

Reparación de DNA y morfogénesis en *Candida albicans*

Jonathan Gómez Raja, Alberto Bellido, Rosario Cueva, Toni Ciudad, Belén Naranjo, Encarnación Andaluz y Germán Larriba

Dpto. de Ciencias Biomédicas, Área de Microbiología. Universidad de Extremadura



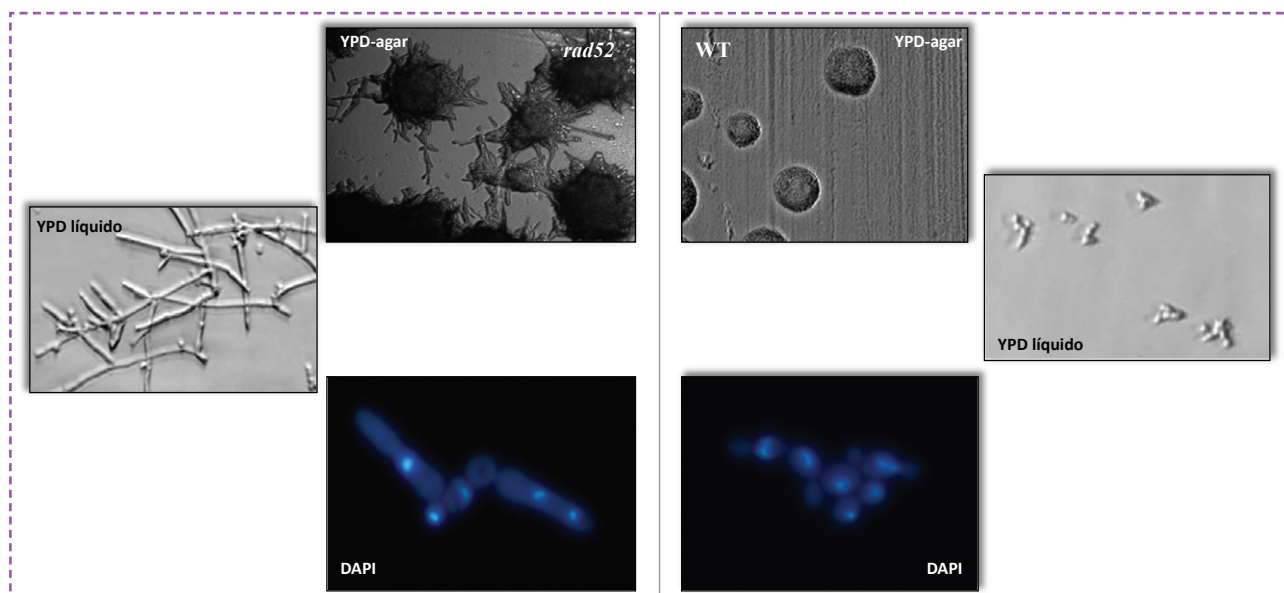
De izquierda a derecha : Jonathan Gómez Raja, Alberto Bellido, Rosario Cueva, Toni Ciudad (delante), Belén Naranjo, Encarnación Andaluz y Germán Larriba.

El grupo de trabajo comenzó a desarrollar su labor hace unos 15 años, cuando la línea de investigación anterior (Secreción y glicosilación en levaduras) fue dando paso paulatinamente a la de «Reparación de DNA y morfogénesis en *C. albicans*». En el año 2007 se publicó el último trabajo en el primer tema, en tanto que el primero de la línea actual se publicó en 1996. Ello significa que el grupo se dedica al estudio exclusivo de *C. albicans* solo hace seis años. Este grupo está formado actualmente por dos Catedráticos (Germán Larriba y Encarnación Andaluz), un Profesor Titular (Rosario Cueva), un Contratado Doctor (Toni Ciudad), un post-doctoral contratado (Jonathan Gómez Raja), un Becario predoctoral (Alberto Bellido), y un Técnico de Laboratorio (Belén Naranjo).

C. albicans es un organismo generalmente diploide con un genoma de unas 32 kb (16 x 2) distribuido en 8 pares de cromosomas. En la naturaleza y en el laboratorio su reproducción es clonal (vegetativa), pero en el año 2000 se

descubrió un ciclo parasexual que implica conjugación de células de distinto o incluso del mismo sexo. El tetraploide formado no sufre meiosis, sino que regresa a la fase diploide por pérdida concertada de cromosomas. Recientemente, se han aislado cepas haploides, las cuales surgen, igualmente, de un diploide por pérdida concertada de cromosomas. Evidentemente, estas células haploides han eliminado los alelos recesivos deletéreos de la población diploide de *C. albicans*, en la que las mutaciones letales en un alelo pasan inadvertidas debido a la funcionalidad del alelo residual. Los procesos de recombinación mitótica traen a homocigosidad alelos beneficiosos surgidos por mutación, una manera habitual de adaptación de *C. albicans* a estreses ambientales incluida la presencia de antifúngicos.

Nuestros esfuerzos se han dedicado a la caracterización de genes de *C. albicans* implicados en recombinación homóloga (HR) y fusión de extremos no homólogos (NHEJ, *non-homologous end-joining*) y a la generación de los corres-



Morfología colonial y celular de mutantes *rad52-ΔΔ* (izquierda) y de cepa silvestre (CAI4) (derecha) de *C. albicans*. Arriba: colonias jóvenes en placas de YPD. Medio: células en YPD líquido. Abajo: células procedentes de medio líquido teñidas con DAPI para la observación de núcleos (obsérvese que en *rad52-ΔΔ* aparecen células anucleadas).

pondientes mutantes, utilizando diferentes técnicas (*URA blaster*, *SAT-flipper*, *PCR-based short-flanking cassettes*). Así, poseemos ahora una colección amplia de mutantes simples, dobles y triples, necesarios para abordar el estudio detallado de procesos específicos de recombinación. También hemos combinado estas mutaciones con construcciones que poseen proteínas etiquetadas con GFP, V5, HA, TAP, etc. En HR nos hemos concentrado en *RAD51*, *RAD52*, y *RAD59*, mientras que en NHEJ hemos estudiado *LIG4*, y *KU70*.

Utilizando mutantes *rad52-ΔΔ* y aprovechando la heterozigosis, descubierta en nuestro laboratorio, existente en el locus *HIS4* de la cepa de referencia SC5314 (Gómez-Raja *et al.*, 2007) aislamos por vez primera cepas de *C. albicans* que son totalmente homocigóticas y aparecen espontáneamente en los cultivos. Este trabajo (Andaluz *et al.*, 2011) fue precursor del descubrimiento de cepas haploides (Hickman *et al.*, 2013, Nature doi:10.1038/nature11865).

Hemos analizados la sensibilidad de los mutantes a diferentes genotoxinas incluyendo químicos (MMS, agentes oxidantes — H_2O_2 , menadiona), radiación ionizante (IR) y ultravioleta (UV), y drogas antitumorales (bleomicina —BLM— y camptotecina —CPT—). Tanto la cepa silvestre de *C. albicans* como sus mutantes de recombinación son entre 40 y 100 veces más resistentes a BLM que las correspondientes cepas de *S. cerevisiae*. De igual manera, los mutantes de recombinación de *C. albicans* son significativamente más resistentes a CPT que los de *S. cerevisiae*. En cambio, los mutantes en HR de *S. cerevisiae* son más resistentes a IR y UV que los de *C. albicans*. Por otra parte, tanto Rad52 como Rad51 son necesarios para la virulencia

de *C. albicans* (Chauhan *et al.*, 2005). Finalmente, todos los mutantes analizados mostraron la misma sensibilidad que la cepa silvestre frente a amphotericina B, anidulafungina, micafungina, y voriconazol, y solo los mutantes *rad52-ΔΔ* y *rad52-ΔΔ rad59-ΔΔ* mostraron mayor sensibilidad a caspofungina, fluconazol e itraconazol. Los mutantes *rad51 rad59* mostraron una alta frecuencia de revertientes resistentes en placas E-test (Bellido, resultados no publicados).

Los mutantes de recombinación en genes importantes para HR (*rad51-ΔΔ*, *rad52-ΔΔ*) exhiben un fenotipo filamentosos (Andaluz *et al.*, 2006), similar al observado en la cepa silvestre en presencia de genotoxinas como MMS o HU (hidroxiurea). Como se deduce de la ausencia de filamentación en los dobles mutantes *rad9 rad52* y *rad53 rad52*, este fenotipo está mediado por las proteínas Rad9 y Rad53 de la cascada de señalización de daño en el DNA. Actualmente trabajamos para conocer el mecanismo por el cual el daño en el genoma induce crecimiento hiperpolarizado en *C. albicans*. Una observación interesante es que, a diferencia de *S. cerevisiae*, los telómeros de *C. albicans* están sujetos a recombinación en presencia de telomerasa (Ciudad *et al.*, 2004; Chico *et al.*, 2011).

Poseemos varias colaboraciones internacionales. Con Richard Calderone (Georgetown University, Washington, DC) hemos colaborado durante la iniciación de la línea de trabajo, especialmente en estudios de virulencia. BB Magee y Judy Berman (Universidad de Minnesota) han proporcionado fósidos y colaborado ocasionalmente en el análisis genómico (hibridación genómica comparada) de nuestras cepas. Kaustuv Sanyal (JCASR, Bangalore, India) solicitó

nuestra colaboración en la determinación epigenética de localización de centrómeros en *C. albicans*, a la que hemos aportado la interacción entre Rad52 y la proteína centromérica Cse4. Neal Lue participó muy decisivamente en el análisis de telómeros de mutantes *rad52* y *ku70*; Christophe d'Enphert (Institute Pasteur, París) trabaja en determinación de haplotipos utilizando nuestras cepas homocigóticas; colaboramos con el Dr. Ruiz-Herrera (CINVESTAV, Irapuato, Mx) en recombinación homóloga en *Yarrowia lipolytica*; y asesoramos a la Maestra Alejandra Espinosa Texis (BUAP, Puebla, Mx), en la caracterización de cepas de *Candida tropicalis* aisladas en México, y en la construcción y análisis de mutantes de recombinación en esta especie.

PUBLICACIONES REPRESENTATIVAS DEL GRUPO

- Andaluz E, Larriba G, Calderone R. (1996) A DNA ligase-encoding gene from *Candida albicans*. *Yeast* 12: 893-898.
- Andaluz E, Calderone R, Larriba G. (1999) Cell cycle regulation of a DNA-ligase encoding gene (CaLIG4) from *Candida albicans*. *Yeast* 15: 1119-1210.
- Larriba G, Coque JJR, Ciudad A, Andaluz E. (2000) *Candida albicans* molecular biology reaches its maturity. *Internat. Microbiol.* 3: 247-252.
- Andaluz E, Calderone R, Reyes G, Larriba G. (2001) Phenotypic analysis and virulence of *Candida albicans* LIG4 mutants. *Infect & Immun* 69: 137-147.
- Ciudad T, Andaluz E, Steinberg-Neifach O, Lue Nf, Gow Nar, Calderone R, Larriba G. (2004) Homologous Recombination In *candida albicans*: Role of CaRad52p in DNA repair, integration of linear DNA fragments and telomere length. *Mol Microbiol.* 53: 1177-1194.
- Conde R, Cueva R, Pablo G, Polaina J, Larriba G. (2004) A search for glycosylation signals in yeast glycoproteins. *J Biol Chem* 279, 43789-43798.
- Andaluz E, Ciudad T, Gómez-Raja J, Calderone R, Larriba G. (2006) Rad52 depletion in *Candida albicans* triggers both the dna-damage checkpoint and filamentation accompanied by but independent of the expression of hypha specific genes. *Mol Microbiol* 59: 1452-1472.
- Chauhan N, Ciudad T, Rodriguez Alejandre A, Larriba G, Calderone R, And Andaluz R. (2005) Virulence and karyotype analysis of *rad52* mutants of *Candida albicans*: regeneration of a truncated chromosome of a revertant strain (*rad52/rad52*) in the host. *Infect & Immun* 73, 8069-8078.
- Andaluz E, Jonathan Gómez-Raja J, Hermosa B, Ciudad T, Rustchenko E, Calderone R, Larriba G. (2007) Loss and fragmentation of chromosome 5 are major events linked to the adaptation of *rad52-ΔΔ* strains of *Candida albicans* to sorbose. *Fungal Genet Biol* 44: 789-798.
- Conde R, Cueva R, Larriba G. (2007) RSC14-controlled expression of MNN6, MNN4 and MNN1 regulates mannosylphosphorylation of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannoproteins. *FEMS Yeast Res* 7: 1248-1255.
- Gómez-Raja J, Andaluz E, Magee B, Calderone R, Larriba G. (2008) A single SNP, G929T (Gly310Val), determines the presence of a functional and a non-functional allele of HIS4 in *Candida albicans* SC5314: detection of the non-functional allele in laboratory strains. *Fungal Genet Biol* 45: 527-541.
- Larriba G, Calderone R. (2008) Heterozygosity and loss of heterozygosity in *Candida albicans*. En «Pathogenic Fungi: Insights in molecular biology» pp. 43-76, Caister Academic Press, UK.
- Ahmad A, Kabir Ma, Kravets A, Andaluz E, Larriba G, Rustchenko E. (2008) Chromosome instability and unusual features of some widely used strains of *Candida albicans*. *Yeast* 25: 433-48.
- García-Prieto F, Gómez-Raja J, Andaluz E, Calderone R, Larriba G. (2010) Role of the homologous recombination genes RAD51 and RAD59 in the resistance of *Candida albicans* to UV light, radiomimetic and anti-tumor compounds and oxidizing agents. *Fungal Genet Biol.* 47: 433-445.
- Zacchi LF, Gomez-Raja J, Davis DA. (2010) Mds3 regulates morphogenesis in *Candida albicans* through the TOR pathway. *Mol Cell Biol* 30: 3695-3710.
- Andaluz E, Bellido A, Gómez-Raja J, Selmecki A, Bouchonville K, Calderone R, Berman J, And Larriba, G. (2011) Rad52 suppresses chromosome loss, and truncation in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 79: 1462-1482.
- Chico L, Ciudad T, Hsu M, Lue N, Larriba G. (2011) The *Candida albicans* Ku70 modulates telomere length and structure by regulating both telomerase and recombination. *PLoS One* 6: e23732.
- Larriba G. and Calderone R. (2011) Genomic instability and DNA repair in *Candida albicans*. En «Candida and Candidiasis». American Society for Microbiology, ASM Press, Washington DC.
- Gomez-Raja J, Davis DA. (2012) The beta-arrestin-like protein Rim8 is hyperphosphorylated and complexes with Rim21 and Rim101 to promote adaptation to neutral-alkaline pH. *Eukaryot Cell* 11: 683-693.



Sigue a la

facebook

twitter

Scoop.it!

www.semicrobiologia.org