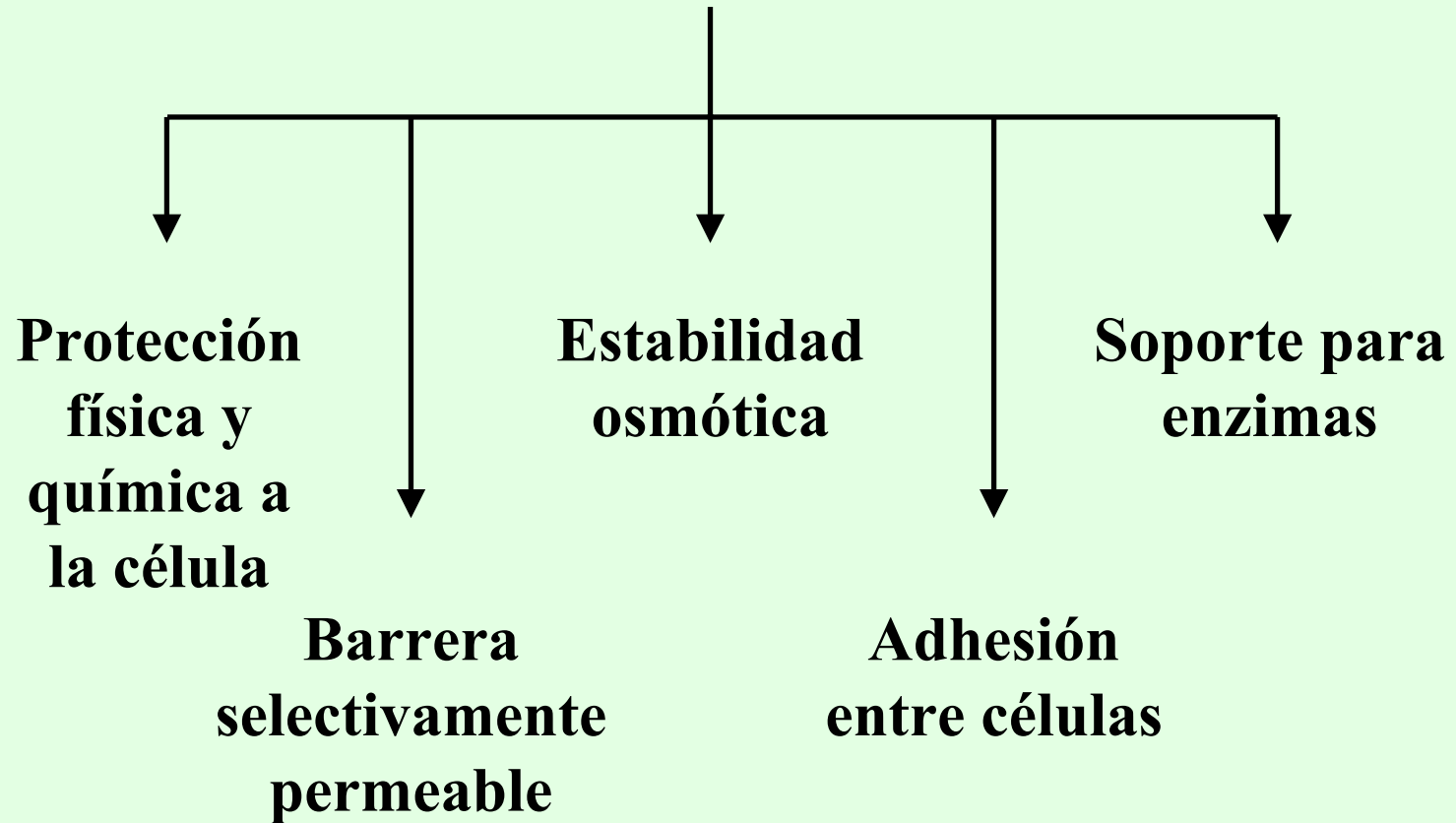


Respuesta transcripcional
global de *C. albicans* al
estrés producido por la
eliminación de la pared
celular (protoplastos) o de
una de sus proteínas
(Ssr1).

Pared Celular



Pared Celular

Espacio Extracelular

MANOPROTEÍNAS

β -1,6-GLUCANO

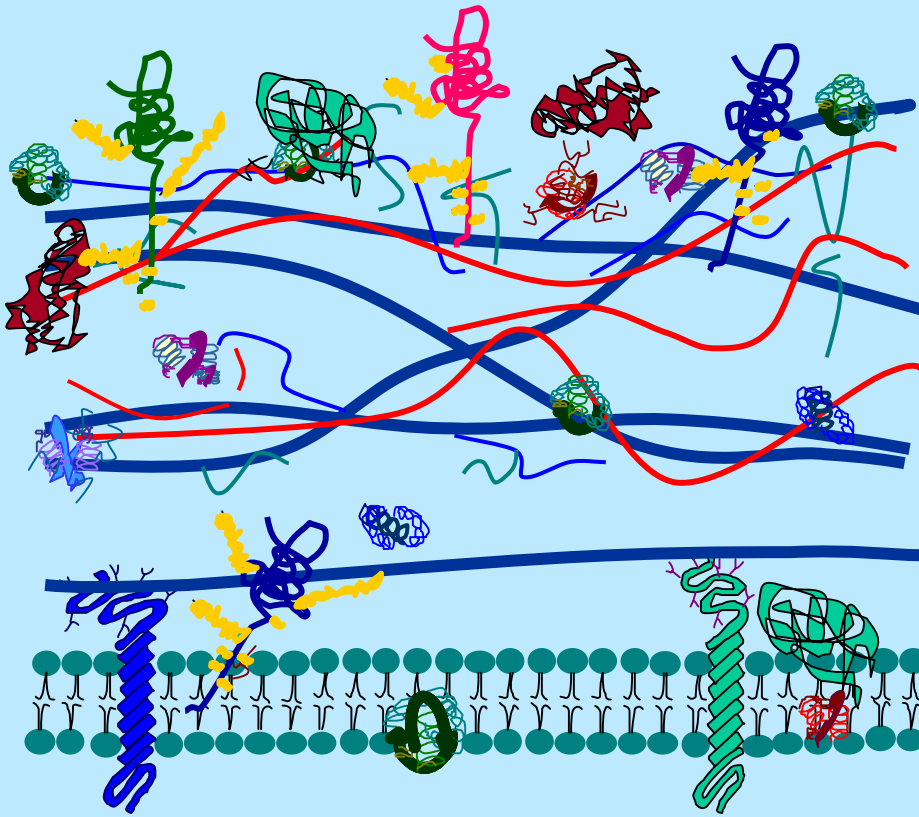
QUITINA

β -1,3-GLUCANO

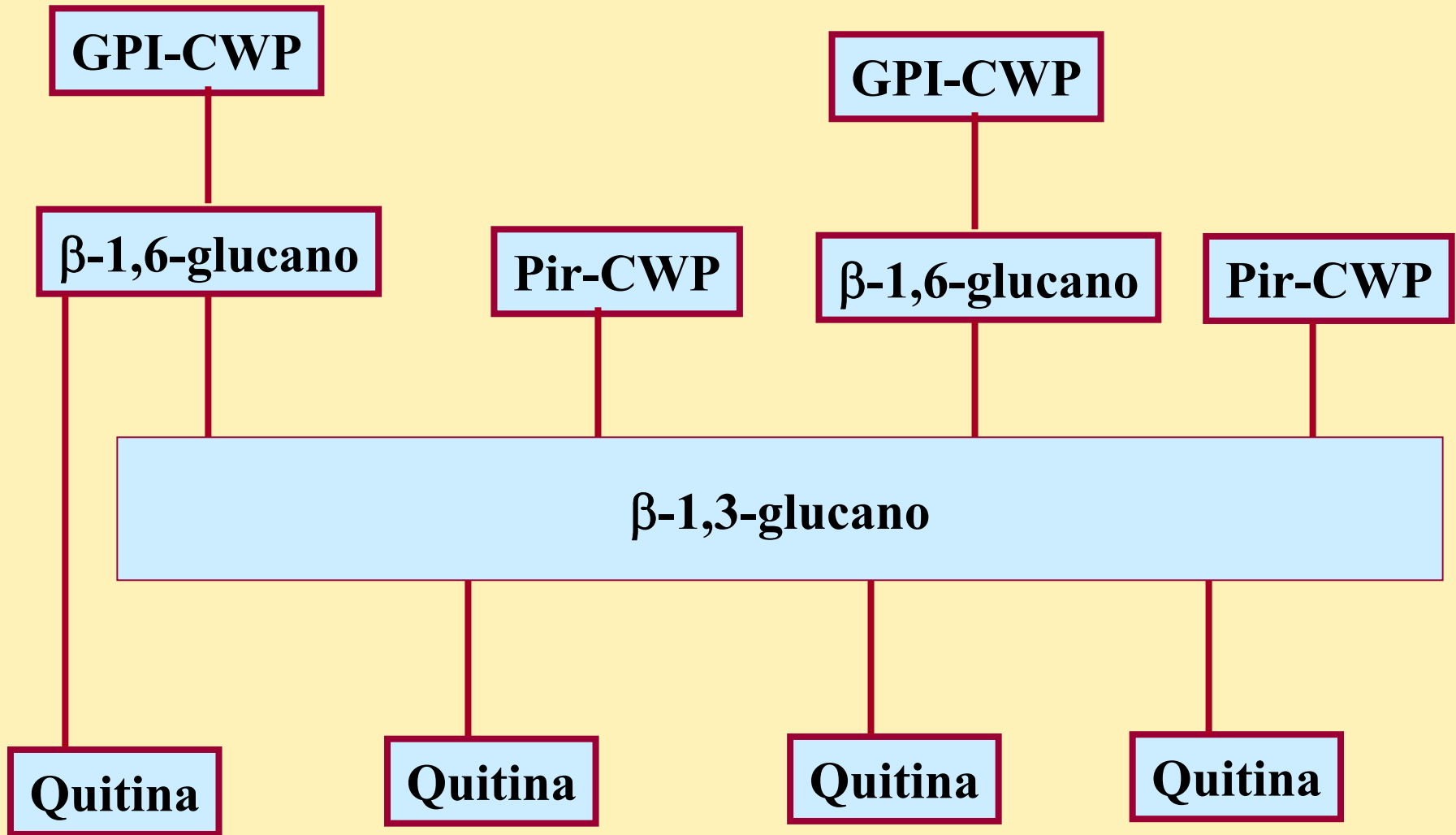
**Pared
Celular**

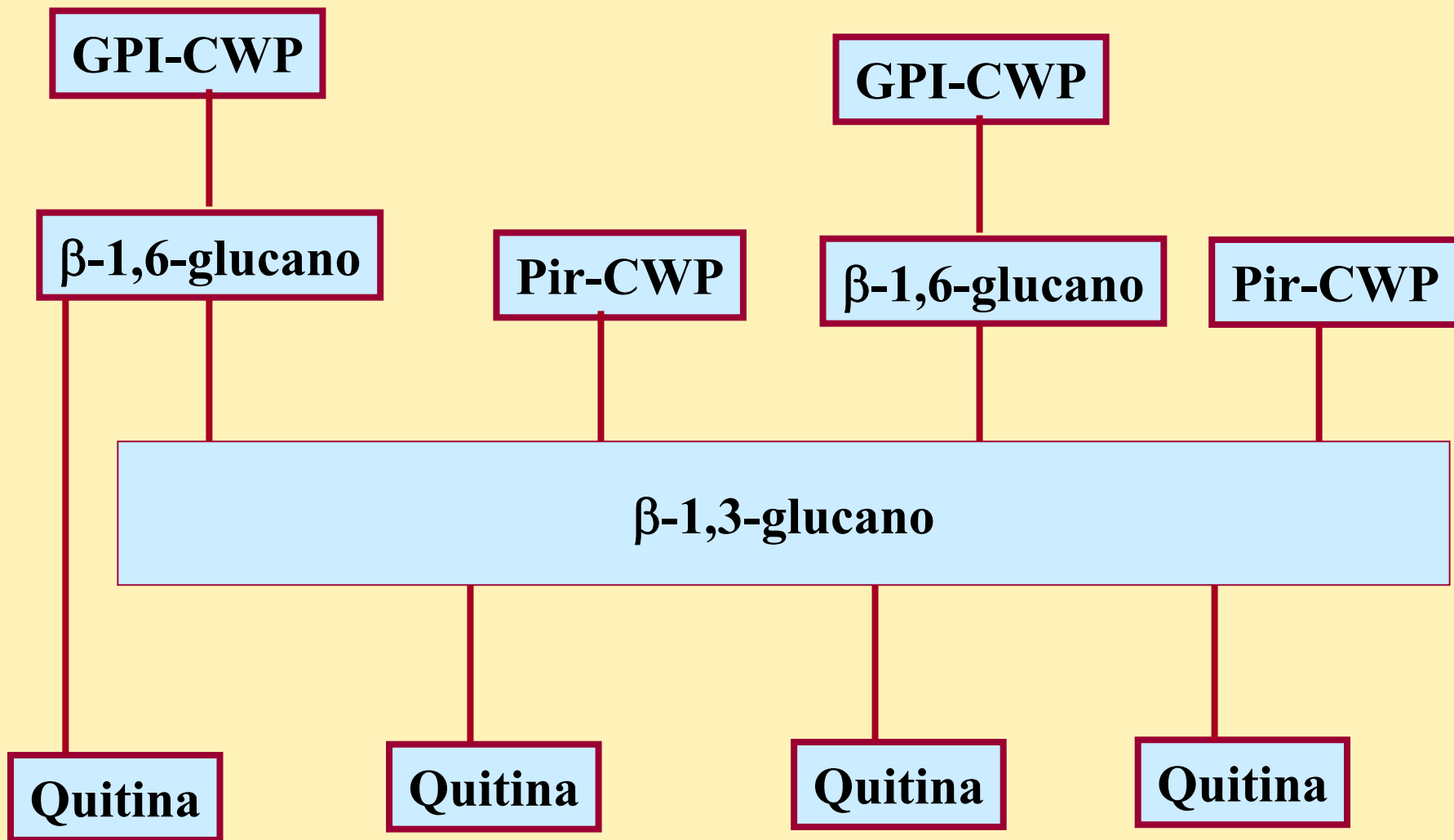
Espacio Periplásmico

Membrana Plasmática

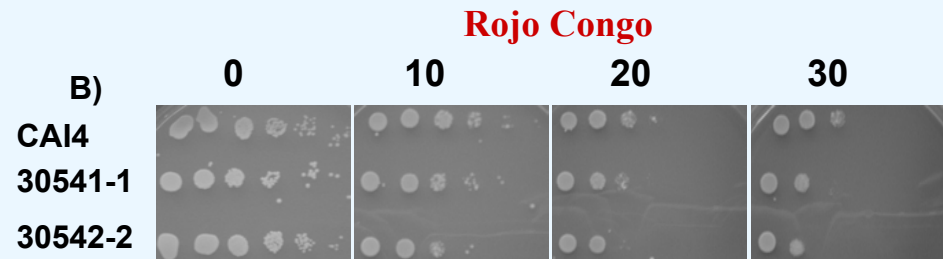
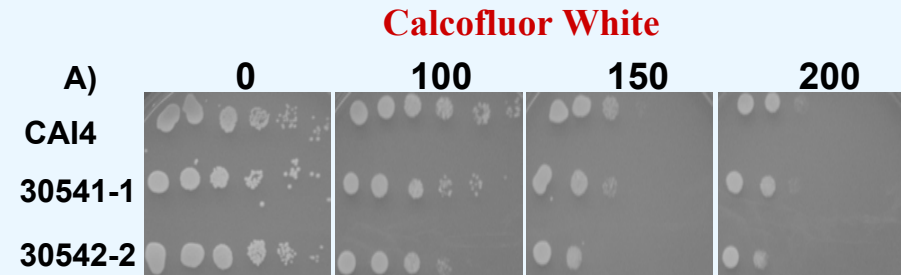
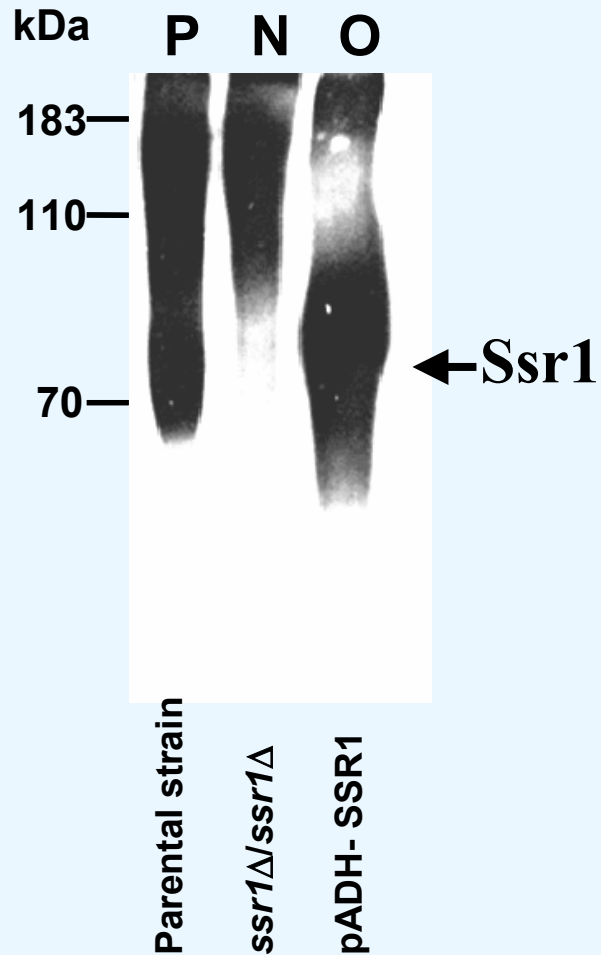


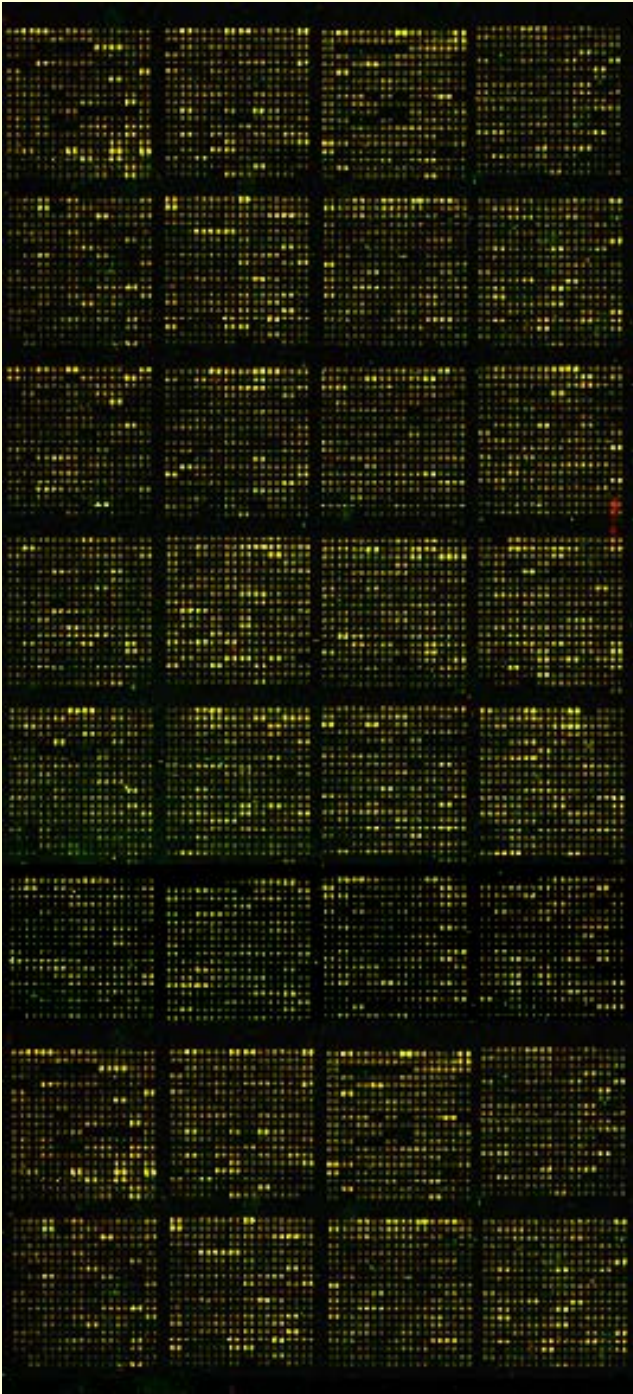
(Glicosilfosfatidilinositol) permite el anclaje de las proteínas





Respuesta transcripcional del mutante $ssr1\Delta$





Estos arrays han sido desarrollados por el Consorcio Europeo, dentro del proyecto (Galar Fungail, QLK2-CT-2000-00795) y en colaboración con Eurogentec, EUROGENTEC Bel S.A., Seraing, Belgium

Hibridación del array
utilizando como sonda el cDNA del mutante *ssr1* (Cy3) y de *CAI4* (Cy5)

Expresión diferencial en el mutante *ssr1*

Nombre	Down-regulated	Función
SSR1	0,3	Secretory Stress Response protein 1
IPF4874	0,3	unknown function
IPF6318	0,4	beta-glucosidase
SOU1	0,5	Sorbitol utilization protein Sou1p
IPF10113	0,5	unknown function
IPF11865	0,5	unknown function
IPF13749.5F	0,5	unknown function, 5-prime end
IPF4181	0,6	putative permease
CRD1	0,6	Cu-transporting P1-type ATPase
YHB3	0,6	flavohemoglobin
IPF8862	0,6	unknown function
AAH1	0,6	adenosine deaminase
IPF8275	0,6	unknown function
IPF6305.EXON1	0,6	unknown function, exon 1
IPF12897	0,6	putative oxidoreductase
IPF7472	0,7	unknown function
IPF3618	0,7	Unknown function
IPF11847	0,7	unknown function
PHA2.3	0,7	prephenate dehydratase, 3-prime end
ATX1	0,7	antioxidant protein and metal homeostasis factor
IPF6085	0,7	unknown function
IPF12470	0,7	unknown function
JEN1	0,7	Carboxylic acid transporter protein
IPF8504	0,7	unknown function
IPF4491	0,7	unknown function
IPF15255	0,7	unknown function
IPF14348.3	0,7	unknown function, 3-prime end

57.7 % función desconocida

Nombre	Up-regulated	Función
IPF10864	1,6	similar to <i>S. cerevisiae</i> Rex4p member exonuclease family
IPF29	1,5	zinc finger protein
PTR3	1,5	transcriptional regulator
IPF5045	1,4	unknown function
IPF16253	1,4	unknown function
SRP54	1,4	signal recognition particle subunit
MRPL33	1,4	ribosomal protein of the large subunit, mitochondrial

Respuesta transcripcional en protoplastos

Células Enteras (CAI4)



H₂PO₄Na pH 8 0.01M
Proteasa/EDTA 1M/βME

30°C-30'



Lavados con KCl 0.6M



Zimoliasa/KCl 0.6M

30°C-15'



Protoplastos



30'

60'

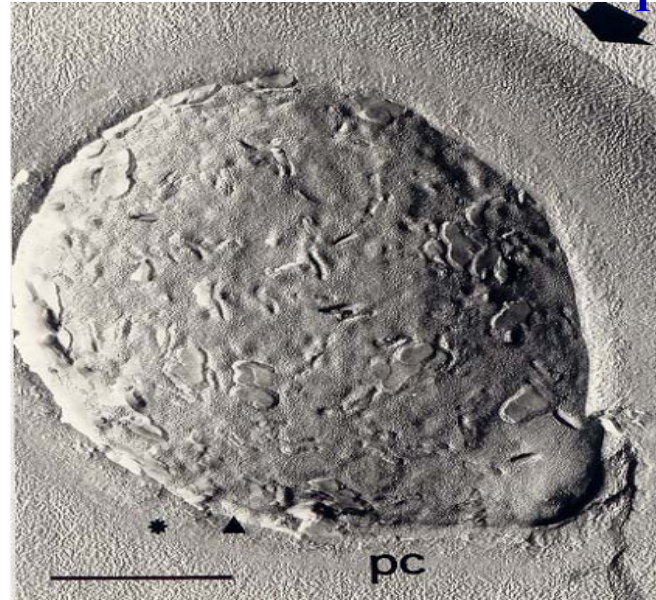
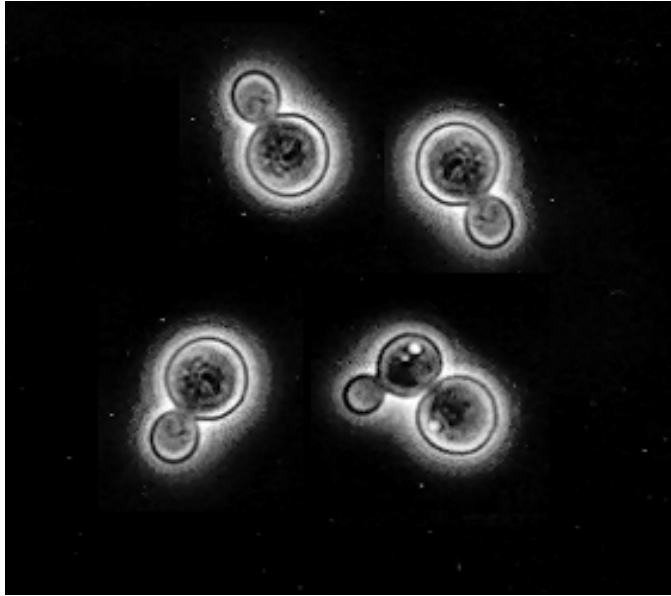
Tiempo de regeneración en
YNB/KCl/uridina

RNA



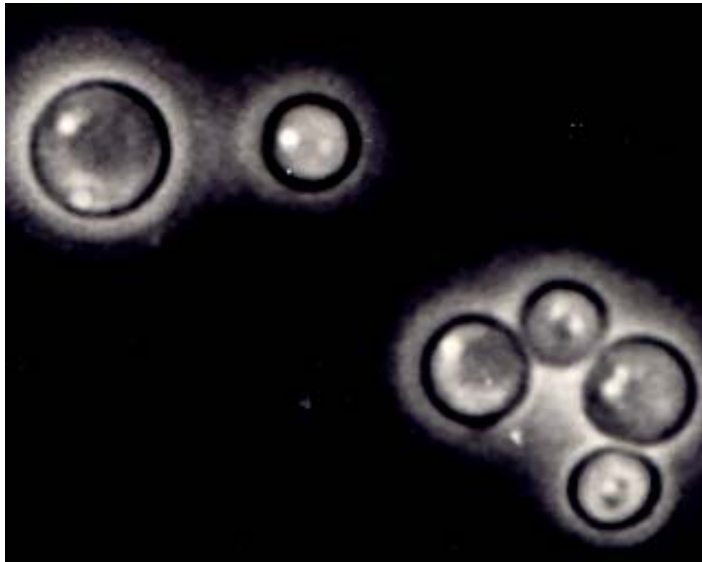
Array

Células Enteras

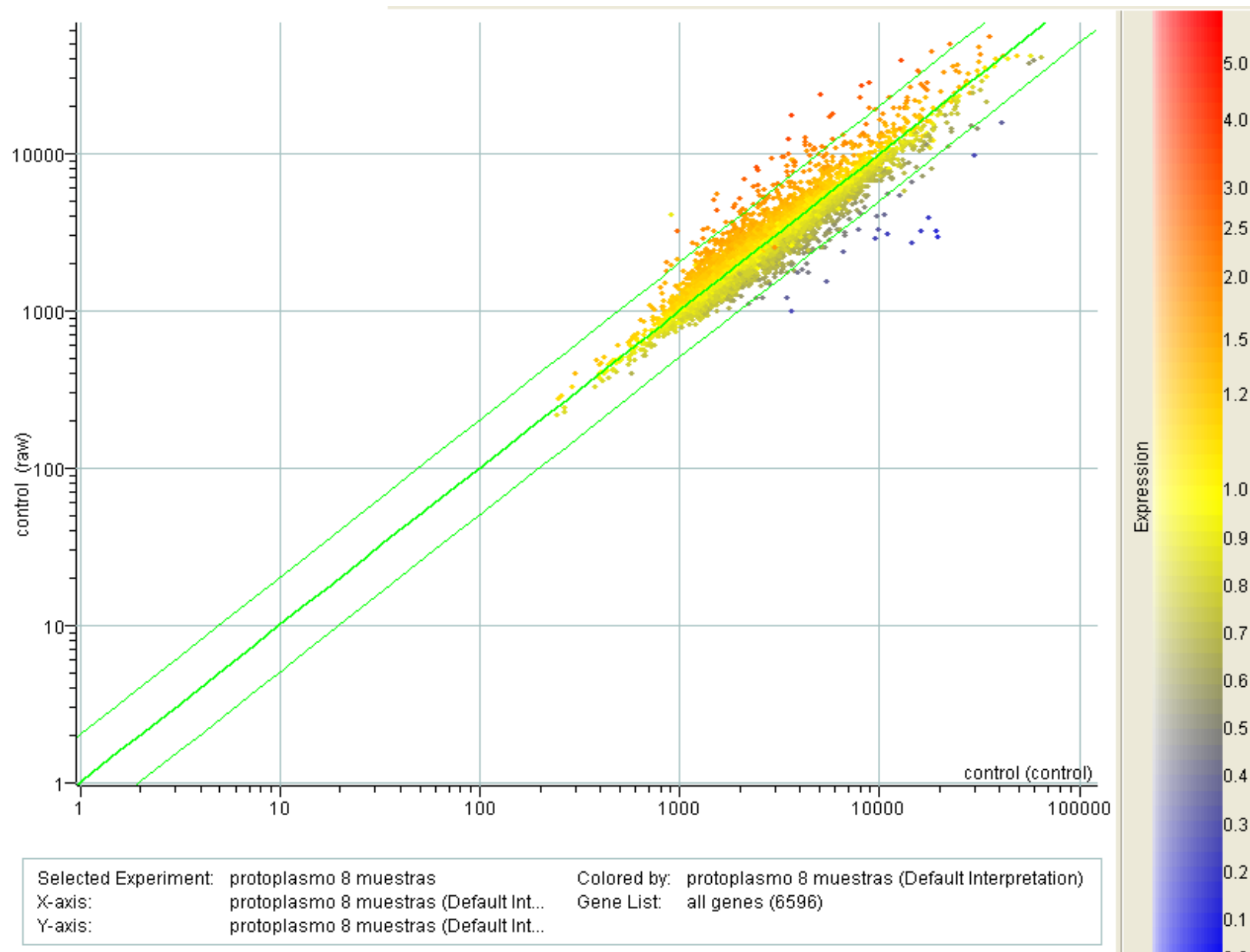


Pared celular

Protoplastos

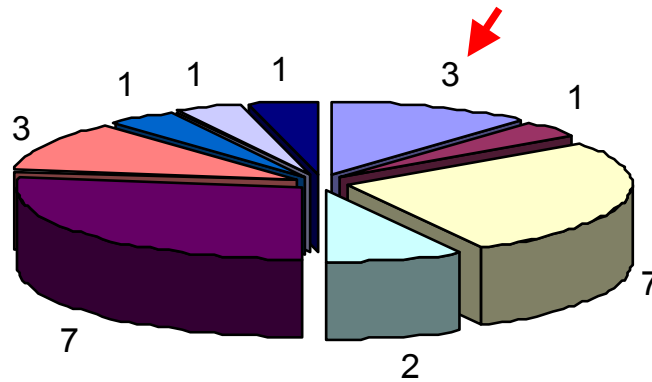


Protoplastos en regeneración 30 minutos



24 genes

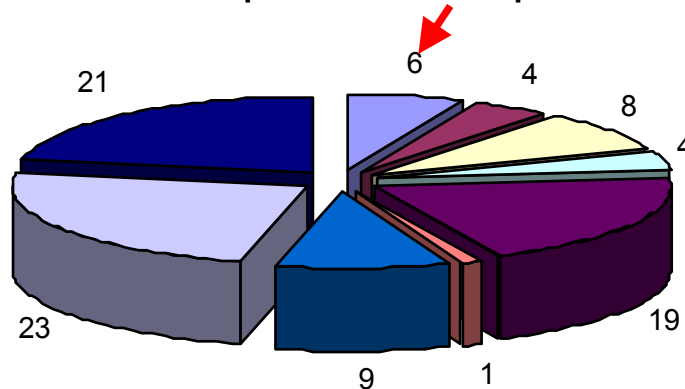
Genes Sobreexpresados de Protoplastos 30'



- cell wall protein
- cytoplasmic and nuclear
- unknow function
- plasma membrane
- cytoplasmic
- Heat-shock
- mitochondrial
- ribosomal
- others

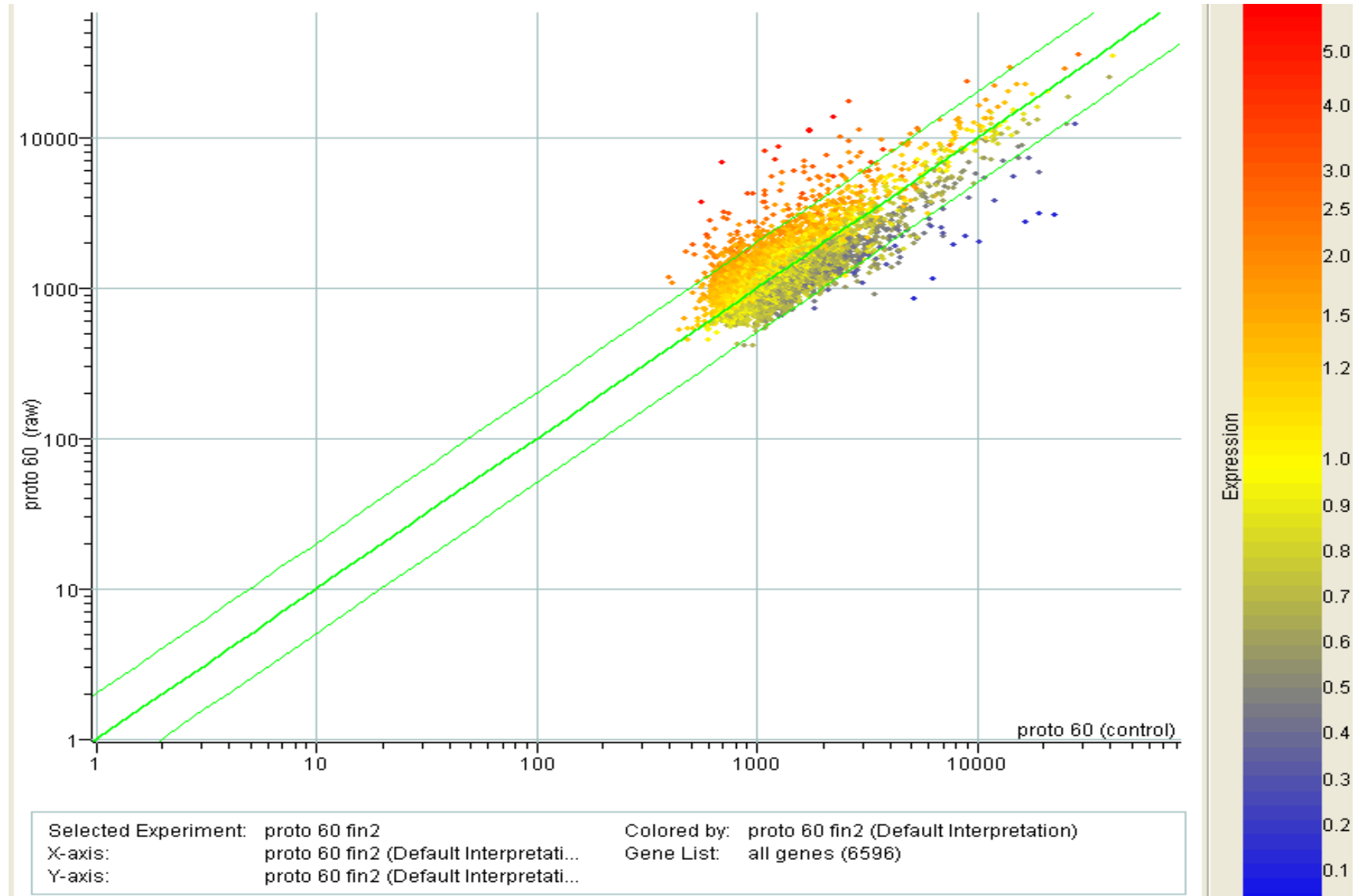
95 genes

Genes Reprimidos de Protoplastos 30'



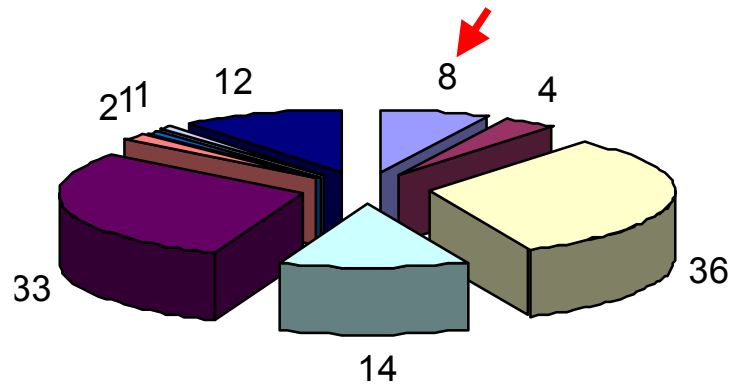
- cell wall protein
- cytoplasmic and nuclear
- unknow function
- plasma membrane
- cytoplasmic
- Heat-shock
- mitochondrial
- ribosomal
- others

Protoplastos en regeneración a 60 minutos

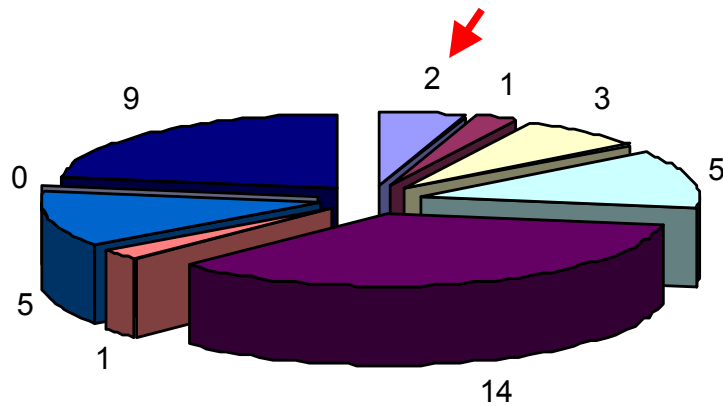


110 genes

Genes Sobreexpresados en protoplastos 60'



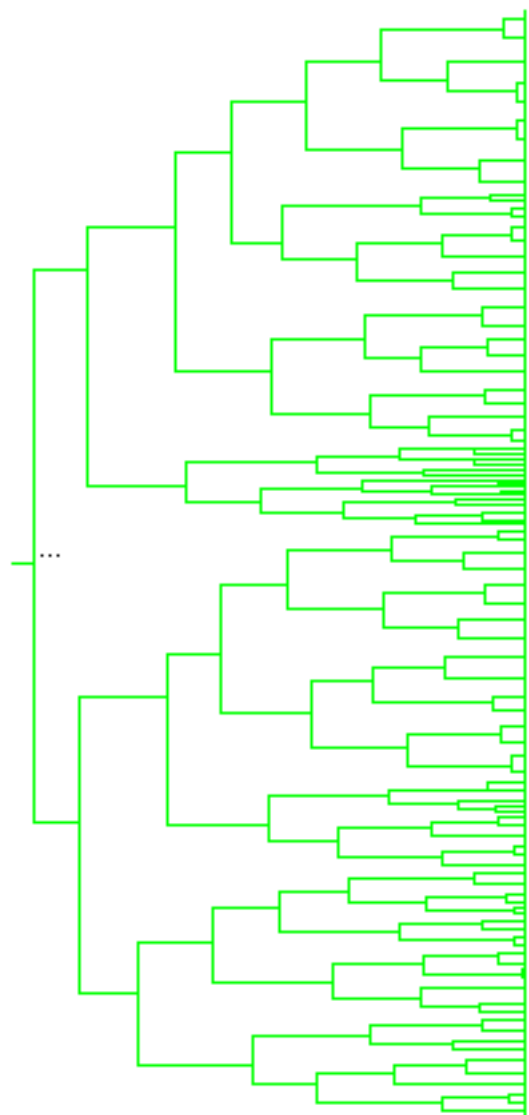
- cell wall protein
- cytoplasmic and nuclear
- unknow function
- plasma membrane
- cytoplasmic
- Heat-shock
- mitochondrial
- ribosomal
- others



- cell wall protein
- cytoplasmic and nuclear
- unknow function
- plasma membrane
- cytoplasmic
- Heat-shock
- mitochondrial
- ribosomal
- others

Genes sobreexpresados durante la regeneración de protoplastos

30 min	60 min	
6,9	2,2	probable heat shock protein (by homology); 385 aa; 37211 Da; pI=7.5
6,1	5,5	DL-glycerol phosphatase; 254 aa; 28134 Da; pI=5.6
4,7	2,3	Glycerol 3-phosphate dehydrogenase (by homology); 371 aa; 40801 Da; pI=5.0
4,4	6,2	unknown function; 352 aa; 37165 Da; pI=5.2
4,1	1,3	unknown function; 258 aa; 27778 Da; pI=5.2
3,8	2,7	sugar transporter (by homology); 546 aa; 60496 Da; pI=5.5
3,6	1,4	Cu-transporting P1-type ATPase; 1197 aa; 131695 Da; pI=5.9
3,5	2,8	unknown function; 439 aa; 50434 Da; pI=6.5
3,5	1,1	cahsp70 mRNA for heat shock; 656 aa; 70324 Da; pI=4.8
2,9	1,9	agglutinin-like protein, 3-prime end; 828 aa; 86543 Da; pI=3.9
2,7	3,4	Isocitrate lyase; 550 aa; 61422 Da; pI=7.3
2,7	3,1	phosphoenolpyruvate carboxykinase; 553 aa; 60978 Da; pI=6.4
2,7	2,3	unknown function; 392 aa; 44035 Da; pI=9.8
2,6	0,7	Unknown function; 88 aa; 9876 Da; pI=7.1
2,5	1,0	unknown function; 121 aa; 13139 Da; pI=5.0
2,4	0,9	nucleosome assembly protein (by homology); 435 aa; 49517 Da; pI=3.9
2,3	2,0	Heat shock protein (by homology); 127 aa; 13325 Da; pI=4.7
2,3	3,5	putative cell wall protein of the PIR family; 346 aa; 36474 Da; pI=4.8
2,2	2,1	unknown Function; 480 aa; 54805 Da; pI=6.9
2,2	1,3	3-isopropylmalate dehydratase (by homology); 776 aa; 86101 Da; pI=5.6
2,1	0,8	putative phosphatidyl synthase; 597 aa; 66372 Da; pI=5.2
2,1	2,5	hexose transporter; 545 aa; 60669 Da; pI=8
2,0	1,5	amino-acid permease (by homology); 568 aa; 63780 Da; pI=8
2,0	4,7	agglutinin-like protein, 3-prime end; 220 aa; 22115 Da; pI=4.5



WT



Protoplast 30



Protoplast 60

← **PIR1**
← **ALS1.5eoc**
← **KRE9**
← **CRH11**
← **IPF1341**
← **IPF20161**
← **IPF1580**
← **PHR2**
← **RBT7**

Expression

Trust



Proteínas con Péptido Señal

Nombre	Descripción		PT30	PT60
IPF19968	putative cell wall protein of the PIR family	→	2,7	3,5
PHR2	pH-regulated protein 2 (cell wall protein)	→	1,3	3,0
RBT7	repressed by TUP1	→	1,0	2,1
KRE2.5f	secretory pathway protein, 5-prime end		1,2	2,0
SEC11	signal peptidase subunit (by homology)		1,1	1,8
IPF3355	similar to S. cerevisiae Cdc1 cell cycle protein involved in ion homeostasis		1,1	1,7
KRE1	secretory pathway protein		1,2	1,6
RBT2	Repressed by TUP1 protein 2; Rbt2p, Ferric reductase	→	1,9	1,1

Nombre	Descripción		PT30	PT60
NCR1	Polytopic membrane protein involved in sterol homeostasis and trafficking		1,0	1,4
KRE9	cell wall synthesis protein	→	0,9	1,3
OST1	oligosaccharyltransferase		0,7	0,5
PHR1	GPI-anchored pH responsive glycosyl transferase	→	0,8	0,5

Teóricas Proteínas GPI

Nombre	Descripción		PT30	PT 60	
ALS4.5f	agglutinin-like protein	→	1,9	4,6	
ALS1.5eoc	agglutinin-like protein	→	2,2	1,9	
ALS12.3f	agglutinin-like protein	→	2,0	4,7	
CRH11	Probable membrane protein		1,0	4,2	←
IPF1341	Similarity to mucin proteins)		1,0	3,1	←
IPF20161	unknown function		0,7	2,9	←
IPF1580	unknown function		1,1	2,3	←
IPF15957	unknown function		0,9	1,9	
SAP9	aspartyl proteinase 9		1,4	1,7	
CRH12	Cell wall protein		1,1	1,6	
IFF2	unknown function		0,9	1,6	
IPF15442	unknown function		1,2	1,5	
RBT5	repressed by TUP1 protein 5		1,4	1,5	
IPF12101	mycelial surface antigen precursor		0,9	1,5	

Nombre	Descripción		PT30	PT 60	
IPF10662	unknown function		0,7	1,4	
SSR1	Secretory Stress Response protein		0,6	1,0	
IFF7	unknown function		0,7	1,0	
IPF20008	unknown function		0,4	0,9	
IPF14598	unknown function		0,7	0,9	
IPF15581	unknown function		0,5	0,8	
IPF10919	Similar to Flo1p (by homology)		0,3	0,7	
IPF11998	unknown function		0,7	0,6	
IPF5185	putative cell wall protein (by homology)		0,3	0,4	

Glucan Sintasa

Nombre	PT30	PT60	Función
→ GSL22	1,2	2,1	1,3-beta-D-glucan synthase subunit
KRE6	1,3	1,7	Glucan synthase subunit
GSL21	1,0	1,7	1,3-beta-D-glucan synthase subunit
KRE62.3F	1,0	1,4	Glucan synthase subunit, 3-prime end
IPF1505	1,4	1,3	similar to saccharomyces cerevisiae Kre6p glucan synthase
SKN1.3	0,8	0,6	Glucan synthase subunit
FEN12	0,7	0,5	Probable subunit of 1,3-beta-glucan synthase

Chitinasa

Nombre	PT30	PT60	Función
CHT3	0,6	0,7	chitinase 3 precursor
CHT2	0,5	0,3	chitinase 2 precursor

Glucanasa-Glucosidasa

Nombre	PT30	PT60	Función
CWH41.5EOC	1,0	2,1	ER glucosidase I, 5-prime end
SCW1	0,7	1,9	glucanase
BGL22	1,1	1,8	endo-beta-1,3-glucanase
UTR2	1,0	1,7	1,3-1,4-beta-glucanase
GLC3	1,1	1,4	1,4-glucan branching enzyme
IPF9740	1,3	1,4	oligo-1,4 -1,4-glucantransferase / amylo-1,6-glucosidase
SUN42	0,8	0,6	Putative cell wall beta-glucosidase
SUN41	0,6	0,5	Putative cell wall beta-glucosidase

Numero de genes que se encuentran sobre-
expresados o reprimidos en los distintos
experimentos.

Experimentos	Sobreexpresados	Reprimidos
<i>ssr1</i> Δ	0	7
Protoplastos 30'	24	95
Protoplastos 60'	110	40

➤ análisis Genespring

- 1- Normalización de los arrays se realizó considerando la intensidad dependiente (Lowess) (per-chip)
- 2- Test Paramétrico , (ANOVA). p-value cutoff 0,01.
- 3- Test de Corrección Múltiple: Benjamini and Hochberg F.D.R

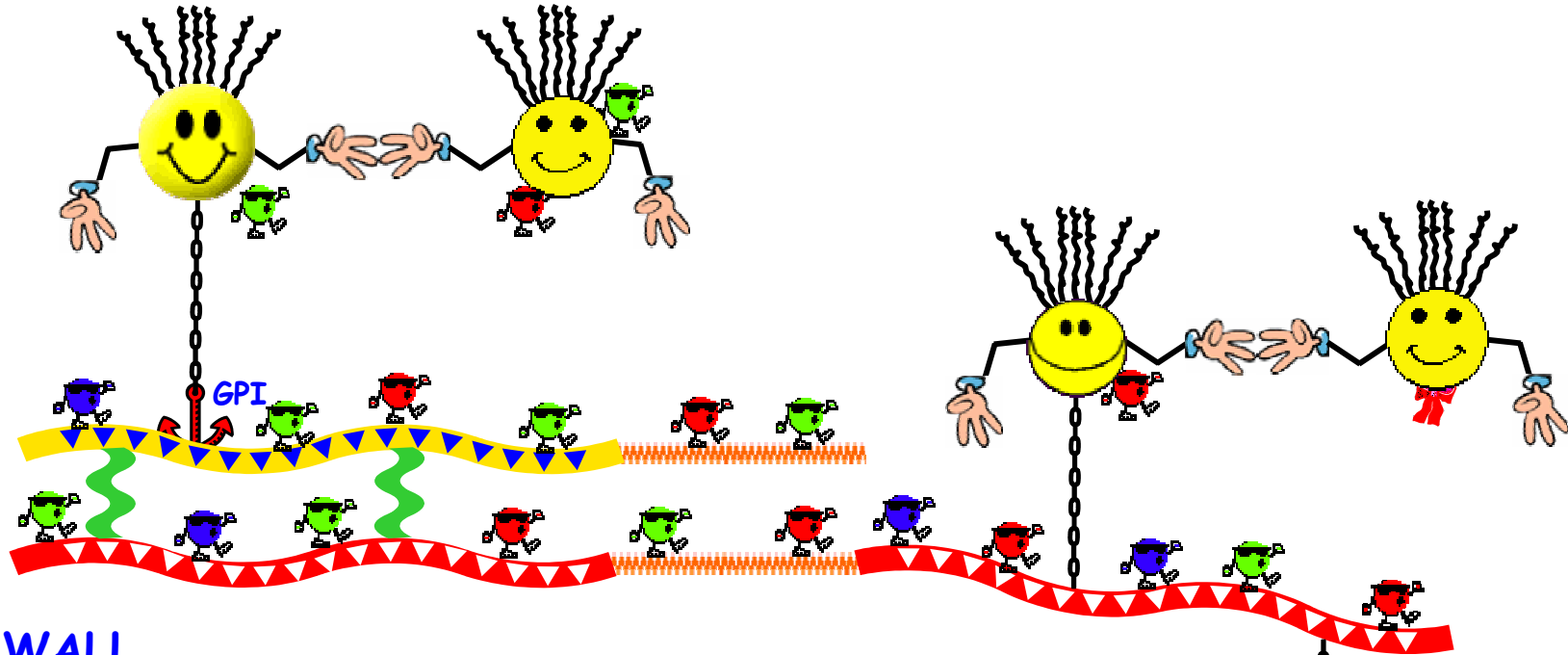
Resumen

1. La respuesta transcripcional del mutante *ssr1*Δ no mostró diferencias significativas con respecto a CAI4, por lo que el efecto de la eliminación de una proteína en la pared, podría estar compensado por otras proteínas.
2. La respuesta transcripcional de protoplastos en regeneración a 30 y 60 minutos mostró diferencias significativas con respecto a la cepa parental CAI4. La respuesta transcripcional de protoplastos regenerados durante 30 minutos genera un aumento considerable de genes con niveles altos de expresión con respecto a la cepa control. Estos genes se encuentran involucrados en:
 - Choque térmico (este último debido al tiempo de reposo de los protoplastos que se realiza a 4°C antes de la regeneración a 28°C)
 - Energía
 - Estabilidad celular
3. Se han encontrado genes de pared celular como aglutininas (ALS4.5f, ALS1.5eoc , ALS12.3f) y la IPF19968 (*CaPIR1*). Los genes relacionados con la biosíntesis de la pared tienen idéntico nivel de expresión que aquellos que se encuentran en células en crecimiento exponencial.

4. En la regeneración de protoplastos a 60 minutos se ha encontrado un aumento de genes de pared celular donde su expresión es mayor en comparación a CAI4, también hemos podido observar la sobreexpresión de genes que se encuentran directamente relacionados con la biosíntesis de la pared como las Glucan sintasa y glucanasas.
5. Podemos decir que la eliminación de una proteína en la pared no altera considerablemente la transcripción genómica en comparación a su control. Por el contrario la eliminación completa de la pared celular provoca un stress a todo nivel y así genes relacionados con la síntesis y arquitectura de la pared, comienzan a sobreexpresarse principalmente a los 60 minutos de regeneración.

El futuro....

- Aumentar los tiempos de regeneración de protoplastos



CELL WALL

 β -1,6-Glucano

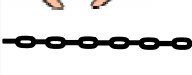
 β -1,3-Glucano

 Quitina

 Proteínas de pared

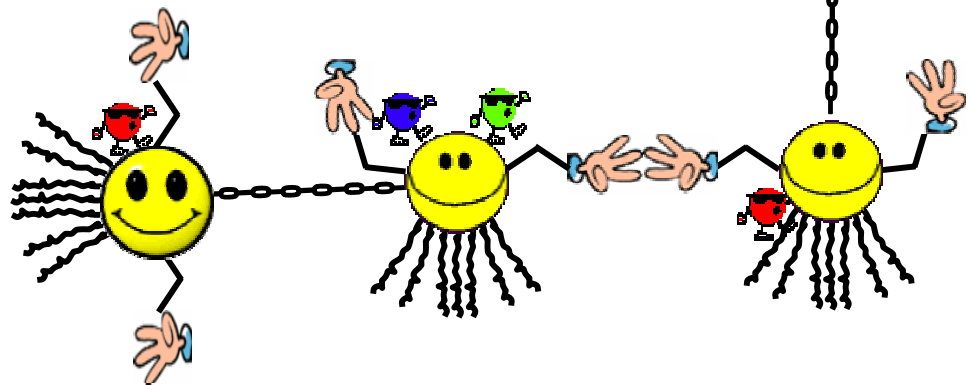
 GPI

 S=S

 Enlace covalente

 Manano

 Proteínas citoplasmáticas



Luis Castillo

Ana Martínez

Ana Garcerá

Inmaculada Moreno

Sergi Maicas

M.Victoria Elorza

Eulogio Valentín

Rafael Sentandreu

Agradecimientos

Angel Dominguez

Rosa Degano

Nuria Martí

Universidad de Salamanca

