C (B).

**- Crecimiento en presencia de compuestos que alteran la membrana plasmática**

Para conocer si el mutante TD28mj103 presentaba alteraciones en la membrana plasmática que justificaran la sensibilidad a etanol y la distribución anormal de quitina, que como se explicará más adelante había sido observada mediante tinción con blanco calcoflúor, se estudió su sensibilidad a compuestos antifúngicos que actúan a este nivel. La anfotericina B interacciona directamente con la membrana formando unos poros que provocan la pérdida de la funcionalidad de la membrana, y el miconazol inhibe la biosíntesis del ergosterol originando el mismo efecto (Georgopapadaku, 1996).

El ensayo se realizó en placas multipocillo con el medio líquido YEPD y anfotericina B o miconazol en concentraciones de 0,002 a 5 µg/ml. Se sembraron  $1 \times 10^3$  células del mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre TD28, procedentes de cultivos en fase exponencial a 26°C, y se incubaron a 26 y a 30°C durante 48 horas. Los resultados obtenidos (figura 52) mostraron una sensibilidad similar a 26°C de ambas cepas a los antifúngicos ensayados. A 30°C el crecimiento del mutante fue inferior al del silvestre, especialmente en presencia de miconazol (figura 52).

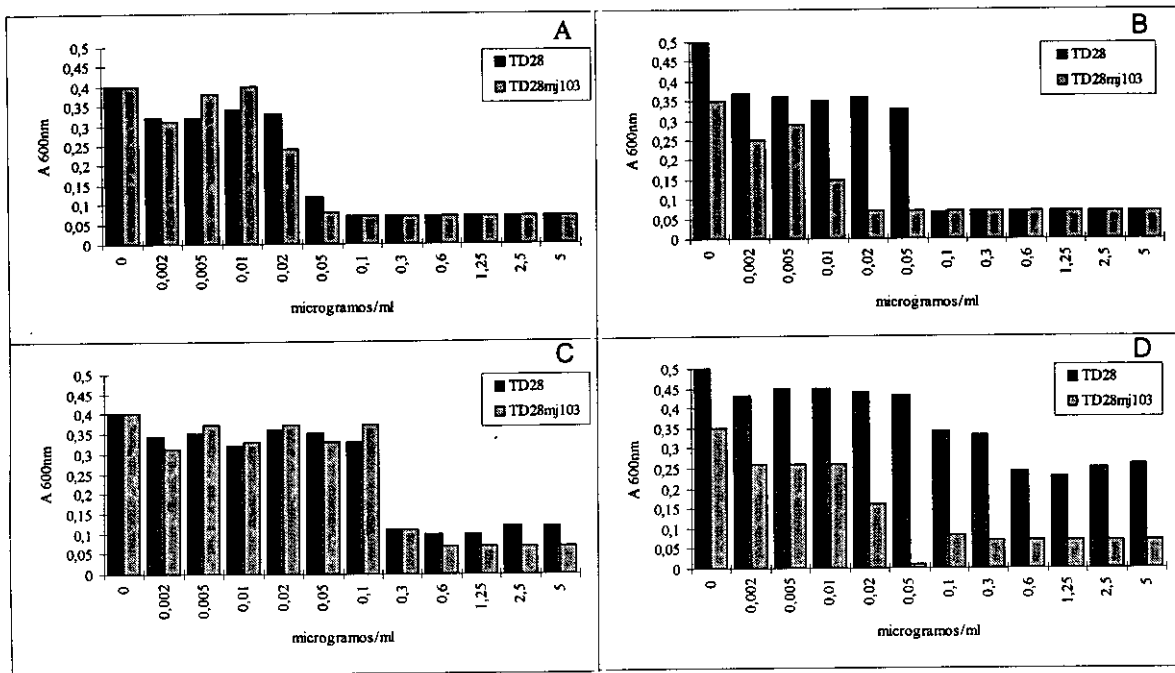


Figura 52: Sensibilidad a anfotericina B y miconazol de la cepa mutante TD28mj103 y cepa silvestre TD28 en medio líquido. La sensibilidad a anfotericina B fue evaluada a 26 (A) y a 30°C (B). La sensibilidad a miconazol fue evaluada a 26(C) y a 30°C (D)

### 13.3.2.9. Estudio del potencial de membrana mitocondrial

Dado que los resultados anteriores parecían indicar una alteración a nivel de membrana en el mutante, se trató de evaluar la funcionalidad de la membrana mitocondrial mediante la técnica de citometría de flujo, tanto en condiciones permisivas como restrictivas. Para ello se inocularon matraces con cultivos exponenciales en YEPD a 26°C de la cepa mutante TD28mj103 y la cepa silvestre TD28, de modo que la absorbancia a 600 nm fuera de 0,1. Las cepas se incubaron durante 48 horas en medio YEPD a 26 y a 37°C, tomando diversas alícuotas durante el ensayo y procesándolas convenientemente para que fuera posible determinar el potencial de la membrana mitocondrial y la viabilidad celular (materiales y métodos). Los resultados obtenidos mostraron una marcada disminución de la señal emitida por la rodamina 123 en las células mutantes incubadas a 37°C, con respecto a la cepa silvestre incubada en las mismas condiciones (figura 53). Este fluorocromo evaluaba el potencial de la membrana mitocondrial, y la disminución de la intensidad de su señal en las células mutantes no se produjo como consecuencia de una muerte celular, como pudo determinarse mediante la cuantificación de las células teñidas con yoduro de propidio. Por otra parte, a 26°C no se detectaron diferencias significativas entre ambas cepas.

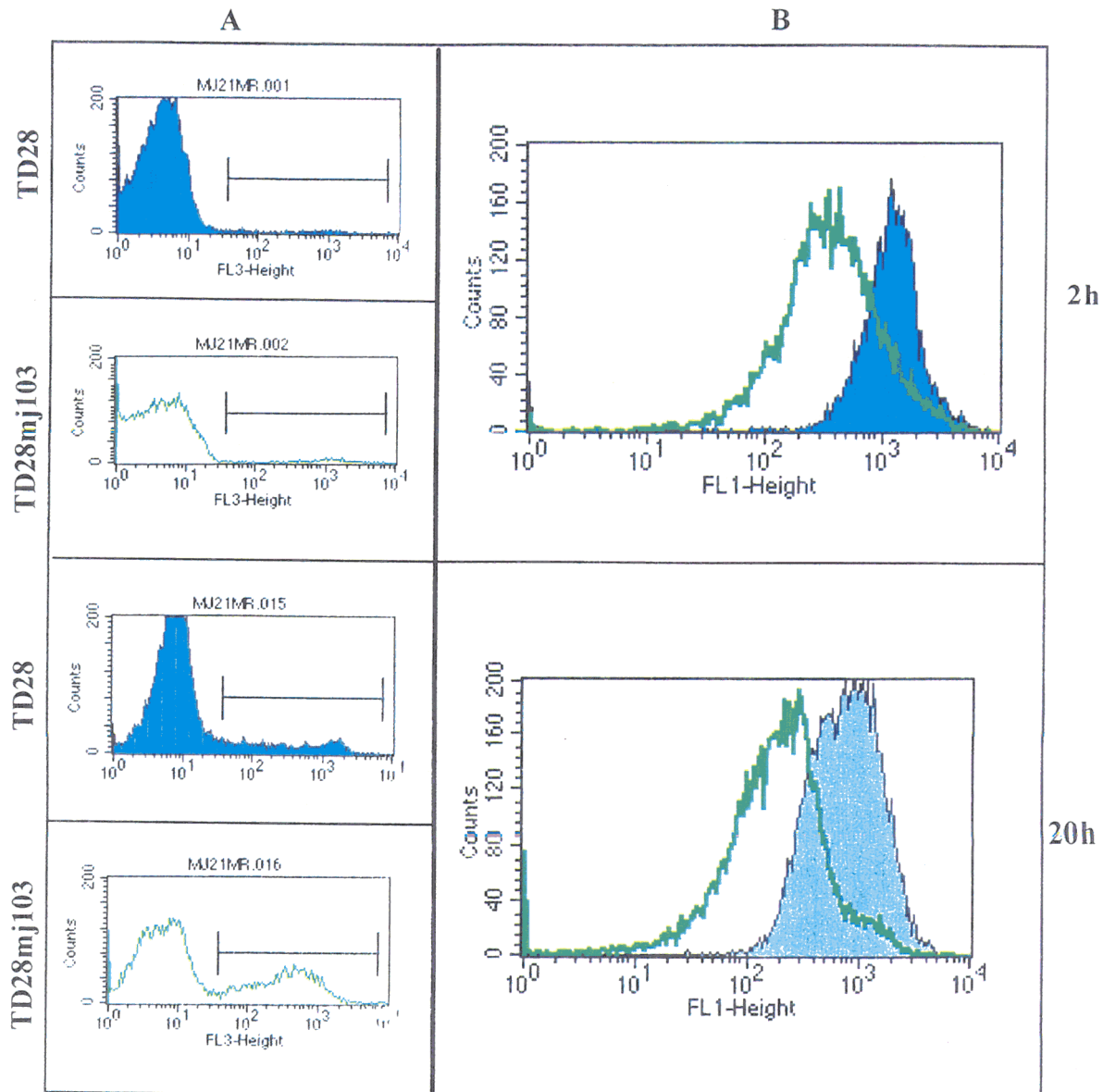


Figura 53: Determinación del potencial de membrana mitocondrial de la cepa mutante TD28mj103 y de la silvestre TD28, analizado mediante citometría de flujo. (A) Viabilidad celular. (B) Potencial de membrana mitocondrial.  $1 \times 10^3$  células de la cepa mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre TD28, procedentes de cultivos en fase exponencial en YEPD a 26°C, fueron sembradas en matraces con medio líquido YEPD e incubadas a 26 y a 37°C. Las alícuotas tomadas en diferentes momentos del ensayo fueron teñidas con yoduro de propidio y tratadas con rodamina 123, para analizar mediante citometría de flujo su viabilidad y su potencial de membrana mitocondrial interna. En la figura se muestran los resultados obtenidos del estudio de las células tras 2 y 20 horas de incubación a 37°C. Las gráficas de viabilidad representan en el eje X la intensidad de la señal del yoduro de propidio y en el eje Y el número de células, distinguiéndose una población mayoritaria viable que corresponde al primer pico y una población minoritaria, correspondiente al segundo pico, que aparece a las 20 horas de células muertas. Las gráficas que muestran el potencial de membrana mitocondrial de la cepa mutante TD28mj103 (área blanca) y de la cepa silvestre TD28 (área azul) representan en el eje X la intensidad de la señal de la rodamina 123 y en el eje Y el número de células. Cada muestra estaba constituida por  $10^4$  células.

### 13.3.2.10. Estudio del contenido de proteínas y de lípidos

Con el objetivo de investigar si la mutación termosensible del mutante provocaba una modificación en los procesos biosintéticos de proteínas y de lípidos, se realizó una determinación mediante citometría de flujo de los niveles de ambos compuestos en la cepa mutante TD28mj103 y en la cepa silvestre TD28 a 26 y a 37°C. El ensayo se realizó como se ha comentado anteriormente para el análisis del potencial de membrana mitocondrial, utilizando en este caso los fluorocromos FITC y rojo nilo para determinar los niveles de proteínas y de lípidos respectivamente. Los resultados obtenidos mostraron niveles similares de ambos compuestos en las dos cepas tanto a 26°C como a 37°C, por lo que la termosensibilidad del mutante no parecía ser debida a una alteración significativa en ninguno de estos procesos.

### 13.3.2.11. Estudio de la actividad peroxidasa y superóxido dismutasa

Con la finalidad de conocer si la termosensibilidad de la cepa TD28mj103 era provocada como consecuencia de una alteración en alguno de los mecanismos de eliminación de los compuestos y radicales oxidantes generados en el metabolismo celular, se analizó la actividad de dos de las enzimas implicadas en este proceso. Los estudios se realizaron mediante citometría de flujo de la manera comentada con anterioridad, determinando la actividad de la peroxidasa citoplasmática y de la superóxido dismutasa mitocondrial, con los fluorocromos DCFH e hidroetidio respectivamente. Los resultados mostraron una actividad similar de ambas enzimas en la cepa mutante y en la cepa silvestre en todas las condiciones analizadas, por lo que no parecía probable que la termosensibilidad del mutante fuera provocada por un daño oxidativo del  $H_2O_2$  ó de los radicales  $O_2^-$ .

### 13.3.2.12. Estudio morfológico y estructural

Para intentar detectar las posibles alteraciones morfológicas y estructurales provocadas por la mutación N148Y, que pudieran aportar alguna información sobre los procesos modificados, se realizaron diversos estudios de la cepa mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre TD28, mediante diferentes técnicas microscópicas.

#### - Caracterización de la morfología celular externa

Para conocer si dicha mutación provocaba una modificación de la morfología externa de la cepa TD28mj103, se analizó el aspecto mostrado por cultivos en medio líquido YEPD a 26 y a 37°C durante 24 horas, comparando las características observadas con las de la cepa silvestre TD28 cultivada en idénticas condiciones. El análisis morfológico se realizó mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido. La información obtenida mediante microscopía óptica fue suficiente para confirmar que las células mutantes eran más redondeadas que la silvestre, tanto a 26 como a 37°C, coincidiendo con las observaciones realizadas en los primeros estudios de caracterización fenotípica del mutante y que han sido comentados con anterioridad en este trabajo (figura 41). La microscopía electrónica de barrido confirmó esta observación en las células analizadas (figura 54), que habían sido congeladas en nitrógeno líquido y procesadas para que mantuvieran intacta su estructura celular, técnica de *crioscanning* (materiales y métodos).

Por otra parte, la observación de la superficie de la pared celular mediante este tipo de microscopía no permitió detectar diferencias entre ambas cepas.

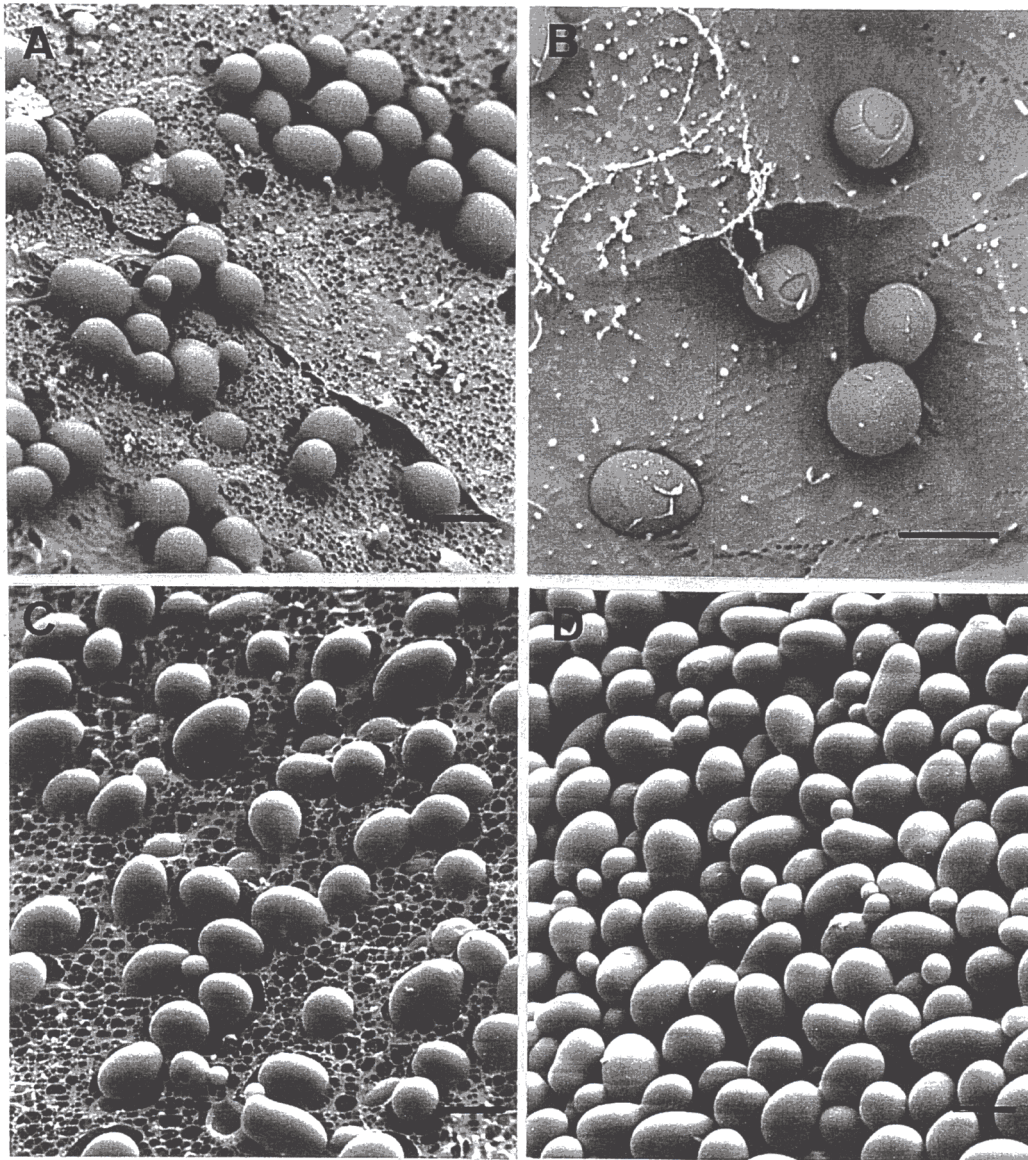


Figura 54: Estudio morfológico mediante microscopía electrónica de barrido, de la cepa mutante TD28mj103 y de la silvestre TD28, durante su crecimiento en el medio líquido en YEPD a 26 y a 37°C.

(A) TD28mj103 a 26°C. (B) TD28mj103 a 37°C. (C) TD28 a 26°C. (D) TD28 a 37°C.  $1 \times 10^3$  células de ambas cepas procedentes de cultivos en fase exponencial en YEPD a 26°C, fueron sembradas en matraces con medio líquido YEPD e incubadas a 26 y a 37°C. Las alícuotas tomadas por duplicado en diferentes momentos del ensayo, se congelaron en nitrógeno líquido y se procesaron adecuadamente para que mantuvieran intacta su estructura celular (técnica de *crioscanning*). Una de las muestras congeladas de cada alícuota fue sometida a un proceso de fractura, para la visualización del interior celular. Las fotografías A, C y D corresponden a células incubadas durante 10 horas y procesadas sin ser fracturadas. La figura B muestra la morfología de células incubadas durante 10 horas y que fueron fracturadas después de ser congeladas. Las barras de escala representan 2  $\mu\text{m}$ .

### - Distribución y cuantificación de la quitina

La observación de una morfología más redondeada de las células mutantes sugirió la posibilidad de que alguno de los componentes estructurales de la pared celular estuviera alterado. Por este motivo se analizaron comparativamente las cantidades de quitina que poseían la cepa TD28mj103 y la TD28 a 26 y a 37°C, así como su distribución en la pared celular. El ensayo se realizó mediante el cultivo de ambas cepas durante 24 horas en matraces con medio YEPD, que habían sido inoculados a una absorbancia a 600 nm de 0,1 con un cultivo en fase exponencial en YEPD a 26°C. La tinción de las células con blanco calcoflúor se realizó en diferentes momentos de la incubación y su visualización al microscopio óptico bajo iluminación con luz ultravioleta, permitió la detección de unos acúmulos puntuales de forma redondeada con intensa fluorescencia, distribuidos irregularmente (figura 55). Estos acúmulos aparecieron únicamente en la cepa TD28mj103 después de 24 horas de incubación a 37°C y el material que originaba estos acúmulos fue considerado quitina. Esta modificación de la distribución del polímero podía estar relacionada con los cambios observados en la morfología externa del mutante, y además ser la consecuencia directa o indirecta de la pérdida de la funcionalidad de la proteína Ypl007cp.

A continuación se intentó determinar si los acúmulos observados correspondían a un incremento de la cantidad de quitina en los mutantes, o se producían como consecuencia de una alteración en su distribución. Para ello se realizó una cuantificación de la quitina presente en la cepa mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre TD28 durante su crecimiento en medio líquido YEPD mediante la técnica de citometría de flujo. Ambas cepas fueron cultivadas durante 24 horas a 26 y a 37°C, en matraces inoculados a una absorbancia a 600 nm de 0,1 con un cultivo en fase exponencial en YEPD a 26°C. Las alícuotas tomadas en diferentes momentos del ensayo fueron teñidas con blanco calcoflúor para posteriormente realizar una cuantificación de la señal fluorescente emitida. Los resultados obtenidos no permitieron detectar diferencias entre ambas cepas cuando habían sido incubadas a 26°C. Sin embargo la cepa mutante incubada durante 24 horas a 37°C, que tenía los acúmulos anteriormente descritos, presentó una señal fluorescente ligeramente superior a la de la cepa silvestre incubada en las mismas condiciones. Esta diferencia fue tan pequeña que no permitió confirmar que los acúmulos observados fueran la consecuencia de un incremento de la síntesis de quitina, sino que parecían ser originados como consecuencia de una alteración en su distribución.

### - Caracterización de la morfología celular interna

Para conocer si la mutación N148Y provocaba modificaciones en la estructura de la pared celular, en la membrana plasmática o en alguno de los orgánulos intracelulares, se realizó un estudio morfológico utilizando diferentes técnicas microscópicas. Las células analizadas procedían del cultivo de la cepa mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre TD28 durante 24 horas en medio líquido YEPD a 26 y a 37°C, en matraces que habían sido inoculados a una absorbancia a 600 nm de 0,1 con un cultivo en fase exponencial en YEPD a 26°C. Las alícuotas tomadas durante el ensayo fueron procesadas convenientemente para que pudieran ser visualizadas por microscopía electrónica de barrido y de transmisión. En el primer caso fue necesario fracturar las células para poder visualizar su membrana y otras estructuras intracelulares (técnica de *crioscanning*, ver materiales y métodos). En el segundo caso las muestras fueron procesadas de dos maneras diferentes dependiendo de las

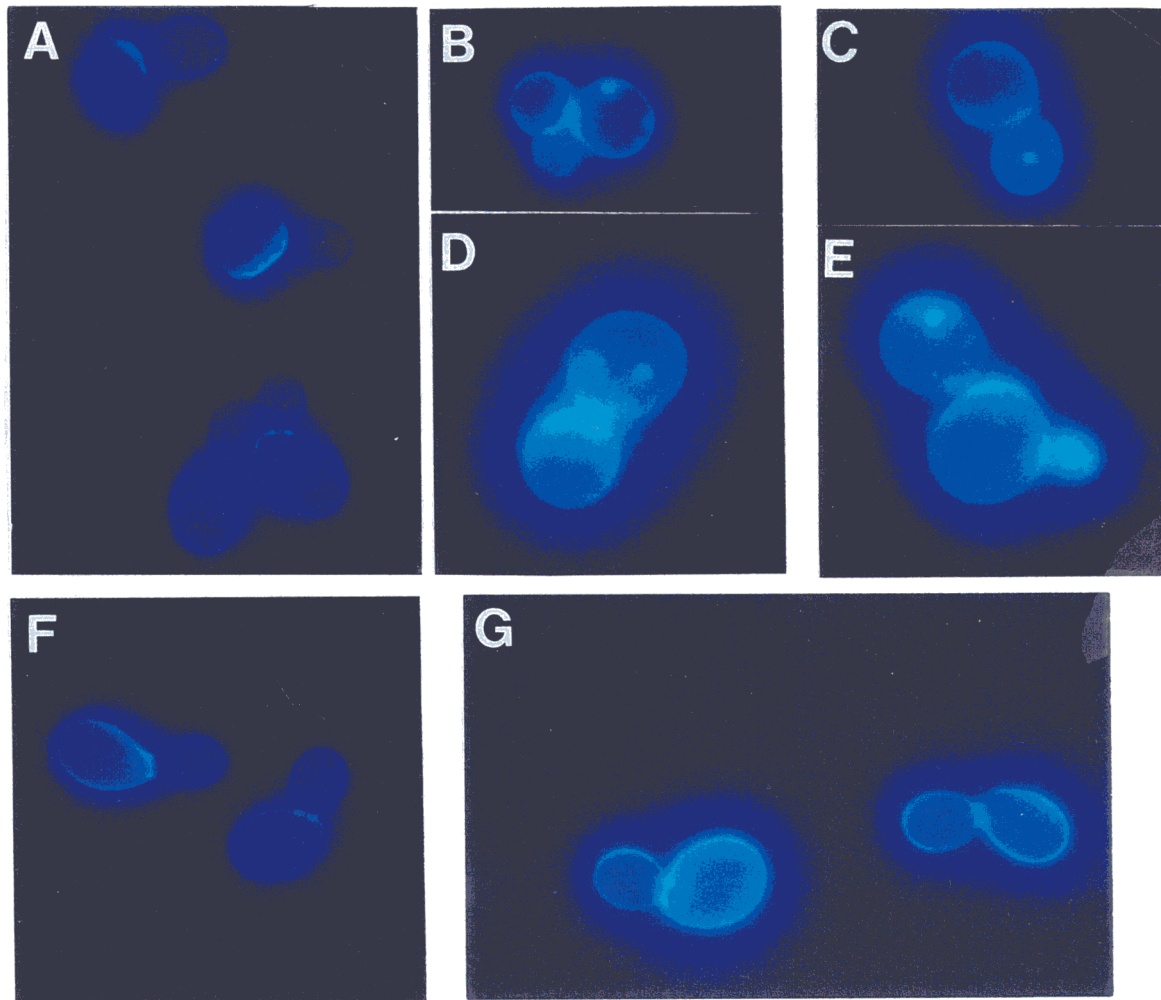


Figura 55: Tinción con blanco calcoflúor de la cepa mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre TD28. (A) TD28mj103 a 26°C. (B, C, D, E) TD28mj103 a 37°C. (F) TD28 a 26°C. (G) TD28 a 37°C.  $1 \times 10^3$  células de la cepa mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre TD28, procedentes de cultivos en fase exponencial en YEPD a 26°C, fueron sembradas en matraces con medio líquido YEPD e incubadas a 26 y a 37°C. Las alícuotas tomadas en diferentes momentos del ensayo se tiñeron con blanco calcoflúor. La figura muestra la morfología de las células tras 24 horas de cultivo, visualizada en un microscopio óptico bajo iluminación con luz ultravioleta.

estructuras que se querían analizar. Así por un lado, fueron fijadas con permanganato potásico (ver materiales y métodos) para analizar la estructura de los orgánulos intracelulares, su membrana plasmática y su pared celular. Por otro lado, y para analizar con detalle el aspecto de la membrana plasmática, se realizó el procesamiento de las muestras según la técnica de criofractura (*freeze-etching*, ver materiales y métodos).

La observación mediante microscopía de barrido de las células que habían sido previamente fracturadas, no permitió detectar diferencias significativas entre la cepa TD28mj103 y la TD28. Sin embargo, el análisis de las muestras mediante microscopía electrónica de transmisión, permitió la observación de un engrosamiento de la pared celular de las células mutantes incubadas a 37°C durante 24 horas (figura 56). Finalmente el aspecto de las membranas plasmáticas de las células mutantes y silvestres sometidas al proceso de criofractura fue similar, sin mostrar cambios ni en el número ni en la distribución de las partículas proteicas características (figura 57 y 58).

#### 13.3.2.13. Búsqueda de genes supresores de la mutación termosensible

Otra de las aproximaciones empleadas para obtener información sobre la funcionalidad de la proteína Ypl007cp, consistió en la búsqueda de otras proteínas que pudieran suprimir la termosensibilidad del mutante TD28mj103. Para ello se transformó este mutante con la genoteca genómica ATCC 37323 clonada en el vector episómico Yep13 (tabla 4), y se analizaron 10 de los clones transformantes capaces de crecer a 37°C. En todos ellos se identificó el gen *YPL007C* como responsable de la complementación fenotípica, sin permitir la identificación de ningún gen supresor de esta mutación.

#### 13.3.2.14. Producción de la proteína de fusión CLTYA-Ypl007cp en *S. cerevisiae* y *E. coli*

Finalmente se abordó de forma preliminar la expresión y purificación de la proteína Ypl007cp en *E. coli* y en *S. cerevisiae* de modo análogo al realizado para la expresión de la proteína Mps1p, que ha sido comentado anteriormente. Así se clonó el gen *YPL007C* en los vectores pT7C y YE<sub>p</sub>PGKC generando los plásmidos pT7CYPL y YE<sub>p</sub>PGKCYPL (tabla 6), respectivamente. La expresión de las fusiones génicas se realizó en la cepa de *E. coli* BL21(DE3)plysS y en la de *S. cerevisiae* TD28. La figura 59 muestra el análisis mediante *Western blot* de la expresión de esta fusión en ambos microorganismos.

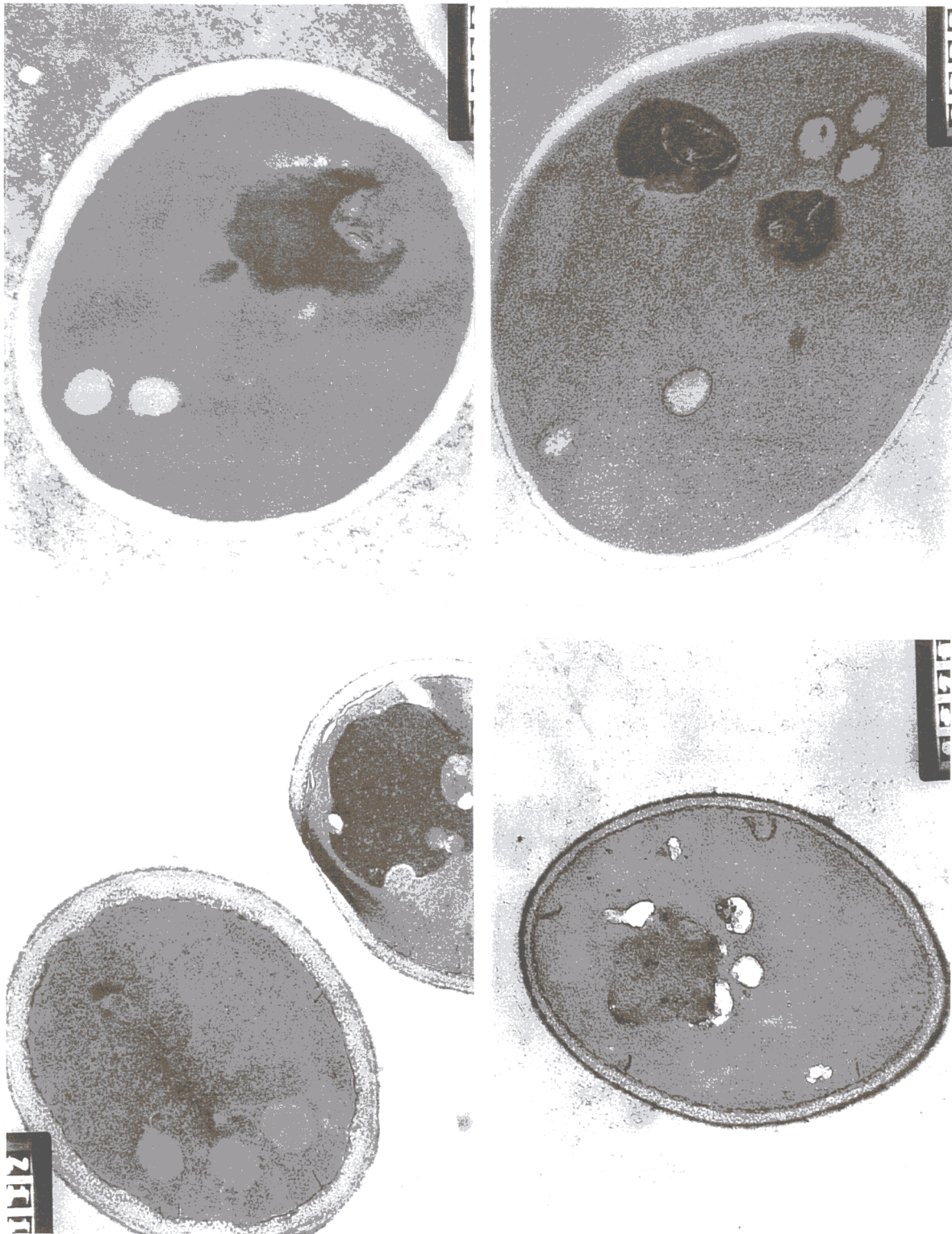


Figura 56: Estudio morfológico mediante microscopía electrónica de transmisión de la cepa mutante TD28mj103 y de la silvestre TD28, durante su crecimiento en medio líquido YEPD a 26 y a 37°C. (A) TD28mj103 a 26°C. (B) TD28 a 26°C. (C) TD28mj103 a 37°C. (D) TD28 a 37°C.  $1 \times 10^3$  células de la cepa mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre TD28, procedentes de cultivos en fase exponencial en YEPD a 26°C, fueron sembradas en matraces con medio líquido YEPD e incubadas a 26 y a 37°C. Las alícuotas tomadas en diferentes momentos del ensayo fueron fijadas con permanganato potásico y procesadas adecuadamente para ser visualizadas mediante microscopía electrónica de transmisión. La figura muestra la morfología de las células tras 24 horas de incubación.

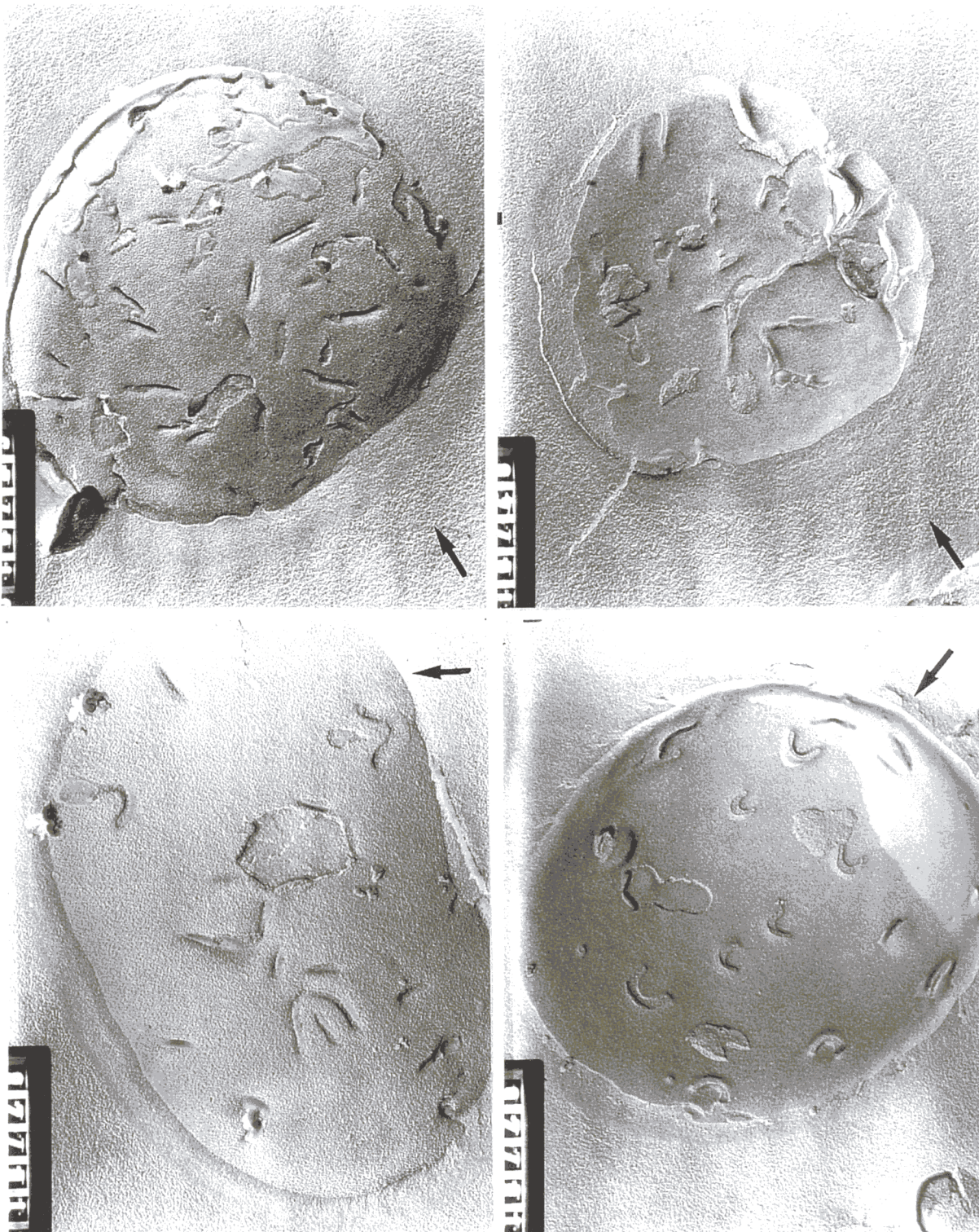


Figura 57: Estudio morfológico mediante microscopía electrónica de transmisión de la membrana plasmática de la cepa mutante TD28mj103 y de la silvestre TD28, durante su crecimiento en medio líquido YEPD a 26°C.

(A) Cara de fractura protoplásmica y (B) cara de fractura exoplásmica, de la membrana plasmática de TD28mj103. (C) Cara de fractura protoplásmica y (D) cara de fractura exoplásmica de TD28.  $1 \times 10^3$  células de la cepa mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre TD28, procedentes de cultivos en fase exponencial en YEPD a 26°C, fueron sembradas en matraces con medio líquido YEPD e incubadas a 26°C. Las alícuotas tomadas en diferentes momentos del ensayo fueron fijadas con paraformaldehído al 5,7 %, y procesadas adecuadamente para ser sometidas a un proceso de criofractura y elaboración de la réplica de la superficie fracturada (*freeze-etching*). Las flechas indican la dirección de sombreado.

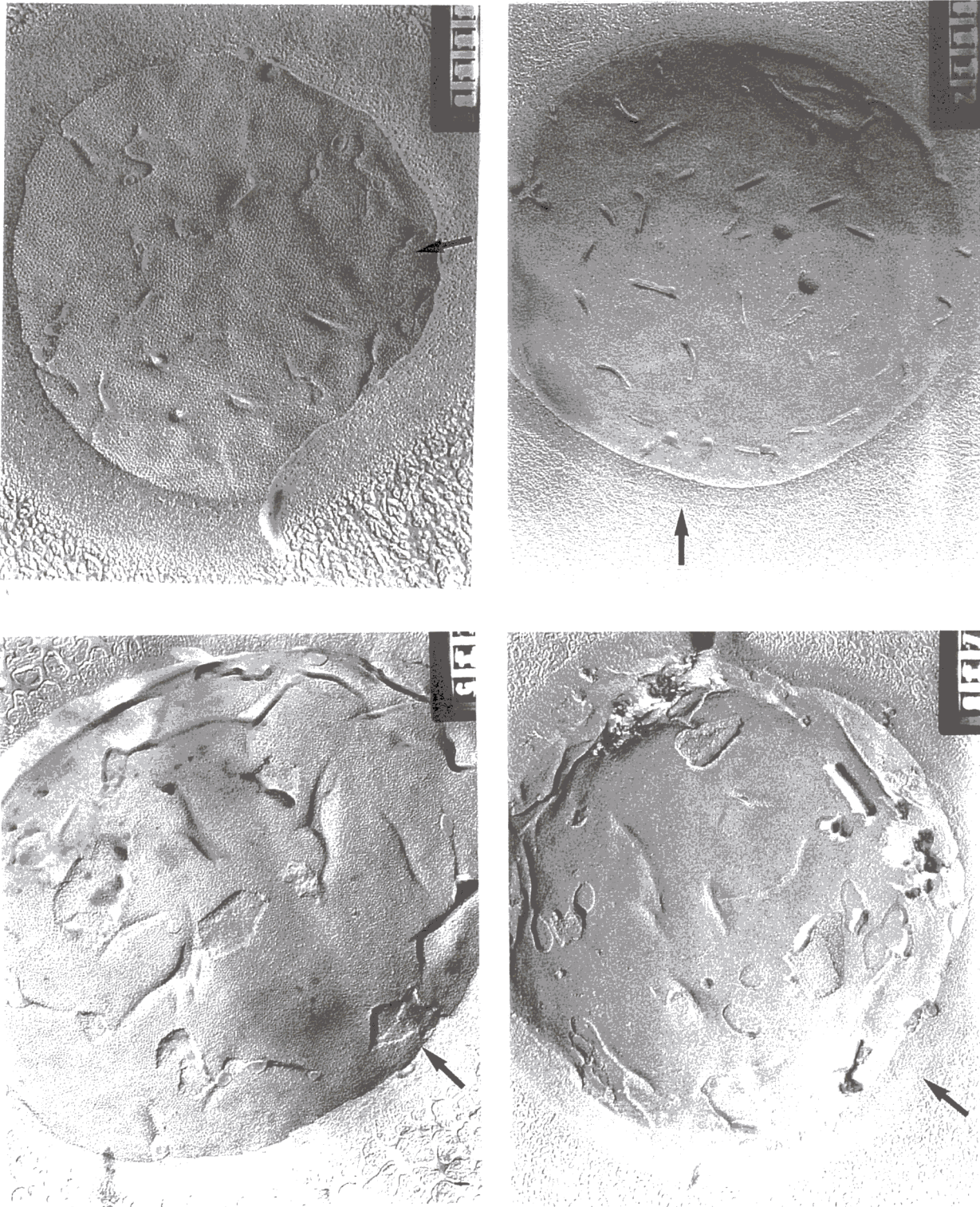


Figura 58: Estudio morfológico mediante microscopía electrónica de transmisión de la membrana plasmática de la cepa mutante TD28mj103 y de la silvestre TD28, durante su crecimiento en medio líquido YEPD a 37°C.

(A) Cara de fractura protoplásmica y (B) cara de fractura exoplásmica, de la membrana plasmática de TD28mj103. (C) Cara de fractura protoplásmica y (D) cara de fractura exoplásmica de TD28.  $1 \times 10^3$  células de la cepa mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre TD28, procedentes de cultivos en fase exponencial en YEPD a 26°C, fueron sembradas en matraces con medio líquido YEPD e incubadas a 37°C. Se tomaron muestras en diferentes momentos del ensayo y se trataron como se indica en la figura 57. Las flechas indican la dirección de sombreado.

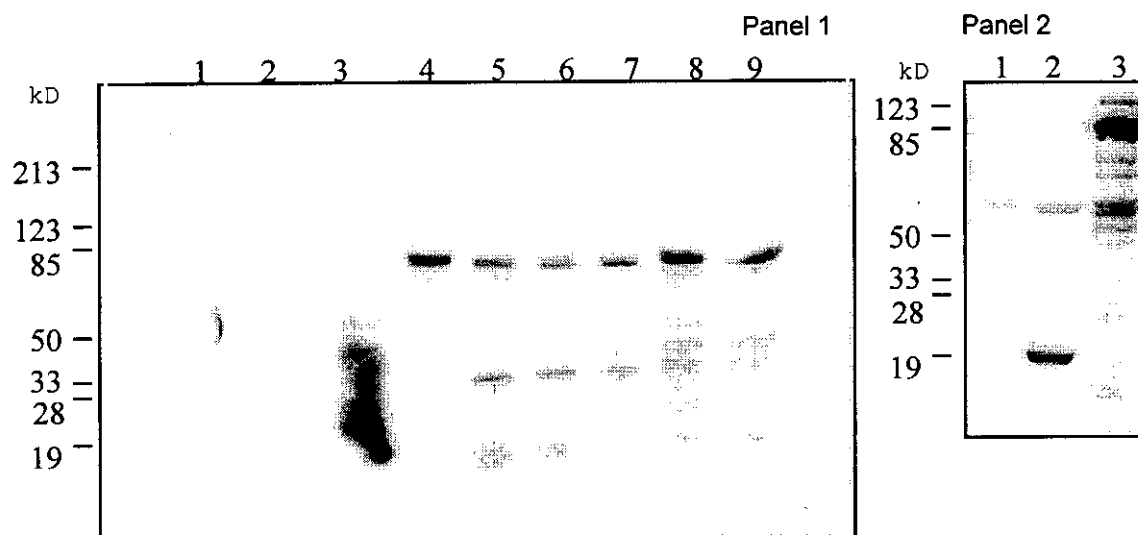


Figura 59: Análisis mediante *Western blot* de la producción de la proteína de fusión C-LYTA-Ypl007cp en *E. coli* y en *S. cerevisiae*. Muestras equivalentes de extractos celulares obtenidos a partir de cultivos de *E. coli* (panel 1) y *S. cerevisiae* (panel 2) se fraccionaron en un gel de poliacrilamida del 10%, se transfirieron a nitrocelulosa y revelaron con anticuerpos policlonales frente al dominio C-LYTA. Las flechas indican la localización de la proteína de fusión de 83 kD. Panel 1: Carriles 1 y 2: controles negativos (*E. coli* transformado con pT7-3 crecido en medio M9 y LB respectivamente). Carril 3: control positivo (*E. coli* transformado con pT7C crecido en M9). Carriles 4 y 5: *E. coli* transformado con pT7CYPL crecido en M9 y LB, respectivamente, tras 150 min de la inducción con IPTG. Carriles 6 y 7: dos clones de *E. coli* transformado con pT7CYPL crecido en M9 tras 240 min de la inducción con IPTG. Carriles 8 y 9: dos clones de *E. coli* transformado con pT7CYPL crecido en LB tras 240 min de la inducción con IPTG. Panel 2: Carril 1: control negativo (*S. cerevisiae* transformado con el vector YEpPGK2). Carril 2: control positivo (*S. cerevisiae* transformado con el vector YEpPGK2). Carril 3: *S. cerevisiae* transformado con el vector de expresión YEpPGKCYPL. En todos los casos las muestras procedían de cultivos en YEPD a 28°C en fase exponencial, inoculados a partir de cultivos exponenciales en medio selectivo.



## V. DISCUSIÓN

### BÚSQUEDA DE NUEVAS DIANAS ANTIFÚNGICAS MEDIANTE EL ESTUDIO DE MUTANTES CONDICIONALES

El reciente incremento de las infecciones fúngicas como resultado de una mayor aplicación de las prácticas médicas de carácter invasivo, y el aumento de la población que padece alteraciones en el sistema inmunitario (Fridkin y Jarvis, 1996), junto con la aparición de cepas resistentes a los antifúngicos disponibles en el mercado (Odds, 1993; Odds, 1996), ha puesto de manifiesto la necesidad de buscar alternativas para el tratamiento de las infecciones provocadas por hongos (Hay, 1993; Graybill, 1996). Por este motivo, los laboratorios farmacéuticos han desarrollado diversas aproximaciones para tratar de solventar el problema. Así, han modificado los fármacos disponibles en el mercado para generar nuevos derivados químicos con mayor actividad antifúngica, mejores características farmacocinéticas y menor toxicidad, que han permitido tratar con éxito algunas infecciones sistémicas cuya mortalidad había sido tradicionalmente elevada (Walsh *et al.*, 1996). Asimismo, intentan incrementar la actividad fungicida de los antifúngicos comercializados mediante su uso conjunto, y tratan de mejorar el sistema inmunitario del paciente utilizando sustancias como las citoquinas humanas recombinantes. Sin embargo, los mayores esfuerzos en la actualidad consisten en el descubrimiento de fármacos nuevos más potentes mediante la utilización de diferentes estrategias (Georgopapadakou y Walsh, 1996).

El presente trabajo ha tenido como objetivo la identificación de proteínas de *S. cerevisiae* que pudieran constituir nuevas dianas antifúngicas. Para ello se han buscado proteínas que cumplieran unos requisitos deseables para ser utilizadas como dianas (Kerridge y Vanden Bossche, 1990). Así se han considerado de mayor interés las proteínas esenciales de *S. cerevisiae*, que no tuvieran homólogos en humanos y que estuvieran conservadas en diferentes especies de hongos patógenos. De este modo se trataba de evitar posibles efectos secundarios provocados por la inhibición inespecífica de alguna proteína humana junto a la proteína fúngica, así como incrementar el espectro de acción de las sustancias capaces de bloquear la diana. También se ha considerado que las proteínas localizadas en la zona más externa de la célula fúngica, como pared y membrana plasmática, podrían ser más fácilmente accesibles a los compuestos inhibitorios, por lo que resultaban especialmente atractivas como dianas. Además, estas proteínas debían permitir el diseño de ensayos automatizables para analizar la posible actividad inhibitoria de un elevado número de muestras.

El desarrollo de este trabajo ha estado condicionando por la dinámica propia de la empresa *SmithKline Beecham* en la que ha sido realizado. La competencia entre las diferentes industrias farmacéuticas genera una necesidad de obtener resultados de una manera rápida, y determina por tanto, el modo en que son llevados a cabo los trabajos de investigación.

En el momento de iniciar el presente trabajo, la secuenciación del genoma de *S. cerevisiae* aún no había sido concluida. Esta situación ofrecía la posibilidad de identificar alguna proteína esencial que cumpliera los requisitos deseables para constituir una diana antifúngica y que todavía no hubiera sido descrita, y por tanto, posiblemente no estudiada por otros laboratorios farmacéuticos. Para identificar estas proteínas se consideró que la

estrategia más adecuada era la caracterización de una colección de mutantes condicionales de *S. cerevisiae*. Los mutantes seleccionados en las condiciones restrictivas, debían lisar o detener completamente su crecimiento, por lo que posiblemente estarían alterados en genes esenciales (Hampsey, 1997). Por otra parte, esta estrategia permitía la identificación de proteínas codificadas por genes aún no secuenciados.

Actualmente, la disponibilidad de la secuencia completa del genoma de *S. cerevisiae* (Oliver, 1997; Mewes, *et al.*, 1997) y el desarrollo del proyecto del análisis funcional del genoma de *S. cerevisiae*, denominado EUROFAN (Oliver, 1996a; Oliver, 1996b), permiten una selección de dianas basada en criterios estrictamente racionales. Sin embargo, esta posibilidad no reduce el interés de la aproximación llevada a cabo como una forma rápida y directa de identificar genes esenciales y dianas potencialmente novedosas.

### **Obtención y caracterización de una colección de mutantes condicionales**

La obtención de una colección de mutantes condicionales numerosa y variada ha sido la primera etapa del proceso de búsqueda de genes esenciales que pudieran constituir nuevas dianas antifúngicas. Para ello se han utilizado diversos agentes mutagénicos físicos y químicos, con la intención de diversificar los genes alterados, ya que algunos agentes mutagénicos suelen presentar una mayor tendencia a mutar regiones concretas del genoma (Kohalmi y Kunz, 1988). Todos los agentes mutagénicos han sido utilizados de manera que se ha tratado de evitar la generación de varias mutaciones en el mismo mutante, que pudieran dificultar su estudio posterior (Pingle, 1975).

Se han intentado aislar mutantes alterados en cualquiera de las rutas metabólicas esenciales para la viabilidad celular, para lo que se han identificado mutantes incapaces de crecer a 37°C (termosensibles) y a 26°C (termodependientes). Asimismo, se ha tratado de recuperar mutantes alterados en rutas metabólicas no existentes en mamíferos, como la síntesis y control de la pared celular, mediante la selección de aquellos clones que requerían sorbitol para crecer, o que por el contrario, eran sensibles a este compuesto (Hampsey, 1997). También se han buscado mutantes alterados en otros procesos metabólicos diferentes de los que tienen lugar en células de mamíferos, como es la síntesis del ergosterol, mediante el estudio de los clones que requerían suplementos lipídicos exógenos para proliferar. La selección de mutantes criosensibles ha sido desestimada debido a que el lento crecimiento de las levaduras a bajas temperaturas hubiera ralentizado excesivamente el trabajo (Hampsey, 1997). Con esta diversidad de las condiciones de selección se ha pretendido incrementar la variedad de los mutantes alterados en genes diferentes (Harris *et al.*, 1992).

En total se han aislado 297 mutantes condicionales procedentes de 168.541 colonias analizadas. El primer estudio de su fenotipo, realizado en medio sólido, ha permitido clasificarlos en seis grupos distintos (tabla 8). Un análisis posterior en medio líquido, que ha permitido analizar de modo más preciso su comportamiento, tanto por las condiciones experimentales de trabajo como por los procesos de cuantificación que pueden realizarse, ha revelado que la mayoría de los mutantes tienen un fenotipo similar al observado en medio sólido. Sin embargo, en estos últimos ensayos se ha identificado un nuevo grupo fenotípico integrado por cepas sensibles a sorbitol 0,9 M a 26°C y termosensibles a 37°C (tabla 10). Los mutantes de este nuevo grupo se comportan en medio sólido como termosensibles y, a diferencia de lo ocurrido en medio líquido, son capaces de crecer en el medio sólido suplementado con sorbitol 0,9 M a 26°C. Este resultado parece sugerir que la

concentración de sorbitol necesaria para que la cepa muestre su sensibilidad osmótica, es superior en medio sólido que en medio líquido.

Los estudios en medio líquido han permitido detectar diferencias en el comportamiento de los mutantes en las condiciones permisivas analizadas, de manera que mientras unos crecen de modo similar al de la cepa parental silvestre, otros tienen una tasa de crecimiento menor. Además, el estudio de la viabilidad de los mutantes en las condiciones analizadas, ha permitido diferenciar las cepas que mueren en las condiciones restrictivas de las que detienen su crecimiento en las mismas condiciones. La lisis observada en algunos mutantes podría indicar un posible efecto fungicida de los compuestos capaces de inhibir el funcionamiento de las proteínas que se encuentran alteradas en estos mutantes, mientras que la detención del crecimiento, supondría un posible efecto fungiestático de estos compuestos. La terapia con fármacos fungicidas es más efectiva que con aquellos que tienen actividad fungiestática (Kerridge y Vanden Bossche, 1990), por lo que los mutantes líticos en condiciones selectivas han sido considerados los de mayor interés para la búsqueda de nuevas dianas. Sin embargo, la posibilidad de que este fenotipo pueda estar originado por mutaciones en varios genes, ha llevado a considerar otros criterios para establecer prioridades en cuanto al interés de los mutantes obtenidos, tratando de seleccionar clones mutados en un único gen.

La evaluación del fenotipo de los mutantes en relación con los agentes mutagénicos que los han generado (tabla 9), ha puesto de manifiesto la eficacia de la luz UV para generar mutantes condicionales de los 7 fenotipos identificados, y por tanto, posiblemente alterados en genes diferentes. Así el 0,38% de las células sometidas a procesos mutagénicos con la luz UV, han sido identificadas como mutantes condicionales, mientras que sólo han sido consideradas como tales el 0,1% de las células tratadas con NG, EMS, AN y sometidas a procesos repetidos de congelación y descongelación. La eficacia de la NG para generar mutantes condicionales no ha destacado sobre el resto de los agentes químicos utilizados, a pesar de haber sido descrita como el agente químico mutagénico más potente (Pringle, 1975). Este comportamiento podría ser debido a varios factores. Por un lado, su tendencia a producir diversas mutaciones génicas en una región pequeña del cromosoma, podrían dificultar el aislamiento de los mutantes generados (Pringle, 1975). Por otra parte, este agente, al igual que el EMS, ha sido utilizado en este trabajo en algunos procesos mutagénicos con niveles de mortalidad inferiores al resto de los otros agentes, y por tanto, con menor probabilidad de generar mutantes condicionales. Por este motivo la eficacia de los agentes mutagénicos EMS y NG probablemente posea unos valores ligeramente inferiores respecto al resto de los agentes empleados.

La mayoría de los mutantes de los diferentes fenotipos identificados han sido generados con luz UV, exceptuando los mutantes termosensibles y dependientes de sorbitol que se obtuvieron mayoritariamente con EMS y NG (figura 15). Este resultado podría ser la consecuencia de una predisposición de algunos mutágenos para originar cepas con fenotipos determinados, probablemente como consecuencia de su mayor afinidad por algunas regiones del genoma (Kohalmi y Kunz, 1988).

El 0,12% de los 168.541 clones analizados, ha mostrado termosensibilidad a 37°C. Este valor es similar al obtenido por otros investigadores en su aislamiento de mutantes termosensibles alterados en un solo gen (Hartwell, 1967; Lacroute, 1967; Klyce y McLaughlin, 1973), por lo que se ha considerado que los procesos mutagénicos se habían realizado correctamente y por tanto existía una elevada probabilidad de haber obtenido mutantes con una única mutación.

La estabilidad de las mutaciones generadas en los mutantes condicionales, ha sido analizada con la intención de identificar aquellos mutantes que no revertieran la mutación o lo hicieran con una frecuencia muy baja, facilitando así su caracterización genética. Aproximadamente las dos terceras partes de los mutantes analizados han mostrado una tasa de reversión inferior a  $1 \times 10^{-7}$ , que ha sido considerado como el máximo permitido para los mutantes que iban a ser analizados en este trabajo. Todos los mutantes estudiados que presentaban dependencia o sensibilidad a sorbitol han mostrado una tasa de reversión superior a  $1 \times 10^{-7}$ , mientras que la mayoría de los mutantes termosensibles y la mitad de los termodependientes evaluados, han tenido unas tasas de reversión inferiores. No se ha podido establecer una relación entre la frecuencia de reversión de la mutación y el agente mutagénico empleado, ya que todos los mutantes estudiados, tanto los que han excedido el máximo de reversión, como aquellos cuyo estudio ha sido priorizado por poseer una tasa de reversión inferior a  $5 \times 10^{-7}$ , proceden de tratamientos con diferentes agentes mutagénicos (tabla 11).

Todos los mutantes analizados han mantenido su fenotipo condicional independientemente del número de células que constituyeran el inóculo del cultivo. El aspecto morfológico de los diferentes mutantes ha sido muy diverso, de modo que algunos clones presentan una morfología similar a la de la cepa silvestre mientras que en otros se han detectado grandes alteraciones, incluso en condiciones permisivas. En general, los mutantes con alteraciones morfológicas importantes presentan una disminución significativa del crecimiento a la temperatura permisiva con respecto a la cepa silvestre. La posibilidad de que este comportamiento sea la consecuencia de una alteración en otros genes además del que confiere termosensibilidad al mutante (Pringle, 1975), ha motivado que estos clones no hayan sido incluidos en el grupo de mutantes de interés prioritario para el desarrollo de este trabajo.

Todos los análisis fenotípicos anteriormente mencionados, han permitido seleccionar 47 mutantes termosensibles y 3 mutantes termodependientes para ser caracterizados genéticamente. Estas cepas poseen una mutación estable que les provoca la muerte a temperatura restrictiva, y tanto su morfología como su comportamiento en condiciones permisivas son bastante similares a los de la cepa silvestre.

La identificación de los genes alterados en los mutantes condicionales seleccionados se ha realizado mediante la complementación fenotípica con dos genotecas diferentes de *S. cerevisiae* y el posterior análisis de los clones complementados. El cruce de los mutantes con especies silvestres, para conseguir que poseyeran una única mutación antes de ser transformados con las genotecas, no ha sido considerado imprescindible para llevar a cabo el objetivo de este trabajo por diferentes razones. Por una parte, la dinámica de trabajo establecida en la empresa, requiere obtener resultados de manera rápida. Por otra parte, los procesos mutagénicos y la caracterización fenotípica posterior de los mutantes, han tratado de generar y seleccionar respectivamente, aquellos que están alterados en un único gen, por lo que deberían ser complementados fácilmente. Los ensayos preliminares de transformación con genotecas, han mostrado que la mayoría de los mutantes generan transformantes, con lo que se confirma la validez de esta aproximación. Además, el estudio de mutantes que tengan un fenotipo letal como consecuencia de la mutación de dos genes no esenciales, podría llevar al desarrollo de dobles dianas antifúngicas, ya que se trataría de proteínas que inhibidas conjuntamente provocarían la muerte celular. Todas estas consideraciones, han motivado que el estudio genético se haya realizado directamente en los mutantes seleccionados, permitiendo el análisis de un número superior de clones que si se hubiera realizado una limpieza previa.

La complementación fenotípica del 86% de los mutantes estudiados con la genoteca de *S. cerevisiae* clonada en el vector centromérico YCp50, podría indicar que estos mutantes han sido transformados con el único gen que tenían alterado, o con uno de los genes directamente relacionado con su proliferación celular, en el caso de que tuvieran mutaciones en varios genes no esenciales. Se ha considerado que aquellos mutantes que no han sido complementados fenotípicamente, entre ellos los tres termodependientes analizados, podrían estar alterados en varios genes esenciales, confirmando así el bajo porcentaje de estos mutantes que han superado los procesos de selección previa a la caracterización genética. La posibilidad de que el gen que permite la proliferación del transformante en condiciones restrictivas actuara como un supresor, ha sido considerada *a priori* pequeña por estar clonado en un vector centromérico.

La agrupación de los mutantes en “grupos de complementación” dependiendo de la capacidad que tienen para generar transformantes con el mismo plásmido, ha tratado de identificar los mutantes que podrían estar alterados en el mismo gen. Estos ensayos han permitido identificar un gen como el responsable de la complementación fenotípica de 7 mutantes termosensibles, mientras que el resto de los clones han sido complementados por genes distintos.

En este trabajo se han clonado 7 genes, de los cuales, al menos, 5 son esenciales para *S. cerevisiae*, uno (*MTF1*) no es esencial, y la importancia del gen *HSP30* para la viabilidad de esta levadura todavía no ha sido determinada (tabla 19). La clonación de los genes *YPL007C*, *MPS1*, *CDC68*, *TAF<sub>II</sub>145*, y *PRP19* supone, por un lado, el logro de la primera parte de los objetivos marcados en cuanto a la clonación de genes esenciales cuyo interés como dianas terapéuticas debería ser posteriormente analizado. Por otro lado, uno de los genes clonados, el *YPL007C* es un gen que no había sido caracterizado con anterioridad e incluso carecía de denominación, aunque ha sido posteriormente designado durante el proyecto de secuenciación del genoma de *S. cerevisiae*, con la nomenclatura establecida. Esta clonación resalta el éxito de la aproximación utilizada, que entre otras razones había sido elegida por la posibilidad de identificar genes que aún no habían sido secuenciados.

La proteína Hsp30p, posee unas características, que como se explicará más adelante, podrían conferirle una actividad protectora frente a alteraciones proteicas diversas (Panaretou y Piper, 1992; Regnacq y Boucherie, 1993). Esta característica le permitiría actuar como supresor de mutaciones en diferentes genes en los 7 mutantes cuyo fenotipo termosensible es capaz de complementar (tabla 19). También el *MTF1* podría estar actuando como supresor de otra mutación, ya que, como se comentará posteriormente, ha sido descrito como gen no esencial para *S. cerevisiae* (Lisowsky y Michaelis, 1988).

### **Evaluación del interés de las proteínas identificadas como posibles dianas antifúngicas**

La evaluación de las proteínas identificadas, para seleccionar aquellas que parecían más interesantes *a priori* y en cuyo estudio se iba a centrar el resto del trabajo, se ha realizado mediante un análisis de los trabajos publicados de cada una de ellas, tratando de conocer si poseen las características deseables para constituir buenas dianas antifúngicas. Si bien todas las proteínas tienen algunas propiedades que les confieren interés suficiente como para continuar su estudio, se ha llevado a cabo una selección utilizando como

criterios las características que se consideran más importantes para las dianas antifúngicas. Así se ha destacado el interés de las proteínas esenciales para *S. cerevisiae* frente a las no esenciales como Mtf1p, ya que si bien en ocasiones no es necesario que el antifúngico destruya al hongo y resulta suficiente la detención de su crecimiento para el control de la infección, la terapia fungicida es necesaria para el tratamiento de pacientes inmunodeprimidos (Fridkin y Jarvis, 1996). También se ha considerado prioritario el estudio de aquellas proteínas que carecen de homólogos conocidos en mamíferos, frente a aquellas que muestran similitud con proteínas humanas ya descritas como TAF<sub>II</sub>145, ya que parece más probable la identificación de inhibidores fúngicos selectivos.

La proteína Mps1p ha sido la proteína que mejor se adaptaba *a priori* a los criterios anteriores, ya que además de ser una proteína esencial, carece de proteínas muy similares en humanos, y su actividad serín-treonín-tirosín quinasa ya caracterizada, permite diseñar ensayos de inhibición *in vitro* (Poch *et al.*, 1994; Lauzé *et al.*, 1995).

La proteína Ypl007cp también ha sido seleccionada como proteína de interés, ya que no ha sido caracterizada anteriormente, y por tanto ofrece la posibilidad de constituir una diana antifúngica novedosa. Además, su estudio permitiría profundizar en el conocimiento del metabolismo y fisiología de *S. cerevisiae*.

La selección de las proteínas Mps1p e Ypl007cp ha motivado que el estudio del resto de las proteínas identificadas no haya podido ser realizado en este trabajo, aunque algunas de ellas poseen unas características que les confieren cierto interés como diana antifúngica. Por este motivo se considera que el análisis previo realizado en este trabajo, debería servir para estimular la continuación de su estudio en el futuro.

### **La proteína Hsp30p como diana antifúngica**

La proteína de respuesta a estrés térmico Hsp30p ha sido la proteína responsable de la complementación del fenotipo termosensible de los 7 mutantes termosensibles pertenecientes al mismo “grupo de complementación” (tabla 19). La posibilidad de que todos estos mutantes posean una alteración en el mismo gen ha sido considerada poco probable, ya que han sido generados con agentes mutagénicos distintos y se desconoce la existencia de regiones del genoma de *S. cerevisiae* tan altamente susceptibles de ser mutadas. Por este motivo se ha considerado que la proteína Hsp30p podría estar suprimiendo mutaciones en diferentes genes esenciales en cada uno de los mutantes, o por el contrario, podría suprimir la mutación de alguno de los genes no esenciales alterados en los mutantes cuyo fenotipo letal es la consecuencia de la mutación conjunta de varios genes de este tipo. Esta hipótesis podría estar justificada por el conocimiento de que la Hsp30p, al igual que el resto de las proteínas de respuesta a estrés térmico (HSP), posee una función general protectora y reparadora de los daños originados por condiciones ambientales adversas (Mager y Moradas Ferreira, 1993; Piper 1993; Piper 1995). Así, las células de *S. cerevisiae* sometidas a situaciones de estrés por calor y etanol, y al comienzo de su entrada en fase estacionaria, hiperproducen la Hsp30p (Panaretou y Piper, 1992; Regnacq y Boucherie, 1993). Esta proteína está constituida por 332 aminoácidos, es muy hidrófoba, posee 7 dominios transmembranales y se encuentra fuertemente asociada a la membrana celular, siendo posiblemente, una proteína integrante de ella (Panaretou y Piper, 1992). Su actividad no está claramente establecida, pero se le atribuye un papel importante en el mantenimiento de la funcionalidad de la membrana plasmática, compensando las posibles alteraciones originadas como consecuencia de la modificación de la composición lipídica y

proteica, y de las variaciones de las actividades de algunas enzimas asociadas a ella, como la H<sup>+</sup>ATPasa, (Panaretou y Piper, 1992; Regnacq y Boucherie, 1993; Piper 1995). De este modo sería razonable la posibilidad de que los mutantes termosensibles integrantes de este grupo, poseyeran mutaciones en diferentes genes, que de manera directa o indirecta provocaran alteraciones a nivel de la membrana plasmática, y que la Hsp30p fuera capaz de compensarlas permitiendo así la proliferación celular a la temperatura restrictiva.

Independientemente de que la proteína Hsp30p pudiera suprimir mutaciones en otros genes, se ha realizado el estudio de la información disponible sobre ella tratando de conocer si cumple las características deseables para constituir una diana antifúngica. Esta información no permite conocer si es una proteína esencial para *S. cerevisiae*, y por tanto, la evaluación de esta proteína como diana antifúngica únicamente puede realizarse de manera limitada, hasta que sea demostrada su importancia para la viabilidad celular. No obstante, en este trabajo se han analizado otras características de Hsp30p que podrían incrementar o disminuir su interés como diana antifúngica, en el caso de que se verificara su esencialidad para *S. cerevisiae*. La ausencia de homologías conocidas con otras proteínas de mamíferos descritas hasta el momento, a pesar de que en general son proteínas muy conservadas (Craig, 1992), junto con su fácil accesibilidad, por estar localizada a nivel de membrana plasmática (Panaretou y Piper, 1992), son características adecuadas para las dianas antifúngicas. Así, otras proteínas de *S. cerevisiae*, con características diferentes a las proteínas humanas y también localizadas en la membrana plasmática de *S. cerevisiae*, como la H<sup>+</sup>ATPasa (Monk y Perlin, 1994; Monk *et al.*, 1995) y las proteínas implicadas en la excreción de compuestos intracelulares (Georgopapadaku, 1996), están siendo evaluadas como posibles dianas antifúngicas, ya que suelen ser proteínas de fácil acceso para diferentes compuestos con actividad inhibitoria y que en muchos casos son esenciales para la célula.

En conclusión con el análisis anterior, el carácter esencial de la proteína y su fácil accesibilidad, han permitido considerar la posibilidad de que esta proteína pueda constituir una diana antifúngica adecuada si se llega a verificar su esencialidad.

### **La proteína Cdc68p como diana antifúngica**

La proteína Cdc68p, identificada a partir de la complementación del fenotipo termosensible del mutante MJ239, ha sido relacionada con los procesos de replicación y transcripción del DNA. Esta proteína está constituida por 1035 aminoácidos y posee un dominio C-terminal rico en serinas y en aminoácidos de carácter ácido, posiblemente esencial para su funcionalidad. El gen *CDC68* fue descrito por primera vez por Prendergast *et al* (1990) como un gen requerido para el paso por el punto START del ciclo celular. Posteriormente Malone *et al.* (1991) clonaron este gen como un supresor de mutaciones insercionales tipo  $\delta$  en las regiones 5' de los genes *HIS4* y *LYS2* cuando se encontraba en elevado número de copias. Recientemente se ha demostrado su interacción con la subunidad catalítica de la DNA polimerasa  $\alpha$  (Pol 1), así como con la proteína Pob3p, que ha sido relacionada con el control de la estructura de la cromatina y con la replicación y transcripción del DNA (Wittmeyer y Formosa, 1997). Esta interacción podría sugerir la participación de la proteína Cdc68p en la replicación del material genético, atribuyéndosele una actividad facilitadora del acceso de la Pol1 hasta el lugar de comienzo de la replicación del DNA (Wittmeyer y Formosa, 1997). Por otra parte y como consecuencia de que los procesos de inicio de replicación y transcripción del DNA son procesos que poseen componentes y características similares (Guarente, 1992), es posible que algunas enzimas

que participen en el primer proceso también estén implicadas en el segundo. De este modo podría justificarse la actuación de la proteína Cdc68p como activadora y represora transcripcional que ha sido observada por diversos investigadores (Malone *et al.*, 1991; Rowley *et al.*, 1991). Así la capacidad de Cdc68p para activar la transcripción de diversos genes como *SWI4*, *SWI16*, *ACT1*, *LEU2*, *CLN1*, *CLN2* y *CLN3* (Malone *et al.*, 1991; Rowley *et al.*, 1991), podría ser la consecuencia de su actividad como proteína que facilita el acceso de la maquinaria necesaria hasta el lugar de inicio de la transcripción, posiblemente mediante modificaciones en la estructura de la cromatina (Xu *et al.*, 1993). Además, su actuación como activador ácido también podría ser debida a la interacción con otros factores activadores proteicos capaces de unirse al DNA, ya que en Cdc68p no se han identificado dichos dominios (Rowley *et al.*, 1991). Por otro lado, su participación en la represión de otros genes como *HSP82* (Rowley *et al.*, 1991), podría ser la consecuencia de su interacción por su dominio ácido C-terminal, con el extremo básico amino terminal de las histonas, manteniendo la conformación de la cromatina en un estado inactivo (Rowley *et al.*, 1991; Winston y Carlson, 1992).

La evaluación de la proteína Cdc68p como diana antifúngica, se ha realizado mediante el estudio de la información disponible, para averiguar si posee las características deseables para estas proteínas, y que ya han sido comentados con anterioridad. El papel esencial de la proteína Cdc68p para *S. cerevisiae*, demostrada por Malone *et al.* (1991) mediante la interrupción del gen *CDC68* y el posterior análisis del fenotipo de las células mutantes, es la característica básica y fundamental que ha llevado a considerar a esta proteína como posible diana antifúngica. La ausencia de homología con las secuencias de células de mamíferos presentes en las bases de datos, mantiene abierta la posibilidad de que existan características diferenciales importantes entre esta proteína y las de humanos, y por tanto, la posibilidad de inhibir selectivamente la proteína fúngica. Sin embargo, este dato debe considerarse de modo provisional y susceptible de ser modificado durante el tiempo que transcurra hasta la completa secuenciación del genoma humano, ya que, además de que el proceso de replicación del DNA es un proceso conservado entre las diferentes especies eucarióticas, en el que participan de manera universal proteínas con actividades similares, se han encontrado similitudes en las secuencias aminoácidas de algunas de ellas (Gavin *et al.*, 1995). Del mismo modo, la ausencia hasta la fecha de proteínas similares en otros hongos patógenos, no excluye su existencia, ya que sólo una pequeña parte de su genoma está secuenciado (Dunn-Coleman y Prade, 1998). La localización nuclear de la proteína (Xu, 1995), la convierte en una proteína de acceso más difícil que si se tratara de una proteína de pared o de membrana plasmática, que suelen ser las más fácilmente alcanzadas por sus inhibidores, y por tanto, suelen ser preferidas como dianas (Kerridge y Vanden Bossche, 1990). Sin embargo, la existencia de fármacos comercializados que actúan sobre otras enzimas nucleares, sugiere la posible utilización de esta proteína como diana para fármacos antifúngicos. Así algunos agentes antitumorales inhiben las topoisomerasas I y II, que al igual que Cdc68p participan en el proceso de duplicación del DNA (Cummings y Smyth, 1993; Charcosset *et al.*, 1993), y antifúngicos como la 5-FC y la griseofulvina también tienen dianas nucleares (Georgopapadaku, 1996). La aparente toxicidad selectiva de algunos compuestos frente a la topoisomerasa II fúngica (Jackson *et al.*, 1992) sugiere la existencia de diferencias entre las proteínas que participan en la duplicación génica de las diferentes células eucarióticas, a pesar de que se trata de un proceso conservado y de que poseen cierta similitud en su secuencia aminoácida (Toyn *et al.*, 1995). Por este motivo, parece posible la inhibición específica de las enzimas de algunas especies fúngicas sin actuar sobre las células humanas. Por otra parte, se ha demostrado la existencia de diferencias en los procesos de duplicación del

DNA entre las células de levaduras y las células humanas, ya que a pesar de que el DNA de levaduras puede replicarse en células de mamíferos, éstas no poseen un control sobre el lugar de iniciación de su replicación (Tran *et al.*, 1993). La participación de la proteína Cdc68p en la iniciación de la replicación del DNA, sugerida a partir de la verificación de su interacción con Pol1p (Wittmeyer y Formosa, 1997), podría corresponder a este proceso diferencial entre humanos y levaduras, ofreciendo así la posibilidad de una inhibición selectiva sin provocar efectos secundarios importantes.

El carácter esencial de la proteína Cdc68p y el desconocimiento, hasta la fecha, de proteínas homólogas en humanos, permiten mantener su interés para la realización de estudios futuros.

### **El factor TAF<sub>II</sub>145 como diana antifúngica**

El factor TAF<sub>II</sub>145, responsable de la complementación del fenotipo termosensible del mutante MJ39, posee un papel reconocido en los procesos de transcripción. Esta proteína está constituida por 1066 aminoácidos, forma parte del complejo proteico TFIID, que es el primer factor general de la transcripción (GTF), que se ensambla al promotor del gen a transcribir. El TFIID está integrado por una proteína de unión a la caja TATA denominada TBP (TATA Binding Protein), y un conjunto de polipéptidos asociados, denominados factores activadores de la transcripción (TAFs), entre los que destaca el TAF<sub>II</sub>145 por ser capaz de unirse directamente a la proteína TBP. Los TAFs no son requeridos para la transcripción basal, pero son necesarios para obtener un nivel elevado de transcripción en respuesta a proteínas activadoras (Pugh y Tijan 1992; Hernández 1993). Recientemente se les ha atribuido una labor de reconocimiento del sitio de inicio de la transcripción en aquellos genes de levaduras que carezcan de caja TATA (Hampsey y Reinberg, 1997).

La valoración del factor TAF<sub>II</sub>145 como posible diana antifúngica se ha realizado teniendo en cuenta las características ya comentadas. El factor TAF<sub>II</sub>145 es un factor esencial para *S. cerevisiae* (Reese *et al.*, 1994), por lo que presenta, al menos *a priori*, interés como diana antifúngica. La existencia de una similitud entre su secuencia aminoacídica y las proteínas TAF<sub>II</sub>240 de humanos, del 65% entre los extremos N-terminales y del 60% entre los dominios centrales (Reese *et al.*, 1994; Bai *et al.*, 1997), sugiere la existencia de características similares entre ambas proteínas. Esta similitud entre los factores implicados en la transcripción génica de diferentes especies eucarióticas no resulta inesperado, ya que es conocida la conservación de los procesos de transcripción entre las células de levaduras y de mamíferos, incluyendo tanto los elementos básicos necesarios para el proceso, como la presencia de proteínas capaces de activar y reprimir la expresión de determinados genes (Guarente, 1992). Además, la demostrada capacidad del TAF<sub>II</sub>145 de levaduras para unirse directamente a la TBP humana (Reese *et al.*, 1994), junto a la verificada unión del dominio funcional C-terminal de la proteína TBP de levaduras con los TAFs humanos (Zhou y Berk, 1995), hace muy probable que los TAFs de levaduras sean estructural y funcionalmente similares a los humanos. También se ha demostrado la existencia de una homología funcional entre otras proteínas implicadas en este proceso, como la proteína TBP de *S. cerevisiae* que es capaz de substituir a la fracción TFIID que contiene la TBP humana de las células HeLa (Buratowski *et al.* 1988; Cavallini *et al.* 1988).

Como consecuencia de esta homología con las células humanas y la conservación de los mecanismos en los que participa, el factor TAF<sub>II</sub>145 no ha sido considerado como una proteína de interés prioritario durante el desarrollo del trabajo. Sin embargo, su posible utilización como diana antifúngica no puede ser excluida, ya que a pesar de que la similitud proteica pudiera dificultar la identificación de compuestos capaces de realizar una inhibición selectiva de la enzima fúngica, la existencia de diferencias entre las proteínas homólogas podría ser suficiente para conseguir una inhibición específica de una de ellas. Así, la proteína RNA polimerasa II de levaduras posee similitud con la humana a nivel de su secuencia aminoacídica pero no puede sustituirla en un sistema de transcripción *in vitro*, por lo que poseen características diferentes. Además, la proteína fúngica presenta una sensibilidad 100 veces inferior a la  $\alpha$ -amanitina de la *Amanita phalloides* que su homólogo en mamíferos (Thuriaux y Sentenac, 1992). Asimismo, y aunque se carece de información relativa a la inhibición selectiva de los factores TAFs, la existencia de regiones poco conservadas, como el dominio C-terminal del factor TAF<sub>II</sub>145, sugiere la posible inhibición selectiva de esta proteína mediante sustancias que interaccionen a este nivel (Reese *et al.*, 1994). Por otra parte, a pesar de que el factor TAF<sub>II</sub>145 se localiza a nivel nuclear, sería posible su inhibición, como se ha comentado con anterioridad. De este modo queda abierta la puerta a estudios futuros que permitan determinar su utilización como diana antifúngica.

### La proteína Prp19p como diana antifúngica

La proteína Prp19p, responsable de la complementación del fenotipo termosensible del mutante MJ69, posee un papel esencial en el proceso de maduración del pre-mRNA (*splicing*). Esta proteína de 503 aminoácidos fue descrita por Cheng *et al.* (1993) como una proteína esencial para la proliferación celular, que estaba fuertemente asociada a un complejo de proteínas, de RNA de pequeño tamaño (snRNA) y de pre-mRNA, denominado *spliceosome*. A este nivel, tiene lugar el proceso de maduración del pre-mRNA en el que se eliminan sus intrones. Recientemente la proteína Prp19p también ha sido relacionada con los mecanismos de reparación del DNA dañado (Grey *et al.*, 1996). La función de la Prp19p no está claramente definida, ya que carece de motivos característicos en su secuencia proteica. Sin embargo, le ha sido atribuida una función similar a las RNA helicasas durante el proceso de maduración del pre-mRNA, ya que su unión al *spliceosome* tiene lugar después de la aparente separación del U4 snRNA del U6 snRNA (Tarn, 1993a; Tarn, 1993b), momento en el que el pre-mRNA es sometido a numerosas reorganizaciones espaciales.

La búsqueda de secuencias homólogas a Prp19p en las bases de datos, no ha permitido identificar hasta el momento ninguna proteína con una secuencia aminoacídica similar, a pesar de que el proceso de maduración del pre-mRNA mantiene un mecanismo general conservado entre las diferentes células eucarióticas. Este resultado sugiere la posibilidad de que podría tratarse de una proteína con características diferenciales de sus homólogas en otras células de mamíferos, aunque esta posibilidad no puede ser confirmada hasta no haya concluido la secuenciación del DNA de otras células eucarióticas.

El análisis del proceso de maduración del pre-mRNA en las levaduras, en los metazoos y en los mamíferos ha mostrado poseer características similares (Rymond y Rosbash, 1992; Newman, 1994), e incluso se han identificado homólogos en humanos de alguno de los numerosos factores proteicos y RNAs que participan en el proceso en estas especies (Newman, 1994). Sin embargo, generalmente existe una pequeña semejanza a nivel de la secuencia primaria entre los factores que realizan funciones similares en

levaduras y mamíferos, como son los snRNA U1, U2, U4 y U5, y las Prps de levaduras Prp9, Prp11 y Prp21 (Guthrie, 1988; Newman, 1994), por lo que probablemente sería posible la inhibición selectiva de algunas de ellas. Por otra parte, y aunque el mecanismo general del proceso se mantiene conservado, se ha verificado la existencia de características diferenciales entre el proceso ocurrido en levaduras y en mamíferos. Así la mayoría de los intrones de *S. cerevisiae*, no pueden ser procesados en células HeLa, o lo hacen de una manera diferente (Ruskin *et al.*, 1986). Por tanto, parece posible la existencia de proteínas exclusivas de levaduras o de hongos, o cuyas características diferenciales permitieran su inhibición selectiva, aunque hasta el momento se carece de información relativa a la utilización de alguna de las proteínas que participan en la maduración del pre-mRNA como diana antifúngica. Por otra parte, aunque la localización de esta proteína no ha sido concretada, la posibilidad de que se sitúe en el citoplasma celular además de en el núcleo, al igual que otras proteínas implicadas en este proceso (Lin, 1985; Cheng y Abelson, 1986), facilitaría su interacción con sustancias inhibitorias.

Como conclusión del análisis realizado, se ha considerado que el carácter esencial de la proteína Prp19p para *S. cerevisiae*, la ausencia de homologías conocidas hasta el momento con proteínas humanas, y su localización aparentemente accesible a los inhibidores, la convierten en una proteína atractiva como diana antifúngica.

### La proteína Mtf1p como diana antifúngica

La proteína Mtf1p, que ha sido considerada la proteína responsable de la complementación del fenotipo termosensible del mutante MJ202, posee 340 aminoácidos y constituye el factor de especificidad de la RNA polimerasa mitocondrial (Schinkel *et al.*, 1987; Lisowsky y Michaelis, 1988; Jang y Jahening, 1991). Mtf1p es una proteína que actúa en el interior de la mitocondria, aunque su gen codificante se localiza en el núcleo. Penetra al interior mitocondrial por un mecanismo todavía no determinado (Sanyal y Getz, 1995), donde es requerida para el comienzo específico de la transcripción y replicación del DNA mitocondrial. El gen *MTF1* fue clonado por Lisowsky y Michaelis (1988), como un supresor del fenotipo *petite* termosensible originado como consecuencia de una mutación en el gen *RPO41*, que codifica para la subunidad catalítica de la RNA polimerasa mitocondrial, en elevado número de copias. El gen *MTF1*, ha sido descrito previamente como un gen no esencial para *S. cerevisiae*, ya que los mutantes con el gen interrumpido presentan un fenotipo *petite* estable (Lisowsky y Michaelis, 1988). Por el contrario el mutante MJ202 obtenido en este trabajo, posee un fenotipo termosensible, que es complementado por el gen *MTF1* en bajo número de copias, y su comportamiento no corresponde al de un mutante *petite*. Por este motivo se han considerado diferentes hipótesis que podrían justificar su comportamiento.

Una primera explicación, podría ser que el gen *MTF1* estuviera mutado de manera que la proteína codificada poseyera unas características tales que, de manera directa o indirecta, provocaran una toxicidad celular. Así por ejemplo una modificación en su conformación espacial que impidiera su entrada normal en la mitocondria, podría provocar una acumulación en el citoplasma y la consiguiente detención de la proliferación y la muerte celular. Esta situación sería similar a la ocurrida en los mutantes alterados en la proteína Ssc1p, que mueren como consecuencia de la acumulación a nivel citoplasmático de los precursores de las proteínas mitocondriales incapaces de pasar a la matriz del orgánulo (Craig, 1992). También podría ocurrir que la mutación en el factor de

especificidad provocara una alteración en la regulación transcripcional de algunos genes, cuya expresión pudiera resultar tóxica para la célula.

Como segunda hipótesis, podría considerarse la posibilidad de que el mutante MJ202 tuviera mutaciones en dos o más genes no esenciales, pero cuya alteración conjunta provocara la detención del crecimiento y la muerte celular. Uno de los genes podría ser el *MTF1* y los otros podrían ser genes relacionados con los procesos de transcripción o replicación celular y que no fueran esenciales para *S. cerevisiae*. Este efecto aditivo de los genes mutados ha sido descrito en diversos genes redundantes como *HSP82* y *HSC82*, que codifican para chaperoninas (Borkovich *et al.*, 1989), o en genes funcionalmente relacionados como *CHS1*, *CHS2* y *CHS3*, que codifican para enzimas con actividad quitín sintetasa (Cid *et al.*, 1995), de manera que se requiere su interrupción conjunta para generar un fenotipo letal.

En tercer lugar existiría la posibilidad de que el gen mutado fuera un gen esencial, cuya alteración pudiera ser suplementada por el gen *MTF1*, de modo similar a como ocurre con los mutantes *petite* termosensibles *Rpo41* (Lisowsky y Michaelis, 1988. Riemen y Michaelis, 1993), aunque en un número menor de copias.

El estudio de los trabajos publicados sobre la proteína Mtf1p ha permitido conocer, además de su carácter no esencial para *S. cerevisiae*, la ausencia de homologías con proteínas de otras especies fúngicas, a pesar de que sus características han sugerido que podría tratarse de una proteína conservada, ya que se han identificado proteínas funcionalmente similares en otros hongos levaduriformes como *Saccharomyces kluyvery* y *Kluyveromyces lactis* (Carrodeguas *et al.*, 1996). Tampoco se han detectado hasta el momento proteínas similares a la proteína Mtf1p en células de mamíferos, lo cual podría ser debido a las diferencias existentes entre las RNA polimerasas mitocondriales de estas células, ya que la de mamíferos es mucho más compleja y está constituida por diversas proteínas aún no caracterizadas en su totalidad (Jaehning, 1993). Por otra parte, la localización temporal de la proteína Mtf1p en el citoplasma celular antes de entrar en la mitocondria, descrita por Sanyal y Getz (1995), facilitaría el acceso hasta ella de cualquier compuesto capaz de inhibir su actividad.

El análisis realizado, permite concluir que la proteína Mtf1p no posee las características óptimas para una diana antifúngica, a pesar de que sea posible evaluar su inhibición *in vitro* (Magnus y Jaehning, 1996). La proteína Mtf1p no es esencial para *S. cerevisiae* y por tanto su interés como diana es menor que el que presentan otras proteínas que poseen un carácter esencial para los hongos. No obstante, la posibilidad de utilizar aquellas proteínas que al ser alteradas originen serios defectos en el desarrollo celular y permitan a las propias defensas del huésped eliminar el agente patógeno, mantendría cierto interés por esta proteína, aunque serían necesarios ensayos *in vivo* que demostraran la eficacia de las propias defensas para erradicar las cepas de *S. cerevisiae* mutadas en este gen, y posiblemente los resultados obtenidos variarían dependiendo del estado inmunitario del huésped (Kerridge y Vanden Bossche, 1990). Por otro lado, la gran variabilidad de la secuencia de las proteínas homólogas funcionales entre las diferentes levaduras analizadas, sugiere la dificultad para encontrar sustancias inhibitorias de las enzimas de diferentes hongos patógenos.

## La proteína Mps1p como diana antifúngica

La proteína Mps1p ha sido la proteína responsable de la complementación del fenotipo termosensible del mutante MJ41. Está constituida por 764 aminoácidos (Poch *et al.*, 1994; Lauzé *et al.*, 1995) y se ha comprobado su actividad quinasa *in vitro*, ya que es capaz de autofosforilarse en los residuos de serina, treonina y tirosina, y de fosforilar substratos exógenos en los residuos serina y treonina (Lauzé *et al.*, 1995). La proteína Mps1p fue identificada por Winey *et al.* (1991b) como una proteína de *S. cerevisiae* relacionada con la duplicación del cuerpo polar del huso mitótico, y a la que posteriormente se le ha atribuido una función como punto de control del ciclo mitótico (*checkpoint*) a nivel del ensamblaje del huso mitótico (Poch *et al.*, 1994; Lauzé *et al.*, 1995; Weiss y Winey, 1996). Este punto de control permitiría evitar la segregación cromosómica y la entrada en mitosis de las células que presentaran defectos en el huso. Los mutantes *Mps1* son incapaces de duplicar sus cuerpos polares, y llevan a cabo una mitosis monopolar con un reparto inadecuado del material genético entre las células madre e hija. De este modo se origina una población letal con una dotación cromosómica variable (Poch *et al.*, 1994). Se desconoce el mecanismo por el cual esta proteína realiza sus funciones en la célula, aunque se ha sugerido su posible participación en alguna cascada de quinasas (Poch *et al.*, 1994; Lauzé *et al.*, 1995; Hardwick *et al.*, 1996; Wells, 1996).

El carácter esencial de esta proteína, descrito por Poch *et al.*, (1994), junto con las diferencias estructurales entre el cuerpo polar del huso mitótico de levaduras y su orgánulo análogo en mamíferos, el centrosoma, y por tanto, las posibles diferencias que podrían existir entre las proteínas que participan en su duplicación y control en ambas especies (Winey *et al.*, 1991a; Winey *et al.*, 1991b), han desarrollado un interés particular por esta proteína como posible diana antifúngica. Las comparaciones del extremo catalítico C-terminal con las proteínas de las bases de datos, han revelado una homología del 45% con otras proteínas quinasas de mamíferos, como son la PYT/TTK humana, y las *eskl* y *esk2* de ratón, que también fosforilan residuos de serina, treonina y tirosina (Poch *et al.*, 1994), y que han sido implicadas en el control del ciclo mitótico y meiótico (Letwin *et al.*, 1992). Sin embargo, esta homología a nivel aminoacídico no excluye la probable existencia de diferencias conformacionales importantes entre ellas, y por tanto, sería posible que el dominio catalítico de Mps1p fuera bloqueado de manera selectiva en los hongos. Por otro lado, y debido a que la homología entre Mps1p y las proteínas de mamíferos queda reducida a su extremo C-terminal (Poch *et al.*, 1994; Lauzé *et al.*, 1995), también debería considerarse la posibilidad de una inhibición selectiva de la enzima fúngica mediante compuestos que provocasen una inhibición enzimática interaccionando con el extremo N-terminal de la enzima, en el caso de que éste mantuviera características comunes entre diversos hongos patógenos.

Las proteínas quinasas son consideradas un grupo importante de proteínas con posible utilidad como diana, pues además de ser proteínas muy abundantes, participan en numerosos procesos celulares relacionados con el crecimiento, la división, la conjugación, la meiosis y la esporulación, siendo algunas de ellas esenciales para la proliferación y viabilidad celular (Hunter y Plowman, 1997). Por este motivo algunas tirosín quinasas de células de mamíferos implicadas en la ruta Ras/cAMP de transmisión de señales, están siendo evaluadas como dianas de compuestos antitumorales (Baringa, 1997). Asimismo, las proteínas quinasas de *S. cerevisiae* que carecen hasta la fecha de homólogas en células de mamíferos, y que posiblemente se encuentren también en levaduras patógenas como *C. albicans* (Hunter y Plowman, 1997), podrían constituir nuevas dianas antifúngicas.

El interés de la proteína Mps1p se ha incrementado al ser relacionada por Winey (1996) con la proteína p53. Winey sugiere un papel comparable de ambas proteínas, actuando en la duplicación del cuerpo polar del huso mitótico y como punto de control de la formación de esta estructura. La proteína p53 parece estar relacionada directamente con la aparición de tumores, y actualmente se considera la posibilidad de que su control pudiera detener la proliferación de las células malignas. La importancia de p53 para el correcto funcionamiento celular, ha sugerido la trascendencia que podría tener la inhibición de la proteína Mps1p. Por este motivo, para intentar confirmar la aparente utilidad de Mps1p como diana antifúngica se ha tratado, en primer lugar, de verificar la ausencia de proteínas homólogas en células humanas, y en segundo lugar, de comprobar la existencia de proteínas similares en otros hongos patógenos. Dado que las bases de datos, como el Gen Bank/EMBL, poseen una información limitada sobre el genoma de estas especies, se han realizado ensayos de hibridación de DNA-DNA, *Southern blot*, entre el gen *MPS1* y el genoma de linfocitos humanos, de *A. fumigatus* y de *C. albicans*. La ausencia de bandas de hibridación que indicasen una homología significativa entre los genes de ambas especies (figura 24) podría sugerir que las similitudes existentes entre los aminoácidos del extremo C-terminal de Mps1p y las quinasas de las especies analizadas, o bien son insuficientes para permitir una hibridación en las condiciones del ensayo, o bien que el diferente uso de codones entre las especies podría originar que la misma secuencia aminoacídica estuviera codificada por secuencias nucleotídicas diferentes. Si bien este experimento no permite concluir que no existan proteínas homólogas en mamíferos, ni confirme la existencia de éstas en las especies fúngicas analizadas, sí contribuye a que la proteína Mps1p siga siendo considerada una posible diana de interés.

Con objeto de continuar avanzando en el conocimiento de la proteína, se ha tratado de obtener información sobre su centro activo, sus zonas funcionalmente importantes y su conformación espacial. Estos datos tendrían gran interés para el diseño de compuestos capaces de bloquear su actividad enzimática (Blundell, 1996). Para conseguir esta información se ha realizado un estudio comparativo de las características de la proteína nativa Mps1p y de la proteína mutada *Mps1p* de la cepa MJ41, cuya mutación ha sido determinada mediante secuenciación.

Las quinasas son unas proteínas que se caracterizan por presentar una estructura tridimensional organizada en dos dominios, con un surco central entre ambos. Esta organización, posiblemente responde a la necesidad de los cambios conformacionales que tienen lugar en la enzima durante la unión del sustrato, así como durante la catálisis (Creighton, 1984). En general, el dominio catalítico de las quinasas está muy conservado, y aunque su localización no es fija, suele estar localizado en la hendidura, cerca del extremo C-terminal. El extremo N-terminal suele tener un papel regulador (Knighton *et al.*, 1991b). La secuenciación del DNA genómico del mutante MJ41 ha revelado la presencia del cambio E517K en *Mps1p*. Esta mutación podría tener una repercusión estructural significativa, como se deduce de la predicción de estructura secundaria de la zona donde se localiza (figura 25). La substitución del ácido glutámico por lisina parece extender la lámina  $\beta$  donde se encuentra dicho residuo, desencadenando la alteración de una estructura en  $\alpha$ -hélice situada a continuación, mediante un giro  $\beta$ . Estos cambios en la estructura secundaria podrían ponerse de manifiesto con el incremento de la temperatura, traducándose en cambios de la disposición tridimensional de la proteína, lo que conllevaría a su inactivación a 37°C. Por tanto, la importancia de este residuo en cuanto al mantenimiento de la conformación estructural activa a 37°C parece claro, pudiendo estar justificado por su posible localización en el sitio del reconocimiento peptídico, cerca de la

hendidura catalítica (figura 60). Esta hipótesis se ha realizado sobre el conocimiento de la estructura terciaria de la proteína cAPK (figura 60) (Knighton *et al.*, 1991a y b. Johnson *et al.*, 1996), cuyo dominio C-terminal presenta homología con el de Mps1p. Ambas proteínas comparten las características estructurales típicas de las serín-treonín-tirosín quinasas, así como las regiones de estructura secundaria en lámina  $\beta$  en la región del E517, deducida para la cAPK a partir de la estructura tridimensional (Poch *et al.*, 1994). Sin embargo, habrá que esperar a localizar este residuo en la estructura tridimensional de Mps1p para poder determinar su papel.

Las únicas modificaciones, conocidas hasta la fecha, que provocan la inactivación enzimática son las que se localizan en la región catalítica, como ocurre al substituir el ácido aspártico de la posición 580 de Mps1p por una alanina (Lauzé *et al.*, 1995). La región N-terminal, que por ser más variable podría dar lugar a una inhibición más selectiva, no ha demostrado constituir una región esencial para la actividad ya que la eliminación de sus 63 aminoácidos terminales no provoca la inactivación enzimática (Lauzé *et al.*, 1995).

Para buscar inhibidores de Mps1p, sería necesario llevar a cabo ensayos *in vitro* de elevado rendimiento (HTP). La realización de estos ensayos requeriría grandes cantidades de proteína Mps1p pura, por lo que como primer paso, se ha intentado buscar un sistema de purificación rápido y eficaz. Por este motivo, esta proteína ha sido fusionada al dominio C-LYTA de la enzima N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa de *S. pneumoniae*. La funcionalidad de este dominio como marcador de purificación en *E. coli* es conocida (Ortega *et al.*, 1992; González de la Peña *et al.*, 1993; Ruiz Echevarría *et al.*, 1995), y en este trabajo se ha tratado de evaluar su posible utilidad en otros sistemas de expresión, como *S. cerevisiae*. El dominio C-LYTA posee elevada afinidad por aminos terciarios como el dietil-amino etanol (DEAE), y permite purificar proteínas de fusión en un único paso, mediante una cromatografía en DEAE-celulosa, que es una resina de bajo coste, selectiva, de elevada capacidad, y estable en un amplio margen de pH (Sánchez-Puelles *et al.*, 1992). A pesar de que la quimera C-LYTA-Mps1p ha demostrado ser incapaz de complementar el fenotipo termosensible del mutante MJ41, a diferencia de la proteína Mps1p, posiblemente como consecuencia de un cambio conformacional al ser fusionada al dominio C-LYTA, se ha mantenido el interés por conseguir su purificación. Sería posible que la modificación conformacional de la proteína Mps1p, en el caso de que existiera, fuera reversible y recuperara su estado nativo una vez que se eliminara el dominio C-LYTA de la proteína purificada. Por este motivo, se ha tratado de obtener la proteína de fusión expresándola en procariontes, como *E. coli*, y en eucariotes, como *S. cerevisiae*, que presenta menos posibilidades *a priori* de modificar la fusión proteica. Para ello se ha clonado el gen *MPS1* en los vectores adecuados para ambos organismos pT7C y pYE<sub>p</sub>PGKC (tabla 5), que habían sido construidos previamente en nuestro laboratorio. Los niveles de expresión obtenidos en ambos casos han sido bajos, solamente detectables mediante *Western blot* (figura 26), y además la proteína de fusión aparece parcialmente degradada. Esta inestabilidad podría ser debida a la existencia de secuencias PEST en la región N-terminal de Mps1p (Poch *et al.*, 1994), que han sido frecuentemente identificadas

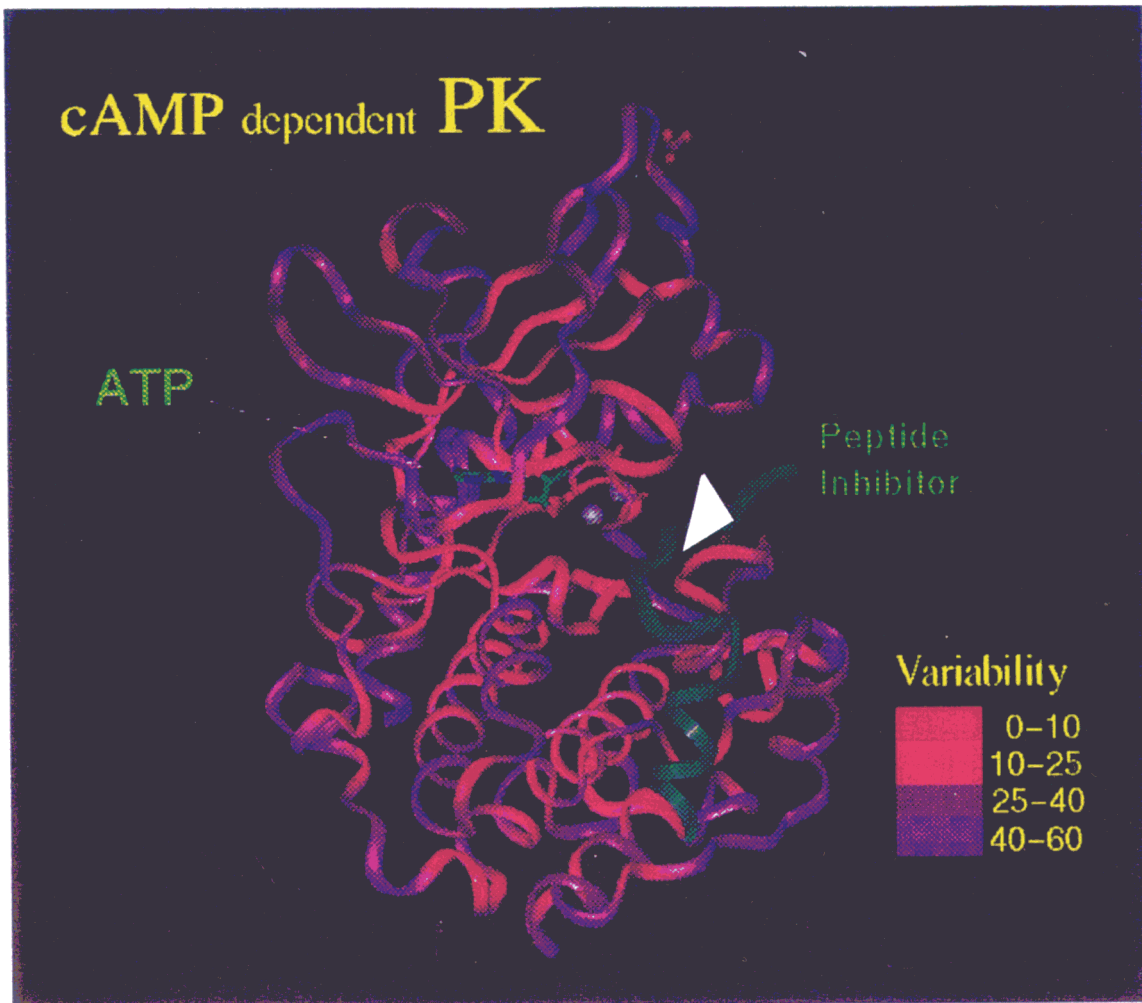


Figura 60: Estructura tridimensional de la proteína quinasa dependiente de cAMP. Se muestran los dominios N-terminal (parte superior) y C-terminal (parte inferior) separados por un surco central. El dominio C-terminal lleva unido un inhibidor peptídico (color verde oscuro). Se indica el sitio de unión del ATP (color verde claro) en la región próxima al surco central. La flecha blanca señala la posible localización del residuo E517 de la quinasa Mps1p sobre la estructura tridimensional de cAPK, deducida a partir de la comparación de ambas secuencias.

en proteínas de rápida degradación (Rogers *et al.*, 1986), y constituye un serio inconveniente para la obtención de la proteína pura. Por este motivo sería necesario buscar otros sistemas de expresión como podrían ser otros organismos de interés creciente en la expresión de proteínas heterólogas, como es *Pichia pastoris* (Romanos *et al.*, 1992). La utilización de este organismo para expresar proteínas fusionadas al dominio C-LYTA está siendo objeto de estudio en el departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, por lo que posiblemente en breve tiempo sea posible conocer si este sistema de expresión permite la obtención de la proteína C-LYTA-Mps1p sin modificaciones ni degradaciones.

Por otra parte, se ha tratado de identificar alguna proteína que interaccione con Mps1p y resulte necesaria para que ésta sea funcional. Existen evidencias de que la proteína Mps1p podría participar en una ruta de proteína quinasas (Poch *et al.*, 1994; Lauzé, 1995; Hardwick, 1996), por lo que el estado activo de Mps1p podría ser alcanzado tras ser fosforilado por otras quinasas. Así, la inhibición de las proteínas quinasas que activen Mps1p sería suficiente para bloquear su actividad y por tanto, se obtendría el mismo efecto letal que si se inhibiera la proteína Mps1p. El sistema elegido para la identificar estas proteínas ha sido el “sistema dos híbridos”. Sin embargo, los estudios iniciales han mostrado la capacidad de la proteína Mps1p para actuar como activador transcripcional y generar falsos positivos, lo cual hace inviable la utilización de este sistema, o requiere una modificación de esta aproximación. Sería posible realizar este ensayo utilizando un fragmento de la proteína Mps1p que careciera de capacidad activadora transcripcional, pero no ha sido llevado a cabo por considerar que los resultados obtenidos en estas condiciones podrían aportar información poco concluyente.

### **La proteína Ypl007cp como diana antifúngica**

La proteína Ypl007cp codificada por la fase de lectura abierta *YPL007C* localizada en el cromosoma XVI de *S. cerevisiae*, es la proteína que complementa el fenotipo termosensible del mutante MJ103. Está constituida por 588 aminoácidos, y ha presentado, desde el momento en que ha sido identificada, un interés particular, ya que es una proteína que posiblemente no haya sido caracterizada previamente, pues se carece de información bibliográfica sobre ella, y además es esencial para *S. cerevisiae*, por lo que podría constituir una diana antifúngica novedosa.

La verificación de la esencialidad de Ypl007cp para *S. cerevisiae* ha sido realizada mediante la interrupción del gen en dos cepas de *S. cerevisiae* diploides diferentes, SX508A/SX50110A y SEY610/SEY611, resultando viables únicamente las dos esporas que poseen el gen funcional, mientras que las otras dos que tienen el gen interrumpido detienen su crecimiento después de dividirse unas 6 veces (figura 29). Este resultado, además de confirmar la esencialidad de esta proteína para *S. cerevisiae*, podría sugerir la existencia de una “reserva” en la spora que permita que las células con el gen interrumpido se dividan varias veces, o por el contrario, la existencia de un daño celular acumulativo, de manera que se incremente la toxicidad en cada división celular hasta que se detenga el ciclo vegetativo y posiblemente se produzca la muerte de las células. Este mismo comportamiento ha sido descrito en otras esporas interrumpidas en genes esenciales diversos (Jarosch *et al.*, 1996), por lo que no parece que sea una característica propia de un grupo de proteínas implicadas en un proceso metabólico concreto.

Se han realizado búsquedas de genes homólogos en mamíferos y en hongos patógenos mediante comparaciones de su secuencia en diversas bases de datos. La proteína Ypl007cp no ha presentado homología con ninguna de las proteínas incluidas hasta el momento en las bases de datos consultadas, lo que podría indicar que es una proteína propia de *S. cerevisiae*, o que las proteínas homólogas funcionales de otras especies poseen gran variabilidad en sus secuencias. Sin embargo, estos datos no se han considerado definitivos, ya que las bases de datos están incompletas como consecuencia de que gran parte del genoma de mamíferos y de los hongos patógenos todavía no se ha secuenciado (Dunn-Coleman y Prade, 1998). Por este motivo se han realizado ensayos de hibridación DNA-DNA, *Southern blot*, para tratar de identificar homólogías entre el gen *YPL007C* y el DNA genómico de linfocitos humanos y de hongos patógenos, como *C. albicans* y *A. fumigatus*. La ausencia de bandas de hibridación (figura 30) ha permitido deducir que, o bien la proteína Ypl007cp podría carecer de similitud suficiente con las proteínas de las especies analizadas para que tenga lugar la hibridación en las condiciones del ensayo, o bien el diferente uso de codones entre las especies podría originar que la misma secuencia aminoacídica esté codificada por secuencias nucleotídicas diferentes (Sharp y Cowe, 1991). Los resultados obtenidos en este ensayo, a pesar de que no han permitido concluir la ausencia de proteínas homólogas a Ypl007cp en humanos, ni la presencia de éstas en otros hongos patógenos, sí han hecho posible que se haya mantenido el interés de la proteína Ypl007cp como posible diana antifúngica, y que se haya continuado su estudio.

Para tratar de localizar la proteína Ypl007cp en *S. cerevisiae*, se ha realizado la fusión de la proteína Ypl007cp al dominio C-LYTA de la enzima N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa de *S. pneumoniae*, mediante la construcción del plásmido pT7CYPL (tabla 6). La localización de la proteína de fusión se ha llevado a cabo por inmunofluorescencia indirecta, con anticuerpos policlonales frente al dominio C-LYTA. Los bajos niveles de expresión de Ypl007cp detectados en las células en crecimiento en fase exponencial mediante ensayos de *Northern blot* (figuras 33 y 34) y *Western blot* (figura 59), han motivado que se analizara inicialmente su hiperexpresión, mediante el uso de un plásmido episómico bajo el control del promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK), denominado YEpPGKCYPL (tabla 6), para tratar de obtener una señal fluorescente suficientemente intensa que pudiera ser detectada mediante microscopía confocal. La señal fluorescente observada en los ensayos realizados con anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína ha sido débil, por lo que se han empleado anticuerpos marcados con el fluorocromo Cy3 que emiten una señal más intensa. Este resultado ha confirmado la necesidad de sobreexpresar la fusión para poder detectar su localización, asumiendo por tanto, la posibilidad de que se pudiera producir una distribución inespecífica de la quimera.

Con esta técnica se ha localizado la proteína de fusión por el citoplasma celular distribuida de modo uniforme, con una intensidad semejante a las mismas cepas que hiperexpresan únicamente el dominio ClytA (figura 37). La proteína de fusión es capaz de complementar el fenotipo termosensible del mutante MJ103, con lo que se demuestra su funcionalidad y por tanto su presencia en la localización habitual de la proteína Ypl007cp. Por este motivo parece probable que la proteína estudiada pudiera tener una localización citoplasmática. Sin embargo, y a pesar de que esta metodología es la utilizada habitualmente para detectar proteínas de bajos niveles de expresión (Maarse *et al.*, 1992), no puede eliminarse la posibilidad de que la sobreexpresión de la proteína de fusión haya originado una distribución inespecífica de ésta, de manera que además de presentar su localización habitual se encuentre distribuida por el resto del citoplasma.

Estos datos parecen indicar que la proteína Ypl007cp se localiza en el citoplasma de las células y por tanto sería accesible a los compuestos inhibidores. Así, otras proteínas citoplásmicas implicadas en diversos procesos celulares, como son los factores que intervienen en la síntesis proteica, como el EF-3, las enzimas implicadas en las modificaciones postraduccionales de las proteínas y las enzimas implicadas en la síntesis de aminoácidos y de poliaminas, también han sido consideradas posibles dianas antifúngicas (Georgopapadakou y Walsh, 1996).

Finalmente, el diseño de un ensayo de elevado rendimiento *in vitro* (HTP) para encontrar inhibidores de la proteína Ypl007cp, exige establecer por un lado, un sistema de expresión y purificación de esta proteína, y por otro lado, la caracterización de su actividad. El sistema empleado para tratar de obtener la proteína Ypl007cp en estado puro ha sido el mismo que se ha utilizado con la proteína Mps1p, y que ha sido comentado con anterioridad. La expresión de la fusión ClytA-YPL007C se ha realizado en *E. coli* y en *S. cerevisiae*, mediante los plásmidos pT7CYPL y YEppGKCYPL (tabla 6), respectivamente. Los niveles de expresión obtenidos en ambas especies han sido bajos, detectables únicamente en ensayos de *Western blot* (figura 59). Por este motivo, se ha considerado necesario investigar otros organismos productores, que permitan incrementar la producción de esta proteína antes de proceder a su purificación. Los estudios de expresión heteróloga de genes fusionados al dominio ClytA en *P. pastoris* se están llevando a cabo en el departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, y posiblemente permitan conocer si este sistema es adecuado para tratar de obtener cantidades grandes de la proteína de fusión C-LYTA-Ypl007cp. Esta proteína debería ser capaz de unirse a columnas de DEAE-celulosa para permitir su purificación en una única etapa. Posteriormente sería digerida para recuperar la proteína Ypl007cp nativa, y utilizada para realizar los ensayos de búsqueda de inhibidores *in vitro*. También sería posible inmovilizar la proteína de fusión en placas multipocillo, por su dominio de afinidad a DEAE-celulosa, y realizar sobre ella los ensayos de búsqueda de inhibidores de la actividad enzimática.

El estudio de la actividad de la proteína Ypl007cp y de los procesos en los que participa ha sido abordado mediante dos estrategias diferentes. Por una parte, se ha realizado el estudio teórico de la regulación transcripcional y post-traducciona del gen, la posterior verificación mediante *Northern blot* de la funcionalidad de los elementos de regulación encontrados y el análisis del efecto producido por alteraciones en el nivel de expresión del gen *YPL007C*. Por otra parte, se ha llevado a cabo un estudio de caracterización fenotípica del mutante TD28mj103, obtenido por recombinación genética y que posee una mutación puntual en el aminoácido 148 de la proteína Ypl007cp, de modo que la asparragina original está substituida por una tirosina. Esta mutación había sido identificada previamente en el mutante MJ103 como la responsable del fenotipo termosensible. La caracterización del mutante TD28mj103 se ha realizado de una forma sistemática, tratando de determinar la función de la proteína Ypl007cp mediante la identificación de los procesos alterados, e intentando complementar el fenotipo termosensible del mutante mediante el aporte exógeno de diferentes sustratos cuya síntesis pudiera estar alterada y fuera la causa del fenotipo observado. En general, se ha evaluado el comportamiento del mutante a la temperatura permisiva de 26°C y a la restrictiva de 37°C, utilizando solamente en algunos ensayos la temperatura semipermisiva de 30°C, ya que el fenotipo mostrado en estas condiciones podría ser una consecuencia indirecta de la mutación estudiada.

La proteína Ypl007cp no ha presentado homología con ninguna de las proteínas de las bases de datos públicas y privadas consultadas, y tampoco ha sido posible detectar en su secuencia alguno de los dominios funcionales caracterizados, e incluidos en la base de datos PROSITE (Bairoch, 1991). Por ambos motivos, no se le ha podido atribuir una función determinada, y ha sido incluida entre el 40% de las proteínas de *S. cerevisiae* de las que aún se desconoce su funcionalidad (Johnston, 1996). El análisis de su secuencia aminoacídica mediante comparaciones con la base de datos PROSITE ha permitido identificar diversas zonas susceptibles de modificación enzimática (figura 31), como son zonas de fosforilación por diversas quinasas, como la proteína quinasa C, la caseína quinasa II, tirosina quinasas y las quinasas dependientes de cAMP o cGMP. Además, posee posibles zonas de N-glicosilación y de miristoilización. Por tanto, es posible que la proteína sea regulada mediante alguno de los procesos de modificación mencionados.

Se han identificado dos posibles sitios de inicio de la transcripción del gen *YPL007C*, a -178 y a -375 del ATG inicial, en células de *S. cerevisiae* en crecimiento exponencial (figura 32). Estos resultados podrían sugerir la existencia de una compleja regulación de la expresión del gen, aunque no se puede descartar la parada inespecífica de la enzima retrotranscriptasa en el ensayo de extensión por cebador. También este experimento ha permitido delimitar la secuencia promotora del gen, e identificar así diferentes elementos en su extremo 5' anterior a la fase abierta de lectura (figura 31), como son MAT-a1 (Miller *et al.*, 1985), STRE y HSE (Ruis y Schüller, 1995), UAS2 (Dang *et al.*, 1994), CT box (Tornow *et al.*, 1993), UAS<sub>NTR</sub> (Coffman *et al.*, 1994) y MCB (Aldea *et al.*, 1994) (figura 26), cuya implicación en la regulación de la transcripción génica ha sido analizada mediante *Northern blot*.

La proteína Ypl007cp es una proteína que mantiene unos niveles bajos y constantes de mRNA durante todo el ciclo mitótico (figura 33). Por este motivo, el elemento MCB de la región promotora, que es responsable de la expresión temporal de determinados genes en la fase G1/S del ciclo mitótico (Aldea *et al.*, 1994), no parece participar en la regulación de la expresión de este gen. Estos resultados podrían indicar que, o bien la proteína es funcional durante todo el ciclo celular, pues su transcripción no está relacionada con un momento concreto del ciclo, o bien se podría producir una activación/inhibición en un momento determinado, mediante una modificación enzimática como podría ser una fosforilación, una glicosilación o una miristoilización, ya que existen regiones aminoacídicas susceptibles de sufrir estos tipos de modificaciones.

No se han detectado diferencias entre los niveles de mRNA de las cepas diploides y haploides analizadas, ni entre las levaduras de tipo  $\alpha$  y  $\alpha$  estudiadas (figura 34 panel 1). Por este motivo, la expresión de esta proteína parece ser independiente del haplotipo celular y del tipo sexual, aunque existe una secuencia MAT-a1 en la región promotora del gen, que ha sido implicada con la represión de la expresión de genes específicos de células haploides (Miller *et al.*, 1985).

La ligera disminución de los niveles de mRNA observada en las células que entran en fase estacionaria, con respecto a las que se encuentran en fase exponencial (figura 34 panel 2), es un comportamiento frecuente entre la mayoría de las proteínas que participan en aquellos procesos metabólicos más activos en células en crecimiento exponencial que en estado estacionario (Bataillé *et al.*, 1991). Las células en este estado incrementan la síntesis de otro tipo de proteínas que les permitan resistir mejor la situación de carencia de nutrientes en la que se encuentran (Bataillé *et al.*, 1991). Estos resultados parecen

relacionar a la proteína Ypl007cp con cualquiera de los procesos metabólicos que son más activos en células en crecimiento exponencial que en fase estacionaria.

Asimismo se ha observado una pequeña disminución del nivel de transcrito en las células que están esporulando (figura 34 panel 6), por lo que la proteína Ypl007cp podría disminuir su actividad en este proceso.

Los niveles de mRNA del gen *YPL007C* de las células crecidas en medios de cultivo con fuentes de carbono fermentables, como glucosa y galactosa, han sido similares y ligeramente superiores a los niveles detectados en las células crecidas en una fuente de carbono no fermentable como es el glicerol (figura 34 panel 3). Estos resultados no han permitido relacionar al gen *YPL007C* con el metabolismo de las diferentes fuentes de carbono, a pesar de existir un elemento CT box en la región 5' anterior a su fase abierta de lectura, que ha sido implicado en la activación de la transcripción de genes glicolíticos mediante la unión a la proteína GCR1 (Tornow *et al.*, 1993).

El incremento de la expresión del gen *YPL007C* observado en las células de *S. cerevisiae* sometidas a una situación de estrés térmico (figura 34 panel 4), y de estrés salino (figura 34 panel 5), podrían relacionar a la proteína Ypl007cp con alguno de los mecanismos de protección desarrollados por las células en condiciones adversas. Los niveles de mRNA han aumentado en las células sometidas durante 40 y 60 min a ambas situaciones de estrés, coincidiendo con el comportamiento de otros genes cuya implicación en procesos de protección celular ha sido descrita (Winderickx *et al.*, 1996). Por este motivo, aunque el incremento de la expresión del gen *YPL007C* en las condiciones analizadas es menor que el que suele ocurrir en otros genes que se hiperproducen en situaciones de estrés (Craig, 1992; Mager y Ferreira, 1993), parece probable que la proteína Ypl007cp tenga una implicación indirecta en los mecanismos de respuesta a choque térmico e iónico. Además, existen elementos HSE y STRE en la región 5' previa a la fase abierta de lectura del gen *YPL007C*, que han sido identificadas en otros genes hiperexpresados en diferentes condiciones de estrés (Ruis y Schüller, 1995; Mager y Kruijff, 1995).

El estudio del efecto de la dosis génica ha sido realizado mediante el análisis comparativo del fenotipo de las cepas diploides que poseen un único alelo del gen *YPL007C* y las que poseen los dos (figura 36). También se ha analizado comparativamente el comportamiento de cepas haploides transformadas con el gen clonado en un vector episómico bajo un promotor PGK y el de la cepa silvestre (figura 35). En ningún caso se han detectado diferencias en cuanto a la morfología, crecimiento y viabilidad a 26 y a 37°C, por lo que se deduce que la presencia de un único gen en el diploide es suficiente para permitir el comportamiento normal de la célula. Además, se podría concluir que la hiperexpresión no parece provocar toxicidad en las levaduras analizadas.

Para obtener más información que pudiera orientar sobre la funcionalidad de la proteína Ypl007cp, se ha utilizado el "sistema dos híbridos", que permite detectar interacciones entre proteínas. Los ensayos realizados, no han mostrado ninguna interacción entre Ypl007cp y otra proteína del genoma de *S. cerevisiae*. Esta técnica presenta diversas limitaciones (Fields y Sternglanz, 1994) que podrían justificar este resultado negativo, como sería el caso de que Ypl007cp interaccionara de forma breve e inestable con otras proteínas de modo que no se formara un complejo estable capaz de activar la transcripción. También podría ocurrir que el complejo proteico formado no pudiera entrar o fuera expulsado rápidamente del núcleo, o podría ser que los niveles de expresión de la proteína Ypl007cp fueran tan bajos que no llegara al núcleo, o lo hiciera de manera tan escasa que la

actividad  $\beta$ -galactosidasa fuera indetectable. Otra posible causa sería que la proteína Ypl007cp modificara sus características estructurales al ser sintetizada como proteína de fusión. Asimismo existiría la posibilidad de que Ypl007cp interaccionara con una estructura proteica compleja y no con una proteína libre. La búsqueda de supresores extragenéticos de *ypl007c* entre los genes de una librería episómica de *S. cerevisiae* tampoco ha tenido éxito, lo que aparentemente sugiere que ninguna otra proteína sobreexpresada de esta levadura es capaz de substituir la funcionalidad de Ypl007cp.

Los resultados obtenidos de los estudios realizados hasta el momento han permitido concluir que el gen *YPL007C* es un gen esencial, que tiene unos niveles bajos de expresión durante todo el ciclo mitótico, y que podría estar implicado de manera indirecta en situaciones de estrés térmico e iónico. El análisis de las características fenotípicas del mutante TD28mj103, como segunda aproximación al estudio de la funcionalidad de la proteína, ha permitido obtener una información complementaria a la obtenida en los estudios anteriores ya descritos, y ha corroborado los resultados previos.

La menor tasa de crecimiento del mutante TD28mj103 en YEPD a 26°C (figura 40) y la aparición de una morfología más redondeada (figura 41), han indicado que la substitución de la asparragina 148 por tirosina origina una alteración en la funcionalidad de la proteína *Ypl007cp*, incluso en las condiciones permisivas en las que la cepa es capaz de proliferar. Además da lugar a una alteración de la distribución de la población en función de su contenido en DNA. Así los mutantes poseen un incremento de las células n (figura 40), mientras que los mutantes complementados con el gen *YPL007C* en monocopia recuperan su fenotipo normal (figura 44). Ambos comportamientos podrían ser la consecuencia de un alargamiento de la fase G0/G1, que suele ser la fase más frecuentemente modificada en los mutantes que presentan variaciones de su crecimiento (Slater *et al.*, 1977).

Por otra parte, esta misma mutación provoca la detención del crecimiento del mutante a 37°C. Esta detención se produce tras una, dos o tres divisiones celulares, de manera variable entre las diferentes células de un mismo cultivo (figura 42). Este comportamiento sugiere que, o bien la proteína Ypl007cp tarda un tiempo en inactivarse a 37°C y permite por tanto, varias divisiones celulares previas a su total pérdida de actividad, o bien que existe una “reserva” de alguna molécula generada por la proteína Ypl007cp que hace posible la proliferación celular hasta su agotamiento como consecuencia de la inactivación de Ypl007cp a la temperatura restrictiva. Esta última hipótesis ya había sido indicada al analizar el comportamiento de las esporas que poseían el gen *YPL007C* interrumpido y que llevaban a cabo unas seis divisiones celulares (figura 29). También se ha observado que las células en fase exponencial en condiciones permisivas son capaces de dividirse a 37°C un número mayor de veces que las células que se encuentran en fase estacionaria, por lo que posiblemente podría existir una mayor cantidad de proteína Ypl007cp o de su producto activo en las células en crecimiento activo. Esta hipótesis también estaría justificada por los resultados obtenidos en los ensayos de *Northern blot*, en los que se ha detectado una mayor expresión del gen *YPL007C* en las células en crecimiento exponencial que en las células en fase estacionaria (figura 34 panel 2).

La detención del mutante a 37°C supone la pérdida de la capacidad de las células detenidas para formar nuevamente colonias en condiciones óptimas, pero no su lisis, ya que

solamente el 30% de la población incubada 24 horas a 37°C, que es incapaz de crecer en YEPD a 26°C se tiñe con yoduro de propidio (figura 53). Este resultado parece sugerir que la alteración de la actividad de la proteína Ypl007cp podría provocar alguno de los estados fisiológicos denominados durmiente, moribundo o latente, que se caracterizan por una disminución en la producción de energía (Davey y Kell, 1996). El mutante TD28mj103 experimenta una disminución progresiva de su actividad mitocondrial a 37°C (figura 53), como ha quedado demostrado por la técnica de citometría de flujo mediante tinción con rodamina 123 y yoduro de propidio, que es la técnica de elección para determinar el estado fisiológico de las células (Davey y Kell, 1996). Esta alteración de la actividad mitocondrial podría ser originada por una modificación de alguno de los elementos encargados de mantener el potencial de membrana mitocondrial, como son los implicados en la cadena de transporte de electrones o en la fosforilación oxidativa. Ninguno de estos procesos ha sido considerado esencial para la viabilidad celular de *S. cerevisiae*, ya que esta levadura es capaz de realizar un metabolismo fermentativo en ausencia de actividad respiratoria mitocondrial (Tzagoloff y Dieckmann, 1990). Por este motivo sería posible que la pérdida del potencial de membrana mitocondrial fuera un efecto secundario a una modificación en la membrana mitocondrial, que además de los efectos descritos, provocara otras alteraciones que dieran lugar a la detención del crecimiento a 37°C y a la progresiva y lenta muerte celular.

El comportamiento termosensible del mutante TD28mj103 sobre diferentes fuentes de carbono, como glucosa, galactosa, glicerol y acetato potásico (figuras 43 y 44), ha mostrado que la actividad de la proteína Ypl007cp es requerida por las células tanto para la obtención de energía a partir de la oxidación de los substratos, como a partir de la fermentación de los mismos.

El estudio metabólico del mutante TD28mj103, realizado mediante el análisis de los metabolitos consumidos y generados a 26°C en fermentadores con medio YEPD, ha mostrado que la cepa mutante consume más lentamente la glucosa que la cepa silvestre (figura 44). Este comportamiento podría ser la consecuencia del enlentecimiento de ciclo celular por un posible alargamiento de la fase G0/G1 (Slater *et al.*, 1977). Además, se ha verificado la existencia de diferencias en el consumo de aminoácidos, de modo que la cepa mutante sigue consumiendo aminoácidos una vez agotada la glucosa del medio de cultivo, a diferencia de la cepa silvestre que detiene su consumo. También se ha observado que el mutante produce a 26°C una mayor cantidad de etanol y de un producto cuya estructura aún está siendo determinada. El estudio metabólico a 37°C ha mostrado un comportamiento similar de las cepas mutante TD28mj103 y silvestre TD28, que detienen su crecimiento una vez agotada la glucosa, sin que se produzca una parada previa del mutante como consecuencia de su termosensibilidad (figura 45). Este resultado parece ser la consecuencia de la elevada concentración celular de los cultivos, de modo que las escasas divisiones que realiza el mutante previas a su detención como consecuencia de la mutación, son suficientes para agotar la glucosa del medio de cultivo, ya que la fermentación se ha realizado en un fermentador de 20 litros que carecía de alimentación continua. Por este motivo se han realizado ensayos similares con cultivos de menor concentración celular, que permitieran la manifestación del fenotipo termosensible previamente al consumo total de la glucosa. Sin embargo la modificación de los caldos en estos ensayos ha sido tan escasa, como consecuencia del bajo número de células crecidas, que no ha sido posible analizar el consumo y producción de metabolitos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Por tanto, sería necesario realizar ensayos con cultivos de alta concentración celular en fermentadores alimentados con flujo continuo, que evitaran el agotamiento de glucosa, y

permitieran conocer si la cepa mutante detenida a 37°C mantiene un metabolismo basal y genera compuestos procedentes de alguna ruta metabólica alterada, lo cual podría implicar a la proteína Ypl007cp en un proceso determinado.

La observación de un menor crecimiento de la cepa mutante TD28mj103 en presencia de cloruro sódico junto con una alteración morfológica (figuras 48 y tabla 21), podría indicar una participación de la proteína Ypl007cp en alguno de los procesos celulares que permitiera a *S. cerevisiae* compensar una situación de estrés iónico. También, el incremento de tamaño que experimentan las ascas de la cepa diploide interrumpida en uno de los alelos del gen *YPL007C*, al ser resuspendidas en un medio hipoosmótico corrobora la hipótesis de que la proteína Ypl007cp podría participar en algún mecanismo de regulación de la homeostasis celular. Además, los resultados previamente obtenidos en los ensayos de *Northern blot* (figura 34 panel 5) habían demostrado un ligero incremento de la expresión de *YPL007C* en las células incubadas en presencia de cloruro sódico 0,5 M, insuficiente para incluir a la proteína Ypl007cp en el grupo de las proteínas hiperproducidas en condiciones de estrés (Craig, 1992; Mager y Ferreira, 1993), pero que sí permitía establecer algún tipo de regulación indirecta o funcionalidad incrementada en estas situaciones. La regulación del volumen celular así como el control de pH intracelular, dependen directamente de la integridad de la membrana plasmática, ya que a través de ella tiene lugar un intercambio de iones y compuestos, y son esenciales para la correcta funcionalidad celular. En situaciones de estrés osmótico las células se osmorregulan ajustando los flujos de iones y niveles de solutos orgánicos. Una modificación de las propiedades físicas de las membrana, como su fluidez, grado de saturación de los ácidos grasos, etc., provoca directamente modificaciones de los procesos de difusión pasiva (Van der Rest *et al.*, 1995). Asimismo una modificación de la membrana podría originar alteraciones en los canales que conducen aniones y cationes a favor de un gradiente electroquímico, que parecen tener un papel importante en la osmorregulación en condiciones de estrés osmótico, o en las proteínas que permiten el transporte activo de iones y que participan en el mantenimiento y regulación del volumen celular (André, 1995). Por este motivo, sería posible que el mutante poseyera alguna modificación en la composición lipídica de la membrana plasmática que produjera la desregulación de los sistemas de transporte (Varela y Mager 1996), de modo análogo al descrito en una cepa mutada en una de las enzimas implicadas en el mantenimiento de niveles normales de ergosterol y de otros esteroides en las membranas celulares, que posee incrementado los niveles de iones Na que entran en la célula (Welihinda *et al.*, 1994).

La proteína Ypl007cp no ha podido ser relacionada con los procesos de protección celular en condiciones de estrés osmótico por sorbitol, ni de ayuno de fuentes de carbono y de nitrógeno, ya que el comportamiento de la cepa mutante en estas condiciones ha sido similar al de la silvestre (figuras 49 y 50). Este resultado parece conferir cierta especificidad a la proteína Ypl007cp en cuanto a su implicación en determinadas condiciones de estrés, como es el iónico. Por otra parte, la ausencia de complementación del fenotipo termosensible de la cepa mutante a 37°C en presencia de concentraciones isoosmóticas de sorbitol, parece indicar que la alteración celular no consiste únicamente en una modificación de las propiedades físicas de la pared celular, ya que generalmente, los mutantes de este tipo proliferan en medios estabilizados osmóticamente (Hampsey, 1997).

La verificación de la termosensibilidad del mutante TD28mj103 a 37°C en ausencia de oxígeno, al igual que ocurría en atmósferas aerobias, ha permitido confirmar que la actividad de la proteína Ypl007cp es necesaria para ambas situaciones. Por este motivo, es

posible que la regulación de esta proteína no dependa directamente del oxígeno (Zitomer y Lowry, 1992).

La proteína Ypl007cp no ha podido ser relacionada con la ruta de las MAP quinasas, ya que no se ha detectado un incremento de la sensibilidad del mutante a la cafeína a 26°C, que es el fenotipo mostrado frecuentemente por mutantes de esta ruta (Hampsey, 1997). Tampoco se ha podido demostrar que la termosensibilidad de TD28mj103 haya sido la consecuencia de una alteración en el proceso biosintético del cAMP, ya que la adición exógena de dicho compuesto, que puede ser internalizado y compensar posibles deficiencias en su síntesis (Baroni *et al* 1992. Baroni *et al.*, 1994), no ha sido capaz de restaurar la proliferación del mutante a 37°C.

El menor crecimiento del mutante en un medio sólido con etanol como fuente de carbono (figura 44), ha sido atribuido a un incremento de la sensibilidad al efecto tóxico del etanol como consecuencia de la mutación *ypl007c*. Previamente se ha descartado la posibilidad de que este fenotipo pudiera estar originado por una deficiencia en el metabolismo de este sustrato, ya que la adición de glucosa al medio con etanol no restaura el crecimiento del mutante. El incremento de la toxicidad del etanol sobre el mutante (figura 51), podría haber sido la consecuencia de un posible efecto sumativo entre el etanol del medio y el generado como producto metabólico, que como se ha comentado con anterioridad, es producido en mayor cantidad en el mutante que en el silvestre (figura 45). Sin embargo, la concentración total de etanol que podría actuar sobre el mutante, no es tan elevada como para justificar un incremento de su sensibilidad. Por otra parte, para tratar de detectar si existe en el mutante una alteración en los mecanismos de compensación del daño oxidativo provocado por el etanol, se ha analizado la funcionalidad de la enzima superóxido dismutasa mitocondrial y de la peroxidasa citoplásmica (Costa *et al.*, 1993). Las actividades de ambas enzimas han sido analizadas mediante citometría de flujo, mostrando un comportamiento similar en el mutante TD28mj103 y en el silvestre TD28 en las condiciones empleadas, por lo que parece probable que la toxicidad del etanol sea debida a otras causas.

Se ha sugerido la existencia de una posible alteración de la síntesis de alguno de los componentes de la membrana plasmática, como consecuencia de la mutación *ypl007c*. Las células de *S. cerevisiae* que crecen en presencia de etanol poseen una composición de sus membranas plasmáticas diferentes a las que crecen en ausencia de este compuesto (Alexandre, 1994). Por este motivo parece probable que si el mutante TD28mj103 posee una composición alterada de la membrana plasmática o es incapaz de llevar a cabo esta modificación, podría presentar una mayor sensibilidad a etanol. Por otro lado, la mayor sensibilidad del mutante a los antifúngicos anfotericina B y miconazol que actúan a nivel de la membrana plasmática (figura 52) (Georgopapadaku y Walsh, 1996), parece apoyar la hipótesis de que la proteína Ypl007cp podría estar relacionada de algún modo con la integridad de la membrana plasmática. De este modo también podría justificarse la disminución del potencial de membrana mitocondrial que ocurre en los mutantes incubados a 37°C, ya que modificaciones en la composición de la membrana mitocondrial, especialmente en la concentración del ergosterol o de los ácidos grasos insaturados, provoca una pérdida de la permeabilidad selectiva de los H<sup>+</sup>. Así se produce una entrada de H<sup>+</sup> desde el citosol al interior de la mitocondria originándose un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y una disminución en el potencial de membrana (Astin y Haslam, 1977).

Los estudios orientados a identificar posibles alteraciones en la composición de la membrana plasmática del mutante que sean la causa de su termosensibilidad, no han revelado ningún resultado concluyente. El ergosterol es uno de los componentes mayoritarios de las membranas de *S. cerevisiae* y es esencial para su viabilidad celular, por lo que una alteración en su proceso biosintético como consecuencia de la mutación *ypl007c*, podría originar la termosensibilidad del mutante TD28mj103. Sin embargo no se ha podido demostrar la implicación de la proteína Ypl007cp en este proceso biosintético, ya que el mutante mantuvo su termosensibilidad a 37°C en presencia de un suplemento exógeno de ergosterol, a pesar de que este compuesto puede penetrar al interior de las cepas incapaces de sintetizarlo, y cubrir así sus necesidades vitales (Youings y Rose, 1989; Lorenz *et al.*, 1989). Tampoco se han podido detectar modificaciones de los procesos biosintéticos generales de lípidos y de proteínas mediante citometría de flujo, pero las limitaciones de esta técnica no permiten eliminar la posibilidad de que se hayan producido variaciones cualitativas entre los compuestos sintetizados, o modificaciones en las concentraciones de alguno de los componentes que se encuentran en la membrana plasmática en pequeñas cantidades.

El cambio morfológico de la cepa mutante TD28mj103, que adopta una morfología menos ovalada que la cepa silvestre (figuras 41 y 54), junto al engrosamiento de la pared de dicha cepa incubada a 37°C durante 24 horas (figura 56), parecen sugerir un efecto directo o indirecto de la proteína Ypl00cp sobre la síntesis de la pared celular. Además la aparición de unos acúmulos puntuales, intensamente teñidos por el blanco calcoflúor, redondeados y situados aparentemente en una zona cercana a la superficie celular, en el 20% las células mutantes incubadas a 37°C durante 24 horas (figura 55), podría corroborar la existencia de una modificación de la actividad de las enzimas que participan en la biosíntesis de la pared celular. Unos acúmulos de quitina, similares en cuanto a su morfología y distribución celular a los acúmulos observados en TD28mj103, han sido descritos previamente en células de *C. albicans* tratadas con concentraciones subinhibitorias de antifúngicos de tipo azólico (Vanden Bossche, 1985; Polak, 1990). Esta analogía entre el mutante en estudio y las células de *C. albicans* alteradas en la biosíntesis del ergosterol como consecuencia del tratamiento antifúngico, parece confirmar la hipótesis de que TD28mj103 podría presentar alguna alteración en su membrana plasmática que originara como consecuencia una modificación de la actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de quitina. La regulación espacial y temporal de este proceso biosintético de la pared celular todavía no está bien caracterizado (Cid *et al.*, 1995), pero se ha propuesto la localización de las quitín sintetasas en unas zonas de la membrana plasmática especialmente ricas en ergosterol (Bottema *et al.*, 1983). En este caso una modificación en la biosíntesis de este esterol podría provocar importantes alteraciones en la funcionalidad de estas proteínas, aunque es posible que la modificación de otros componentes de la membrana también produjera un efecto similar. En general, parece razonable suponer que una alteración en la membrana plasmática a la que se encuentran asociadas las quitín sintetasas, podría provocar directa o indirectamente, una hiperactivación o una activación inespecífica de estas enzimas, o dificultar su correcto desplazamiento hasta el lugar de actuación. En ambos casos se originaría un depósito anormal de quitina y por tanto, una modificación estructural que podría ser la causa de la termosensibilidad del mutante. El mutante TD28mj103 ha mostrado una cantidad ligeramente superior de polímero con afinidad por el blanco calcoflúor que la cepa silvestre tras 24 horas de incubación a 37°C, por lo que parece probable que los acúmulos observados sean consecuencia de una alteración de los procesos regulatorios de localización de la quitina. Sin embargo, no debe descartarse la posibilidad de que los acúmulos fluorescentes estén constituidos por un

polisacárido aberrante sintetizado como consecuencia de la modificación de alguna ruta metabólica, que también presente afinidad por el blanco calcoflúor (Bulawa, 1993).

El análisis ultraestructural de la membrana plasmática de la cepa mutante TD28mj103 y de la cepa silvestre mediante microscopía electrónica de transmisión, no ha permitido detectar ninguna diferencia en el número, agrupación y distribución de sus partículas e invaginaciones (figuras 57 y 58), que por ser características propias del estado de la membrana podrían reflejar pequeños cambios en ella (Necas *et al.*, 1981). Sin embargo, el engrosamiento de la pared celular de las células mutantes incubadas a 37°C durante 24 horas, podría sugerir la existencia de una modificación directa o indirecta de la actividad de algunas de las proteínas implicadas en su síntesis, y que se localizan en la membrana plasmática.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren una posible participación de la proteína Ypl007cp en la correcta funcionalidad de la membrana plasmática y mitocondrial de *S. cerevisiae*, aunque sería necesario profundizar en el estudio de la composición y fisiología de estas membranas para verificar la existencia de una alteración. La proteína Ypl007cp podría participar de manera directa, en el caso de que estuviera integrada en la membrana mediante el posible dominio transmembrana identificado en su secuencia, o de manera indirecta, llevando a cabo la síntesis de algún componente estructural o regulando la actividad de otras proteínas. Para diferenciar entre ambos tipos de actuaciones, sería conveniente localizar de una manera precisa la proteína, mediante el empleo de anticuerpos monoclonales sobre células enteras o, en el caso de que la señal obtenida fuera insuficiente, sobre fracciones celulares. Esta técnica, que requiere la previa purificación de la proteína para la obtención de anticuerpos, permitiría confirmar si la proteína Ypl007cp posee la localización generalizada que ha sido observada tras los experimentos realizados con anticuerpos policlonales, o bien se localiza exclusivamente en las membranas, con lo que se podría sugerir algún tipo de función celular. Por otra parte, la purificación y cristalización de la proteína Ypl007cp podría revelar información suficiente para comenzar un diseño racional de antifúngicos. Además, la búsqueda de homologías con las nuevas proteínas que se están identificando en otras especies podría revelar la clave de la actividad y funcionalidad de esta proteína, que debe ser conocida antes de diseñar un ensayo de búsqueda de inhibidores.

Los resultados obtenidos de estos estudios confirmarán si la proteína Ypl007cp, que por los estudios realizados en este trabajo parece cumplir las características apropiadas para constituir una diana antifúngica, sigue resultando de interés para la industria farmacéutica y puede ser utilizada para llevar a cabo ensayos *in vitro* para la búsqueda de inhibidores, o permite diseñar racionalmente compuestos que interaccionen con ella basándose en el conocimiento de su estructura tridimensional.



## VI. CONCLUSIONES

1. Se han aislado 297 mutantes incapaces de crecer en diferentes condiciones, a partir de la cepa de *S. cerevisiae* S288C. Su estudio fenotípico ha permitido seleccionar 13 mutantes termosensibles con fenotipo repetitivo y mutación estable, que han sido caracterizados genéticamente, con la intención de identificar posibles dianas antifúngicas.
2. La caracterización genética de los 13 mutantes seleccionados ha permitido identificar 7 genes capaces de complementar su fenotipo termosensible. Al menos 5 de estos genes, *CDC68*, *TAF<sub>II</sub>145*, *PRP19*, *MPS1*, *YPL007C* son esenciales para *S. cerevisiae*, y uno de ellos, el *YPL007C*, aún no había sido secuenciado por el proyecto Genoma en el momento de su clonación. De este modo se confirma que el análisis de mutantes letales condicionales es una estrategia directa y rápida para identificar genes esenciales y potenciales dianas novedosas.
3. Se ha clonado el gen *HSP30* en diversas ocasiones a partir de la complementación de mutantes termosensibles obtenidos con diferentes agentes mutagénicos. Este gen podría estar actuando como supresor de mutaciones en diferentes genes de *S. cerevisiae* en bajo número de copias.
4. Las proteínas Cdc68p y Prp19p son proteínas que por su esencialidad para *S. cerevisiae*, ausencia de similitudes con proteínas descritas de humanos y participación en procesos conservados entre diversas especies, tienen interés como posibles dianas antifúngicas, susceptibles de ser estudiadas en el futuro.
5. La proteína TAF<sub>II</sub>145 también posee interés como posible diana ya que, a pesar de presentar homología con la proteína humana TAF<sub>II</sub>240, podrían existir compuestos capaces de interactuar específicamente con ella.
6. La proteína Mps1p tiene especial interés como diana antifúngica por ser una proteína esencial para *S. cerevisiae*, con escasa similitud con las proteínas humanas descritas y cuya actividad serín-treonín-tirosín quinasa está caracterizada. La substitución E517K en el dominio catalítico de la proteína Mps1p provoca su inactivación a 37°C, probablemente como consecuencia de una modificación de su estructura tridimensional.
7. El gen *YPL007C* es un gen esencial para *S. cerevisiae*. La transversión A→T en el nucleótido 442 provoca un fenotipo termosensible en el mutante.
8. No se han detectado genes con homología significativa a *YPL007C* en otros hongos como *Candida albicans* y *Aspegillus fumigatus*, ni en linfocitos humanos. Tampoco se han identificado proteínas homólogas entre las presentes en diversas bases de datos.
9. El gen *YPL007C* mantiene unos niveles de expresión bajos y constantes durante el ciclo mitótico y meiótico de *S. cerevisiae*. La transcripción de dicho gen es similar en levaduras con diferente haplotipo y tipo sexual, así como en las células que han crecido en diferentes fuentes de carbono.
10. La existencia de un posible dominio transmembrana de la proteína Ypl007cp sugiere que esta proteína podría localizarse en las membrana de *S. cerevisiae* y podría participar en los mecanismos de protección celular en las condiciones adversas de hiperosmolaridad por cloruro sódico y temperaturas altas, ya que se ha observado un ligero aumento de la expresión del gen *YPL007C* en las células de la levadura *S. cerevisiae* TD28 sometidas a ambos tipos de estrés.

11. Diversos resultados experimentales obtenidos del estudio del mutante TD28mj103 sugieren la relación directa o indirecta de la proteína Ypl007cp con la integridad de la membrana de *S. cerevisiae*, como son: su mayor sensibilidad a etanol, a los antifúngicos anfotericina B y miconazol, y al cloruro sódico, disminución de su potencial de membrana mitocondrial a condiciones restrictivas, engrosamiento de su pared y aparición de acúmulos puntuales teñidos intensamente por blanco calcoflúor.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adler-Moore, J.P., y Proffitt, R.T.** 1993. Development, characterization, efficacy and mode of action of AmBisome, a unilamellar liposomal formulation of amphotericin B. *J. Liposomal Res.* **3**: 429-450.
- Aguilera, A. y Benítez, T.** 1986. Ethanol-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **143**:337-344.
- Aldea, M., Casas, C., Gallego C., Espinet, C. y Herrero, E.** 1994. The yeast cell cycle: positive and negative controls. *Microbiología SEM.* **10**:27-34.
- Alexandre, H., Rousseaux, I. y Charpentier, C.** 1994. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol. Lett.* **124**:17-22.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
- Ampel, N.M.** 1996. Emerging disease issues and fungal pathogens associated with HIV infection. *Emerg. Infect. Dis.* **2**:109-116.
- André, B.** 1995. An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **11**:1575-1611.
- Aoki, Y., Kondoh, M., Nakamura, M., Fujii, T., Yamazaki, T. y Arisawa, M.** 1994. A new methionine antagonist that has antifungal activity: mode of action. *J. Antibiot.* **47**:909-916.
- Astin, A.M. y Haslam, J.M.** 1977. The effects of altered membrane sterol composition on oxidative phosphorylation in a haem mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **166**:287-298.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K.** (1985-1997). *Saccharomyces cerevisiae*. En Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc.
- Bai, Y., Pérez, G.M., Beechem, J.M. y Weil, P.A.** 1997. Structure function analysis of TAF130: identification and characterization of a high-affinity TATA-binding protein interaction domain in the N terminus of yeast TAF<sub>n</sub>130. *Mol. Cell. Biol.* **17**:3081-3093.
- Bairoch, A.** 1991. PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucleic Acids Res.* **19**:2241-2245.
- Baloch, R.I. y Mercer, E.I.** 1987. Inhibition of sterol  $\Delta^8$ - $\Delta^7$  isomerase and  $\Delta^{14}$  reductase by fenpropimorph, tridemorph and fenpropidin in cell-free systems from *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry.* **26**:663-668.
- Balzi, E., y Goffeau, A.** 1994. Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* **1187**:152-162.
- Banerjee, S.N., Emori, T.J. y Culver, D.H.** 1991. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States 1980-1989 National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am. J. Med.* **91**:86S-89S.
- Barinaga, M.** 1997. From bench top to bedside. *Science.* **278**:1036-1039.
- Baroni, M.D., Monti, P. y Alberghina, L.** 1994. Repression of growth-regulated G1 cyclin expression by cyclic AMP in budding yeast. *Nature.* **371**:339-342.
- Baroni, M.D., Monti, P., Marconi, G. y Alberghina, L.** 1992. cAMP-mediated increase in the critical cell size required for the G1 to S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Cell Res.* **201**:299-306.
- Bassett Jr., D.E., Boguski, M.S. y Hieter, P.** 1996. Yeast genes and human disease. *Nature.* **379**: 589-590.
- Bataillé, N., Régnac, M. y Boucherie, H.** 1991. Induction of a heat-shock-type response in *Saccharomyces cerevisiae* following glucose limitation. *Yeast.* **7**:367-378.
- Beck-Sagué, C.M., Jarvis, W.R., and the National Nosocomial Infections Surveillance System.** 1993. Secular Trends in the Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections in the United States, 1980-1990. *J. Infect. Dis.* **167**:1247-51.
- Blondelle, S.E. y Houghten, R.A.** 1996. Novel antimicrobial compounds identified using synthetic combinatorial library technology. *Trends in Biochem. Techn.* **14**:60-65.
- Blundell, T.L.** 1996. Structure-based drug design. *Nature.* **384**:23-26.
- Borkovich, K.A., Farrelly, F.W., Finkelstein, D.B., Taulien, J., y Lindquist, S.** 1989. hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol. Cell. Biol.* **9**:3919.
- Bottema, C.D.K., McLean-Bowen, C.A. y Parks, L.W.** 1983. Role of sterol structure in the thermotropic behavior of plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **734**:235-248.

- Boyle, F.T.** 1990. Drug discovery: a chemist's approach. En Ryley, J.F., (ed.), *Chemotherapy of Fungal Diseases*, Springer-Verlag, pp.3-30.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Brajtburg, L., Powderly, W. G., Kobayashi, G.S. y Medoff, G.** 1990. Amphotericin B: current understanding of the mechanism of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:183-188.
- Brill, S.J., DiNardo, S., Voelkel-Meiman, K. y Sternglanz, R.** 1987. Need for DNA topoisomerase activity as a swivel for DNA replication for transcription of ribosomal RNA. *Nature.* **326**:414-416.
- Broach, J.R. y Thorner, J.** 1996. High-throughput screening for drug discovery. *Nature.* **384**:14-16.
- Brown, M.S. y Goldstein, J.L.** 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* **232**:34-47.
- Bruhn, S.L., Housman, D.E. y Lippard, S.J.** 1993. Isolation and characterization of cDNA clones encoding the *Drosophila* homolog of the HMG-box SSRP family that recognizes specific DNA structures. *Nucleic Acids Res.* **21**:1643-1646.
- Buckholz, R.G. y Gleeson, M.A.G.** 1991. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology.* **9**:1067-1072.
- Bulawa, C.E.** 1993. Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**:505-534.
- Bulawa, C.E. y Osmond, B.C.** 1990. Chitin synthase I and chitin synthase II are not required for chitin synthesis *in vitro* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:7424-7428.
- Buratowski, S., Hahn, S., Sharp, P.A. y Guarente, L.** 1988. Function of a yeast TATA element-binding protein in a mammalian transcription system. *Nature.* **334**:37-42.
- Cabib, E.** 1991. Differential inhibition of chitin synthetases 1 and 2 from *S. cerevisiae* by polyoxin D and nikkomycins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:170-173
- Campbell, A.** 1961. Sensitive mutants of bacteriophage  $\lambda$ . *Virology* **14**:22-32.
- Campbell, J.L. y Newlon, C.S.** 1991. Chromosomal DNA replication. En Jones, E.W. y Broach, J.R. (eds.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: genome dynamics, protein synthesis, and energetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. pp 41-146.
- Capobianco, J.O., Zakula, D., Coen, M.L. y Goldman, R.C.** 1993. Anticandida activity of cispentacin. The active transport by amino acid permease and possible mechanisms of action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**:1037-1044.
- Carrodeguas, J.A., Yun, S., Shadel, G.S., Clayton, D.A. y Bogenhagen, D.G.** 1996. Functional conservation of yeast mtTFB despite extensive sequence divergence. *Gene Expr.* **6**:219-230.
- Castro, C., Ribas, J.C., Valdivieso, M.H., Varona, R., del Rey, F. y Durán, A.** 1995. Papulacandin B resistance in yeast: isolation and characterization of PBR1, a gene involved in (1,3) $\beta$ -D-glucan synthesis in *S. cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**:5732-5739.
- Cavallini, B., Huet, J., Plassat, J.L., Sentenac, A., Egly, J.M., y Chambon, P.** 1988. A yeast activity can substitute for the HeLa cell TATA box factor. *Nature.* **334**:77-80.
- Cid, V.J., Durán, A., del Rey, F., Snyder, M.P., Nombela, C. y Sánchez, M.** 1995. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **59**: 345-386
- Coffman, J.A., El Berry, H.M. y Cooper, T.G.** 1994. The URE2 protein regulates nitrogen catabolic gene expression through the GATAA-containing UAS<sub>NTR</sub> element in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **176**:7476-7483.
- Colthurst, D.R., Santos, M., Grant, C.M. y Tuite, M.F.** 1991. *Candida albicans* and three other *Candida* species contain an elongation factor structurally and functionally analogous to elongation factor 3. *FEMS Microbiol. Lett.* **80**:45-50.
- Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.** 1997. Antimicóticos de vía general. En Catálogo de especialidades farmacéuticas. Madrid, pp.1043-1050.
- Cormican, M.G. y Pfaller, M.A.** 1996. Standardization of antifungal susceptibility testing. *J. Antimicrob. Chem.* **38**:561-578.
- Costa, V., Reis, E., Quintanilla, A. y Moradas-Ferreira, P.** 1993. Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the key role of the mitochondrial superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**:608-614.
- Craig, E.A.** 1992. The heat-shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. En Jones, E.W., Pringle, J.R. y Broach, J.R. (eds.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. pp 501-537.

- Creighton, T.E.** 1984. Proteins. Structures and Molecular Properties. W.H. Freeman and Company. New York. pp 397-488.
- Cummings, J. y Smyth, J.F.** 1993. DNA topoisomerase I y II as targets for rational design of new anticancer drugs. *Ann. Onco.* 4:533-543.
- Charcosset, J.Y., Soues, S., Laval, F.** 1993. Poisons of DNA topoisomerases I and II. *Bull Cancer* (Paris). 80:923-954.
- Cheng, S.C., Tarn, W.Y., Tsao, T.Y. y Abelson, J.** 1993. PRP19: a novel spliceosomal component. *Mol. Cell. Biol.* 13:1876-82.
- Cheng, S.C., y Abelson, J.** 1986. Fractionation and characterization of a yeast mRNA splicing extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:2387-2391.
- Chmurny, A.B.** 1997 Combinatorial genomics and small molecule drug discovery. Oceanix Biosciences Corporation. Natural products drugs discovery. New technologies to increase efficiency and speed. San Diego.
- Chung, C.T., Niemela, S.L. y Miller, R.H.** 1989. One-step preparation of competent *E. coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:2172-2175.
- Dang, V.D., Valens, M., Bolotin-Fukuhara, M. y Faignan-Fornier, B.** 1994. A genetic screen to isolate genes regulated by the yeast CCAAT-box binding protein Hap2p. *Yeast* 10:1273-1283.
- Davey, H.M. y Kell, D.B.** 1996. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol. Rev.* 60:641-696.
- de la Fuente, J.M., Álvarez, A., Nombela, C., y Sánchez, M.** 1992. Flow cytometric analysis of *Saccharomyces cerevisiae* autolytic mutants and protoplasts. *Yeast* 8:39-45.
- Debono, M. y Gordee, R.S.** 1990. Drug discovery: nature's approach. En Ryley, J.F., (ed.), Chemotherapy of fungal diseases. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.77-109.
- Debono, M., y Gordee, R.S.** 1994. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu Rev. Microbiol.* 48: 471-497.
- Decker, H., Walz, F., Borman, C., Fiedler, H.P., Zahner, H., Heitsch, H.H. y König, W.A.** 1990. Metabolic products of microorganisms. 255. Nikkomycins Wz and Wx, new chitin synthetase inhibitors from *Streptomyces tendae*. *J. Antibiot.* 43:43-48.
- Demain, A.L.** 1998. Microbial natural products: alive and well in 1998. *Nat. Biotechnol.* 16:3-4.
- Di Domenico, B.J., Lupisella, J., Sandbaken, M. y Chakraborty, K.** 1992. Isolation and sequence analysis of the gene encoding translation elongation factor 3 from *Candida albicans*. *Yeast* 8:337-352
- Dick, J.D., Merz, W.G., Saral, R.** 1980. Incidence of polyene resistant yeast recovered from clinical specimens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18:158-163.
- Douglas, C.M., Marrinan, W.L., Li, W. y Kurtz, M.B.** 1994. A *S. cerevisiae* mutant with echinocandin-resistant 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase. *J. Bacteriol.* 176:5686-5696.
- Drutz, D.J. y Lehrer, R.I.** 1978. Development of amphotericin B-resistant *Candida tropicalis* in a patient with defective leukocyte function. *Am. J. Med. Sci.* 276:77-92.
- Dunn-Coleman, N. y Prade, R.** 1998. Toward a global filamentous fungus genome sequencing effort. *Nat. Biotechnol.* 16:5.
- Dupont, B.** 1993. Resistance trends in oral *Candida* infections: the clinical challenge. *Clinician.* 11:19-22.
- Duronio, R.J., Towler, D.A., Heuckeroth, R.O. y Gordon, J.I.** 1989. Disruption of the yeast *N*-myristoyltransferase gene causes recessive lethality. *Science.* 243:796-800.
- Eardley, S.C.** 1990. Regulatory procedures. En Ryley, J.F., (ed.), Chemotherapy of fungal diseases. Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp.279-311.
- Edgar, R.S. y Lielausis, I.** 1964. Temperature-sensitive mutants of bacteriophage T4D: their isolation and genetic characterization. *Genetics* 49:649-662.
- Elorza, M.V., Mormeneo, S., García de la Cruz, F., Gimeno, C. y Sentandreu, R.** 1989. Evidence for the formation of covalent bonds between macromolecules in the domain of the wall of *C. albicans* mycelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162:1118-1125.
- Epstein, R.H., Bolle, A., Steinberg, C.M., Kellenberger, E., Boy de la Tour, E. y Chevalley, R.** 1963. Physiological studies of conditional lethal mutants of bacteriophage T4D. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28:375-394.
- Fasoli, M. y Kerridge, D.** 1988. Isolation and characterization of fluoropyridine-resistant mutants in two *Candida* species. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 544:260-263.
- Fenical, W.** 1997. New pharmaceuticals from marine organisms. *Trends Biotechnol.* 15:339-341
- Fields, S. y Sternglanz, R.** 1994. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* 10:286-292.

- Flint, O.P. y Boyle, F.T.** 1990. Structure-teratogenicity relationships among antifungal triazoles. En Ryley, J.F., (ed.), *Chemotherapy of Fungal Diseases*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.231-249.
- Fomting, R.** 1988. Overview of medically important azole derivatives. *Clin. Microbiol. Rev.* 1:187-217.
- Fostel, J., y Montgomery D.** 1995. Identification of the aminocatechol A-3253 as an *in vitro* poison of DNA topoisomerase I from *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:586-592.
- Fox, J.L.**, 1993. Fungal infection rates are increasing. *ASM News.* 10:515-518.
- Francis, P. y Walsh, T.J.** 1992. Evolving role of flucytosine in immunocompromised patients: new insights into safety, pharmacokinetics, and antifungal therapy. *Rev. Infect. Dis.* 15:1003-1018.
- Fridkin, S.K. y Jarvis W.R.** 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:499-511.
- Fromtling, R.** 1988. Overview of medically important azole derivatives. *Clin. Microbiol. Rev.* 1: 187-217.
- Fusek, M., Smith, E.A., Monod, M., Dunn, B.M. y Foundling, S.I.** 1994. Extracellular aspartic proteinases from *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, y *Candida parapsilosis* yeasts differ substantially in their specificities. *Biochemistry* 33:9791-9799.
- Gallis, H.A., Drew, R.H., Pickard, W.W.** 1990. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev. Infect. Dis.* 12:308-329.
- Gaughram, J.P., Lai, M.H., Kirsch, D.R. y Silverman, D.R.** 1994. Nikkomycin Z is a specific inhibitor of *S. cerevisiae* chitin synthase isozyme Chs3 *in vitro* and *in vivo*. *J. Bacteriol.* 176:6857-5860.
- Gavin, K.A., Jidaka, M. y Stillman, B.** 1995. Conserved initiator proteins in eukaryotes, *Science.* 270:1667-1671.
- Georgopapadakou, N.H. y Tkacz, J.S.** 1995. The fungal cell wall as a drug target. *Trends Microbiol.* 3:98-104.
- Georgopapadakou, N.H. y Walsh, T.J.** 1994. Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science.* 264:371-373.
- Georgopapadakou, N.H., y Walsh, T.J.** 1996. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 40:279-291.
- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styple, C.A. y Fink, G.R.** 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell.* 68:1077-1090.
- Goebel, M.G. y Petes, T.D.** 1986. Most of the yeast genomic sequences are not essential for cell growth and division. *Cell.* 46:983-992.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. y Oliver, S.G.** 1996. Life with 6000 genes. *Science.* 274:562-567.
- González de la Peña, M.A., Villalba, M., García López, J.L. y Rodríguez, R.** 1993. Cloning and expression of the major allergen from yellow mustard seeds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190:648-653.
- Graybill, J.R.** 1996. The future of antifungal therapy. *Clin. Inf. Dis.* 22:S166-S178.
- Grey, M., Dusterhoft, A., Henriques, J.A. y Brendel, M.** 1996. Allelism of *PSO4* and *PRP19* links pre-mRNA processing with recombination and error-prone DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 24:4009-4014.
- Guarente, L.** 1992. Messenger RNA transcription and its control in *Saccharomyces cerevisiae*. En Jones, E.W., Pringle, J.R. y Broach, J.R. (eds.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. pp 49-98.
- Guldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J., y Hegemann, J.H.** 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 24: 2519-2524.
- Gustin, K.E y Burk, R.D.** 1993. A rapid method for generating linker scanning mutants utilizing PCR. *Biotechniques.* 14:22-23.
- Gustin, K.E., Burk, R.D., Guthrie, C., Patterson, B.** 1988. Spliceosomal snRNA. *Ann. Rev. Genet.* 22:387-419.
- Guthrie, C. y Patterson, B.** 1988. Spliceosomal snRNAs. *Ann. Rev. Genet.* 22:387-419.
- Hampsey, D.M., Das, G. y Sherman, F.** 1986. Amino acid replacements in yeast iso-1-cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 261:3259-3271.
- Hampsey, M.** 1997. A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 13:1099-1133.
- Hampsey, M. y Reinberg, D.** 1997. Why are TAFs essential?. *Curr. Biol.* 7:R44-R46.

- Hänel, H. y Ritter, E. Formulation. En Ryley, J.F., (ed.), *Chemotherapy of fungal diseases*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.251-278.
- Hanger, D.P., Jevons, S. y Shaw, J.T.B. 1988. Fluconazole and testosterone: *in vivo* and *in vitro* studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**:646-648.
- Hardwick, K.G., Weiss, E., Luca, F.C., Winey, M. y Murray, A.W. 1996. Activation of the budding yeast spindle assembly checkpoint without mitotic spindle disruption. *Science.* **273**:953-956.
- Harris, S.D. y Pringle, J.R. 1991. Genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome I; On the role of mutagen specificity in delimiting the set of genes identifiable using temperature-sensitive-lethal mutations. *Genetics.* **127**:279-285.
- Harris, S.D., Cheng, J., Pugh, T.A. y Pringle, J.R. 1992. Molecular analysis of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome I: on the number of genes and the identification of essential genes using temperature-sensitive-lethal mutations. *J. Mol. Biol.* **225**:53-65.
- Hartwell, L.H., Culotti, J., y Reid, B. 1970. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **66**:352-359.
- Hay, R.J. 1993. The need for new antifungals: a clinical appraisal. En Benthley, P.H. y Ponsford, R. (eds.), *Recent advances in the chemistry of anti-infective agents*. Royal Society of Chemistry, pp.163-181.
- Herbrecht, R. 1996. The changing epidemiology of fungal infections: are the lipid-based forms of amphotericin B an advance?. *Eur. J. Haematol.* **56**:112-17.
- Hernández, N. 1993. TBP, a universal eukaryotic transcription factor?. *Genes Dev.* **7**:1291-1308.
- Hinnebusch, A. 1992. General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. En Jones, E., Pringle, J., y Broach, J. (Eds), *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp319-414.
- Hoffman, C.S. y Winston, F. 1987. A ten minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene.* **57**:267-272.
- Hogan Jr., J.C. 1996. Directed combinatorial chemistry. *Nature.* **384**:17-19
- Hong, A., Mann, P., Shaw, K.J. y Didomenico, B. 1994. Analysis of  $\beta$ -glucans and chitin in a *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mutant using high-performance liquid chromatography. *Yeast.* **10**:1083-1092.
- Horowitz, N.H. y Leupold, U. 1951. Some recent studies bearing on the one gene-one enzyme hypothesis, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **16**:65-72.
- Hunter, T. y Plowman, G.D. 1997. The protein kinases of budding yeast:six score and more. *Trends Biochem. Sci.* **22**:18-22.
- Ibrahim AS, Mirbod, F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, , Edwards JE, Nozawa Y, y Ghannoum MA. 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *C. albicans* . *Infect. Immun.* **63**:1993-1998.
- Irie, K., Takase, M., Lee, K.S., Levin, D.E., Araki, H., Matsumoto, K. y Oshima, Y. 1993. *MKK1* and *MKK2*, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.* **13**:3076-3083.
- Ito, F., Fukuda, Y., Murata, K. y Kimura, A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**:163-168.
- Iwasaki, S. 1993. Antimitotic agents: chemistry and recognition of tubulin molecule *Med. Res. Rev.* **13**:183-198.
- Jackson, D.E. y Dewick, P.M. 1984. Aryltetralin lignans from *Podophyllum hexandrum* and *Podophyllum peltatum*. *Phytochemistry.* **23**:1147-1152.
- Jackson, D.E., Figgitt, D.P. y Denyer, S.P. 1992. Topoisomerase II inhibitors: prospects for new antifungal agents. En Sutcliffe J y Georgopapadakou, NH (eds.), *Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy*. Chapman & Hall, New York. pp 374-392.
- Jaehning, J.A. 1993. Mitochondrial transcription: is a pattern emerging?. *Mol. Microbiol.* **8**:1-4.
- Jang, S.H.,y Jaehning, J.A. 1991. The yeast mitochondrial RNA polymerase specificity factor, *MTF1*, is similar to bacterial sigma factors. *J. Biol. Chem.* **266**:22671-22677.
- Jarosch, E., Tuller, G., Daum, G., Waldherr, M., Voskova, A., y Schweyen, R.J. 1996. Mrs5p, an essential protein of the mitochondrial intermembrane space, affects protein import into yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **271**:17219-17225.
- Johnson, L.N., Noble, M.E.B. y Owen, D.J. 1996. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell.* **85**:149-158.

- Johnston, J.R.** 1988. Yeast genetics, molecular aspects. En Campbell, I. y Duffus, J.H. (eds), *Yeast, a practical approach*. IRL Press. pp107-123.
- Johnston, M.** 1996. Genome sequencing: the complete code for a eukaryotic cell. *Curr. Biol.* **6**:500-503.
- Jolidon, S., Polak-Wyss, A., Hartman, P.G. y Guerry, P.** 1993. 2,3-Oxidosqualene-lanosterol cyclase, an attractive target for antifungal drug design. En P.H. Bentley y R. Ponsford (eds.), *Recent advances in the chemistry of anti-infective agents*. Royal Society of Chemistry, London. pp.224-233.
- Jones, T.C. y Stern, J.J.** 1990. Clinical Trials. En Ryley, J.F., (ed.), *Chemotherapy of fungal diseases*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.314-331.
- Kaback, D.B., Oeller, P.W., Yde Steensma, H., Hirschman, J., Ruezinsky, D., Coleman, K.G. y Pringle, J.R.** 1984. Temperature-sensitive lethal mutations on yeast chromosome I appear to define only a small number of genes. *Genetics.* **108**:67-90.
- Kamath, A. y Chakraborty, K.** 1989. Role of yeast elongation factor 3 in the elongacion cycle. *J. Biol. Chem.* **264**:15423-15428.
- Kang, M.S., Elango, N., Mattia, E., Au-Young, J., Robbins, P.W. y Cabib, E.** 1984. Isolation of chitin synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification of an enzyme by entrapment in the reaction product. *J. Biol. Chem.* **259**:14966-14972.
- Kerkenaar, A.** 1987. The mode of action of dimethylmorpholines. En Fromtiling, R.A., (ed), *Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents*. J.R. Prous, Barcelona, pp.523-542.
- Kerridge, D. y Vanden Bossche, H.V.** 1990. Drug discovery: a biochemist's approach. En *Chemotherapy of Fungal Diseases*. Ryley, J.F. (ed). Springer-Verlag, pp. 31-76
- Klepser, M.E., Ernst, E.J. y Pfaller, A.** 1997. Update on antifungal resistance. *Trends Microbiol.* **5**:372-375.
- Klis, F.M.** 1994. Cell wall assembly in yeast. *Yeast.* **10**: 851-869.
- Klotz, S.A., Smith, R.L., y Stewart, B.W.** 1992. Effect of an arginine-glycine-aspartic acid-containing peptide on hematogenous candidal infections in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:132-136.
- Knighton, D.R., Zheng, J., Ten Eyck, L.F., Asford, V.A., Xuong, N.H., Taylor, S.S. y Sowadski, J.M.** 1991a. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science.* **253**:407-414.
- Knighton, D.R., Zheng, J., Ten Eyck, L.F., Xuong, N.H., Taylor, S.S. y Sowadski, J.M.** 1991b. Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science.* **253**:414-420
- Kohalmi, S.E. y Kunz, B.A.** 1988. Role of neighbouring bases and assessment of strand specificity in ethylmethanesulphonate and N-methyl-N'-nitrosoguanidine mutagenesis in the *SUP4-o* gene of *S. cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **204**:561-568.
- Konishi, M., Nishio M., Saitoh, K., Miyaki T., y Kawaguchi.** 1989. Cispentacin, a new antifungal antibiotic. I. Production, isolation, physicochemical properties, and structure. *J. Antibiot.* **42**:1749-1755.
- Kunz, B.A. y Haynes, R.H.** 1981. DNA repair and mutagenesis in yeast. En Strathern, J.N., Jones, E.W. y Broach, J.R. (eds), *Molecular Biology of the yeast Saccharomyces: life cycle and inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. pp.371-414.
- Kwon-Chung, K.J. y Rhodes, J.C.** 1986. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **51**:218-223.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:777-785.
- Langner, C.A., Lodge, J.K., Travis, S.J., Caldwell, J.E., Lu, T, Li, Q., Bryant, M.L., Devadas, B., Gokel, G.W., Kobayashi, G.S. y Gordon, J.I.** 1992. 4-Oxatetradecanoic acid is fungicidal for *Cryptococcus neoformans* and inhibits replication of human immunodeficiency virus. *I. J. Biol. Chem.* **267**:17159-17169.
- Lauzé, E., Stoelcher, B., Luca, F.C., Weiss, E., Schutz, A.R. y Winey, M.** 1995. Yeast spindle pole body duplication gene *MPS1* encodes an essential dual specificity protein kinase. *EMBO J.* **14**:1655-1663.
- Lee, G.S., Savage, E.A., Ritzel, R.G. y Von Borstel, R.C.** 1988. The base-alteration spectrum of spontaneous and ultraviolet radiation-induced forward mutations in the *URA3* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **214**:396-404.
- Lee, S.B. y Taylor, J.W.** 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. En innis, M.A. (eds.). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Inc. pp 282-287. COMPLETAR
- Lehninger, A.L.** 1981. Nucleótidos y estructura covalente de los ácidos nucléicos. En Lehninger, A.L. (ed.), *Bioquímica 2ª edición*. Omega, S.A. pp.315-339.

- Lester, R.L. y Dickinson, R.C. 1993. Sphingolipids with inositolphosphate-containing head groups. *Adv. Lipid Res.* 26:253-273.
- Letwin, K., Mizzen, L., Motro, B., Ben-David, Y., Gernstein, A., Pawson, T. (1992). A mammalian dual specificity protein kinase, Mak1, is related to the NIMA cell cycle regulator and highly expressed in meiotic germ cells. *EMBO J.* 11:3521-3531.
- Levin, D.E. y Bartlett-Heubusch, E. 1992. Mutants in the *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J. Cell. Biol.* 116:1221-1229.
- Lin, R.J., Newman, A.J., Cheng, S.C. y Abelson, J. 1985. Yeast mRNA splicing *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 260:14780-14792.
- Lisowsky, T. y Michaelis, G. 1988. A nuclear gene essential for mitochondrial replication suppresses a defect of mitochondrial transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 214:218-223.
- Lorenz, R.T., Casey, W.M. y Parks, L.W. 1989. Structural discrimination in the sparking function of sterols in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 171:6169-6173.
- Losel, D.M. 1989. Lipids in the structure and function of fungal membranes. En Kuhn, A.P., Trinci, A.P.J., Jung, M.J., Goosey, M.W. y Copping, L.G. (eds), *Biochemistry of the cell walls and membranes in fungi*. Springer-Verlag KG. Berlin. pp119-133
- Maarse, A.C., Blom, J., Grivell, L.A. y Meijer, M. 1992. *MPI1*, an essential gene encoding a mitochondrial membrane protein, is possibly involved in protein import into yeast mitochondria. *EMBO J.* 11:3619-3628.
- Mager, W.H. y de Kruijff, A.J.J. 1995. Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol. Rev.* 59:506-531.
- Mager, W.H. y Moradas Ferreira, P. 1993. Stress response of yeast. *Biochem. J.* 290:1-13.
- Magnus, D.A. y Jaehning, J.A. 1996. Transcription *in vitro* with *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial RNA polymerase. *Methods Enzymol.* 264:57-66.
- Magnus, D.A., Jang, S.H. y Jaehning, J.A. 1994. Release of the yeast mitochondrial RNA polymerase specificity factor from transcription complexes. *J. Biol. Chem.* 269:26568-26574.
- Malone, E.A., Clark, C.D., Chiang, A. y Winston, F. 1991. Mutations in *SPT16/CDC68* suppress *cis*- and *trans*- acting mutations that affect promoter function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11:5710-5717.
- Mandel, G.L., Douglas, R.G. y Bennett, J.E. 1991. *Mycoses. Principles and practice of infectious diseases* (Third Edition). Churchill Livingstone N.Y. Edinburgh, London, Melbourne, pp1942-2034.
- Marriott, M.S. 1990. Rational design of a magic bullet: antifungal drugs. *Rev. Med. Microbiol.* 1: 151-159.
- Martín, H., Arroyo, J., Sánchez, M., Molina, M. y Nombela, C. 1993. Activity of the yeast MAP kinase homologue Slt2 is critically required for cell integrity at 37°C. *Mol. Gen. Genet.* 241:177-184.
- Meunier, F. 1995. Targeting fungi: a challenge. *Am. J. Medicine.* 99:S60-S67.
- Meunier, G. 1989. New methods for delivery of antifungal agents. *Rev. Infect. Dis.* 11:1605-1609.
- Mewes, H.W., Albermann, K., Bahr, M., Frishman, D., Gleissner, A., Hani, J., Heumann, K., Kleine, K., Maierl, A., Oliver, S.G., Pfeiffer, F. y Zollner, A. 1997. Overview of the yeast genome. *Nature.* 387:7-65.
- Michelet, D. y Hélène, C. 1997. La síntesis combinatoria. *Investigación y ciencia.* 254: 20-24.
- Miller, A.M., MacKay, V.L. y Nasmyth, K.A. 1985. Identification and comparison of two sequence elements that confer cell-type specific transcription in yeast. *Nature.* 314:598-603.
- Moir, D., Stewart, S. E., Osmond, B.C. y Botstein, D. 1982. Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties and pseudoreversion studies. *Genetics.* 100:547-563.
- Monk, B.C. y Perlin, D.S. 1994. Fungal plasma membrane proton pumps as promising new antifungal targets. *Crit. Rev. Microbiol.* 20:209-223.
- Monk, B.C., Mason, A.B., Abramochkin, G., Haber, J.E., Seto-Young, D. y Perlin, D.S. 1995. The yeast plasma membrane proton pumping ATPase is a viable antifungal target. I. Effects of the cysteine-modifying reagent omeprazole. *Biochim. Biophys. Acta.* 1239:81-90.
- Muroi, M., Takasu, A., Yamasaki, M. y Takatsuki, A. 1993. Folimycin (concanamycin A), an inhibitor of V-type H<sup>+</sup>ATPase, blocks cell surface expression of virus-envelope glycoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193:999-1005.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Proposed standard M27-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
- Necas, O., Svoboda, A. y Pivnickova, E. 1981. Plasma membrane particles in yeast protoplasts. *Acta Histochem. Suppl.* 23:151-155.

- Newman, A.J. 1994. Pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4:298-304.
- Nguyen, M.H., Barchiesi, F., McGough, D.A., Yu, V.L., Rinaldi, M.G. 1995. *In vitro* evaluation of combination of fluconazole and flucytosine against *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39:1691-1695
- Noble, S.M. y Guthrie, C. 1996. Identification of novel genes required for yeast pre-mRNA splicing by means of cold-sensitive mutations. *Genetics.* 143:67-80.
- Nunes, E., Candreva, E.C., Keszenman, D. y Salvo, V.A. 1993. The mutagenic effect of elevated temperatures in yeast is blocked by a previous heat shock. *Mutation Research.* 289:165-170.
- Odds, F.C. 1993. Resistance of yeast to azole-derivative antifungals. *J. Antimicrob. Chemother.* 31:463-471
- Odds, F.C. 1996. Resistance of clinically important yeast to antifungal targets. *International J. Antimicrob. Agents.* 6:145-147.
- Oehlschlager, A.C. y Czyzewsk, A. E. 1992.. Rationally designed inhibitors for sterol biosynthesis En Sutcliffe J y Georgopapadaku, NH (eds.), Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy. Chapman & Hall, New York. pp.437-475.
- Oki, T., Konishi, M., Tomatsu, K., Tomita, K., Saitoh, K., Tsunakawa, M., Nishio, M., Miyaki, T. y Kawaguchi, H. 1988. Pradimicins, a novel class of potent antifungal antibiotics. *J. Antibiot.* 41:1701-1704.
- Oliver, S.G. 1996a. A network approach to the systematic analysis of yeast gene function. *Trends Genet.* 12:241-242.
- Oliver, S.G. 1996b. From DNA to biological function. *Nature.* 379:597-600.
- Oliver, S.G. 1997. From gene to screen with yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7:405-409.
- Oliver, S.G., van der Aart, Q.J., Agostoni-Carbone, M.L., Aigle, M., Alberghina, L., Alexandraki, D., Antoine, G., Anwar, R., Ballesta, J.P., Benit, P., et al. 1992. The complete DNA sequence of yeast chromosome III. *Nature.* 357:38-46.
- Op den Kamp, J.A.F. 1979. Lipid asymmetry in membranes, *Annu. Rev. Biochem.* 48:47-71.
- Ortega, S., García, J.L., Zazo, M., Varela, J., Muñoz-Wilery, I., Cuevas, P. y Giménez-Gallego, G. 1992. Single step purification on DEAE-Sephacel of recombinant polypeptides produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology.* 10:795-798.
- Panaretou, B. y Piper, P.W. 1992. The plasma membrane of yeast acquires a novel heat-shock protein (hsp30) and displays a decline in proton-pumping ATPase levels in response to both heat shock and the entry to stationary phase. *Eur. J. Biochem.* 206:635-640.
- Paravicini, G., Cooper, M., Friedli, L., Smith, D.J., Carpentier, J.L., Klig, L.S. y Payton, M.A. 1992. The osmotic integrity of the yeast cell requires a functional PKC1 gene product. *Mol. Cell. Biol.* 12:4896-4905.
- Parkinson, T., Falconer, D.J. y Hitchcock, C.A. 1995. Fluconazole resistance due to energy-dependent drug efflux in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1696-1699.
- Parks, L.W., Lorenz, R.T., y Casey, W.M. 1992. Functions for sterols in yeast membranes. En Sutcliffe, J. y Georgopapadaku, N.H., (eds.), Emerging targets in Antibacterial and Antifungal Chemotherapy. Chapman & Hall, New York, pp.393-409.
- Perfect, J.R. y Schell, W.A. 1996. The new fungal opportunists are coming. *Clin. Infect. Dis.* 22: S112-S118.
- Perfect, J.R., Toffaletti, D.L. y Rude, T.H. 1993. The gene encoding phosphoribosylaminoimidazole carboxylase (ADE2) is essential for growth of *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid. *Infect. Immun.* 61:4446-4451.
- Petranyi, G., Meingassner, J.G. y Mieth, H. 1987. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:1365-1368.
- Petsko, G.A. 1996. For medicinal purposes. *Nature.* 384:7-9.
- Pfaller, M. y Wenzel, R. 1992. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11:287-291.
- Pfaller, M.A., Riley, J. y Gerarden, T. 1990. Polyamine deprivation and growth inhibition of *Cryptococcus neoformans* by  $\alpha$ -difluoromethylornithine and cyclohexylamine. *Mycopathologia.* 112:27-32.
- Pinilla, C., Appel, J., Blondelle, S., Dooley, C., Dorner, B., Eichler, J., Ostresh, J., Houghten, R.A. 1995. A review of the utility of soluble peptide combinatorial libraries. *Biopolymers. (Pept. Sci.)* 37:221-240.
- Piper, P.W. 1993. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 11:339-356.
- Piper, P.W. 1995. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity

- and functional overlap. *FEMS Microbiol Lett.* **134**:121-127.
- Piper, P.W., Talreja, K., Panaretou, B., Moradas-Ferreira, P., Byrne, K., Praekelt, U.M., Meacock, P., Recnacq, M., y Boucherie, H. 1994. Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. *Microbiology.* **140**:3031-3038.
- Plunkett, M.J. y Ellman, J.A. 1997. Combinatorial chemistry and new drugs. *Sci. Am.* **276**:68-73
- Poch, O., Schwob, E., de Fraipont, F., Camasses, A., Bordonne, R., y Martin, R.P. 1994. *RPK1*, an essential yeast protein kinase involved in the regulation of the onset of mitosis, shows homology to mammalian dual-specificity kinases. *Mol. Gen. Genet.* **243**:641-653.
- Polak, A. 1988. Mode of action of morpholine derivatives. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **544**:221-228.
- Polak, A. 1990. Mode of action studies. En Ryley, J.F. (ed.), *Chemotherapy of fungal diseases.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 153-182.
- Poon, D., Bai, Y., Campbell, A.M., Bjorklund, S., Kim, Y.J., Zhou, S., Kornberg, R.D. y Weil, P.A. 1995. Identification and characterization of a TFIID-like multiprotein complex from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:8224-8228.
- Popolo, L., Gilardelli, D., Bonfante, P. y Vai, M. 1997. Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggp1Δ* mutant of *S. cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**:463-469.
- Prendergast, J.A., Murray, L.E., Rowley, A., Carruthers, D. R., Singer, R.A. y Johnston, G.C. 1990. Size selection identifies new genes that regulate *Saccharomyces cerevisiae* cell proliferation. *Genetics.* **124**: 81-90.
- Pringle, J.R. 1975. Induction, selection, and experimental uses of temperature-sensitive and other conditional mutants of yeast. *Methods Cell Biol.* **12**:233-272.
- Pringle, J.R. y Hartwell, L.H. 1981. The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. En Strathern, J.N., Jones, E.W., Broach, J.R. (eds.), *Molecular biology of the yeast Saccharomyces: life cycle and inheritance.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.97-142.
- Pringle, J.R. 1991. Staining of bud scars and other cell wall chitin with calcofluor. *Methods Enzymol.* **194**:732-735.
- Pronk, J.T., Steensma, H.Y., y Van Dijken, J.P. 1996. Pyruvate metabolism in *S. cerevisiae*. *Yeast.* **12**:1607-1633.
- Pugh, B.F. y Tijan, R. 1992. Diverse transcriptional functions of the multisubunit eukaryotic TFIID complex. *J. Biol. Chem.* **267**:679-682.
- Rank, G.H. y Robertson, J. 1983. Protein and lipid composition of the yeast plasma membrane. En Spencer, J.F.T., Spencer, D.M. y Smith, A.R.W. (eds.), *Yeast genetics, fundamental and applied aspects.* Springer-Verlag KG. Berlin. pp. 225-241.
- Reese, J.C., Apone, L., Walker, S.S., Griffin, L.A. y Green, M.R. 1994. Yeast TAF<sub>II</sub>s in a multisubunit complex required for activated transcription. *Nature* **371**:523-527.
- Regnacq, M. y Boucherie, H. 1993. Isolation and sequence of HSP30, a yeast heat-shock gene coding for a hydrophobic membrane protein. *Curr. Genet.* **23**:435-442.
- Rex, J.H., Rinaldi, M.G. y Pfaller, M.A. 1995. Resistance of *Candida* species to fluconazol. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1-8
- Reynolds, E.F. 1996. Antifungal agents. En Martindale (ed.), *The extra pharmacopoeia*, 31<sup>st</sup> edition. London: Royal Pharmaceutical Society, pp 393-417.
- Rhodes, J.C. 1988. Virulence factors in fungal pathogens. *Microbiol. Sciences.* **5**:252-254.
- Richardson, D., Brammer, K.W., Marriott, M.S. y Troke, P.F. 1985. Activity of UK 49,858, a bis-triazole derivative, against experimental infections with *Candida albicans* and *Trychophyton mentagrophytes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**:832-835.
- Richardson, K. Recent developments in azole antifungal agents. 1993. En Bentley, P.H. y Ponsford, R., (eds.), *Recent advances in the chemistry of anti-infective agents.* Royal Society of Chemistry, pp.182-191.
- Riemen, G. y Michaelis, G. A. 1993. A point mutation in the core subunit gene of yeast mitochondrial RNA polymerase is suppressed by a high level of specificity factor *MTF1*. *Mol. Gen. Genet.* **237**:49-57.
- Roberts, R.L. y Fink, G.R. 1994. Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev.* **8**:2974-2985.
- Rogers, S., Wells, R., y Rechsteiner, M. 1986. Amino acid sequences common to rapidly

- degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*. **234**:364-368.
- Romanos, M.A., Scorer, C. A. y Clare, J.J.** 1992. Foreign gene expression in yeast, a review. *Yeast*. **8**:423-488.
- Rose, M.D. y Broach, J.R.** 1991. Cloning genes by complementation in yeast. En Guthrie, C. y Fink, G.R. (eds.), *Methods in enzymology*. Academic Press INC. vol 194:195-230
- Rothstein, R.J.** 1983. One step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* **101**:202-211.
- Rowe, J.M., Andersen, J.W., Mazza, J.J., Bennett, J.M., Paietta, E., Hayes, F.A., Oette, D., Cassileth, P.A., Stadtmauer, E.A., Wiernik, P.H.** 1995 A randomized placebo-controlled phase III study of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adult patients (>55 to 70 years of age) with acute myelogenous leukemia: a study of the Eastern Cooperative Oncology Group (E1490). *Blood*. **86**:457-462.
- Rowley, A., Singer, R.A. y Johnston, G.C.** 1991. *CDC68*, a yeast gene that affects regulation of cell proliferation and transcription, encodes a protein with a highly acidic carboxyl terminus. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 5718-5726.
- Ruis, H. y Schüller, C.** 1995. Stress signaling in yeast. *Bioessays*. **17**:959-965.
- Ruiz Echevarría, M.J., Giménez-Gallego, G., Sabariego-Jareño, R. y Díaz-Orejas R.** 1995. Kid, a small protein of the parD stability system of plasmid RI, is an inhibitor of DNA replication acting at the initiation of DNA synthesis. *J. Mol. Biol.* **247**:568-577.
- Ruskin, B., Pikielny, C.W., Rosbash, M., Green, M.R.** 1986. Alternative branchpoints are selected during splicing of a pre-mRNA in mammalian and yeast extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**:2022-2026.
- Ryder, N.S.** 1988. Mechanism of action and biochemical selectivity of allylamine antimycotic agents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **544**:208-220.
- Ryley, J.F.** 1990. Screening and evaluation *in vivo*. En Ryley, J.F., (ed.), *Chemotherapy of fungal diseases*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 129-147.
- Ryley, J.F. y Barrett-Bee, K.** 1992. Screening for antifungal activity. En Sutcliffe J y Georgopapadakou, NH (eds.), *Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy*. Chapman & Hall, New York. pp. 546-567.
- Rymond, B.C. y Rosbash, M.** 1992. Yeast pre-mRNA splicing. En Jones, E.W., Pringle, J.R. y Broach, J.R. (eds.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. pp 143-192.
- Sakuda, S., Nishimoto, Y., Ohi, M., Watanabe, M., Takayama, S., Isogai, A. y Yamada, Y.** 1990. Effects of demethylallosamidin, a potent yeast chitinase inhibitor, on cell division of yeast. *Agric. Biol. Chem.* **54**:1333-1335.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.** 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York.
- Sánchez-Puelles, J.M., Sanz, J.M., García, J.L. y García, E.** 1992. Immobilization and single-step purification of fusion proteins using DEAE-cellulose. *Eur. J. Biochem.* **203**:153-159.
- Sanyal, A. y Getz, F.S.** 1995. Import of transcription factor *MTF1* into the yeast mitochondria takes place through an unusual pathway. *J. Biol. Chem.* **270**:11970-11976.
- Sassenfeld, H.M.** 1990. Engineering proteins for purification. *Trends Biotech.* **8**:88-93.
- Scherer, S. and Davies, R.W.** 1979. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**:4951-4955.
- Schinkel, A.H. y Tabak, H.F.** 1989. Mitochondrial RNA polymerase: dual role in transcription and replication. *Trends Genet.* **5**:149-154.
- Schinkel, A.H., Groot Koerkamp, M.J.A., Tow, E.P.W., y Tabak, H.F.** 1987. Specificity factor of yeast mitochondrial RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **262**:12785-12791.
- Seow, K.T., Meurer, G., Gerlitz, M., Wendt-Pienkowski, E., Hutchinson, C.R. y Davis, J.** 1997. A study of iterative type II polyketide synthases, using bacterial genes cloned from soil DNA: a means to access and use genes from uncultured microorganisms. *J. Bacteriol.* **179**:7360-7368.
- Serrano, R.** 1991. Transport across yeast vacuolar and plasma membrane. En Jones, E.W. y Broach, J.R. (eds.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: genome dynamics, protein synthesis, and energetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. pp 523-585.
- Sharp, P.M. y Cowe, E.** 1991. Synonymous codon usage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **7**:657-678.
- Sherman, D.S.** 1997. Combinatorial biology and the natural product continuum. Natural products drugs discovery. New technologies to increase efficiency and speed. San Diego. Comunicación oral.
- Shi, X., Finkelstein, A., Wolf, A.J., Wade, P.A., Burton, Z.F. y Jaehning, J.A.** 1996. Paf1p, an RNA

- polymerase II-associated factor in *Saccharomyces cerevisiae*, may have both positive and negative roles in transcription. *Mol. Cell. Biol.* **16**:669-76.
- Silverman, S.J., Sburlati, A., Slater, M.L., Cabib, E. 1988. Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 4735-4739.
- Slater, M.L., Sharrow, S.O. y Gart, J.J. 1977. Cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae* in populations growing at different rates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**:3850-3854.
- Smith, V., Botstein, D., Brown, P.O. 1995 Genetic footprinting: a genomic strategy for determining a gene's function given its sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 6479-6483.
- Smith, V., Chou, K.N., Lashkari, D., Botstein, D. y Brown, P.O. 1996. Functional analysis of the genes of yeast chromosome V by genetic footprinting. *Science.* **274**:2069-2074
- Sociedad Española de Higiene y Medicina Preventiva Hospitalarias y Grupo de Trabajo Epincat. 1995. Prevalencia de las infecciones nosocomiales en los hospitales españoles. Proyecto EPINE, 5 años. Informe de la evolución de la prevalencia de infecciones nosocomiales según las encuestas EPINE 1990-1994.
- Sokol-Anderson, M., Sligh J.E., Jr., Elberg, S., Brajtborg, J., H., Kobayashi GS y Medoff G. 1988. Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *C. albicans* to the killing effect of amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**:702-705.
- Stanier, R.Y., Adelberg, E.A. e Ingraham, J.L. 1986. Mutación y función del gen a nivel molecular. En: Stanier, R.Y., Adelberg, E.A.e Ingraham, J.L. (eds.), Microbiología. Reverté S.A.pp:383-409.
- Stillman, B. 1994. Smart machines at the DNA replication fork. *Cell.* **78**:725-728.
- Strauss, E.J. y Guthrie, C. 1991. A cold-sensitive mRNA splicing mutant is a member of the RNA helicase gene family. *Genes Dev.* **5**:629-641
- Sud, I.J. y Feingold, D.S. 1985. Effect of ketoconazole in combination with other inhibitors of sterol synthesis on fungal growth. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**:532-534.
- Sugar, A.M., Hitchcock, C.A., Troke, P.F. y Picard, M. 1995. Combination therapy of murine invasive candidiasis with fluconazole and amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:598-601.
- Sugar, A.M., Salibian, M., Goldani, L.Z. 1994. Saperconazole therapy of murine disseminated candidiasis: efficacy and interactions with amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:371-373.
- Sutcliffe, J.A., Gootz, T.D., y Barrett, J.F. 1989. Biochemical characteristics and physiological significance of major DNA topoisomerases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:2027-2033.
- Suzue, K. y Young, R.A. 1996. Heat shock proteins as immunological carriers and vaccines. *EXS.* **77**:451-465.
- Takeuchi, T., Hara, T., Naganawa, H., Okada, M., Hamada, M, Umezawa, H., Gomi, S., Sezaki, M. y Kondo, S. 1988. New antibiotics, benanomycins A and B from *Actinomycete*. *J. Antibiot.* **41**:807-811.
- Tarbit, M.H. 1990. Pharmacokinetic aspects of antifungal therapy. En Ryley, J.F., (ed.), Chemotherapy of fungal diseases. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.183-204.
- Tarbit, M.H., Robertson, W.R.y Lambert, A. 1990. Hepatic and endocrine effects of azole antifungal agents. En Ryley, J.F., (ed.), Chemotherapy of fungal diseases. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.205-229.
- Tarn, W.Y., Hsu, C.H., Huang, K.Y., Chen, H.R., Kao, H.Y., Lee, K.R. y Cheng, S.C. 1994. Functional association of essential splicing factor(s) with *PRP19* in a protein complex. *EMBO J.* **13**: 2421-2431.
- Tarn, W.Y., Lee, K.R. y Cheng, S.C. 1993a. The yeast *PRP19* protein is not tightly associated with small nuclear RNAs, but appears to associate with the spliceosome after binding of U2 to the pre-mRNA and prior to formation of the functional spliceosome. *Mol. Cell. Biol.* **13**:1883-1891.
- Tarn, W.Y., Lee, K.R. y Cheng, S.C. 1993b. Yeast precursor mRNA processing protein PRP19 associates with the spliceosome concomitant with or just after dissociation of U4 small nuclear RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:10821-10825
- Teutsch, G.T. 1997. Química médica. *Investigación y ciencia.* **254**:12-18.
- Thevelein, JM. 1994. Signal transduction in yeast. *Yeast.* **10**:1753-1790.
- Thuriaux, P. y Sentenac, A. 1992. Yeast nuclear RNA polymerases. En Jones, E.W., Pringle, J.R. y Broach, J.R. (eds.), The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.pp 1-48.
- Tkacz, J.S. 1992. Glucan biosynthesis in fungi and its inhibition. En Sutcliffe J y Georgopapadakou, NH (eds.), Emerging targets in antibacterial and

antifungal chemotherapy. Chapman & Hall, New York. pp. 495-523.

**Tornow, J., Zeng, X., Gao, W. y Santangelo, G.M.** 1993. GCR1, a transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae* complexes with RAP1 and can function without its DNA binding domain. *EMBO J.* **12**:2431-2437.

**Toyn, J.H., Toone, W.M., Morgan, B.A. y Johnston, L.H.** 1995. The activation of DNA replication in yeast. *Trends Biochem. Sci.* **20**:70-73.

**Tran, C.T., Caddle, M.S., Calos, M.P.** 1993. The replication behavior of *S. cerevisiae* DNA in human cells. *Chromosoma.* **102**:129-136.

**Tuite, M.F.** 1996. Death by decapitation for mRNA. *Nature.* **382**:577-579.

**Tzagoloff, A. y Dieckmann, C.L.** 1990. *PET* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **54**:211-225.

**Urbina, J.A., Cohen, B.E., Perozo, E. y Cornivelli, L.** 1987. Spin-labeled amphotericin B: synthesis, characterization, biological and spectroscopic properties. *Biochim. Biophys. Acta.* **897**:467-473.

**Van der Rest, M.E., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B. y Konings, W.N.** 1995. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. *Microbiol. Revs.* **59**:304-322.

**Vanden Bossche, H.** 1985. Biochemical targets for antifungal azole derivatives: hypothesis on the mode of action. En McGinnis, M.R. (ed.), Current Topics in Medical Mycology. Springer-Verlag, New York. Inc. vol 1, pp.313-351.

**Vanden Bossche, H., Marichal, P., Odds, F.C.** 1994. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends in Microbiol.* **2**:393-400.

**Vanden Bossche, H., Marichal, P., Odds, F.C., Le Jeune, L. y Coene, M-C.** 1992. Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:2602-2610.

**Varela, J.C.S. y Mager, W.H.** 1996. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to changes in external osmolarity. *Microbiology.* **142**:721-731.

**Verdine, G.L.** 1996. The combinatorial chemistry of nature. *Nature.* **384**:11-13.

**Wach, A.,** 1996. PCR-Synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast.* **12**:259-265.

**Wach, A., Brachat, A., Poehlmann, R. y Philippsen, P.** 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast.* **10**: 1793-1808.

**Walsh, T.J.** 1992. Invasive fungal infections: problems and challenges for developing new antifungal compounds. En Sutcliffe J y Georgopapadakou, NH. (eds.), Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy. Chapman & Hall, New York. pp.349-373.

**Walsh, T.J. y Butler, K.** 1990. Fungal infections complicating pediatric AIDS. En Pizzo, P.A. y Wilfert, C. (eds.), Pediatric AIDS. Williams and Wilkins, Baltimore, pp.225-244.

**Walsh, T.J. y Pizzo, P.A.** 1988. Nosocomial fungal infections: a classification for hospital-acquired fungal infections and mycoses arising from endogenous flora or reactivation. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**:517-545.

**Walsh, T.J., Hiemenz, J.W., Anaissie, E.** 1996. Recent progress and current problems in treatment of invasive fungal infections in neutropenic patients. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **10**:365-400.

**Weiss, E., Winey, M.** 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene *MPS1* is part of a mitotic checkpoint. *J. Cell. Biol.* **132**:111-123.

**Welihinda, A.A., Beavis, A.D. y Trumbly, R.J.** 1994. Mutations in *LISI(ERG6)* gene confer increased sodium and lithium uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1193**:107-117.

**Wells, W.A.E.** 1996. The spindle-assembly checkpoint: aiming for a perfect mitosis, every time. *Trends Cell Biol.* **6**:228-234.

**Williams, N.** 1996. Yeast genome sequence ferments new research. *Science.* **272**:481

**Winderickx, J., de Winde, J.H., Crauwels, M., Hino, A., Hohmann, S., Van Dijck, P. y Thelevein, J.M.** 1996. Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control?. *Mol. Gen. Genet.* **252**:470-482.

**Winey, M.** 1996. Genome stability: keeping the centrosome cycle on track. *Current Biology.* **6**:962-964.

**Winey, M., Baum, P., Goetsch, L. y Byers, B.** 1991a. Genetic determinants of spindle pole body duplication in budding yeast. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Vol LVI:705-708.

**Winey, M., Goetsch, L., Baum, P., Byers, B.** 1991b. *MPS1* and *MPS2*: novel yeast genes defining distinct steps of spindle pole body duplication. *J. Cell. Biol.* **114**:745-754.

**Winston, F. y Carlson, M.** 1992. Yeast *SNF/SWI* transcriptional activators and the *SPT/SIN* chromatin connection. *Trends Genet.* **8**:387-391.

**Whitehead, R.S.** 1998. Combinatorial chemistry at the crossroads. *Nat. Biotechnol* **16**:2-3.

**Wittmeyer, J. y Formosa, T.** 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase  $\alpha$  catalytic subunit interacts with Cdc68/Spt16 and with Pob3, a protein similar to an HMG1-like protein. *Mol. Cell. Biol.* **17**:4178-4190.

**Wolfner, M., Yep, D., Messenguy, F. y Fink, G.R.** 1975. Integration of aminoacid biosynthesis into the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **5**: 96:272-290.

**Xu, Q., Johnston, G.C. y Singer, R.A.** 1993. The *Saccharomyces cerevisiae* Cdc68 transcription activator is antagonized by San1, a protein implicated in transcriptional silencing. *Mol. Cell Biol.* **13**:7553-7565.

**Xu, Q., Singer, R.A. y Johnston, G.C.** 1995. Sug1 modulates yeast transcription activation by Cdc68. *Mol. Cell Biol.* **15**:6025-6035.

**Yamaki, H., Yamaguchi, M., Imamura, H., Suzuki, H., Nishimura, T., Saito, H. y Yamaguchi, H.** 1990. The mechanism of antifungal action of (S)-2-amino-4-oxo-5-hydroxypentanoic acid, RI-331: the inhibition of homoserine dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**:837-843.

**Yarbrough, G.G., Taylor, D.P., Rowlands, R.T., Crawford, M.S. y Lasure, L.L.** 1993. Screening microbial metabolites for new drugs. Theoretical and practical issues. *J. Antibiotics.* **46**:535-544.

**Youngs, A. y Rose, A.H.** 1989. Sterol uptake by anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **5**:S459-S463.

**Young, R.A.** 1991. RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.* **60**:689-715.

**Zhou, Q. y Berk, A.J.** 1995. The yeast TATA-binding protein (TBP) core domain assembles with human TBP-associated factors into a functional TFIID complex. *Mol. Cell Biol.* **15**:534-539.

**Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C.D.M., Fasch, E.V., Kohlwein, S.D., Paltauf, F. y Daum, G.** 1991. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *S. cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **173**:2026-2034.

**Zitomer, R.S. y Lowry, C.V.** 1992. Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **56**:1-11.

**Zweerink, M.M., Edison, A.M., Wells, G.B., Pinto, W. y Lester, R.L.** 1992. Characterization of a novel, potent and specific inhibitor of serine palmitoyltransferase. *J. Biol. Chem.* **267**:25032-25038.



**ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO:**

μF	microfaradios
μg	microgramos
μl	microlitros
A <sub>600nm</sub>	absorbancia a 600 nm
AN	ácido nitroso
ATP	adenosín trifosfato
cAMP	adenosina-5'-monofosfato-cíclico
Ci	curio
cm	centímetro
DCFH	dihidrocloro fluoresceína
dCTP	deoxicitosin trifosfato
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilen diamino tetracético
EMS	etilmetano sulfonato
g	gramo
GDP	guanosín difosfato
GTP	guanosín trifosfato
h	horas
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
HSP	proteínas de respuesta a estrés térmico ( <i>Heat Shock Proteins</i> )
HTP	ensayos <i>in vitro</i> de elevado rendimiento ( <i>hightrouhput screening</i> )
IP	ioduro de propidio
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
Kb	kilobase
l	litro
M	Molar
mbar	milibar
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
N	normal
NG	nitrosoguanidina
ng	nanogramos
nm	nanómetros
p/v	peso/volumen
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PGK	fosfoglicerato quinasa
RNA	ácido ribonucleico
s	segundo
SDS	dodecil sulfato sódico
SNC	sistema nervioso central
SPB	cuerpo polar del huso mitótico ( <i>Spindle Pole Body</i> )
T°	temperatura
TE	tampón Tris-EDTA
TR	tasa de reversión de la mutación
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
ts	termosensible
U	unidades
ufc	unidades formadoras de colonias
UV	ultravioleta

## Abreviaturas

---

v	voltios
v/v	volumen/volumen
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolil- $\beta$ -galactósido