

Universidad de Córdoba
Departamento de Química Agrícola, Edafología y Microbiología
Biociencias y Ciencias Agroalimentarias



Regulación y actividad de CaTrk1, CaAcu1 y CaHak1, los tres transportadores de potasio de la membrana plasmática de *C. albicans*.

Regulation and activity of CaTrk1, CaAcu1 and CaHak1, the three potassium transporters of the plasmatic membrane of *C. albicans*.

Autor: Francisco Javier Ruiz Castilla

Directores:

Dr. José Ramos Ruiz

Dra. Carmen M^a Michán Doña

Fecha: 04/02/2022

TITULO: *Regulación y actividad de CaTrk1, CaAcu1 y CaHak1, los tres transportadores de potasio de la membrana plasmática de C. albicans*

AUTOR: *Francisco Javier Ruiz Castilla*

© Edita: UCOPress. 2022
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>



TÍTULO DE LA TESIS: REGULACIÓN Y ACTIVIDAD DE CaTRK1, CaACU1 Y CaHAK1, LOS TRES TRANSPORTADORES DE POTASIO DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE *C. albicans*.

DOCTORANDO/A: FRANCISCO JAVIER RUIZ CASTILLA

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Este trabajo contiene todos los requerimientos necesarios de una Tesis doctoral. La memoria presentada incluye un trabajo riguroso, con unos objetivos claros, unos resultados bien estructurados y novedosos, que se debaten y se resumen en una discusión adecuada y unas conclusiones pertinentes. Estos resultados han sido recogidos hasta la fecha en diversas comunicaciones a reuniones y congresos, y en 4 publicaciones científicas indexadas en revistas de primer nivel internacional.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 02 de febrero de 2022

Firma del/de los director/es

RAMOS RUIZ
JOSE -
30436447H
Firmado digitalmente
por RAMOS RUIZ JOSE
- 30436447H
Fecha: 2022.02.02
12:34:22 +01'00'

Fdo.: José Ramos Ruiz

MICHAN DOÑA
CARMEN MARIA -
31838358X
Firmado digitalmente por MICHAN
DOÑA CARMEN MARIA -
31838358X
Fecha: 2022.02.02 12:31:50 +01'00'

Fdo.: Carmen M^a Michán Doña

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. José Ramos por haber tenido el valor de acoger a aquel estudiante que el primer día de clase se acercó a preguntar si podía estar como alumno colaborador en su laboratorio. Gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de empezar en este mundo. Gracias por los consejos, por tu paciencia conmigo y por enseñarme durante estos años a ser el investigador que soy hoy en día. Aunque acabe esta Tesis Doctoral siempre vas a ser mi mentor y mi referente.

En segundo lugar, quiero agradecer a la Dra. Carmen Michán por la infinita paciencia que ha tenido desde el día que me conoció. Muchas gracias por hacer siempre un hueco para recibirme y sacarme de mis aprietos. Gracias por todas las horas que has dedicado para enseñarme y aconsejarme, tanto con mis experimentos como con mi vida. Sin duda alguna, creo que todos tus alumnos coincidimos en que, tu predisposición por enseñarnos y dedicarnos tu tiempo, hará que nunca nos podamos olvidar de ti.

Al profesor José Luis Martínez y a Clara Navarrete por acogerme en su grupo durante mi estancia en Dinamarca. Os agradezco muchísimo que siempre hayáis tenido la puerta abierta para mí y mis infinitas preguntas, gracias por todos vuestros consejos, por vuestra paciencia conmigo y con la burocracia de la UCO. También quiero agradecer a Fabiano Jares Contesini y a Tomas Struko que, durante mi estancia, me ayudaron a comprender mejor el apasionante mundo de la genética.

A las tres increíbles técnicas que me han aguantado estos años, Tere, Esther y Mari Carmen. Muchísimas gracias por darme vuestro apoyo y ánimos cuando iba a quejarme de que todo iba mal. Sin duda habéis contribuido a que pudiese terminar esta Tesis Doctoral. En especial, me gustaría agradecer a Tere por estar desde mis comienzos en el laboratorio y estar preocupándose por mí hasta el día de hoy.

A Maca, mi “plantóloga” favorita, con lo tranquila y callada que parecías... ¡Como me engañaste! Gracias por las risas, por acogerme en tu piso cuando lo necesitaba y por supuesto, por ser mi amiga incondicional.

A mi amigo Ángel, que desde que lo conocí no hubo día que no me contagiase con su risa y me alegrase el día con sus historias.

A Laura, quien fue mi primera amiga en micro y con la que tantas risas y gorduras he podido compartir. Gracias por estar siempre cuando te necesitaba y por sacarme una sonrisa todo el tiempo.

A mi compañero de departamento y amigo, Juanje. Solo quería decirte que he ganado nuestra apuesta y voy a ser doctor antes que tú. Aunque espero que seas el siguiente en exponer la Tesis a la que tanto esfuerzo le estas dedicando ¡No tardes mucho si no quieres sufrir mis bromas!

A mis compañeros del team "*Candida*" que sufrieron junto a mí haciendo transporte y curvas durante 12 horas seguidas. Junto a vosotros dos: Eli y Pablo, las horas se pasaban volando en el laboratorio. Sois geniales y sé de buena mano que os espera un futuro brillante.

A mis dos compañeros de RT-PCR, Gabi y Fran. No hace falta que diga cuantas horas hemos pasado juntos extrayendo ARN y buscando el "problema" que hacía que no saliesen los resultados. Leer los resultados de las RT-PCRs fallidas con el tema de la película "Tiburón" de fondo siempre estarán en mi memoria.

A mis amigos de la infancia y a mis amigos de Valdejetas. Gracias por tantísimos años siendo mis amigos y por levantarme el ánimo cuando estaba frustrado por algún experimento. Gracias por "secuestrarme" de vez en cuando para alejarme de mis agobios. En especial, quiero agradecer a Carlos que es uno de mis mejores amigos desde la carrera y que me ha ayudado y apoyado mucho durante estos años.

A Belén por ser mi compañera de vida. Gracias por caminar a mi lado durante estos diez años y por creer en mi aun cuando yo no creía, por ser mi felicidad en mis momentos de flaqueza, por ser la persona con la que siempre puedo hablar de mis problemas. No hay día que no recuerde lo afortunado que soy por tenerte a mi lado.

Y por último quiero agradecer a mi familia, a la que le dedico esta Tesis Doctoral, sois las personas más importantes de mi vida. Gracias por todos vuestros ánimos. Especialmente quiero agradecer a mis padres por todo el esfuerzo que han realizado siempre por mí, sé que os habéis privado de mucho por garantizarme un futuro y poder asegurarme una educación. Las palabras se quedan cortas para describir mi agradecimiento. Gracias por ser mis padres.

Índice General

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	5
INTRODUCCIÓN	9
1. Introducción general	11
1.1 Importancia del potasio en los seres vivos	11
1.2 Homeostasis de potasio	11
1.3 Los transportadores de potasio en levaduras	12
1.3.1 Trk1	14
1.3.2 Acu1	18
1.3.3 Hak1.....	20
2. La levadura <i>Candida albicans</i>	24
2.1 Biología y Filogenia	24
2.2 <i>C. albicans</i> : comensalismo y patogenicidad	26
2.3 Homeostasis de potasio en <i>C. albicans</i>	33
3. La tecnología de edición genética CRISPR/Cas9.....	35
3.1 Origen, componentes y mecanismo del sistema CRISPR	35
3.2 Mecanismo de edición genética basado en el sistema CRISPR/Cas9.....	37
OBJETIVOS	41
MATERIAL Y MÉTODOS	45
1. Material biológico. Microorganismos utilizados	47

2. Medios de cultivo y tampones	47
3. Análisis del crecimiento de las cepas	50
3.1 Análisis fenotípico en medio sólido. Test de goteo	50
3.2 Análisis fenotípico en medio líquido. Curvas de crecimiento	51
4. Métodos bioquímicos	52
4.1 Obtención de células con distintos niveles de potasio	52
4.2 Análisis del contenido interno y del flujo de cationes	53
4.2.1 Contenido intracelular de potasio, sodio y litio	53
4.2.2 Determinación del potasio extracelular	54
4.2.3 Transporte de rubidio	54
4.2.4 Efecto del potasio sobre la absorción de sodio y litio	55
4.3 Determinación del volumen celular	56
5. Estudio y determinación del nivel de transcripción	56
5.1 Obtención de las células	57
5.2 Extracción de ADN	57
5.3 Extracción de ARN	58
5.4 Tratamiento con ADNasa.....	58
5.5 Determinación de la concentración de los ácidos nucleicos.....	59
5.6 Retrotranscripción a ADNc	59
5.7 Determinación de la expresión génica mediante RT-PCR.....	60
6. Sistema CRISPR/Cas9	61

6.1 Plásmidos utilizados	61
6.2 Pruebas preliminares.....	61
6.2.1 Linealización y adición de la secuencia telomérica	62
6.3 Diseño del sistema CRISPR/Cas9 para <i>C. albicans</i>	64
6.3.1 Diseño de los ARNg.....	64
6.3.2 Preparación de la zona USER	66
6.3.3 Preparación de los moldes de reparación	67
6.4 Incorporación de los ARNg al plásmido	69
6.5 Linealización del plásmido para USER Cloning	70
6.6 Protocolo de fusión clonación USER.....	72
6.7 Verificación del nuevo plásmido obtenido	73
6.8 Transformación de <i>C. albicans</i>	73
6.9 Comprobación de las mutaciones	74
7. Análisis estadístico.....	76
RESULTADOS	77
Capítulo I: Homeostasis de potasio en cepas “silvestres” de <i>Candida albicans</i>	79
1. Análisis fenotípico en medio sólido y líquido	79
1.1 Crecimiento en condiciones limitantes de potasio	80
1.2 Crecimiento en presencia de los cationes tóxicos sodio y litio.....	82
1.3 Crecimiento en presencia de otras sustancias tóxicas.....	84
2. Contenido intracelular de potasio, sodio y litio	84

3. Absorción del potasio extracelular	86
4. Transporte de rubidio	87
5. Expresión génica de los transportadores de potasio en <i>C. albicans</i>	88
5.1 Análisis transcriptómico en <i>C. albicans</i> 12C	89
5.2 Análisis transcriptómico de <i>C. albicans</i> SC5413	91
CAPÍTULO II: CRISPR/CAS9 MUTAGÉNESIS EN <i>CANDIDA ALBICANS</i>	95
1. Pruebas preliminares.....	96
2. Obtención de mutantes mediante CRISPR/Cas9.....	98
2.1 Incorporación de ARNg y fusión de plásmidos	99
2.2 Colonias obtenidas tras la transformación	99
2.3 Verificación de mutantes.....	100
Capítulo III: Rol del transportador Hak1 en la homeostasis de potasio de <i>Candida albicans</i>	103
1. Análisis fenotípico en medio sólido y líquido	104
1.1 Crecimiento en condiciones limitantes de potasio	104
1.2 Crecimiento en presencia de los cationes tóxicos sodio y litio	107
1.3 Crecimiento en presencia de otras sustancias tóxicas	109
2. Contenido intracelular de potasio, sodio y litio	109
3. Absorción del potasio extracelular	111
4. Transporte de rubidio	112
5. Expresión génica de los transportadores de potasio en <i>C. albicans</i>	113

Capítulo IV: Expresión heteróloga de los transportadores de <i>Candida</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	117
1. Análisis fenotípico en medio sólido y líquido de <i>S. cerevisiae</i>	117
1.1 Crecimiento en condiciones limitantes de potasio	118
1.2 Crecimiento en presencia de los cationes tóxicos sodio y litio	121
1.3 Crecimiento en presencia de otras sustancias tóxicas	123
2. Contenido intracelular de potasio, sodio y litio	125
3. Absorción del potasio extracelular	128
4. Inhibición de la absorción del potasio por los cationes tóxicos sodio y litio en <i>S. cerevisiae</i>	130
5. Determinación del volumen celular en <i>S. cerevisiae</i>	132
6. Transporte de rubidio en <i>S. cerevisiae</i>	133
DISCUSIÓN	137
CONCLUSIONES	147
CONCLUSIONS	151
BIBLIOGRAFÍA.....	155
ANEXO I: DATOS SUPLEMENTARIOS Y ESTADÍSTICA	170
ANEXO II: PUBLICACIONES	196

Índice de Figuras

Figura 1. Transportadores de potasio en la levadura <i>S. cerevisiae</i>	12
Figura 2. Transportadores de potasio identificados en la membrana de las levaduras ...	13
Figura 3. Modelo estructural de ScTrk1	16
Figura 4. Modelo estructural de ScTrk1 basado en la similitud entre Trk1 y Trk2	17
Figura 5. Representación esquemática propuesta de la estructura secundaria y la topología del transportador Acu1	20
Figura 6. Mecanismo de funcionamiento de KimA en <i>B. subtilis</i>	22
Figura 7. Representación esquemática propuesta de la estructura secundaria y la topología del transportador Hak1 de <i>C. albicans</i>	23
Figura 8. Filogenia de especies secuenciadas de clado <i>Candida</i> y <i>Saccharomyces</i>	25
Figura 9. Sitios del cuerpo humano donde <i>C. albicans</i> es comensal y enfermedades que puede producir	27
Figura 10. Etapas del desarrollo de un biofilm en <i>C. albicans</i>	31
Figura 11. Fases del sistema inmune adaptativo CRISPR/Cas	36
Figura 12. Esquema del funcionamiento de CRISPR/Cas9	38
Figura 13. Ejemplo del uso del molde de replicación para realizar el test de goteo	51
Figura 14. Posibles ARNg para la secuencia objetivo	65
Figura 15. Ejemplo de molde de reparación para la secuencia <i>HAK1</i> de <i>C. albicans</i> 12C	68
Figura 16. Comparación de las secuencias del gen <i>ACU1</i> en las cepas SC5314 y 12C de <i>C. albicans</i>	79

Figura 17. Requerimientos de potasio para el crecimiento de las cepas de <i>C. albicans</i> 12C y SC5314 a diversos pHs	80
Figura 18. Efecto de la concentración de KCl y el pH sobre la constante específica de crecimiento de las cepas de <i>C. albicans</i> 12C y SC5314.....	81
Figura 19. Tolerancia a sodio y litio en las cepas de <i>C. albicans</i> 12C y SC5314	82
Figura 20. Efecto de la concentración de NaCl y LiCl sobre la constante específica de crecimiento de las cepas de <i>C. albicans</i> 12C y SC5314	83
Figura 21. Absorción del potasio externo a diferentes pHs en las cepas de <i>C. albicans</i> 12C y SC5314	86
Figura 22. Diagramas de Lineweaver-Burk para el transporte de rubidio	88
Figura 23. Cambios en los niveles de expresión de los genes que codifican los transportadores de potasio en <i>C. albicans</i> 12C	90
Figura 24. Cambios en los niveles de expresión de los genes que codifican los transportadores de potasio en <i>C. albicans</i> SC5314	92
Figura 25. Eficiencia de la transformación de <i>C. albicans</i> 12C con diferentes choques térmicos	96
Figura 26. Eficiencia de la transformación de <i>C. albicans</i> 12C con las dos formas del plásmido pDIV066.....	97
Figura 27 Porcentaje de colonias tras la transformación que pierden del plásmido y recuperan el fenotipo sensible al antibiótico.....	98
Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa con los distintos ARNg tras su incorporación al plásmido pDIV515	99
Figura 29. Eficiencia de la transformación	100
Figura 30. Ejemplos de geles de electroforesis para la verificación de posibles mutantes de <i>C. albicans</i> 12C en los genes de interés	101

Figura 31. Requerimientos de potasio para el crecimiento de las cepas de <i>C. albicans</i> HAK1+ y hak1- a diversos pHs	105
Figura 32. Efecto de la concentración de KCl y pH sobre la constante específica de crecimiento de las cepas de <i>C. albicans</i> SN250 HAK1+ y hak1-	106
Figura 33. Tolerancia a sodio y litio en las cepas de <i>C. albicans</i> SN250 HAK1+ y hak1-	107
Figura 34. Efecto de la concentración de NaCl y LiCl sobre la constante específica de crecimiento de las cepas de <i>C. albicans</i> SN250 HAK1+ y hak1-	108
Figura 35. Contenido intracelular de sodio/litio y potasio en las cepas de <i>C. albicans</i> SN250 HAK1+ y hak1-	110
Figura 36. Absorción del potasio externo a diferentes pHs en las cepas de <i>C. albicans</i> SN250 HAK1+ y hak1-	111
Figura 37. Cambios en los niveles de expresión de los genes que codifican los transportadores de potasio en <i>C. albicans</i> SN250 HAK1+ y hak1-	115
Figura 38. Requerimientos de potasio para el crecimiento de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> BYT12 expresando los genes de transportadores de <i>C. albicans</i> a diversos pHs	119
Figura 39. Efecto de la concentración de KCl y el pH sobre el crecimiento de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> BYT12 expresando los genes de transportadores de <i>C. albicans</i>	120
Figura 40. Tolerancia a sodio y litio en las cepas de <i>S. cerevisiae</i> BYT12 expresando los genes de transportadores de <i>C. albicans</i>	122
Figura 41. Efecto de la concentración de NaCl y LiCl sobre la constante específica de crecimiento de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> BYT12 expresando los genes de transportadores de <i>C. albicans</i>	123
Figura 42. Efecto de los genes de transportadores de <i>C. albicans</i> sobre la tolerancia a la cafeína al expresarse heterológamente en la cepa <i>S. cerevisiae</i> BYT12	124

Figura 43. Efecto de los genes de transportadores de <i>C. albicans</i> sobre la tolerancia al 2,4-dinitrofenol al expresarse heterológicamente en la cepa <i>S. cerevisiae</i> BYT12	125
Figura 44. Contenido intracelular de potasio en las cepas de <i>S. cerevisiae</i> BYT12 expresando los genes de transportadores de <i>C. albicans</i>	126
Figura 45. Contenido intracelular de sodio, litio y potasio en las cepas de <i>S. cerevisiae</i> BYT12 expresando los genes de transportadores de <i>C. albicans</i>	127
Figura 46. Variación del potasio externo a diferentes pHs en las cepas de <i>S. cerevisiae</i> BYT12 expresando los genes de transportadores de <i>C. albicans</i>	129
Figura 47. Inhibición de la absorción del sodio por el catión potasio en las cepas de <i>S. cerevisiae</i> BYT12 expresando los genes de transportadores de <i>C. albicans</i>	131
Figura 48. Inhibición de la absorción del litio por el catión potasio en las cepas de <i>S. cerevisiae</i> BYT12 expresando los genes de transportadores de <i>C. albicans</i>	132

Índice de Tablas

Tabla 1. Sistemas de transporte de potasio en la membrana plasmática de diversas levaduras	14
Tabla 2. Cepas de levadura utilizadas en este trabajo	47
Tabla 3. Medios de cultivo utilizados en este trabajo	48
Tabla 4. Tampones y soluciones utilizados en este trabajo	49
Tabla 5. Cebadores utilizados	60
Tabla 6. Cebadores utilizados para la modificación del plásmido	62
Tabla 7. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR	63
Tabla 8. ARNg diseñados para cada gen diana	67
Tabla 9. Secuencias de los moldes de reparación	68
Tabla 10. Reacción de PCR para fusión plásmido ARNg	69
Tabla 11. Reacción para la enzima AsiSI	71
Tabla 12. Reacción para la enzima Nb.Bsml	71
Tabla 13. User Cloning	72
Tabla 14. Mezcla de transformación	73
Tabla 15. Cebadores de verificación	75
Tabla 16. Reactivos para la verificación de mutantes por PCR	75
Tabla 17. Contenido intracelular de sodio/litio y potasio en las cepas de <i>C. albicans</i> 12C y SC5314	85
Tabla 18. Parámetros cinéticos del transporte de rubidio en <i>C. albicans</i> 12C y SC5314	87

Tabla 19. Parámetros cinéticos del transporte de rubidio en *C. albicans* SN250 *HAK1+* y *hak1-*112

Tabla 20. Volumen celular en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los transportadores de *C. albicans* en diferentes concentraciones de KCl añadido133

Tabla 21. Parámetros cinéticos del transporte de rubidio en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los transportadores de *C. albicans*134

Lista de abreviaturas

Acu: Alkali Cation Uptake.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ADNc: ADN copia.

ADNg: ADN genómico.

Agua DEPC: Agua mQ tratada con dietilpirocarbonato.

Als: Agglutinin-like sequence.

AMP (Antimicrobial peptides): Péptidos antimicrobianos.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNg o RNAg: ARN guía o RNA guide.

Cas (CRISPR asociated protein): Es una enzima endonucleasa de ADN guiada por ARN asociada con el sistema CRISPR.

CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats): Repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas.

crRNA: CRISPR RNA.

CT (Cycle threshold): Ciclo umbral.

dNTPs (Deoxynucleotide Triphosphates): Desoxinucleótidos-trifosfato.

DSBs (Double Strand Breaks): Rotura de la doble cadena de ADN.

H₂O mQ: Agua ultra pura mQ.

Hak: High Affinity K⁺ transporter.

HDR (Homology directed repair): Reparación dirigida por homología.

HNH: Dominio de endonucleasa denominado así por sus dos residuos de Histidina (H) y Asparagina (N).

Hwp: Hyphal wall protein.

HYR/IFF (Hypally upregulated protein e Individual protein file family F)

INDELS (Insertions-Deletions): Inserciones y deleciones

LHL (Long hydrophilic loop): Bucle hidrofílico largo.

MPM (Membrane-Pore-Membrane motifs).

NHEJ (Non homologous end joining): Unión de extremos no homólogos.

NTC: Nourseotricina

ORF (Open reading frame): Marco de lectura abierto.

PAM (Protospacer adjacent motif): Motivo adyacente de protoespaciador.

Pb: Par de bases.

PCR (Polymerase chain reaction): Reacción en cadena de la polimerasa.

Rbt1: Repressed by Tup1.

RNS (Reactive nitrogen species): Especies reactivas de nitrógeno.

ROS (Reactive oxxygen species): Especies reactivas de oxígeno.

RT (Repair template): Molde de reparación.

RT-PCR (Real Time PCR): PCR a tiempo real.

Saps (Secreted aspartyl proteinases): Proteinases aspárticas secretadas.

TAE tampón (Tris, Acetato, EDTA).

TE tampón (Tris-EDTA).

T_m (Melting temperature): Temperatura de fusión.

tracrRNA: Trans-activating CRISPR RNA

Trk: Transport of K⁺.

YNB: Yeast nitrogen base.

YPD: Yeast peptone dextrose.

Resumen

C. albicans es una levadura diploide y patógeno oportunista que se encuentra presente como comensal en la mayoría de los individuos sanos de forma inofensiva. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, esta levadura se convierte en uno de los principales patógenos causantes de infecciones fúngicas en el ser humano, provocando desde enfermedades leves hasta enfermedades potencialmente letales.

Al igual que en todos los seres vivos, el potasio es un catión esencial para este microorganismo, por lo que, para obtener la cantidad necesaria para su supervivencia, *C. albicans* compete con las células de su huésped por el potasio extracelular disponible en el organismo, que suele estar presente a baja concentración (nmol/L) extracelular. Para poder obtener este catión, *C. albicans* ha desarrollado tres sistemas de transporte de potasio diferentes en su membrana plasmática (Trk1, Acu1 y Hak1). Este hecho hace a este microorganismo particularmente interesante al ser de las pocas levaduras que contiene en su membrana plasmática un transportador de potasio de cada familia.

Previamente a esta Tesis Doctoral, se tenía poca información respecto a la homeostasis de potasio en este microorganismo, ya que solo se conocía la existencia de estos transportadores en su membrana plasmática, y que el gen *ACU1* había sido caracterizado como un pseudogen, no encontrándose presente de forma funcional en todas las cepas de *C. albicans*.

Por estas razones y para ampliar el conocimiento que se tenía hasta la fecha, el objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar el proceso de la homeostasis en *C. albicans*. Para ello, se ha llevado a cabo un análisis de estos transportadores en dos cepas "silvestres" de *C. albicans*: la cepa 12C, que contiene los tres transportadores de K⁺ (Trk1, Acu1 y Hak1) y la cepa SC5314, que es ampliamente utilizada como cepa de referencia, pero contiene solo dos transportadores de K⁺ (Trk1 y Hak1). Para poder comprender mejor el papel de cada transportador de forma independiente, se intentó obtener mutantes mediante el sistema CRISPR/Cas9. Sin embargo, debido a los problemas encontrados para obtener estos mutantes, finalmente se decidió realizar dos aproximaciones: en primer lugar, mediante la expresión heteróloga de estos transportadores en una cepa mutante de *S. cerevisiae* carente de sus transportadores de potasio endógenos (*trk1Δtrk2Δ*) y, en segundo lugar, mediante la caracterización de

Resumen

una cepa mutante *hak1-* obtenida anteriormente para estudiar el papel del transportador Hak1 en la homeostasis de potasio de *C. albicans*.

En esta Tesis Doctoral hemos logrado demostrar que *C. albicans* cuenta con unos sistemas de transporte de potasio altamente eficientes que, de forma independiente, son más que suficientes para que este microorganismo sea capaz de adquirir eficazmente el potasio necesario para su supervivencia. Asimismo, demostramos que el transportador Hak1 es especialmente importante en condiciones de pH ácido, donde todo indica que funciona como un simportador de $K^+ : H^+$. Además, se han relacionado algunos de estos transportadores con la tolerancia a diversos iones como son el sodio o el litio. Los estudios del perfil transcriptómico han evidenciado que, como ocurre en otras levaduras, el gen *TRK1* no se encuentra regulado transcripcionalmente de forma importante en ninguna de las condiciones de estrés estudiadas mientras que los genes *ACU1* y *HAK1* se encuentran fuertemente regulados por el ayuno de potasio.

Summary

C. albicans is a diploid yeast and opportunistic pathogen that is harmlessly present as a commensal in most healthy individuals. However, under certain conditions, this yeast becomes one of the main pathogens causing fungal infections in humans, causing mild to life-threatening illnesses.

As in all living beings, potassium is an essential cation for this microorganism. Therefore, to obtain the potassium necessary for its survival, *C. albicans* competes with the cells of its host for the extracellular potassium available in the organism, which is usually present at a low concentration (nmol/L) extracellularly. In order to obtain this cation, *C. albicans* contains three different potassium transport systems in its plasma membrane (Trk1, Acu1 and Hak1). This fact makes this microorganism particularly interesting as it is one of the few yeasts that contains a potassium transporter from each family in its plasma membrane.

Before this Thesis, little information was available regarding potassium homeostasis in this microorganism, since the existence of these transporters was only detected in its plasma membrane, and the *ACU1* gene had been characterized as a pseudogene, not being functionally present in all strains of *C. albicans*.

For these reasons and to broaden the knowledge available to date, the general objective of this Thesis has been to study the process of homeostasis in *C. albicans*. For this, an analysis of these transporters has been carried out in two "wild type" strains of *C. albicans*: strain 12C, which contains the three K⁺ transporters (Trk1, Acu1 and Hak1) and strain SC5314, which is widely used as a reference strain, but contains only two K⁺ transporters (Trk1 and Hak1). In order to better understand the role of each transporter independently, we tried to obtain mutants using the CRISPR/Cas9 system. However, due to the problems encountered in obtaining these mutants. We finally carried out two approaches: first, through the heterologous expression of these transporters in a mutant strain of *S. cerevisiae* lacking its endogenous potassium transporters (*trk1* Δ *trk2* Δ) and secondly, by characterizing a mutant strain previously obtained to study the role of the Hak1 transporter in *C. albicans* potassium homeostasis.

Summary

In this Thesis we have managed to demonstrate that *C. albicans* has highly efficient potassium transport systems that, independently, are more than sufficient for this microorganism to be able to efficiently acquire the potassium necessary for its survival. Likewise, we show that the Hak1 transporter is especially important in acidic pH conditions, where everything indicates that it functions as a $K^+::H^+$ symporter. In addition, some of these transporters have been related to tolerance to various toxic cations such as sodium or lithium. Studies of the transcriptomic profile have shown that, as in other yeasts, the *TRK1* gene is not significantly transcriptionally regulated under any of the stress conditions studied, while the *ACU1* and *HAK1* genes are strongly regulated by potassium starvation.

Introducción

1. Introducción general

1.1 Importancia del potasio en los seres vivos

El potasio es un elemento que resulta indispensable para la vida y todos los seres vivos acumulan grandes cantidades de potasio en el interior celular. La importancia de este elemento radica en que este catión es necesario para cumplir diversas funciones fisiológicas en las células, tales como la regulación del volumen celular y del pH intracelular, el mantenimiento del potencial de membrana, la síntesis de proteínas y la activación de enzimas (Ariño *et al.*, 2010). Debido a que el potasio es un componente celular importante, normalmente se mantiene en concentraciones que pueden oscilar entre 50 mM y 500 mM en el interior de todas las células vivas (Bañuelos *et al.*, 2000) dependiendo del tipo de organismo: 250 mM en *Escherichia coli* (Ashraf *et al.*, 2016), entre 200-300 mM en la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae* (Navarrete *et al.*, 2010), entre 100-200 mM en la mayoría de células vegetales (Leigh y Wyn, 1984) y alrededor de 120 mM en células de mamíferos (Melkikh y Sutormina, 2008).

Por todo lo mencionado anteriormente y debido a que las funciones del potasio en las células no pueden ser reemplazadas por otros cationes sin producir alteraciones en las funciones celulares, todos los seres vivos han desarrollado múltiples mecanismos para acumular este elemento que resulta tan crucial para su supervivencia y lograr mantener una correcta homeostasis.

1.2 Homeostasis de potasio

Los estudios para explicar la homeostasis de potasio se remontan a más de 60 años, donde se dieron los primeros pasos para explicar los mecanismos que mediaban en la absorción de K^+ y otros cationes alcalinos en las levaduras (Conway y O'Malley 1946; Conway y Duggan 1958; Armstrong y Rothstein 1964; Armstrong y Rothstein 1967; Borst-Pauwels, 1981). A partir de entonces, estos organismos se desarrollaron como el modelo ideal para estudiar el transporte y la homeostasis de cationes alcalinos en células eucariotas, convirtiéndose *Saccharomyces cerevisiae* en la levadura mayormente utilizada para estos trabajos. Las razones que convirtieron a *S. cerevisiae* en un organismo modelo se fundamentan principalmente en:

Introducción

- La anotación completa de su secuencia genómica (siendo el primer organismo eucariota secuenciado) (Goffeau *et al.* 1996).
- Su rápido crecimiento.
- La disposición de multitud de herramientas genéticas para la creación de mutantes.
- Su falta de patogenicidad.
- Su capacidad de adaptarse con éxito a una gran variedad de perturbaciones ambientales, iónicas, osmóticas y estrés por pH.

1.3 Los transportadores de potasio en levaduras

Para mantener estable la concentración interna de potasio, las levaduras han desarrollado múltiples sistemas de transporte de este catión. Estos sistemas se encuentran tanto en la membrana plasmática como en las membranas de los distintos orgánulos. En la levadura modelo *S. cerevisiae* se han descrito varios transportadores de potasio en los orgánulos y en la membrana plasmática (Figura 1).

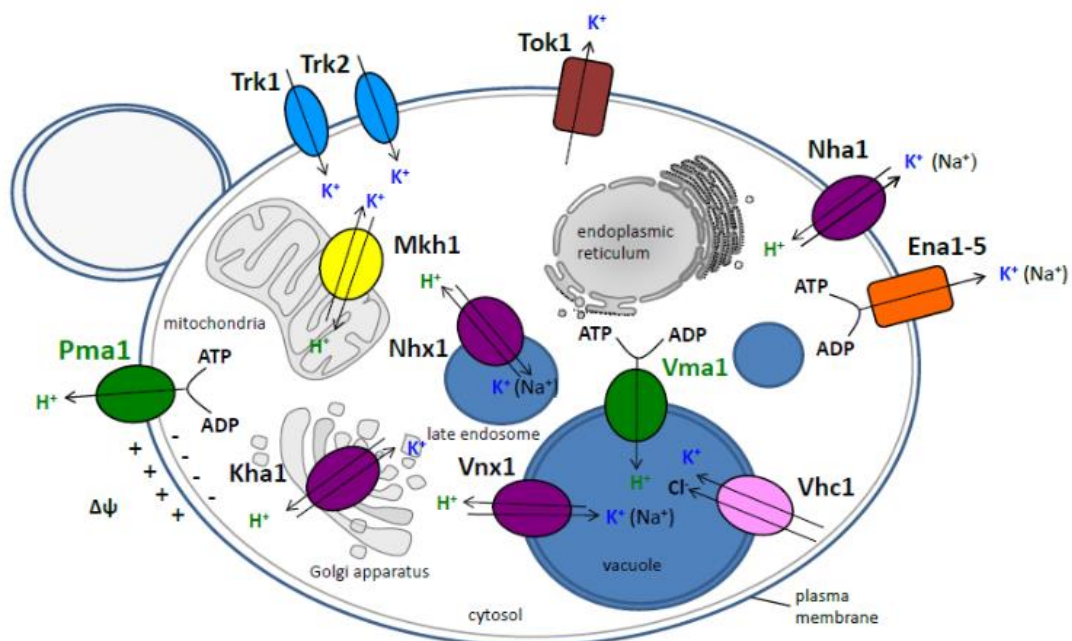


Figura 1. Transportadores de potasio en la levadura *S. cerevisiae* (Adaptado de Ariño *et al.*, 2013).

La existencia de estos transportadores de potasio juega un papel fundamental en la supervivencia de estos microorganismos, ya que permiten captar el potasio externo y regular las concentraciones internas de este catión. Hasta ahora, en levaduras se ha observado que pueden coexistir tres sistemas diferentes de absorción de potasio en la membrana plasmática (Figura 2), difiriendo estos entre sí en su mecanismo de transporte, así como en su estructura primaria proteica y su eficiencia. Estos tres sistemas de transporte son: Trk (Transport of K⁺), un transportador uniportador, Hak (High Affinity K⁺ transporter), un simportador K⁺::H⁺, y Acu (Alkali Cation Uptake), una ATPasa que absorbe K⁺ (Na⁺) (Ramos *et al.*, 2011).

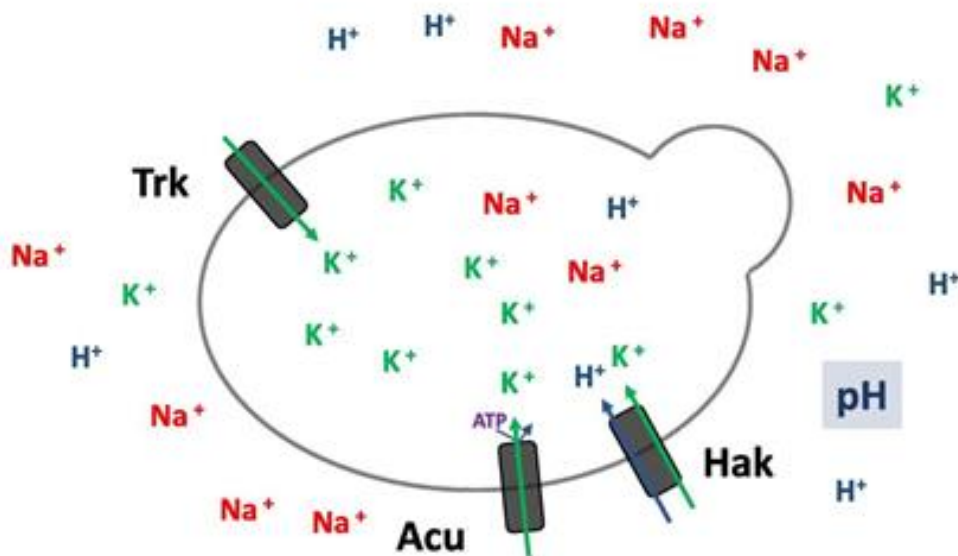


Figura 2. Transportadores de potasio identificados en la membrana de las levaduras (Adaptado de Ruiz-Castilla *et al.*, 2021a).

Sin embargo, la presencia de estos transportadores puede variar dependiendo de la levadura. La existencia de diferentes sistemas de transporte de potasio y las distintas combinaciones refleja la filogenia y la originalidad de los hábitats de las especies de levaduras (Ramos *et al.*, 2011; Stříbný *et al.*, 2012). La Tabla 1 recoge un listado actualizado de los sistemas de transporte de potasio en la membrana plasmática que poseen diversas levaduras.

Tabla 1. Sistemas de transporte de potasio en la membrana plasmática de diversas levaduras (Adaptado de Ramos *et al.*, 2011).

Levadura	Transportadores
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Trk1, Trk2
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Trk1, Trk2
<i>Candida glabrata</i>	Trk1
<i>Candida dubliniensis</i>	Trk1, Hak1, Acu1*
<i>Candida albicans</i>	Trk1, Hak1, Acu1*
<i>Candida parapsilosis</i>	Trk1, Hak1
<i>Candida orthopsilosis</i>	Trk1, Hak1
<i>Candida tropicalis</i>	Trk1, Hak1
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	Trk1, Hak1
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Trk1
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Trk1, Hak1
<i>Pichia stipites</i>	Trk1, Hak1, Acu1

*Pseudogen.

1.3.1 Trk1

La familia de transportadores Trk (Transport of K⁺) comprende una serie de proteínas responsables de transportar potasio, encontrándose distribuidas en muchos tipos de organismos eucariotas (plantas y hongos), procariotas y arqueas (Corratgé-Faillie *et al.*, 2010). Además, estos transportadores son los más ampliamente distribuidos entre levaduras. La denominación de esta familia varía dependiendo del organismo donde se encuentran, llamándose: Trk en hongos (Gaber *et al.*, 1988; Ko y Gaber 1991; Lichtenberg-Fraté *et al.*, 1996; Haro *et al.*, 1999; Bañuelos *et al.*, 2000), Hkt en plantas

(Schachtman *et al.*, 1994; Uozumi *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Horie *et al.*, 2001), y Trk (Rhoads *et al.*, 1976; Epstein y Kim 1971; Schlösser *et al.*, 1991) o Ktr (Nakamura *et al.*, 1998; Takase *et al.*, 1994; Holtmann *et al.*, 2003) en bacterias.

El estudio de este transportador en levaduras (*S. cerevisiae*) comienza en el año 1984, cuando se publica que esta levadura posee un modo de transporte de alta afinidad por el potasio (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984) y un año más tarde, en 1985, se obtiene y caracteriza el primer mutante carente de este modo de transporte (Ramos y Rodríguez-Navarro, 1985). A partir de este mutante, en 1988 se logra identificar el gen *TRK1* (Gaber *et al.*, 1988), convirtiéndose en el primer gen aislado y estudiado que codificaba un transportador de potasio en células eucariotas no animales.

Estas proteínas transportadoras probablemente han evolucionado a partir de canales de K⁺ ancestrales (similares a KcsA de *Streptomyces lividans*) a través de la duplicación de genes y alteraciones en los mecanismos de activación y/o translocación (Durell *et al.*, 1999). La estructura de Trk1 en *S. cerevisiae* (ScTrk1) está compuesta principalmente de cuatro dominios (A, B, C y D) y cada dominio corresponde a un monómero del canal de potasio similar a KcsA (Figura 3A). Estos cuatro dominios se ensamblan alrededor de un eje central formando el poro (Figura 3B y 3C) (Zayats *et al.*, 2015). De esta manera, se forma una estructura tetra-M1PM2 (por sus siglas en inglés, Membrane-Pore-Membrane motifs) donde M corresponde a un segmento hidrofóbico y P a una α -hélice que ingresa a la membrana y conecta los segmentos M. Además de esta estructura, Trk1 también cuenta con una parte intracelular, que se encuentra mayormente localizada entre la primera y segunda estructura MPM formando un bucle hidrofílico largo (LHL por sus siglas en inglés, long hydrophilic loop) (Figura 3D) (Ramos, Sychrová, Kschischo, 2016; Kale *et al.*, 2019).

Introducción

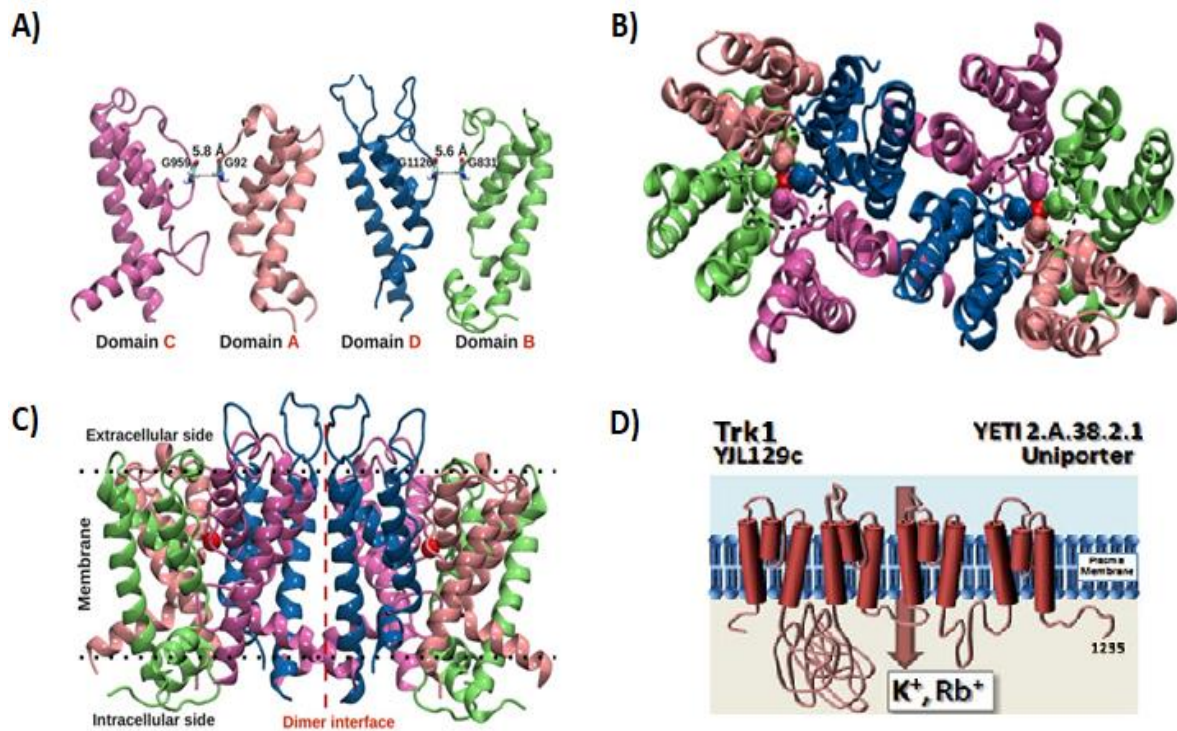


Figura 3. Modelo estructural de ScTrk1. A) La imagen muestra las cuatro repeticiones de cada monómero de Trk1 coloreadas (Dominio A rosa, Dominio B verde, Dominio C magenta, Dominio D azul). Además, se muestran los residuos de glicina del filtro de selectividad en forma de barra y se indican las distancias entre sus átomos de C α (la parte más estrecha del poro). B) La imagen muestra los cuatro dominios ensamblados formando el poro con los iones potasio en los filtros selectivos (esferas rojas). C) La imagen muestra una vista lateral de la estructura dimérica de Trk1 con los iones potasio en los filtros selectivos (esferas rojas). D) Topología propuesta del transportador ScTrk1 donde se muestra la especificidad por el sustrato (Adaptado de Zayats *et al.*, 2015 (A, B y C) y Ramos *et al.*, 2015, p. 193 (D)).

Además de *TRK1* cabe mencionar que, en la levadura modelo *S. cerevisiae*, también se ha descrito un segundo gen de la familia *TRK*, que ha sido denominado como *TRK2* (Ko *et al.*, 1990). Este gen codifica una proteína de 889 residuos de aminoácidos con un 55% de identidad con *TRK1*. Su estructura proteica es muy similar a Trk1, siendo la principal diferencia la longitud de la cadena intracelular de aminoácidos que existe entre el primer y el segundo MPM ya que, mientras que en Trk1 tiene una longitud de 642 residuos de aminoácidos, en Trk2 es más corta, estando compuesta de 326 residuos de aminoácidos (Figura 4) (Ariño *et al.*, 2010; Kale *et al.*, 2019).

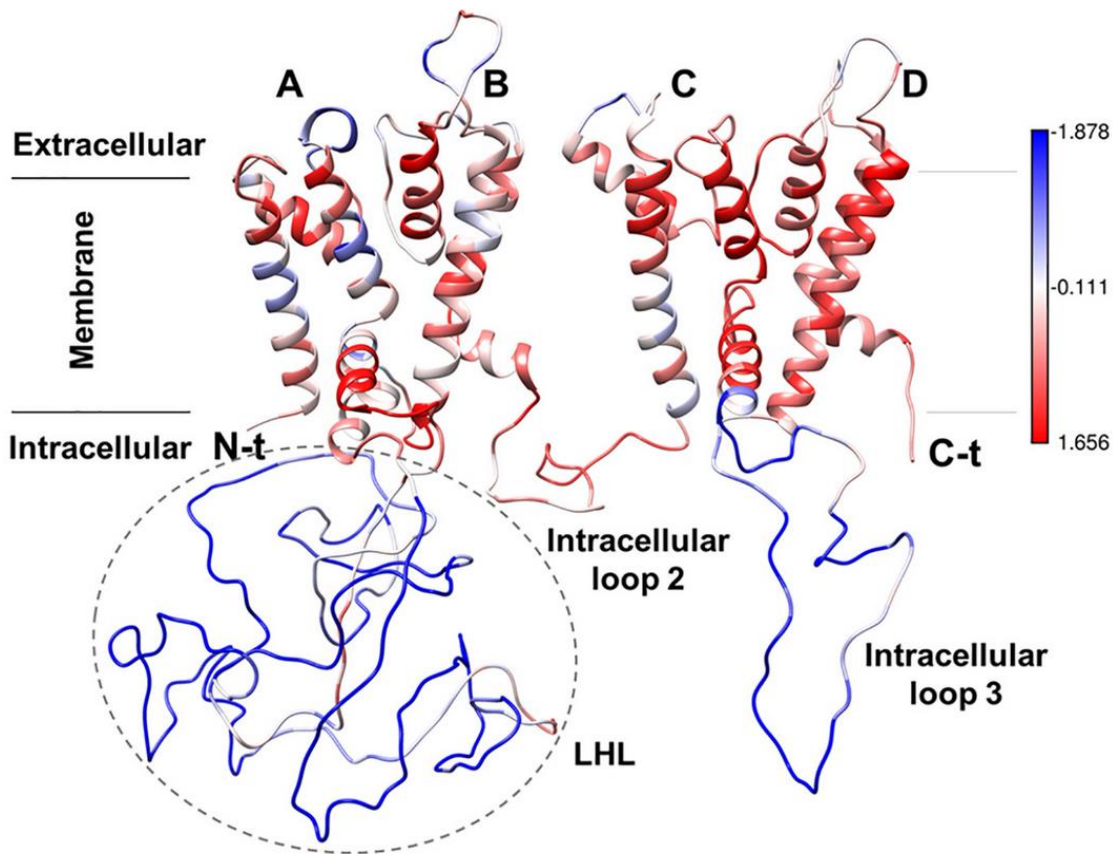


Figura 4. Modelo estructural de ScTrk1 basado en la similitud entre Trk1 y Trk2. El color rojo indica una alta similitud mientras que el color azul indica una baja similitud (Adaptado de Kale *et al.*, 2019).

Cuando se comparan a nivel proteico las proteínas Trk de *S. cerevisiae* y de *C. albicans*, se puede observar que ambas proteínas son funcionalmente similares. Sin embargo, existen algunas diferencias entre ellas: En *S. cerevisiae* el gen *TRK1* codifica una proteína constituida por 1235 residuos de aminoácidos (Mw \approx 180 kDa) mientras que en *C. albicans* este gen codifica una proteína constituida de 1056 residuos de aminoácidos (Mw \approx 120 kDa) y cuya identidad aproximada en la secuencia respecto a ScTrk1 es del 32,7%.

En *S. cerevisiae* se ha demostrado que el gen *TRK1* no es esencial, debido a que cepas que carecen de este gen pueden crecer, aunque para ello necesitan altas concentraciones de K^+ en el medio debido a una reducción en la capacidad de transporte de este catión (Gaber *et al.*, 1988). Sin embargo, en *C. albicans*, la esencialidad del gen *TRK1* se encuentra en controversia. En un primer artículo de 2004 (Baev *et al.*, 2004) se intentó obtener un mutante homocigoto de *TRK1* sin éxito, por lo que los autores

Introducción

catalogaron este gen como esencial para la supervivencia de este microorganismo. No obstante, un trabajo posterior donde se caracterizaron los genes esenciales de *C. albicans* parece indicar lo contrario (Segal *et al.*, 2018). La hipótesis que barajan estos autores es que, en el primer artículo de 2004, al intentar deletar *TRK1* afectaron también al gen *IMP4* que se encuentra localizado corriente abajo de *TRK1* (downstream) y que según los resultados que obtuvieron en este mismo artículo, este gen es esencial para esta levadura.

Sobre la regulación de *TRK1*, resultados previos a esta tesis doctoral parecen indicar que este gen se expresa menos en fase estacionaria (Gasch *et al.*, 2000) pero no se ha encontrado evidencia experimental de cambios en su regulación a nivel transcripcional bajo estrés catiónico (Ariño *et al.*, 2010).

Respecto al mecanismo de transporte mediado por Trk1, no se ha podido llegar a una conclusión clara, ya que no se ha logrado medir con exactitud el potencial de membrana en las levaduras. Sin embargo, sí se tienen datos exactos sobre el potencial de membrana de algunos hongos filamentosos (-200 mV) que aplicados al mecanismo de transporte de Trk1 sugieren que funcionaría como un uniportador de potasio (Martínez *et al.*, 2011). Existen otras hipótesis menos aceptadas que parecen indicar que este transportador podría funcionar como un cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+$ como ocurre en la bacteria *Vibrio alginolyticus* (Tholema *et al.*, 1999), o como un cotransportador de $\text{K}^+:\text{H}^+$ (Lichtenberg-Fraté *et al.*, 1996). Adicionalmente, un enfoque electrofisiológico en *S. cerevisiae* reveló también una función secundaria para las proteínas Trk: la salida de iones cloruro (Kuroda *et al.*, 2004). Sin embargo, esta posible función parece estar mal conservada, en *C. albicans*, debido ya que la velocidad de activación, amplitud, comportamiento del canal, dependencia del pH y sensibilidad a los inhibidores es muy diferente entre ambas especies (Miranda *et al.*, 2009).

1.3.2 Acu1

Existe otro sistema de captación de K^+ , las ATPasas ACU (Alkali Cation Uptake) que forman una nueva subfamilia de ATPasas de tipo P de alta afinidad implicadas en la captación de K^+ o Na^+ . Al contrario que otros transportadores como Trk, este sistema no

se encuentra ampliamente distribuido entre las levaduras, aunque se ha encontrado en algunas de ellas: *Ustilago Maydis*, *Pichia sorbitophila* y *C. albicans* (Benito *et al.*, 2004). Desafortunadamente, este hecho hace que, de los transportadores de potasio conocidos en las levaduras, el transportador Acu sea el más desconocido y por ello no exista apenas información al respecto.

En el artículo de Benito *et al.*, 2004, los autores lograron identificar dos genes de la familia ACU (*ACU1* y *ACU2*) en el hongo *Ustilago maydis*. Asimismo, el efecto de la delección de los genes *ACU1* y *ACU2*, junto a posteriores estudios sobre el transporte, demostraron que estos genes codifican transportadores que median una captación de K^+ y Na^+ de alta afinidad, siendo esta última funcionalmente idéntica a la encontrada en algunos transportadores HKT de plantas. Este hallazgo también fue confirmado mediante la expresión heteróloga de *UmAcu2* en un mutante de *S. cerevisiae* el cual era deficiente en sus transportadores de potasio endógenos (*trk1Δtrk2Δ*).

Curiosamente, en este trabajo de Benito *et al.*, 2004 se identificó *ACU1* como un pseudogén en la cepa de *C. albicans* SC5314 ya que se encontró un codón de parada en la posición 1066 de su secuencia. El pseudogén completo comprende 3243 pb, dividido en dos orfs (19.2553 y 19.2552) por una región intergénica y que aparentemente no contiene intrones (Figura 5). Además, en este mismo trabajo, los autores llevaron a cabo una modificación en la secuencia de *CaACU1* de forma que el codón de parada codificase en su lugar un residuo de lisina, al igual que ocurre en el gen *ACU1* de *P. sorbitophila* (TAG→AAG, posición 1066). La expresión heteróloga de esta reversión en un mutante *trk1Δtrk2Δ* de *S. cerevisiae* fue capaz de suprimir el crecimiento defectuoso a bajo potasio de una manera casi idéntica a la descrita anteriormente por el transportador silvestre Acu1 de *Pichia. sorbithophila*.

Respecto a la regulación transcripcional de ACU, y antes de la realización de esta tesis, solo se había llevado a cabo un estudio en profundidad en el hongo *Magnaporthe oryzae* donde se describió un aumento significativo en el número de transcritos de ACU después del ayuno de potasio (Benito *et al.*, 2011).

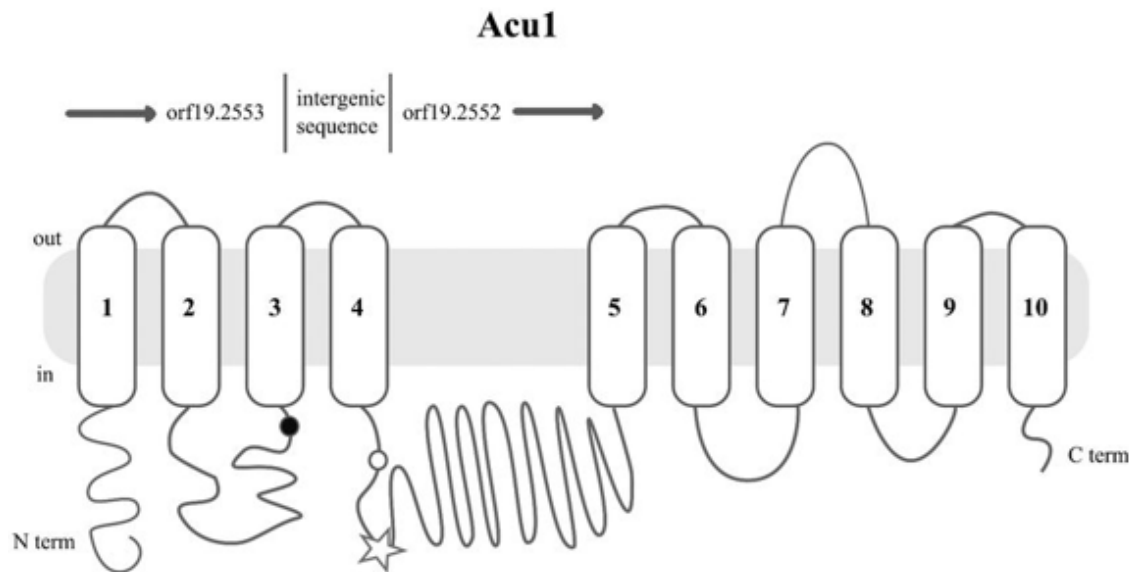


Figura 5. Representación esquemática propuesta de la estructura secundaria y la topología del transportador Acu1. En la imagen se representan los segmentos transmembrana numerados, el codón de parada (●) entre el primer y segundo orf, el codón de inicio del segundo orf (○) (orf 19.2552) y el sitio de unión al ATP (☆) (Adaptado de Elicharová *et al.*, 2016).

1.3.3 Hak1

Como se ha mencionado anteriormente, muchas levaduras no convencionales contienen un segundo tipo de transportador de potasio, el transportador HAK (High Affinity K⁺ Transporter). Sin embargo, este transportador no solo se encuentra en levaduras sino que también se encuentra distribuido en distintos reinos con diferentes denominaciones como puede ser: en procariotas, donde fue identificado en el organismo modelo *E. coli* bajo el nombre de *KUP* (K⁺ Uptake Permeases) (M. Schleyer y E.P. Bakker, 1993), en hongos micelares como *Neurospora crassa* (Haro *et al.*, 1999), en levaduras donde fue identificado por primera vez en *Schwanniomyces occidentalis* por homología con el sistema KUP de *E. coli* y donde fue nombrado como HAK (Bañuelos *et al.*, 1995) por su alta afinidad por el potasio ($K_m \approx 1 \mu M$), en plantas bajo el nombre de KT (K⁺ Transporter) o HAK (Gierth y Mäser, 2007), e incluso en virus como el *Chlorovirus* FR483 (Greiner *et al.*, 2011). Años más tarde y a partir del estudio de Bañuelos *et al.*, 1995, se lograron identificar nuevos ortólogos en otras especies de levaduras como: *P. sorbitophila* (Benito *et al.*, 2004), *D. hansenii* (Prista *et al.*, 2007), *C. albicans* (Miranda *et al.*, 2009) o *Hansenula polymorpha* (Cabrera *et al.*, 2012).

Respecto a su mecanismo de transporte, tanto en la levadura *S. occidentalis* como en el hongo micelar *N. crassa*, se observó que este transportador funcionaba como un simportador $K^+::H^+$ (Bañuelos *et al.*, 1995; Haro *et al.*, 1999). Además de *S. occidentalis*, en levaduras también se ha estudiado las funciones de *HAK* en *D. hansenii*. En un artículo de 2007 (Prista *et al.*, 2007) se observó que la expresión heteróloga de *HAK1* en cepas mutantes de *S. cerevisiae* carentes de sus sistemas de transporte de potasio endógenos (*trk1Δtrk2Δ*) lograba mejorar la absorción de potasio. Adicionalmente, en un artículo posterior de nuestro grupo con *D. hansenii* (Martínez *et al.*, 2011) se logró demostrar que a bajas concentraciones (milimolares) de potasio y sodio, el catión sodio puede sustituir los H^+ en este transportador de forma que podría actuar también como un simporte de $K^+::Na^+$.

Hasta la realización de esta tesis doctoral, existía poca información sobre la regulación transcripcional de *HAK* en levaduras. En el artículo de Martínez *et al.*, 2011 se observó que la expresión de *HAK1* en *D. hansenii* no requería solamente de un bajo nivel de potasio externo, sino que también de una baja concentración de sodio ya que, en ausencia de potasio, la presencia de sodio reducía la expresión de *DhHAK1*. Asimismo, en este mismo artículo se constató que la adición de concentraciones milimolares tanto de sodio como de potasio en *D. hansenii* provocaba una rápida reducción en la expresión de *DhHAK1*. Por otro lado, en el artículo de Cabrera *et al.*, 2012 se observó que, el gen *HAK1* de *H. polymorpha* se inducía fuertemente en respuesta a baja concentración de K^+ y su expresión no se detectaba en condiciones no limitantes de potasio.

No hay mucha información sobre la estructura de las proteínas Hak1 en levaduras. Recientemente se ha publicado un artículo (Tascón *et al.*, 2020) sobre la estructura y funcionamiento del transportador homólogo KimA de *Bacillus subtilis* perteneciente a la familia KUP. La proteína mantendría una conformación abierta hacia el exterior celular proporcionando acceso a los protones y al potasio desde el lado extracelular a los sitios de unión internos, mientras que en el lado citoplásmico el túnel de salida de esta proteína se encontraría herméticamente sellado (Figura 6A). Al entrar un protón y un ion de potasio por el túnel se produciría el movimiento del residuo Y43, que sirve como puerta externa, bloqueando la entrada. Posteriormente, las hélices transmembrana TM1 y TM6 se alternarían y sellarían completamente el túnel extracelular, abriendo a su

Introducción

vez el túnel hacia el medio intracelular. Adicionalmente, una puerta interior formada por los residuos D36 e Y377 mantendría un estado ocluido al medio intracelular (Figura 6B). Tras esto, y dependiendo de la concentración de potasio intracelular, se producirían dos posibles situaciones:

1. Si existiesen altas concentraciones de potasio en el medio intracelular, los iones de potasio se unirían dentro del túnel intracelular evitando la apertura de la puerta intracelular y regulando así su entrada (Figura 6C).
2. Si las concentraciones intracelulares de potasio fuesen bajas en el medio intracelular, el residuo E233 se desprotonaría, permitiendo la apertura de la puerta intracelular y liberando de esta forma los iones de potasio al citoplasma (Figura 6D).

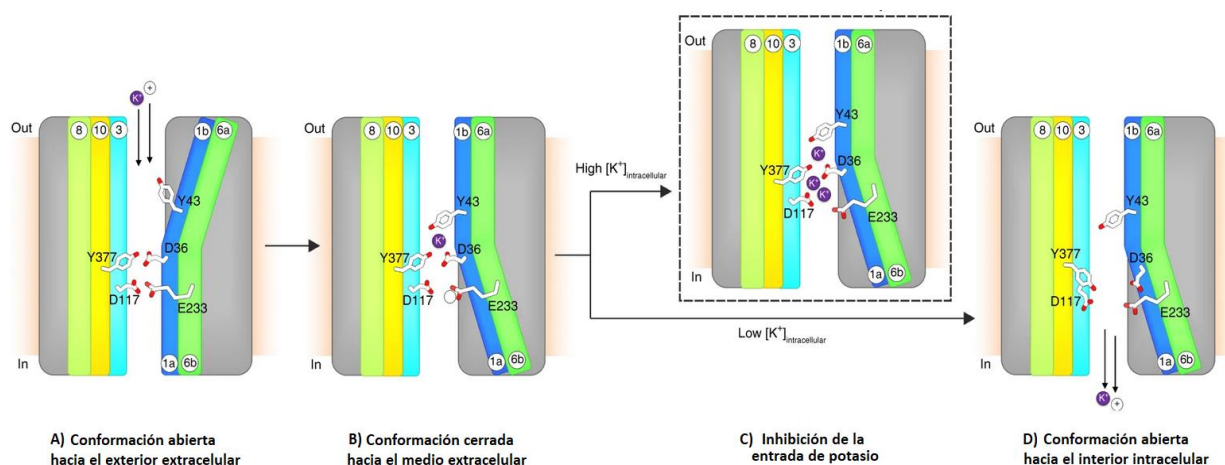


Figura 6. Mecanismo de funcionamiento de KimA en *B. subtilis* (Adaptado de Tascón *et al.*, 2020).

La identidad de secuencia entre KimA de *B. subtilis* y Hak1 de *C. albicans* es sólo $\approx 11\%$, pero curiosamente, el residuo E233 también se conserva en *C. albicans*. Sin embargo, solo se han propuesto modelos hipotéticos sobre la estructura de Hak1 en *C. albicans* (Figura 7) y solo con la estructura real esta proteína será posible confirmar si utiliza el mismo mecanismo que KimA de *B. subtilis*.

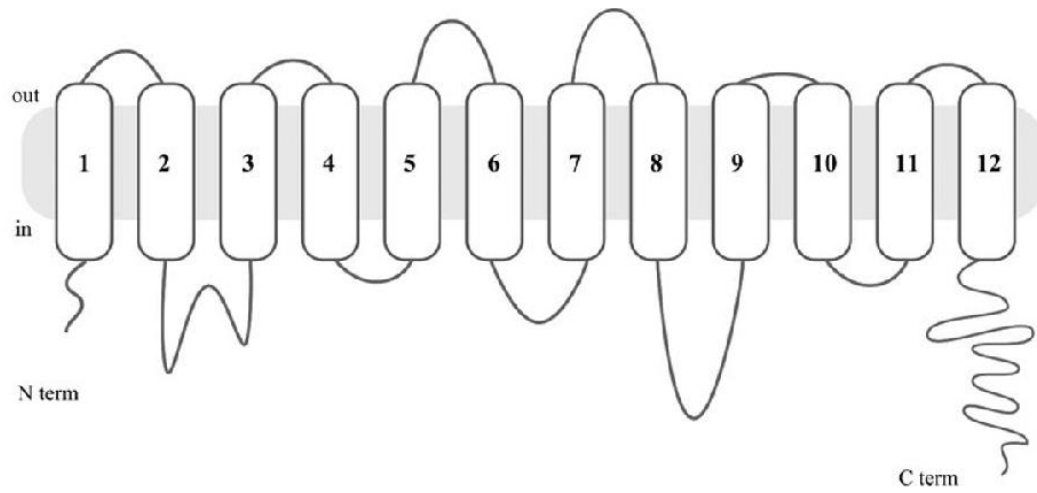


Figura 7. Representación esquemática propuesta de la estructura secundaria y la topología del transportador Hak1 de *C. albicans* (Adaptado de Elicharová *et al.*, 2016).

2. La levadura *Candida albicans*

2.1 Biología y Filogenia

C. albicans es un microorganismo perteneciente a la familia de los sacaromicetos que se caracteriza por ser polimórfico (puede encontrarse en forma de levadura, pseudohifa o hifa), diploide y reproducirse mediante gemación, aunque también es conocido un ciclo parasexual que permuta entre fenotipos blancos y opacos (d'Énfert y Hube, 2007). Esta levadura se encuentra formando parte de la microbiota humana como un microorganismo comensal colonizando de forma asintomática muchas zonas del cuerpo humano como el tracto gastrointestinal (Kennedy y Volz, 1985), el tracto reproductivo y urinario (Achkar y Fries 2010), la cavidad bucal (Ganguly y Mitchell, 2011), y la piel de la mayoría de los seres humanos (McCreight *et al.*, 1985). *C. albicans* puede convertirse, bajo ciertas circunstancias, en un microorganismo patógeno provocando infecciones fúngicas en las zonas donde reside, lo que ha convertido la comprensión de la biología de este microorganismo en un requisito importante para la identificación de nuevas dianas de medicamentos para la terapia antifúngica, así como servir de modelo para comprender otros patógenos fúngicos (Kabir *et al.*, 2012)

A lo largo de la historia, *C. albicans* ha tenido numerosos nombres, desde la primera publicación con el nombre de *Oidium albicans* en 1853 por el francés Charles Phillippe Robin (Robin, 1853), pasando por *Saccharomyces albicans*, *Dematium albicans*, *Monilia albicans* y muchos otros (*Candida albicans* NCBI Taxonomy browser), hasta llegar al nombre actual dado por la micóloga holandesa Christine Marie Berkhout en 1923 (Berkhout, 1923) en su tesis doctoral donde denominó finalmente el género como *Candida*.

En la actualidad, *C. albicans* pertenece al phylum *Ascomycota*, orden *Endomycetales*, a la que también pertenece la familia *Saccharomycetaceae*, aunque *S. cerevisiae* y *C. albicans* están separadas por 140-850 millones de años de evolución (Baker *et al.*, 2011). La mayoría de las especies de *Candida*, a excepción de *C. glabrata*, pertenecen al clado CTG (Figura 8) que se caracteriza por la traducción de los codones CUG como serina en lugar de leucina (Santos y Tuite, 1995).

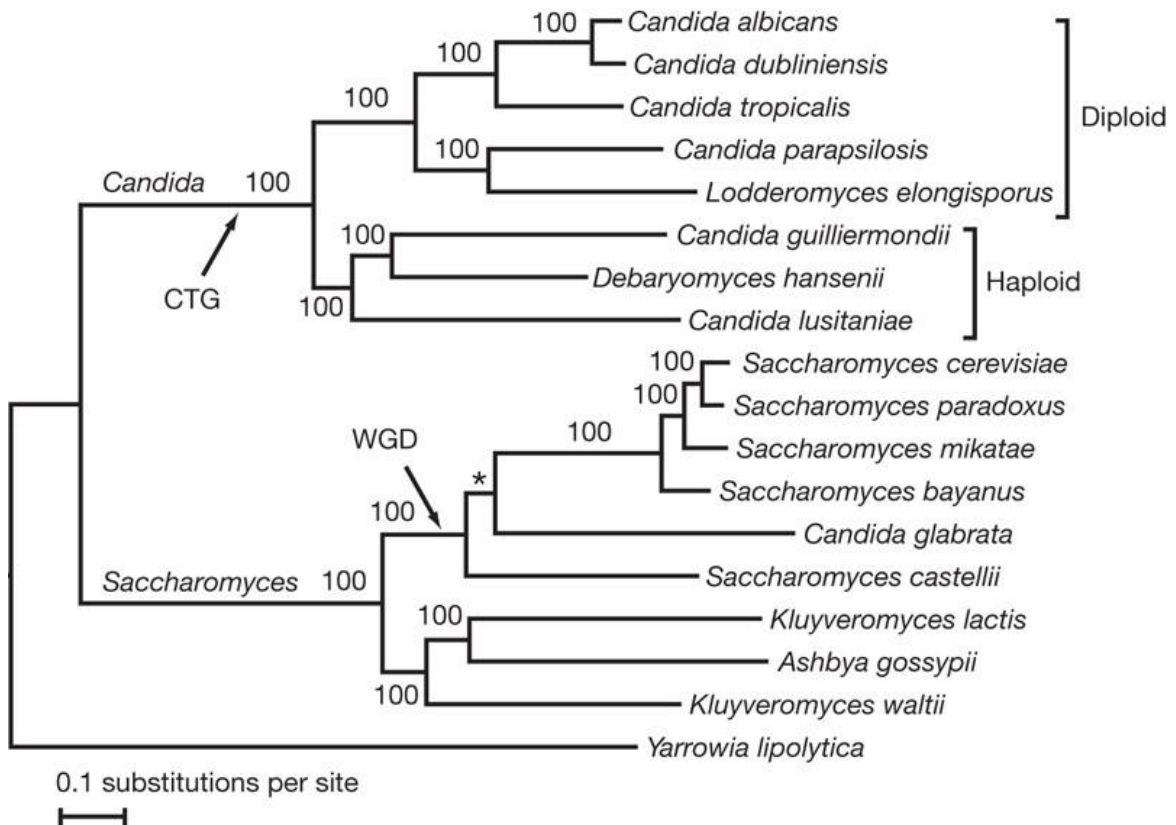


Figura 8. Filogenia de especies secuenciadas de clado *Candida* y *Saccharomyces* (Adaptado de Butler *et al.*, 2009).

Uno de los mayores esfuerzos para el desarrollo de la investigación con este microorganismo tuvo lugar en el año 1996, cuando el Centro de Tecnología de Stanford, Genome, comenzó la secuenciación de su genoma. Estos esfuerzos culminarían con la secuencia completa del genoma de la cepa SC5314 de *C. albicans* (Jones *et al.*, 2004).

La decisión de seleccionar a este microorganismo para ser uno de los primeros patógenos humanos eucariotas en secuenciarse se debe a que esta levadura es la responsable de las infecciones fúngicas más comunes en humanos. Alrededor del 95% de las infecciones por *Candida* son producidas por cuatro especies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, siendo *C. albicans* la más común. El 5% restante pertenece a otras especies de *Candida*: *Candida krusei*, *Candida lusitaniae* y *Candida guilliermondii* (Pfaller y Diekema, 2007).

Por otra parte, la decisión de secuenciar la cepa SC5314 fue tomada por Jones *et al.* debido principalmente a que esta cepa de *C. albicans*, era y sigue siendo, de uso generalizado en todos los laboratorios del mundo, tanto en análisis moleculares como

Introducción

en estudios de virulencia en modelos animales, y por contener aparentemente un cariotipo diploide estable.

Gracias a este proyecto, se creó una base de datos con el genoma completo de *C. albicans* y otras especies del género *Candida* (Candida Genome Database, <http://www.candidagenome.org/>). Esta base de datos en línea es de libre acceso lo que permite a investigadores de todo el mundo acceder tanto a la información de su genoma como a información sobre proteínas, fenotipos, secuencias, ortólogos, etc.

2.2 *C. albicans*: comensalismo y patogenicidad

C. albicans es un patógeno oportunista que existe como comensal en la mayoría de los individuos. Este microorganismo habita en la cavidad oral, vaginal e intestinal de la mayoría de los individuos sanos (Ghannoum et al., 2010; Nash et al., 2017). Sin embargo, este microorganismo se encuentra entre los principales causantes de muertes por infecciones fúngicas (Miranda et al., 2009; Brown et al., 2012) y puede convertirse en un patógeno cuando la microbiota natural del huésped se altera, las barreras normales de los tejidos se debilitan, o el sistema inmune se encuentra comprometido. *C. albicans* puede causar varios tipos de infecciones en humanos: infecciones en las mucosas, como candidiasis oral y vaginal, o infecciones sistémicas que pueden ser potencialmente mortales (Figura 9).

A diferencia de la mayoría de los patógenos fúngicos, *C. albicans* generalmente se considera que está asociado de manera obligada con animales de sangre caliente (Odds 1988), aunque algunos artículos han reportado aislamientos ambientales en distintos organismos como un escarabajo y un tulipán africano de las Islas Cook (Lachance et al., 2011) o incluso en árboles de roble en el Reino Unido (Robinson et al., 2016). Sin embargo, aunque no se puede excluir la existencia de un reservorio ambiental, aparentemente no es necesario para la colonización humana ya que este microorganismo es normalmente transmitido verticalmente desde la madre al hijo durante el paso del feto por el canal del parto u horizontalmente a través de la manipulación del recién nacido por el personal sanitario. Los recién nacidos colonizados son asintomáticos, sin embargo, esta primera colonización podría ser el primer paso

para el desarrollo de una candidiasis mucocutánea (Waggoner-Fountain *et al.*, 1996; Bliss *et al.*, 2008). Estas infecciones además pueden agravarse en las unidades de cuidados intensivos neonatales, especialmente entre los recién nacidos prematuros y de bajo peso.

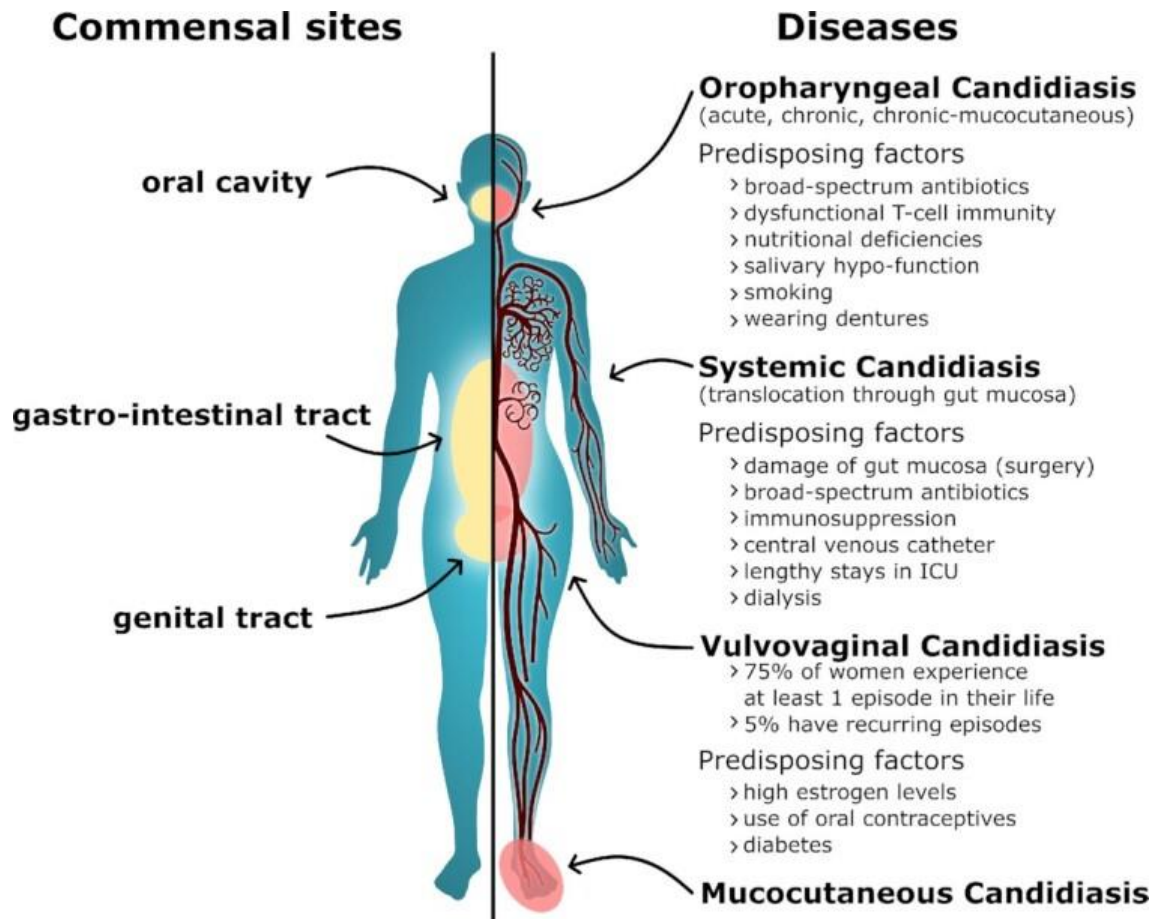


Figura 9. Sitios del cuerpo humano donde *C. albicans* es comensal y enfermedades que puede producir (Adaptado de d'Enfert *et al.*, 2021).

La capacidad de *C. albicans* para infectar las distintas variedades de nichos de su huésped está respaldada por una amplia gama de factores de virulencia. Entre estos factores de virulencia destacan: la transición morfológica entre las formas de levadura e hifas, la expresión de adhesinas en la superficie celular, la detección por contacto y el tigmotropismo, la formación de biopelículas, y la secreción de enzimas hidrolíticas. Además de estos factores de virulencia, otros atributos de aptitud también influyen ya que tiene una rápida adaptación a las fluctuaciones en el pH ambiental, flexibilidad

Introducción

metabólica, potentes sistemas de adquisición de nutrientes y robustas maquinarias de respuesta al estrés.

2.2.1 Polimorfismo

C. albicans es un hongo polimórfico, ya que puede crecer tanto en forma de levadura como en forma de pseudohifa o como hifas verdaderas (Berman y Sudbery, 2002). Esta transición entre levadura e hifa se denomina dimorfismo y se ha propuesto que ambas formas de crecimiento son importantes para la patogenicidad (Jacobsen *et al.*, 2012). Mientras que se ha demostrado que la forma de hifas es más invasiva que la forma de levadura (Berman y Sudbery, 2002), la forma de levadura al ser más pequeña se cree que representa la forma principalmente involucrada en la diseminación por el torrente sanguíneo. Esta transición entre estas dos fases puede ser desencadenada por una gran variedad de señales ambientales que afecta a su morfología (Saville *et al.*, 2003).

Una de las señales ambientales que median este cambio es el pH. Se ha demostrado que a pH bajo (<6) las células de *C. albicans* crecen predominantemente en forma de levadura, mientras que a pH alto (>7) se induce el crecimiento de hifas (Odds, 1979). Esta respuesta al cambio de pH se encuentra regulada principalmente por el regulador transcripcional Rim101p que, una vez activado, provoca el cambio de la morfología de este microorganismo de levadura a hifa para adaptarse al pH alcalino (Buffo, *et al.*, 1984; Porta *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2020; Villa *et al.*, 2020). En ambientes ácidos, Rim101p no tiene ninguna función conocida (Orejas *et al.*, 1995; Li y Mitchell, 1997), pero en entornos alcalinos se produce la escisión proteolítica de su extremo C-terminal provocando la activación de Rim101p y, con ello, la expresión de los genes que median la formación de hifas (Davis, Wilson y Mitchell, 2000). A su vez, esta activación proteolítica de Rim101p está controlada por dos proteínas transmembrana denominadas Dfg16p y Rim21p, que actúan como sensores de pH (Barwell *et al.*, 2005).

Otros factores conocidos que influyen en la morfología son la concentración de cationes como el potasio y la presencia de suero, ambos relacionados. En un artículo de Watanabe *et al.*, 2006, se analizaron las concentraciones de potasio intracelulares en las distintas fases de esta levadura y se sugirió que las células de hifas contienen potasio en altas concentraciones en comparación con las células de levadura. Además, se observó

que la inhibición del crecimiento de las hifas por el compuesto valinomicina era impedida por la adición de suero, asociado a un aumento del potasio intracelular.

Por último, *C. albicans* también es muy sensible a los múltiples cambios producidos en el huésped que parasita, ya que es capaz de reaccionar y formar hifas en respuesta a señales como la temperatura, producción de suero (como mencionamos en el párrafo anterior), concentración de CO₂ o incluso por la presencia de otras células de *C. albicans* y bacterias mediante el “quórum”, un mecanismo de comunicación microbiana (Albuquerque y Casadevall, 2012). Mediante este mecanismo, densidades celulares altas (> 10⁷ células ml⁻¹) promueven el crecimiento de levaduras, mientras que las densidades celulares bajas (<10⁷ células ml⁻¹) favorecen la formación de hifas (Sudbery, 2011).

2.2.2 Adhesinas

C. albicans tiene un conjunto especializado de proteínas denominadas adhesinas. Estas proteínas son utilizadas por este microorganismo para adherirse a otras células de *C. albicans*, a otros microorganismos, a las células del huésped e incluso a superficies abióticas (Verstrepen y Klis, 2006).

Las adhesinas mejor estudiadas de *C. albicans* son las proteínas de secuencia similar a aglutinina (Als por su nombre en inglés, agglutinin-like sequence) que forman una familia que consta de ocho miembros (Als1 a Als7 y Als9). Los genes *ALS* codifican glucoproteínas de la superficie celular unidas a glucosilfosfatidilinositol (GPI). La proteína más estudiada de esta familia hasta la fecha es Als3, debido a sus múltiples funciones. Esta adhesina es capaz de unirse a ligandos heterogéneos que incluyen desde cadherinas, ferritinas hasta a una proteína de superficie de *Streptococcus gordonii* (Phan *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2008; Bamford *et al.*, 2015). Además de esto, se ha comprobado que Als3 promueve la invasión fúngica (Phan *et al.*, 2007) y la asimilación de hierro (Almeida *et al.*, 2008). Debido a todas estas funciones, esta proteína se ha convertido una diana potencial para el diseño de drogas anti-Candida (Marc *et al.*, 2018; Kioshima *et al.*, 2019).

Otra familia de adhesinas en *C. albicans* es la familia Hwp formada por las proteínas Hwp1, Hwp2 (Hypthal wall protein) y Rbt1 (Repressed by Iup1) siendo consideradas

Introducción

proteínas pertenecientes a la misma familia debido a que comparten zonas altamente conservadas (De Groot *et al.*, 2013). La expresión de estas tres proteínas se produce específicamente en la forma de hifa de *C. albicans* y son necesarias para la adhesión a las proteínas de superficie de las células del huésped, el apareamiento, la adherencia célula-célula y la formación de biopelículas (Nobile *et al.*, 2008, Ene y Bennett, 2009). Hwp1 es una proteína asociada a hifas cuya función es servir como sustrato para las transglutaminasas de mamíferos. Esto permite crear uniones covalentes entre las hifas *C. albicans* y las células huésped.

Por último, existe una tercera familia de adhesinas denominada HYR/IFF (“HYR” son las siglas de “Hyphally Upregulated Protein e “IFF” de “Individual Protein File family F en CandidaDB”) tienen un alto grado de similitud de secuencia en sus dominios efectores N-terminales (De Groot *et al.*, 2013). La familia *HYR* ha sido menos caracterizada que las *ALS* y *HWP*, pero se suma a las adhesinas que expresa *C. albicans*. Al igual que *ALS3* y *HWP1*, el miembro fundador de esta familia, *HYR1*, se expresa durante el desarrollo de las hifas (Bailey *et al.*, 1996).

2.2.3 Formación de biofilm o biopelículas

Otro factor importante que contribuye a la virulencia de *C. albicans* es su capacidad para formar biopelículas o biofilms en superficies abióticas como: catéteres o dentaduras postizas (Andes *et al.*, 2004), o bióticas como células mucosas vaginales (Harriott *et al.*, 2010) u orales (Dongari-Bagtzoglou *et al.*, 2009).

Las biopelículas se forman en un proceso secuencial de varias etapas donde se encuentran implicadas tanto la forma de levadura como la forma de hifa de este microorganismo (Figura 10). La primera etapa de formación de la biopelícula comienza cuando las células en forma de levadura se adhieren al sustrato en el lugar donde se va a formar la biopelícula (Figura 10A). Una vez adheridas comienza la segunda etapa en la cual las células se multiplican y comienzan a producir hifas (Figura 10B). Tras esto, comienza la tercera etapa denominada: maduración. En esta etapa la biomasa del biofilm se expande y se comienza a segregar una matriz extracelular que está relacionada con la resistencia a los fármacos y al sistema inmune del huésped (Figura 10C). La última etapa, es denominada dispersión. En esta etapa la biopelícula ya madura

comienza a liberar células en forma de levadura con el objetivo de colonizar otras zonas circundantes (Figura 10D) (Finkel y Mitchell, 2010).

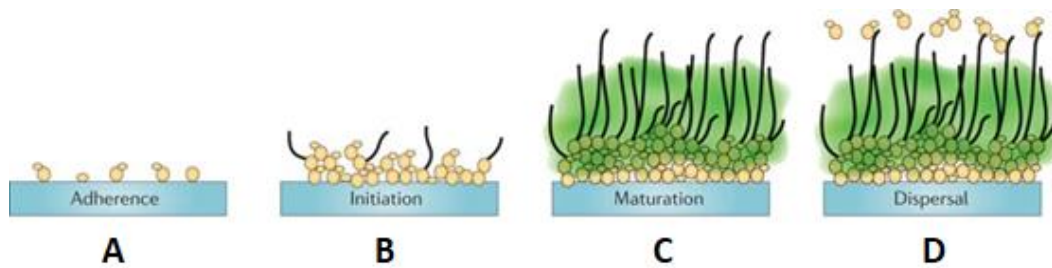


Figura 10. Etapas del desarrollo de un biofilm en *C. albicans*. La imagen muestra las cuatro etapas del desarrollo: A) Adherencia al sustrato, B) Iniciación del biofilm, C) Maduración del biofilm y D) Dispersión de células. El color verde representa la formación de la matriz extracelular (Adaptado de Finkel y Mitchell, 2010).

Como se ha mencionado anteriormente, las biopelículas maduras son mucho más resistentes a los agentes antimicrobianos como la anfotericina B y el fluconazol (Douglas, 2003), y al sistema inmune del huésped (Xie *et al.*, 2012). Esta resistencia se debe principalmente a la matriz de la biopelícula (Xie *et al.*, 2012), el aumento de la expresión genes relacionados con bombas de salida del fármaco (*MDR1*, *CDR2*, *PDR16* y *ERGs*) (Nett *et al.*, 2009) y la plasticidad metabólica (Fanning y Mitchell, 2012). Además de conferir resistencia, la formación de esta biopelícula también aumenta la virulencia (Uppuluri *et al.*, 2010).

2.2.4 Secreción de enzimas hidrolíticas

Después de la adhesión a las superficies de las células hospedadoras y el crecimiento de las hifas, *C. albicans* puede secretar hidrolasas para facilitar la penetración en las células del huésped y de esta forma acceder a una mayor cantidad de nutrientes (Wächtler *et al.*, 2012, Naglick *et al.*, 2003). Para ello, *C. albicans* secreta tres clases de hidrolasas: proteasas, fosfolipasas y lipasas.

La familia de proteasas aspárticas secretadas (Saps) comprende diez miembros (Sap1-10). La producción de estas enzimas es una adaptación evolutiva de los patógenos para utilizar los nutrientes y sobrevivir en el hospedador. Se cree que Sap1-10 contribuyen a la adhesión e invasión de los tejidos del huésped a través de la degradación de las

Introducción

estructuras de la superficie celular. Las proteasas aspárticas controlan varios pasos en la evasión inmune innata y degradan proteínas relacionadas con la defensa inmunológica (anticuerpos, complemento y citocinas), permitiendo que el hongo escape de la primera línea de defensa del huésped (Monika *et al.*, 2017).

La familia de las fosfolipasas consta de cuatro clases diferentes (A, B, C y D) cuya función principal reside en la metabolización de fosfolípidos (Niewerth y Kortling, 2001). Sin embargo, solo los cinco miembros de la clase B (Plb1-5) son extracelulares y pueden contribuir a la patogenicidad a través de la rotura de las membranas del hospedador, siendo *Plb1* el responsable de la mayor parte de actividad fosfolipasa extracelular (Mavor y Hube, 2005).

La tercera familia de hidrolasas secretadas son las lipasas, que constan de 10 miembros (Lip1-10) cuya función principal es la de romper enlaces éster. Sin embargo, también se ha sugerido que pueden tener otras funciones. Por ejemplo, las lipasas en sinergia con las fosfolipasas B también pueden desarrollar actividades lipolíticas hacia los fosfolípidos permitiendo dañar las membranas de las células del huésped. Además, las lipasas de *C. albicans* también pueden afectar el sistema inmunológico del huésped inhibiendo la quimiotaxis o dañando las células fagocíticas directamente (Hube *et al.*, 2000).

2.2.5 Flexibilidad metabólica

Una de las características de *C. albicans* es la flexibilidad metabólica que le permite adaptarse a distintas situaciones hostiles dentro de su huésped. Esta característica es particularmente importante para los hongos patógenos durante el proceso de infección (Brown *et al.*, 2014).

En individuos sanos, *C. albicans* se encuentra predominantemente como parte de la microbiota gastrointestinal y su proliferación se controla mediante la competencia con otros microorganismos pertenecientes a esta microbiota (Brock, 2009). Sin embargo, esto cambia cuando *C. albicans* obtiene acceso al torrente sanguíneo, en este ambiente el hongo se encuentra con un medio rico en glucosa (6-8 mM) y libre de competidores. Para luchar contra la infección, las células inmunitarias del huésped intentan fagocitar a este hongo y, una vez dentro de ellas, utilizan distintos compuestos para eliminarlo,

como: las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés, reactive oxygen species), las especies reactivas de nitrógeno (RNS por sus siglas en inglés, reactive nitrogen species) y los péptidos antimicrobianos (AMP por sus siglas en inglés, Antimicrobial peptides). Además, una vez las células de *C. albicans* han sido fagocitadas, se encuentran en un medio restringido de nutrientes (Frohner *et al.*, 2009). No obstante, la flexibilidad metabólica de *C. albicans* ha permitido a este microorganismo desarrollar múltiples estrategias para asegurar su supervivencia en este entorno hostil.

Dentro de los macrófagos y debido a la privación de una fuente de glucosa, el hongo estimula la respuesta transcripcional de la gluconeogénesis y activa el ciclo del glioxilato. (Lorenz *et al.*, 2004). Además, para combatir las ROS y RNS producidas por el fagocito, comienza a producir la catalasa Cta1 y las superóxido dismutasas, Sod1 y Sod5 (Wysong *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 2002; Martchenko *et al.*, 2004), y Yhb1 para combatir las RNS (Hromatka *et al.*, 2005). Por otra parte, para defenderse de la actividad antifúngica de los AMP, *C. albicans* secreta distintas proteínas que inhiben la actividad de estos compuestos mediante su degradación o unión, un ejemplo de esto es la glicoproteína Msb2, que es capaz de inactivar una amplia gama de AMP entre los que se encuentran: la catelicidina humana LL-37, Hst 5, hNP-1 y hBD1 (Swidergall y Ernst, 2014).

Junto a todo lo anterior, y para lograr escapar de los macrófagos y asegurar su supervivencia, *C. albicans* activa numerosos genes responsables del cambio de morfología de levadura a hifa (Lorenz *et al.*, 2004). De esta forma, el hongo mediante la formación de hifas es capaz de atravesar la membrana de la célula inmunitaria mediante fuerzas mecánicas provocando la muerte del macrófago y logrando escapar con éxito del sistema inmune (Lorenz *et al.*, 2004; Ghost *et al.*, 2009).

2.3 Homeostasis de potasio en *C. albicans*

Al igual que todos los seres vivos, las células de *C. albicans* deben conseguir el potasio necesario para realizar las distintas funciones celulares en las que este importante catión está involucrado. Para ello, las células de este microorganismo están forzadas a competir con las células de su huésped para lograr obtener el potasio necesario ya que este catión suele encontrarse en concentraciones del rango de mmol L^{-1} en el medio extracelular de

Introducción

su huésped. Con el fin de conseguirlo, las células de *C. albicans* necesitan sistemas de captación de potasio eficientes en su membrana plasmática como se recoge en la Tabla 1 (Ramos *et al.*, 2011). Este hecho hace que *C. albicans* sea un organismo de gran interés en el estudio del aporte de estos sistemas a la homeostasis de potasio, ya que es de las pocas levaduras que contienen en su membrana un transportador de cada familia (Trk1, Acu1 y Hak1).

Existe muy poca información sobre la capacidad de *C. albicans* de transportar potasio. En un artículo de 2010, se consiguió el primer y único mutante en *C. albicans* carente de un transportador de potasio en su membrana plasmática (*hak1*-). Este mutante fue obtenido en la cepa SN152 de *C. albicans*, una cepa derivada de la cepa parental SC5314, pero con auxotrofías para la histidina, leucina y arginina. Sin embargo, este mutante apenas fue caracterizado por los autores, ya que solamente describieron que presentaba un defecto en la infectividad en ratones y que no producía colonias anormales (Noble *et al.*, 2010). Más tarde, el grupo de Hana Sycrovhá del laboratorio de transporte de membranas del instituto de fisiología de Praga publicó un trabajo en el que demostraban que la existencia de estos tres transportadores con diferentes mecanismos de transporte (*Trk1*, *Acu1*, *Hak1*) puede ayudar a las células patógenas de *C. albicans* a adquirir potasio en diversos órganos y tejidos del huésped. En este artículo también lograron clonar las secuencias que codifican los tres transportadores de *C. albicans* en una serie de plásmidos para su expresión en la cepa mutante de *S. cerevisiae* BYT12, carente de sus transportadores endógenos de potasio. Los resultados de esta expresión heteróloga demostraron que los tres transportadores fueron capaces de proporcionar a las células la capacidad de crecer con bajas cantidades de potasio sobre una amplia gama de pH externo (desde pH 3,5 a 7,0) (Elicharová *et al.*, 2016).

3. La tecnología de edición genética CRISPR/Cas9

3.1 Origen, componentes y mecanismo del sistema CRISPR

CRISPR (por sus siglas en inglés, *C*lustered *r*egularly *i*nterspaced *s*hort *p*alindromic *r*epeats) es el nombre dado a unas secuencias repetitivas que se han encontrado tanto en bacterias como arqueas. Estas secuencias están compuestas por repeticiones cortas de bases y tras las cuales aparecen segmentos cortos de secuencias de ADN cuyo origen proviene de bacteriófagos que han infectado con anterioridad a estos microorganismos (Marraffini y Sontheimer, 2010). A su vez, las secuencias CRISPR se encuentran asociadas a una multitud de genes diferentes pertenecientes a la familia Cas (por sus siglas en inglés, *C*RISPR *a*ssociated) (Haft *et al.*, 2005).

El sistema CRISPR/Cas, tras muchos años de estudio, fue descrito como un sistema inmune adaptativo debido a que estos fragmentos son utilizados por los microorganismos que poseen este sistema para detectar y destruir el material genético procedente de nuevas infecciones producidas por virus que habían infectado con anterioridad al organismo y, de esta forma, lograr defenderse eficazmente contra ellos (Mojica *et al.*, 2005, Poucel *et al.*, 2005). Por estas razones, estas secuencias juegan un papel clave en los sistemas de defensa de bacterias y arqueas, y a su vez forman la base de una tecnología conocida como CRISPR/Cas de la que se hablará en detalle más adelante.

El locus donde se encuentran codificados los elementos del sistema CRISPR/Cas está compuesto por distintos componentes (Jiang *et al.*, 2013):

- Un promotor, encargado de modular la transcripción de todos los elementos.
- La región CRISPR, compuesta a su vez por los elementos repetidos y los espaciadores (ADN procedente de una infección vírica anterior).
- Unas pequeñas moléculas de ARN denominadas crRNA (por sus siglas en inglés, RNA CRISPR), codificadas a partir de las secuencias anteriores y cuya función es la de guiar a la endonucleasa Cas a un objetivo específico.
- Los genes asociados a CRISPR que codifican a las proteínas Cas de este sistema.

Introducción

El mecanismo de funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9 se basa en dos fases distintas:

- 1. Fase de inmunización:** Tras la infección por el bacteriófago y la inserción de su material genético, este es reconocido por un complejo Cas que recoge el material genético exógeno y lo integra como una nueva unidad espaciadora en el locus CRISPR, donde se utilizará posteriormente para proteger a la célula de una reinfección por un virus similar (Figura 11A) (Horvath y Barrangou, 2010).
- 2. Fase de inmunidad:** La secuencia espaciadora que había sido incorporada anteriormente es transcrita desde el promotor y el transcrito resultante forma un crRNA inmaduro denominado pre-crRNA. Este crRNA inmaduro se procesa en un crRNA maduro que posteriormente será utilizado como guía por un complejo Cas para interferir con el ácido nucleico invasor correspondiente (Figura 11B) (Horvath y Barrangou, 2010).

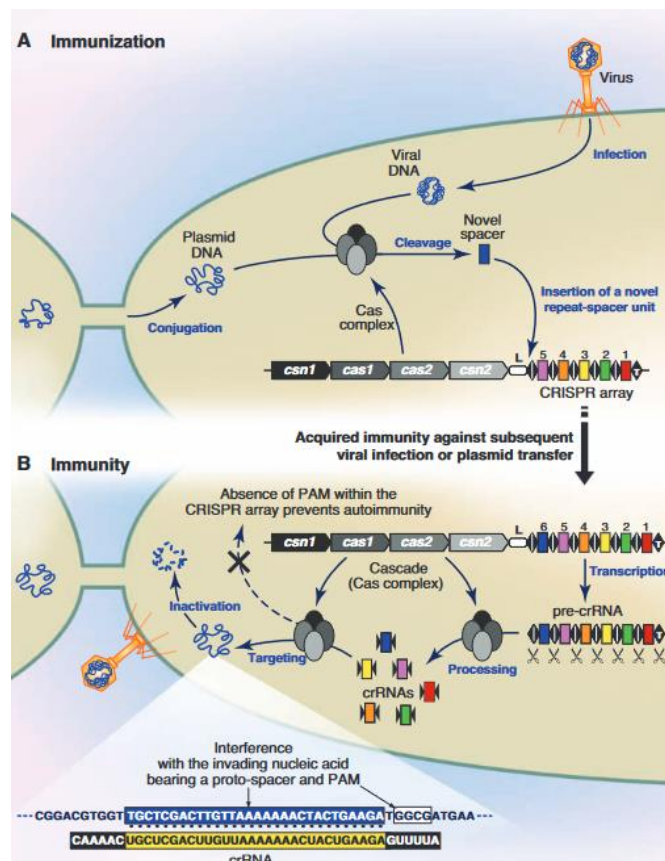


Figura 11. Fases del sistema inmune adaptativo CRISPR/Cas. A) Fase de inmunización tras la infección. B) Fase de inmunidad y funcionamiento del sistema CRISPR (Adaptado de Horvath y Barrangou, 2010).

La proteína Cas contiene dos dominios conservados que le permiten interferir con el ácido nucleico exógeno: el dominio helicasa (HNH denominada así por ser un dominio caracterizado por residuos de histidina y asparagina) que abre la doble cadena de ADN y el dominio RuvC que le confiere la capacidad de actuar como una nucleasa para cortar el ADN en la región específica definida por el crRNA (Sapranauskas *et al.*, 2011). Adicionalmente, para el proceso de inmunidad es necesario un sitio adicional de reconocimiento compuesto por una secuencia corta de ADN de 3-5 pares de bases, que se encuentra inmediatamente río arriba (upstream) de la secuencia específica y que reconocen tanto a los crRNA como a la proteína Cas (Sashital *et al.*, 2012). Este sitio se conoce como PAM (por sus siglas en inglés, Protospacer adjacent motif) y es necesario para evitar que los crRNA maduros reconozcan su propio sistema y utilicen a Cas para eliminarlo de su propio genoma (Wang *et al.*, 2015A). Estas secuencias PAM son diferentes en cada microorganismo, por ejemplo, en *Streptococcus pyogenes* la secuencia PAM es NGG, donde N es cualquier nucleótido (Mojica *et al.*, 2009). Los elementos del sistema CRISPR se mantienen expresándose de manera constitutiva, por lo que el sistema siempre está preparado para una nueva posible infección (Gasiunas *et al.*, 2012).

3.2 Mecanismo de edición genética basado en el sistema CRISPR/Cas9

El primer sistema CRISPR/Cas en ser adaptado y el más extendido en la comunidad científica para la edición genética es el sistema tipo II CRISPR/Cas9 de *S. pyogenes* (Cong *et al.*, 2013). Este sistema de edición genética está compuesto por dos moléculas asociadas, un ARN (compuesto a su vez por dos moléculas de ARN distintas: crRNA y tracrRNA) de secuencia complementaria a la secuencia de ADN de interés y una endonucleasa (Cas) encargada de romper la hebra de ADN en dicha secuencia. De esta forma el proceso de edición genética con el sistema CRISPR/Cas comienza cuando la molécula de ARN, diseñada previamente, guía a la endonucleasa Cas hacia el fragmento del genoma que se quiere modificar produciendo una ruptura en la hebra de ADN denominada DSBs (por sus siglas en inglés, Double Strand Breaks).

Tras la ruptura de la doble cadena y debido a que la preservación de la integridad del genoma es crucial para la supervivencia de las células, se activan los mecanismos

Introducción

naturales de reparación del ADN para intentar reparar el daño. Las células disponen de dos mecanismos diferentes para reparar esta ruptura en la hebra de ADN:

1. La vía de reparación no homologa (NHEJ, Non Homologous End Joining) es un mecanismo de reparación que se basa en insertar o delecionar nucleótidos al azar para conseguir restaurar la doble cadena y restaurar el ADN. Este procedimiento genera INDELS (inserciones y deleciones) de nucleótidos, por lo que, habitualmente comporta cambios sustanciales en la secuencia del gen que conlleva su inactivación (Figura 12) (Sander and Keith, 2014).
2. La vía de reparación dirigida por homología (HDR, Homology-Directed Repair), necesita de una molécula de ADN que actúe como un molde para reparar la ruptura de la doble cadena (Figura 12). Este mecanismo de reparación celular puede ser aprovechado para realizar distintas ediciones en el genoma empleando una hebra de ADN molde que contenga mutaciones específicas o secuencias de ADN de interés para incorporar en el locus objetivo (Sander and Keith, 2014).

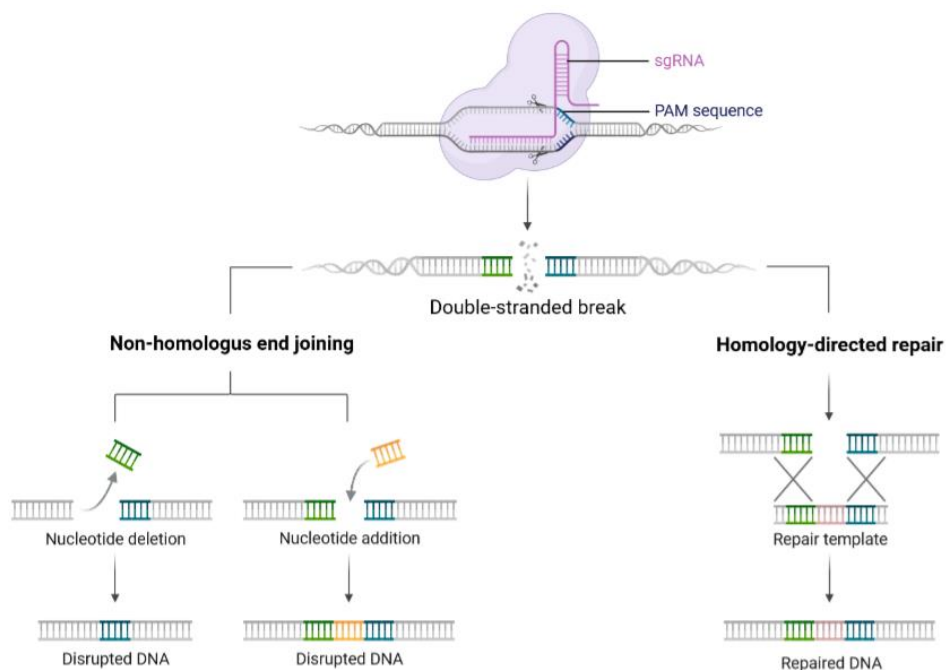


Figura 12. Esquema del funcionamiento de CRISPR/Cas9. A la izquierda se encuentra representada la vía de reparación no homologa (NHEJ) y a la derecha la vía de reparación dirigida por homología (HDR). Imagen realizada con la herramienta online Biorender.

El sistema CRISPR-Cas se ha convertido en una tecnología muy prometedora para la edición genética, capaz de editar, corregir y alterar el genoma de cualquier célula de forma altamente precisa. Ambas vías descritas en la Figura 12, pueden ser empleadas para realizar mutaciones de interés por los investigadores. Sin embargo, la vía preferente por las células puede variar dependiendo del organismo en el que se quiera realizar la modificación. Ejemplos de esta disparidad pueden encontrarse entre distintas especies de levadura dentro del mismo género, en concreto: *C. albicans* y *C. parapsilosis* dependen principalmente de la vía de reparación dirigida por homología (HDR) para reparar el daño producido en su ADN mientras que otras como *Candida lusitaniae* depende principalmente de la vía no homóloga (NHEJ), o utilizan ambas vías de reparación, como es el caso de las especies *C. glabrata* y *C. tropicalis* (Morio, Lombardo y Butler, 2020). En la actualidad diferentes laboratorios de todo el mundo trabajan para perfeccionar esta herramienta y adaptarla a distintos organismos.

Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es estudiar el proceso de la homeostasis en *C. albicans* y para lograrlo, se han abordado una serie de objetivos específicos:

- [1] Estudiar las características bioquímicas del proceso de transporte de potasio.
- [2] Analizar diversos parámetros fisicoquímicos sobre el proceso de transporte de potasio.
- [3] Estudiar el papel específico en el proceso global de homeostasis de cada uno de los transportadores de potasio en la membrana plasmática.
- [4] Estudiar fenotipos adicionales a los intrínsecos de transporte de potasio y dependientes de *TRK1*, *ACU1* y *HAK1*.

Material y Métodos

1. Material biológico. Microorganismos utilizados.

En la Tabla 2 aparecen reflejadas las cepas de levaduras que fueron utilizadas durante la realización de esta Tesis doctoral, así como los diferentes transportadores de potasio que contienen.

Tabla 2. Cepas de levadura utilizadas.

Microorganismo	Cepa/Plásmido	Proteína Transportadora	Referencia
<i>C. albicans</i>	12C	Trk1, Acu1, Hak1	Hirakawa <i>et al.</i> , 2015
<i>C. albicans</i>	SC5314	Trk1, Hak1	Jones <i>et al.</i> , 2004
<i>C. albicans</i>	SN250 HAK1+	Trk1, Hak1	Noble <i>et al.</i> , 2010
<i>C. albicans</i>	SN250 hak1-	Trk1	Noble <i>et al.</i> , 2010
<i>S. cerevisiae</i>	BYT12 [YEp352]	-	Elicharová <i>et al.</i> , 2016
<i>S. cerevisiae</i>	BYT12 [YEp-CaTRK1]	Trk1	Elicharová <i>et al.</i> , 2016
<i>S. cerevisiae</i>	BYT12 [YEp-CaACU1]	Acu1	Elicharová <i>et al.</i> , 2016
<i>S. cerevisiae</i>	BYT12 [YEp-CaHAK1]	Hak1	Elicharová <i>et al.</i> , 2016

Adicionalmente y solo para el proceso de transformación y multiplicación de los plásmidos utilizados en el sistema CRISPR/Cas9, se empleó la cepa de *E. coli* DH5 α (ThermoFisher, 18265017), una cepa versátil utilizada para aplicaciones generales de clonación y subclonación.

2. Medios de cultivo y tampones.

Se utilizaron distintos medios de cultivo para el crecimiento, el mantenimiento y la realización de los distintos experimentos de este trabajo. Los medios de cultivo fueron esterilizados a 120°C, 1 atm durante 20 min. La composición de cada medio de cultivo utilizado aparece reflejada en la Tabla 3.

Material y Métodos

Para el mantenimiento de las distintas cepas de *C. albicans*, fue utilizado el medio de cultivo Yeast Peptone Dextrose (YPD). Para el crecimiento de las distintas estirpes de *C. albicans* y su posterior uso en los distintos experimentos se utilizó Yeast Nitrogen Base (YNB) sin aminoácidos ni amonio, por ser un medio sintético cuya composición química está definida. Adicionalmente, para obtener las denominadas células normales en potasio en los experimentos de transporte se suplementó el medio YNB con 30 mM de KCl. Para el crecimiento y mantenimiento de las cepas BYT12 de *S. cerevisiae* se utilizó el medio YNB sin aminoácidos ni amonio, suplementado con 0,1 M de KCl y los requerimientos auxotróficos de las distintas cepas en las cantidades necesarias.

Para ayunar las células y realizar los distintos experimentos con potasio limitante, se utilizó YNB-F que es una variante del medio YNB preparada por la casa comercial Formedium y que se caracteriza por tener solo cantidades residuales de potasio en su composición.

Tabla 3. Medios de cultivo utilizados en este trabajo.

Medio de cultivo	Composición
Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos ni sulfato de amonio	YNB 0,17% (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,4% D-glucosa 2% KCl y Requerimientos auxotróficos*
Yeast Nitrogen Base - Formedium (YNB-F)	YNB 0,17% (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,4% D-glucosa 2% Requerimientos auxotróficos*
Yeast Peptone Dextrose (YPD)	D-glucosa 2% Peptona 2% Extracto de levadura 1%
LB	Peptona 1% Extracto de levadura 0,5% Cloruro de sodio 0,5%

*Requerimientos auxotróficos para *S. cerevisiae*: Inositol 100 mg/L, Metionina 40 mg/L, Histidina 80 mg/L, Leucina 120 mg/L, Triptófano 80 mg/L, Adenina 40 mg/L. Requerimientos auxotróficos para *C. albicans* SN250: Histidina 40 mg/L, Leucina 60 mg/L y Arginina 40 mg/L.

Nota: Cuando se emplearon los medios LB e YPD para intentar realizar las ediciones genéticas con el sistema CRISPR/Cas9 al medio LB se le adicionó ampicilina en una concentración de 100 mg/L y al medio YPD se le adicionó nourseotricina en una concentración de 100 mg/L.

Además de los medios de cultivo, se utilizaron tres tipos de tampones para ajustar los medios a las distintas condiciones ácido-base. La composición química de estos tampones se recoge en la Tabla 4.

Tabla 4. Tampones y soluciones utilizados.

Tampones y soluciones	Composición
Tris	Tris 10 mM MgCl ₂ 0,1 mM CaCl ₂ 0,1 mM Ajustado el pH a 4,5 añadiendo Ácido Cítrico
MES	Acido-2-[N-Morfolino] etanosulfónico 10 mM MgCl ₂ 0,1 mM Ajustado el pH 5,8 añadiendo Ca(OH) ₂
Hepes	Hepes 10 mM MgCl ₂ 0,1 mM Ajustado el pH a 7,5 añadiendo Ca(OH) ₂
TE	Tris 10 mM, ajustado a pH 8,0 con HCl EDTA 1 mM, ajustado a pH 8,0 con NaOH
TAE 50X	Tris 2 M, ajustado a pH 8,0 con HCl EDTA 50 mM, ajustado a pH 8,0 con NaOH Ácido acético 1 M
Agua DEPC	Dietilpirocarbonato 0,1% Agitado durante 4 horas Autoclavado 2 veces

Los tampones se conservaron en frío hasta su uso. Los tampones utilizados para los experimentos de transporte fueron suplementados con un 2% de D-glucosa antes de su utilización.

3. Análisis del crecimiento de las cepas.

El análisis del crecimiento de las cepas se llevó a cabo mediante la variación de dos modalidades de experimentos: el primero realizado en medio sólido mediante un test de goteo con diluciones seriadas, y el segundo realizado en medio líquido observando el crecimiento de las distintas cepas mediante a lo largo del tiempo mediante la medición de la densidad óptica.

3.1 Análisis fenotípico en medio sólido. Test de goteo.

Este tipo de experimentos se realizó para determinar las posibles diferencias fenotípicas de las distintas cepas utilizadas en la realización de esta Tesis doctoral. Se llevó a cabo en condiciones de limitación de potasio y distinto pH, presencia de cationes tóxicos (sodio y litio), o presencia de distintas drogas inhibitoras como fueron el azida de sodio (NaN_3), 2,4-dinitrofenol ($\text{C}_6\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_5$), rotenona ($\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_6$) y cafeína ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$).

Para los experimentos con potasio limitante se prepararon distintas placas de medio YNB-F con los requerimientos necesarios para cada cepa descritos en el *Apartado 2 de Material y Métodos*. Estos medios fueron suplementados con agar al 2% y con las distintas concentraciones de KCl a las que se quería observar el crecimiento de las distintas cepas. Tras esto, el pH fue ajustado al requerido mediante el uso de ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de amonio (NH_4OH).

En el caso de los experimentos realizados en presencia de los cationes tóxicos o de los distintos tóxicos se utilizó YNB sin aminoácidos y sin amonio con los requerimientos necesarios para cada cepa descritos anteriormente. Los medios fueron suplementados con las concentraciones del catión o tóxico que se quería estudiar tras lo cual se ajustó su pH y se le adicionó agar al 2%. Si la sustancia era sensible al autoclavado se añadió al medio tras esterilizarse por filtración. Las cepas se inocularon en 50 mL del medio necesario para su crecimiento y posterior uso (*Apartado 2 de Material y Métodos*) y se dejaron crecer durante toda la noche a 28 °C en agitación. Posteriormente, se ajustó la suspensión celular a una densidad óptica de 1 ($A_{600\text{nm}} = 1$) y a partir de esta, se realizaron diluciones seriadas en H_2O mQ estéril 1:10, 1:100, 1:1000, en una placa Elisa de 96 pocillos.

El proceso de inoculación en placa se realizó mediante un molde de replicación para placas Elisa (R2383 Sigma-Aldrich, Replica plater for 96 well plate) en orden de mayor a menor concentración celular como se muestra en la Figura 13.



Figura 13. Ejemplo del uso del molde de replicación para realizar el test de goteo.

Las placas se incubaron a 28°C durante 24-48 h, según la estirpe, para el permitir el crecimiento de las células, y se tomaron imágenes del resultado.

3.2 Análisis fenotípico en medio líquido. Curvas de crecimiento.

Estos experimentos se llevaron a cabo en condiciones de limitación de potasio a distintos pH, y en presencia de los cationes tóxicos sodio y litio.

Para los experimentos con potasio limitante se preparó medio YNB-F con los requerimientos necesarios para cada cepa descritos en el *Apartado 2 de Material y Métodos*. Este medio fue suplementado con las distintas concentraciones de potasio y el pH requerido fue ajustado con ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de amonio (NH₄OH). A continuación, se distribuyó en tubos en un volumen final de 5 mL y fue esterilizado en autoclave.

De manera similar se procedió en los experimentos donde se pretendía estudiar el efecto de la presencia de los cationes tóxicos sodio y litio. Se preparó medio YNB sin

Material y Métodos

aminoácidos y sin amonio con los requerimientos necesarios para cada descritos en el *Apartado 2*. Este medio fue suplementado con las distintas concentraciones de sodio y litio estudiadas, y como se describió anteriormente se ajustó su pH, se distribuyó en tubos y se esterilizó en autoclave.

Posteriormente, las cepas se inocularon en 50 mL del medio necesario para su crecimiento y posterior uso (*Apartado 2 de Material y Métodos*), y se dejaron crecer durante toda la noche a 28°C en agitación. Una vez obtenidas, se centrifugaron y se lavaron las cepas con H₂O mQ estéril, se ajustaron las cantidades de células a una $A_{600nm}=1$ y a partir de esta suspensión celular, se procedió a inocular en los distintos tubos de manera que la densidad celular estuviese a una $A_{600nm}=0,05$.

Los tubos se incubaron a 28°C con una agitación adecuada para su correcta aireación. Tras incubar toda la noche, se midió la absorbancia a A_{600nm} en un Spectronic 20D (Milton Roy) de forma periódica durante al menos 12 h.

4. Métodos bioquímicos

4.1 Obtención de células con distintos niveles de potasio.

A lo largo de esta Tesis doctoral se utilizaron células crecidas en diferentes condiciones de potasio y sometidas a distintos tiempos de ayuno de este catión. Las células crecidas bajo condiciones no limitantes de potasio fueron denominadas células normales en potasio, mientras que aquellas células que tras ser crecidas en condiciones de suficiencia de potasio fueron sometidas a ayuno en el medio especial YNB-F fueron denominadas células ayunadas de potasio.

Para preparar las células “normales” en potasio, las levaduras crecieron durante una noche en medio YNB sin aminoácidos y sin amonio cuya composición se describe en el *Apartado 2 de Material y Métodos*. Este medio fue suplementado con 100 mM de KCl en el caso de las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 que expresaron los distintos transportadores de *C. albicans* o 30 mM de KCl en el caso de las distintas cepas de *C. albicans*. Las células “ayunadas” de potasio se obtuvieron incubando durante 3 horas células “normales” en el medio YNB-F cuya composición se encuentra nuevamente descrita en el *Apartado 2 de Material y Métodos*.

4.2 Análisis del contenido interno y del flujo de cationes.

El análisis de la acumulación o la pérdida de cationes a lo largo del tiempo se determinó mediante el estudio del contenido de cationes en la célula, o de los cambios en el contenido del medio externo. Los tiempos de toma de muestras se ajustaron en función al tipo de ensayo.

4.2.1 Contenido intracelular de potasio, sodio y litio.

Para estudiar el contenido intracelular de potasio, sodio y litio de las distintas levaduras utilizadas en esta Tesis doctoral, se diseñaron dos tipos de experimentos:

1. Se realizó una primera tanda de experimentos para determinar las concentraciones intracelulares de potasio en condiciones de suficiencia de potasio y en condiciones de ayuno de este catión. Para obtener estos valores se cultivaron los distintos microorganismos en YNB con las condiciones de potasio estándar para su correcto crecimiento descritas en el *Apartado 2 de Material y Métodos*, y en condiciones de ayuno de potasio en medio YNB-F sin potasio añadido.
2. El segundo tipo de experimento se diseñó para obtener los valores del contenido intracelular de los cationes tóxicos sodio y litio que acumularon los distintos microorganismos de estudio. Para ello, las cepas fueron cultivadas nuevamente en YNB en las condiciones necesarias para cada cepa descritas en el *Apartado 2 de Material y Métodos*, pero este YNB fue suplementado con 0,2 M de NaCl o 0,1 M LiCl dependiendo de la condición que queríamos estudiar.

Para ambos experimentos, las cepas fueron inoculadas en las distintas condiciones y se dejaron crecer a 28°C en agitación hasta obtener una A_{600nm} de 0,6. En el caso del ayuno de potasio, las cepas una vez crecidas en condiciones de suficiencia de potasio fueron lavadas y resuspendidas a una A_{600nm} de 0,6 para obtener células ayunadas de potasio como se describió anteriormente en el *Apartado 4.1 de Material y Métodos*.

A partir de las células cultivadas en las condiciones descritas se tomaron distintas muestras de 1 mL que se filtraron (filtros Millipore AAWP, 0,8 μm de diámetro) y lavaron

Material y Métodos

con una solución 20 mM de $MgCl_2$. Además, se realizó, un segundo lavado, que se llevó a cabo por arrastre y resuspensión de las células sobre otro filtro. El contenido celular se obtuvo mediante lisis ácida con 5 mL de una solución de HCl 0,2 M y $MgCl_2$ 10 mM durante 3 h en frío.

Posteriormente se procedió a centrifugar para separar los restos celulares (4.500 g, 2 minutos) y se midieron las concentraciones de cationes (potasio, sodio y litio) presentes en el sobrenadante mediante un espectrofotómetro de absorción atómica (SpectrAA-240FS, Varian). El contenido intracelular de estos cationes se expresó en nmoles del catión por mg de peso seco de células (Ramos *et al.*, 1990).

4.2.2 Determinación del potasio extracelular.

En esta modalidad de experimento se pretendió estudiar la diferencia de absorción de potasio entre las distintas cepas de levadura tanto de *C. albicans* como de *S. cerevisiae*.

Para la realización de este experimento se obtuvieron células ayunadas de potasio como se indicó en el *Apartado 4.1 de Material y Métodos*. Estas células fueron resuspendidas a una A_{600nm} de 0,5 en los tampones Tris, Mes o Hepes en función del pH que se quería estudiar (4,5, 5,8 ó 7,5 respectivamente) suplementados con 25-30 μ molar de KCl. Las células se mantuvieron en agitación en un baño a 28°C y se tomaron muestras de 5 mL durante 1 hora en el caso de las cepas de *C. albicans* y 3 horas en el caso de las cepas de *S. cerevisiae*. Estas muestras se filtraron (filtros Millipore AAWP, 0,8 μ m de diámetro), y se determinó inmediatamente el contenido de potasio en el filtrado mediante espectrofotometría de absorción atómica.

4.2.3 Transporte de rubidio.

El rubidio es un catión utilizado habitualmente como análogo del potasio y el estudio de sus características de transporte se asimila al del transporte de potasio (Ramos *et al.*, 1986). Las características del transporte de rubidio se midieron tanto en células “normales” en potasio como en células “ayunadas” de potasio. A partir de un cultivo en medio YNB con composición como se indica *Apartado 2 de Material y Métodos* y suplementado con 30 mM de KCl (*C. albicans*) ó 100 mM KCl (*S. cerevisiae*) se obtuvieron

células (18 h, 28°C y en agitación) que se utilizaron para realizar experimentos de transporte de rubidio. En el caso de las células “normales” en potasio se procedió a un centrifugado y lavado (H_2O mQ estéril a 4°C) y su suspensión en 5 mL del tampón que se utilizó en función del pH: Tris, Mes o Hepes. Las células se mantuvieron en hielo durante la realización de los experimentos. En el caso de las células “ayunadas” de potasio se procedió a una etapa intermedia de ayuno durante 3 h en un medio sin potasio tal como se ha comentado anteriormente (*Apartado 4.1 de Material y Métodos*).

A partir de este punto, el transporte interno de rubidio se llevó a cabo resuspendiendo las células con una $A_{600\text{nm}} = 0,3$ aproximada en 50 mL de tampón Tris, Mes o Hepes en función del pH que se quería estudiar. Al tampón se le añadió la concentración requerida de RbCl mientras se mantuvo en agitación en un baño a una temperatura constante de 28°C.

Se recogieron muestras de 5 mL con micropipeta a distintos tiempos tras la exposición al ion, y se procedió a su filtrado en filtros Millipore de 0,8 μm . Se realizó un lavado con una solución de cloruro de magnesio (20 mM de MgCl_2 en H_2O mQ) y se extrajo el filtro con la muestra para colocarlo en tubos con 5 mL de líquido extracción (10 mM de MgCl_2 y 0,2 M de HCl en H_2O mQ) para concentraciones de RbCl inferiores al 1 mM. Cuando las concentraciones fueron mayores a esta, se realizó un segundo lavado, que se llevó a cabo por arrastre y resuspensión de las células sobre otro filtro. Las muestras obtenidas se dejaron en frío (4°C) durante al menos 3 h. Por último, estas muestras se midieron mediante espectrofotometría de absorción atómica, obteniendo su absorbancia, que se utilizó para la estimación de las constantes cinéticas del transporte mediante la realización de gráficas de Eadie-Hofstee y Lineaweaver-Burk.

4.2.4 Efecto del potasio sobre la absorción de sodio y litio.

Se obtuvieron células “ayunadas” de potasio como se detalló en el *Apartado 4.1 de Material y Métodos*. Estas células se resuspendieron a una $A_{600\text{nm}}$ de 0,3 en tampón Mes suplementado con 100 mM del catión tóxico de interés (sodio o litio) y distintas concentraciones de cloruro potásico (además de un control sin potasio añadido). Tras esto se tomaron muestras a diversos tiempos mediante el filtrado de las células en filtros

Material y Métodos

Millipore y se determinó del contenido intracelular de los cationes sodio y litio según el proceso descrito en el *Apartado 4.2.3 de Material y Métodos*.

4.3 Determinación del volumen celular

Las mediciones del tamaño celular se llevaron a cabo en cultivos líquidos de las distintas cepas de *S. cerevisiae* que expresaron heterológicamente los genes de los transportadores de potasio de *C. albicans* en medio YNB-F en condiciones normales de crecimiento (0,1 M de KCl), 30 mM de KCl y de ayuno del catión.

Las cepas fueron cultivadas en condiciones normales hasta fase exponencial. Tras esto, parte de las células se centrifugaron y se lavaron con H₂O mQ dos veces. Finalmente, se resuspendieron en YNB-F líquido suplementado con 30 mM de KCl y sin adición del catión, y se mantuvieron durante tres horas.

Una vez obtenidas las células en las distintas condiciones se resuspendieron en tampón Isotón II (Beckman-Coulter) para medir la distribución del tamaño celular a lo largo de la población (Navarrete et al., 2010). El ensayo se repitió tres veces para cada condición experimental, y los resultados obtenidos se expresaron en μM .

El tamaño celular se determinó gracias a un contador de células Z2 (Beckman-Coulter). El método utilizado para la medición del tamaño celular se basa en cambios medibles de resistencia eléctrica producidos por las partículas no conductoras (en nuestro caso células) que se encuentran en suspensión en un electrolito. Las partículas pasan a través de un sensor entre dos electrodos y desplazan un cierto volumen de electrolito, igual al suyo propio, obteniendo así el tamaño de las células. El contador estima el tamaño celular realizando una media automática entre todas las células medidas.

5. Estudio y determinación del nivel de transcripción

La determinación molecular se realizó mediante amplificación por RT-PCR de ADNc retrotranscrito de ARNm obtenido tras someter a las células a diversas condiciones de estrés.

5.1 Obtención de las células

Para obtener las células en su punto de crecimiento exponencial, se cultivaron en YNB y se dejaron crecer a 28°C en agitación durante toda una noche. Posteriormente, a partir de este cultivo, se inoculó un cultivo nuevo a una densidad óptica (A_{600nm}) de 0,1 y se dejó crecer en las distintas condiciones de estrés que se requerían hasta una densidad óptica (A_{600nm}) aproximada de 0,6-0,7.

Las distintas condiciones en la que se estudió la expresión de los genes *TRK1*, *ACU1* y *HAK1* fueron ó distintos pH (YNB ajustado a pH 5,8 como control, 7,5 y 4,5), estrés salino (YNB 1 M de NaCl), y ayuno de potasio (células suspendidas en YNB-F) durante distintos tiempos: 0 minutos, 30 minutos, 1 hora y 3 horas.

5.2 Extracción de ADN

Con el objetivo de extraer ADN cromosómico, se centrifugó y se lavó un cultivo de 50 mL en fase exponencial ($A_{600nm} \approx 0,6$). Tras esto, se concentraron las células y procedió a repartir un volumen de 200 μ L de células en tubos eppendorfs. Después, a cada tubo se le añadió: 0,2 mL de bolas de vidrio, 0,2 mL de tampón A y 0,2 mL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (proporción 25:24:1).

Tras esto, se selló el eppendorf con parafilm y se agitó con el agitador en 5 pulsos de 1 minuto con intervalos de 1 minuto en hielo para la correcta ruptura de las células. Posteriormente, se añadió 0,2 mL de TE y se centrifugó 5 minutos a 12.000 *g* y se extrajo la fase acuosa superior en un nuevo tubo con ayuda de una micropipeta. Se procedió a añadir en el nuevo tubo con la fase acuosa 1 mL de etanol 100% y se mezcló por inversión. Se volvió a centrifugar 2 minutos a 12.000 *g*.

Tras la centrifugación se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado obtenido en 0,4 mL de TE al cual se le añadió 10 μ L de acetato sódico pH 4,8 y 1 mL de etanol 100%. Se volvió a centrifugar 2 minutos a 12.000 *g* y se descartó el sobrenadante dejando secar el precipitado. Una vez seco, se resuspendió en 50 μ L de tampón TE.

5.3 Extracción de ARN

Con el objetivo de extraer ARN, se concentraron las células de igual manera que en apartado anterior y al precipitado celular obtenido se añadió aproximadamente 0,2 ml de bolas de vidrio y 1 mL de Tri-Reagent (Sigma-Aldrich). El tubo eppendorf se selló con parafilm para evitar pérdidas y se agitó 5 veces de forma vigorosa durante 1 minuto con intervalos de 1 min en hielo. Posteriormente se incubó 5 minutos a 70°C en un termobloque y se repitieron las 5 agitaciones.

Tras esto, se añadió 200 µL de cloroformo, se agitó durante 1 minuto y se centrifugó 15 min a 4°C y 12.000 *g*. Tras la centrifugación se apreciaron en el eppendorf tres fases, una inferior orgánica de color rosa (contiene las proteínas, lípidos y restos celulares), una interfase (contiene el ADN cromosómico) y una superior acuosa e incolora que contiene el ARN. Se recogió esta fase y transfirió a un tubo eppendorf limpio.

Se añadió 0,5 ml de isopropanol al eppendorf y se mezcló por inversión e incubó por al menos 30 minutos a -80°C. Tras esto, se centrifugó 15 minutos a 12.000 *g* y 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 0,5 mL de etanol al 70% resuspendiendo el precipitado. Se centrifugó 10 min a 12.000 *g* a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado, que se resuspendió en 10 µL de H₂O ultra pura (mQ) DEPC.

5.4 Tratamiento con ADNasa

El ARN total aislado a partir de las levaduras se encuentra normalmente contaminado con ADN genómico que puede alterar los resultados de los análisis. Para poder eliminar estos restos, las muestras deben ser tratadas con la enzima ADNasa I (New England Biolabs) que degrada el ADN sin alterar el ARN. Para ello a un tubo eppendorf con 10 µL del ARN a tratar se le añadió 34 µL de H₂O mQ DEPC, 5 µL de tampón de ADNasa 10x (New England Biolabs) y 1 µL de ADNasa en este orden. Se resuspendió con la pipeta y se incubó 1 hora en la estufa de 37°C. Seguidamente se añadió 150 µL de H₂O mQ DEPC y 100 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), tras esto, se agitó vigorosamente y se centrifugó durante 5 min a 13.400 *g*. Tras la centrifugación se recogió la fase acuosa superior.

A esta fase acuosa superior se le añadió 20 µL de Acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 1 mL de etanol y se incubó a -80°C al menos durante 30 minutos. Tras la incubación se centrifugó a 13.400 *g*, 15 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. Una vez seco se resuspendió en 10 µL H₂O mQ DEPC.

Este paso se repitió tantas veces como fueron necesarias hasta comprobar que el ARN no retrotranscrito no amplificaba en ciclos anteriores al 30 en reacciones de RT-qPCR con cebadores específicos para el gen de la actina (*ACT1*).

5.5 Determinación de la concentración de los ácidos nucleicos.

Tras realizar el aislamiento de ARN y el tratamiento con ADNasa, se procedió a su cuantificación mediante un espectrofotómetro Nanodrop 2000 de Thermo Scientific, Este espectrofotómetro ha sido utilizado a lo largo de esta Tesis Doctoral para cuantificar y evaluar la concentración y la pureza de los ácidos nucleicos aislados.

5.6 Retrotranscripción a ADNc

La retrotranscripción es un proceso que implica la generación de un fragmento de ADN copia (ADNc) a partir de ARNm. Este proceso, junto a la técnica de PCR, es utilizado para estudiar la expresión de un gen en distintas condiciones ambientales y de estrés. El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARN usando el Kit iScript™ cDNA Synthesis, siguiendo las instrucciones de la casa comercial: 4 µL de 5X iScript react. mix, 1 µL de iScript reverse transc. y 14 µL de H₂O mQ DEPC. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf), con una etapa de hibridación a 25°C durante 5 minutos y una etapa de elongación de 30 minutos a 42°C. Por último, se desactivó la enzima durante 5 minutos a 85°C.

Una vez obtenido el ADNc se almacenó a 4°C para su utilización a corto-medio plazo. Para periodos de almacenamiento superiores se conservó a -20°C.

5.7 Determinación de la expresión génica mediante RT-PCR

Para la cuantificación mediante PCR de la expresión génica se utilizó la mezcla supermix iQ SYBR Green de Bio-Rad. Siguiendo la metodología indicada por este producto se rellenó cada pocillo de una placa de PCR con 10 μ L de la supermix, 1 μ L de ADNc, 2 μ L de la mezcla de cebadores correspondientes a una concentración de 1 μ M (Tabla 5) y 7 μ L de H₂O mQ.

Hay dos tipos de cebadores identificados como Forward (F) y Reverse (R) llamados así debido a que el cebador forward o directo es para extender la cadena de ADN molde y el cebador reverse o inverso sirve para extender la cadena de ADN complementario. Así es como los dos cebadores nos ayudan a obtener un ADN amplificado de doble cadena. El diseño de los diferentes cebadores para los experimentos de transcriptómica fue realizado con el software Oligo v7.

Tabla 5. Cebadores utilizados.

Nombre de la secuencia	Secuencia (Forward/Reverse 5' → 3')
12C, SC5314 y SN250 <i>ACT1</i>	F: ACTGGGACGATATGGAAAAATCTGGCATC
	R: GATTTTGGATTCATTGGAGCTTCGGTCA
12C, SC5314 y SN250 <i>TRK1</i>	F: CGAAAGAAAGCACCAAAGCGGAAAACCCCA
	R: AGAATTCCGACCAACAGTAGGCGTCCACGA
12C <i>ACU1</i>	F: GGGAACAATTGGTGGCACACAATGAATTGGTT
	R: CCGTCACCAGTCATCCCAACCACTTGACCGTA
12C <i>HAK1</i>	F: AGGGGCACCTGAAGCTTCTGATATGCAAT
	R: ACATGACCAAGGCACTACCAAGGAAACAAGC
SC5314 y SN250 <i>ACU1</i>	F: GGTCAAGTGGTTGGGATGACTGGTGACGG
	R: CAGCATCTGAATTCATAAGGATCAAATCGGCAGCT
SC5314 y SN250 <i>HAK1</i>	F: GGGGCACCTGAAGCTTCTGACATGCAA
	R: ACATGACCAAGGCACTACCAAGGAAACAAGC

Tras cargar todos los pocillos de la placa, esta fue introducida en el termociclador MJMini Personal Thermal Cycler de Bio-Rad programado con los siguientes pasos:

- 3 minutos a 95°C para la activación del enzima
 - 15 segundos a 95°C para la desnaturalización
 - 30 segundos a 70°C para la hibridación y la elongación
- } 40 ciclos

Una vez finalizados estos ciclos se programó para lectura de placa tras ciclo y para la obtención de las curvas de desnaturalización (Melting) de 65°C a 95°C incrementando la temperatura 0,5 grados cada 5 segundos.

6. Sistema CRISPR/Cas9

6.1 Plásmidos utilizados

Se utilizaron tres plásmidos para intentar realizar las mutaciones mediante CRISPR/Cas9 en la cepa 12C de *C. albicans*:

1. El plásmido pDIV066 que es el plásmido utilizado como base para construir el resto de los plásmidos utilizados para la edición genética. Este plásmido no cuenta con la secuencia de Cas9, pero si con la secuencia que otorga resistencia al antibiótico nourseotricina optimizada para el clado CTG.
2. Los plásmidos pDIV515 y pDIV489 fueron utilizados para crear las distintas construcciones con los ARNg específicos para realizar la delección en los genes de interés, con la secuencia de Cas9 y con la resistencia al antibiotico nourseotricina.

Todos estos plásmidos se han descrito en un trabajo anterior (Strucko *et al.*, 2021) donde han sido utilizados con éxito para la edición genética de *D. hansenii*.

6.2 Pruebas preliminares

Para llevar a cabo la edición genética mediante la tecnología CRISPR se comprobó y optimizó la transformación de la cepa 12C de *C. albicans* utilizada en este trabajo por el plásmido pDIV066, utilizado como base para el resto de los plásmidos. El proceso de transformación se monitorizó por la resistencia al antibiótico nourseotricina que porta el plásmido.

Material y Métodos

Para optimizar la eficiencia de la transformación, teniendo en cuenta lo descrito anteriormente en un artículo preliminar sobre la transformación en *C. albicans* (Bijlani *et al.*, 2019), se decidió probar el plásmido de dos formas distintas: circular y linealizado con secuencias teloméricas en los extremos. Además, para comprobar que temperatura era la ideal para esta cepa de *C. albicans* durante el choque térmico de la transformación, se probaron distintas temperaturas: 39, 40, 42 y 44°C.

6.2.1 Linealización y adición de la secuencia telomérica

Para la creación del plásmido lineal con los telómeros se diseñaron cebadores específicos que contenían las secuencias teloméricas naturales de *C. albicans*. Estos cebadores se encuentran recogidos en la Tabla 6.

Tabla 6. Cebadores utilizados para la modificación del plásmido.

Secuencias (5' → 3')
F: ACGGATGTCTAACTTCTTGGTGTAGTATAGGAACTTCTGAAGTGGGG
R: ACGGATGTCTAACTTCTTGGTGTGTGTCGCCCTTATTCGACTC

En la Tabla 6 se encuentra representada en negrita la secuencia telomérica correspondiente a *C. albicans* (McEachern y Hicks, 1993) junto a la secuencia complementaria, sin resaltar, del plásmido pDIV066.

Se llevo a cabo una reacción de PCR para amplificar el plásmido pDIV066 y, de esta forma, obtenerlo en forma lineal incorporando las secuencias teloméricas de *C. albicans* descritas en la Tabla 6. Para llevar a cabo este proceso, se utilizaron los reactivos recogidos en la Tabla 7.

Tabla 7. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR.

Material	Cantidad
10 x PCR buffer	5 μL
dNTPs (2 mM mix)	5 μL
Cebador 1 (10 pmol/ μL)	2 μL
Cebador 2 (10 pmol/ μL)	2 μL
ADN	10 pg
X7 polimerasa	1 μL
H ₂ O mQ hasta 50 μL	* μL

*La cantidad de H₂O mQ añadida a la reacción depende de la cantidad de μL de ADN necesarios para añadir la cantidad de ADN necesaria en la reacción. Esta cantidad de ADN depende del organismo del que se trate, siendo normalmente 10 ng para ADN de levaduras, 1 ng para ADN de bacterias y 10 pg para plásmidos.

Tras cargar todos los elementos de la PCR, los tubos se introdujeron en un termociclador MJMini Personal Thermal Cycler de Bio-Rad programado con los siguientes pasos:

- 2 minutos a 98°C para la desnaturalización completa del plásmido
 - 30 segundos a 98°C para la desnaturalización
 - 30 segundos a 59°C para la hibridación
 - 1 minuto a 72°C para la extensión
 - 5 minutos a 72°C
 - Mantenido a 12°C
- } 34 ciclos

Tras la reacción de PCR se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1% con un programa de 100 V durante 20 minutos TAE.

Tras la electroforesis, se comprobó las bandas obtenidas fueran nítidas y no contuviesen ningún tipo de productos de PCR secundarios. Una vez comprobadas, se procedió a

Material y Métodos

recortar las distintas bandas en el gel de agarosa en un transiluminador UV. Posteriormente se extrajo y purificó el plásmido utilizando el kit comercial CFX Healthcare siguiendo el protocolo dado por el fabricante. El plásmido lineal purificado fue conservado a -20°C hasta su utilización.

6.3 Diseño del sistema CRISPR/Cas9 para *C. albicans*

6.3.1 Diseño de los ARNg

El ARN guía (ARNg o gRNA en inglés) es un elemento importante para el sistema CRISPR/Cas9 ya que determina la conexión y unión a la secuencia de ADN que se quiere modificar. Para diseñar el ARNg se pueden utilizar numerosas herramientas online como por ejemplo CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>).

Para generar los ARNg de este trabajo se utilizaron las secuencias génicas completas de cada gen diana que se quería deletar. Estas secuencias se extrajeron de la base de datos del genoma de *Candida* (Candida Genome Database, <http://www.candidagenome.org/>). En la Figura 14, se explica un ejemplo de diseño de ARNg para el gen *HAK1* donde se obtuvo como resultado más de 100 posibles ARNg para este gen y las características de cada candidato. Para diseñar y seleccionar el ARNg más idóneo, hay algunas consideraciones que el usuario debe tener en cuenta:

1. **El contenido de GC:** un contenido de GC más alto estabiliza el dúplex ARN:ADN mientras desestabiliza la hibridación fuera del objetivo
2. **Evitar sitios potenciales fuera del objetivo del ARNg diseñado.** Las últimas 3 columnas de la "tabla de resultados" especifican los sitios fuera del objetivo, un número menor (pero no cero) es mejor para estas columnas para evitar la edición fuera del objetivo.



Enter an accession number (e.g. NM_006299) or genome location (e.g. hg19:chr7:900000-901000): ?

or Paste a nucleotide sequence: ?

```

CTCATAAAGTTCGAGGTTTAAATTCAGTAAAGTAAATGGTGTAAATGATGGGTTGATTCAGTAAAC
GGCTGGGTTCAAACAACGTAATAATGTCACCCGCTTACGGGTTAGGAATTTCAATGGATTTCTTGT
ACTTCACGTGTGATAATAATTTGCTTATCTATGCTACAAATGCAACATTTTGGCCATTTGATTC
TATTGATTTTCGTTCCCTTGGAAAGTTTGTATGGTGGTGTAACTTGAAGAAAGTACCAATGGTGG
GTGCCACTTTTGTGACAGGTATATCTTCTCATTCTTGTGCTTTGGCGTTGGCCAGATCCAAAAA
GTGCATCAAGAATACGAACAAGAATTAATTTGGTGTATTTGTCOCATTTCTTCCGCAAGTCCATAA
CTGTTGATCTTAATCATAATGAGGTTTCGCCAAATTAATTCATTGCAAGAACAACACCAAGTCCGTCC
ATATTTCAAGAAGATGTTGTACCAAAATTTGGTACCGTTCCATTATCTAGACATCCCGGACTAGGATC
ATGATGTCGATTCATTAATGACCAATTCGCCGAACACTTTCCTCAACTATATGAAAGTTGATTACTT
CATTGTCATCTATACCTTCTGAATTTGTGTTTGGGGATTGAGTATTATCTATTTCTATATGTGAATC
TGATGAAGAATATTTGGCCAAATGAAATTCCTGGTCAATATAAATGATATTAAGATTGGATTT
ATGGAAATGTTCAAATGATAAAGAATTAAGTTCTAAATAATGGCAAGAATTCCTGGATTAAGTGT
TAACCTCGCAAAATACATAATCAATCAATTTTCGAAATGATTAATAGATGTCAATCA
ATATCATCTGGTAAAGAAATTTTCAAAAATTTGGTCAATTTGATAAGAAAATTTATTAATCAT
ATATATAGTCCCTTATATCTTTGACTCAAGATAAAGGAGGTTCTTGTATGATAATGAAAAGAGG
AAAGTAAAAGAAATTTATTTGGTGTATTTCTAGAAATAAA
    
```

or upload sequence file: ? No se ha seleccionado ningún archivo.

PAM sequence requirement: (e.g. NGG, NRG, NNGRRT, NG) ?

Specificity check: ?

show **highly specific** target only

Show entries

Search:

position		target sequence	sequence information				number of target sites ?		
start	end		GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTT in 20mer	restriction sites	20mer +PAM	12mer +PAM	8mer +PAM
15	37	TGCATCAATTAGGAAATCACAGG [gRNA]	35.00 %	64.05 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	36 [detail]
62	84	AAATGATCAGACTGAATTA CCG [gRNA]	25.00 %	58.73 °C	-	BclI	1 [detail]	1 [detail]	27 [detail]
200	222	GTGTTTCCAACAACAATCA TGG [gRNA]	35.00 %	63.46 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	56 [detail]
203	225	TTTCCAAACAACAATCATGGAGG [gRNA]	35.00 %	63.54 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	23 [detail]
206	228	CCAACAACAATCATGGAGGAAA [gRNA]	35.00 %	65.13 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	122 [detail]
247	269	CTGTCATTTGGGTCAAATTA TGG [gRNA]	40.00 %	67.05 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	72 [detail]
256	278	GGTCAATTTATGGTATCT TGG [gRNA]	40.00 %	67.42 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	13 [detail]
284	306	CCCATTATATGTTCTCAATTCA [gRNA]	25.00 %	57.28 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	43 [detail]
285	307	CCCATTATATGTTCTCAATTCAA [gRNA]	20.00 %	55.91 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	31 [detail]
286	308	CCATTATATGTTCTCAATTCAAT [gRNA]	20.00 %	55.91 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	33 [detail]
325	347	CCAATTAAGAAGACATTTA [gRNA]	30.00 %	61.17 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	50 [detail]
328	350	CCCAATAAGAAGACATTTA TGG [gRNA]	30.00 %	61.17 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	17 [detail]
328	350	CCCATAAGAAGACATTTATGG [gRNA]	25.00 %	57.83 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	73 [detail]
329	351	CCAATAAGAAGACATTTATGGT [gRNA]	25.00 %	59.75 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	92 [detail]
380	402	CCATTATGTTATTTCAAATAT [gRNA]	10.00 %	49.47 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	157 [detail]
421	443	ATCGGAGTTAATTTGTAATCA TGG [gRNA]	30.00 %	61.95 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	27 [detail]
424	446	GGAGTTAATTTGTAATCATGG TGG [gRNA]	35.00 %	62.96 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	23 [detail]
455	477	CCATTATTTGCCAAGATTGCTCGA [gRNA]	40.00 %	67.97 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	22 [detail]
462	484	TGCCAAGATTGCTCGACACT TGG [gRNA]	50.00 %	73.13 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	8 [detail]
463	485	GCCAAGATTGCTCGACACTT GGG [gRNA]	50.00 %	72.19 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	12 [detail]

Showing 1 to 20 of 139 entries (filtered from 198 total entries)

Figura 14. Posibles ARNg para la secuencia objetivo. A) Página principal de la herramienta online CRISPRdirect. B) Página de resultados obtenidos para la secuencia de *HAK1* de *C. albicans* 12C.

6.3.2 Preparación de la zona USER

Una vez seleccionado el ARNg con la secuencia PAM y para terminar la construcción del ARNg se realizan las siguientes modificaciones:

1. Se excluye la zona PAM del ARNg, quedándose una secuencia de 20 nucleótidos.
2. Dentro de la secuencia de ARNg de 20 nucleótidos, se busca la posible zona USER (zona para colocar uracilo) que nos permita posteriormente el ensamblaje de los múltiples fragmentos de PCR (6 ~ 12 nt, comenzando con "A" y terminando con "T").
3. Tras esto, se cambian la última timina de la zona USER por un uracilo y se añaden las colas complementarias al plásmido que se utilice.

A continuación, se muestra en negrita un ejemplo de diseño de la zona USER para el gen *HAK1* de *C. albicans* 12C:

ARNg para *HAK1* → CTTGGGT**ATTGGTC**CTAGAG

Ca*HAK1*_gRNA_Forward → **ATTGGTCCU**AGAG

Ca*HAK1*_gRNA_Reverse → **AGGACCAAU**ACCCAAG

Para el plásmido, las secuencias son las siguientes:

Ca*HAK1*_gRNA_F → ATTGGTCC**U**AGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT

Ca*HAK1*_gRNA_R → AGGACCAA**U**ACCCAAGTGCGCAAACCCGGAATCG

En este ejemplo, se encuentra en color azul la modificación de la timina por uracilo de la zona USER y subrayada se muestra la secuencia complementaria a los plásmidos utilizados en este trabajo.

En la Tabla 9, se muestran los ARNg y las plantillas de reparación diseñadas para realizar las deleciones en la cepa *C. albicans* 12C.

Tabla 8. ARNg diseñados para cada gen diana.

Nombre de la secuencia	Secuencia (Forward/Reverse 5' → 3')
ARNg para <i>TRK1</i>	F: AAATTUCGGGTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
	R: AAATTUCACCAATATGCGCAAACCCGGAATCG
ARNg para <i>ACU1</i>	F: AAGAACAACUGCATCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
	R: AGTTGTTCTUCCAATGCGCAAACCCGGAATCG
ARNg para <i>HAK1</i>	F: ATTGGTCCUAGAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
	R: AGGACCAAUACCCAAGTGCAGCAAACCCGGAATCG

6.3.3 Preparación de los moldes de reparación

C. albicans utiliza principalmente la reparación dirigida por homología (HDR por sus siglas en inglés) (Vyas *et al.*, 2018) y mediante este mecanismo se pueden producir deleciones completas de un gen de interés para generar mutantes específicos. Para utilizar con éxito este mecanismo de reparación y lograr la edición del genoma, se debe introducir una plantilla de reparación de ADN. Este molde o plantilla de reparación (en inglés, Repair Template) debe contener una secuencia homóloga aguas arriba (upstream) y aguas abajo (downstream) del gen que se quiere deleccionar. La longitud elegida para el diseño de esta plantilla fue de 45 pb en ambas zonas (Figura 15).

A)

```

CTCACTCCCTACACGTACACTCCCTCACATAATATACACAGCTTATGGTGGAAATCATCTGCATCAATTA
GGAAATCACAGGATTCAGCTAATGATAATAATCAGAAATGATCAGACTGAATTCGGTACTTTACTGA
AGTTGATATTGATGAACACCAAGTAACAACACTTTTGATGAAGAAGAAGACGACGAAGAAGATATTTCT
TCTTCTGCAAACTCAGCCATTGAAGAAGAAAAGGTGTTCCAACAACAATCATGGAGGAAAGTTTTAA
TGCTTTGTTTTCTGTCATTTGGGTCAATTTATGGTGATCTTGGTACTTCCCCATATATGTTTCAATTC
AATCAAAATATTTCTTACCACCCCAATAAAGAAGACATTTATGGTGTCTCTATCATTTTCTACATA
TTTACCATTATGTTATATTCAAATATGTGCTAATGTTTTGTTTATCGGAGTTAATTTGTAATCATGGTG
GACAAAGTTGCCATATTTGCCAAGATTGCTCGACACTTGGGTATTTGGTCTAGAGGGGTAGCTTGGCAGG
GGCACCTGAAGCTTCTGATATGCAATTATTAACCAGACAAGACCCACTACATCTTCAATCAAATCTACT
CAAAACCGAGTTGAAAAATAAAGAAAACCCCATATTGCTTTCTTTTCTCAGTATTTTATATAGGGG
CTTTGTTCCCTTGGTAGTGCCTTGGTATGTCAGATGGATTATTGACTCCAACCACTTCTGTATTAAGTGC
AATTGGTGGGATTCAGTTGCTGTTCCCTCTTTTCTAATGTTTTGGCAGTTTCAAGAAGTATCCTTATT
GTTTTGTTTGGCCCAAGTTTGGTGCAGTAAACTTTCATTTACATTTGCCCAATATATATTTATTT
GGATGATTTGGTTGATTCTTTGTTGGGACTATAAATATTGCCAAATATAATCCTGGTATTTTTCAGCAT
GTCACCTATTATGCTATCAAGCTTTTGAATCTGGTCAATTGATGTTTTCTCGGGGGCAATGTTGTCC
ATCACCGGTACTGAGGCCCTCTCAGCGATGTTTCGGTAGTTGGTAGACTCCCCATACAAATGACTATTGG
GATTTTTTGTATCCAGCATTAAATGTTATGTTATCTGGACAAGGTGCATACTTACTGAGTACCCAGAGA
AGCATATTCAAATCCATTTTCCCTTCAATACCTGGTGGTCAAGGTATATATTTGGACCATGTTGTTTTG
GCTACTCTTGCCACAAATATTGCTTCAAGCATTGATATTGCTGGTTTTTCTATTTCTTCAAAATGA
TAAACTTGGATTGTTCCCTAAATGAAAATGTTTCTCTTCTCATCAAAGTGGCGAGGTTTACAT
TCCAGTAAATGAATGGTGTGTAATGATTTGGGTGATTTGCACACGGCTGGGTTCAAAAACAGTAATAAT
GTCACCCGACGTTACGGGTTAGGAATTTCAATGGATTTTCTTGTACTTCACTGTTGATAATAATTTGCT
TATCTATGCTACAAATGCAAAATATTTGGCCATTGTTATCTTATGATTTTCTGTTCCCTTGGAAAT
TTGATGGTGGTTGCTAAGTTGAGAAAAGTACCACATGGTGTGTTGGTCCCACTTTTATGGCAGGATA
TCTTCTCATTCTTGTCTTTGGCCTTGGGCCAGATCCAAAAGTCCGATCAAGAAATACGAACAAGAA
TTAAAATTTGGTATTTGTTCCCATCTTTGGCCGAAAGTCCATAACTGTTGATCTTAATCATAATGAGGT
TTCGCCAAATTTATTCATTTGCAAGAACAACAACAAGTCTGCCATATTTCAAGAAGATGTTGTCAAC
AAATTTGGTACCGTTCCATTTATCTAGACATCCCGGACTAGGATTCATGATGTCGATTCATATGACCA
ATTTGCCGAACACTTTGCCCTCAACTATATGGAAGTTGATTACTTCATTGTCATCTATACCTTCTGAATT
TGTGTTTGGGGATTCGAGTATTCTATCTATATGTAATCTGATGAAAGATATATTTGGCACA
ATGAAAATTTCTGGTCAATATAAATGTATTAAGATTGGATTATGAAAATGTTCAAATTTGATAAAG
AATTAAGTTCTAAAATAATGGCAAGAATTCCTGGATTAAGTGTTTAACTCCTGAACAATTACATAATCA
TCCAAATTTTTCGAAAATGATTTAATTAGATGTCATCAATATCATTTCTGGTAAAAGAAATAT
TCAAAAAATTTGGTCAATTTGATAAAGAAAACATATTAATCATATATATAGTCCCTTATATTTCTTGA
CTCAAGATAAAGGAGGTTTCTTTGGTATGATAATGAAAAGAGGAAAGTAAAAGAAATTTATTTGG
TGGTATTTCTAGAAATATAAAGTTGAAGAATTATAGAGTTTTTGCATATTTTATAGTGTATT
    
```

B)

```

CTCACTCCCTACACGTACACTCCCTCACATAATATACACAGCTTGAAGTTGAAGAATTATAGAGTTTTTGCATATTTTATAGTGTATT
    
```

Figura 15. Ejemplo de molde de reparación para la secuencia *HAK1* de *C. albicans* 12C. A) Secuencia completa de *HAK1* (gris) con 45 pb upstream (verde) y downstream (amarillo). B) Molde de reparación para hacer la delección del gen mediante HDR.

En la Tabla 9, se muestran los moldes de reparación diseñados para intentar realizar mediante HDR las delecciones en la cepa *C. albicans* 12C.

Tabla 9. Secuencias de los moldes de reparación.

Gen	Secuencia de la plantilla de reparación (5' → 3')
<i>TRK1</i>	ATAGGATATTTGGACAGGTGTACGAAAGATTATCATACCAAGCTTTTCATGGTACCAC TTTTACGTATATCAAATATAAATGCATTA
<i>ACU1</i>	TACTATTCTATTCAAGAAATCGACAAATAACATTTAATTGATCAACACATCATTGGTGG GGAAGAAGTTATAGTATATAGTTTTGAAGTTG
<i>HAK1</i>	CTCACTCCCTACACGTACACTCCCTCACATAATATACACAGCTTCAAGTTGAAGAATTAT AGAGTTTTTGCATATTTTATAGTGTATT

6.4 Incorporación de los ARNg al plásmido

Una vez terminado el diseño de los distintos ARNg y los moldes de reparación se procede a fusionar los ARNg con el plásmido con la secuencia de Cas9 (pDIV515). Para llevar a cabo esta fusión se utiliza el protocolo de PCR recogido en la Tabla 10 en dos reacciones separadas para cada gen y con dos cebadores específicos de nuestro plásmido.

Los cebadores específicos para este plásmido son:

PR_DIV1052_F: CGTGCGAUATCCCAAGCCACCATAATAAATATAC

PR_DIV1731_R: CACGCGAUAAATAACAGAGACGTACTAGGGAG

Las dos PCRs estarán compuestas, además de los reactivos, por:

PCR1: PR_DIV1052 + ARNg R

PCR2: ARNg_F + PR_DIV1731

Tabla 10. Reacción de PCR para fusión plásmido ARNg.

Material	Cantidad
Phire Reaction Buffer*	10 μ L
PfuX7 DNA polymerase*	1 μ L
dNTP (2 mM)	5 μ L
Cebador (10 μ M)	1 μ L
ARNg (μ g)	1 μ g
pDIV515	50 ng
H ₂ O mQ estéril	Hasta 50 μ L

*Phire reaction buffer (Thermo Scientific™) y PfuX7 DNA polymerase (Agilent Technologies, Inc)

Tras cargar todos los elementos de la PCR, los tubos se introdujeron en un termociclador MJMini Personal Thermal Cycler de Bio-Rad programado con los siguientes pasos:

Material y Métodos

- 2 minutos a 98°C para la desnaturalización completa del plásmido
 - 20 segundos a 98°C para la desnaturalización
 - 30 segundos a 59°C para la hibridación
 - 1 minuto a 72°C para la elongación
 - 5 minutos a 72°C
 - Mantenido a 12°C
- } 35 ciclos

Una vez obtenidos los productos de PCR se procedió a su análisis mediante electroforesis. Para ello, primero se añadió 1 µL de enzima de restricción DpnI (New England Biolabs) a los productos de PCR del paso anterior y se dejó actuar durante 1 hora a 37°C. Tras este tiempo, se mezcló la digestión completa con azul bromofenol en un ratio de 5:1 y se cargó en un gel de agarosa al 1% con tampón TAE.

El programa de electroforesis utilizado fue de 100V durante 20 minutos. Tras la electroforesis, el gel fue analizado en un Gel Doc™ XR y el software Image Lab (Bio Rad). Tras comprobar que las bandas eran nítidas y con el tamaño correspondiente, se procedió a su purificación. Para purificar a partir del gel de agarosa, el gel fue colocado en un UV Safe Imager™ (Invitrogen). Cada banda de gel correspondiente fue cortada y colocada en un tubo eppendorf de 1,5 ml estéril y tras esto, se utilizó el kit comercial CFX Healthcare. Una vez purificado se procedió a cuantificar la concentración de ADN en el Nanodrop.

6.5 Linealización del plásmido para USER Cloning

En este paso se procedió a linealizar el segundo plásmido para la técnica de USER cloning. Para ello se utilizó el plásmido pDIV489 y las enzimas AsiSI/Nb.BsmI conforme al protocolo de Geu-Flores *et al.*, 2007.

De acuerdo con el protocolo, el plásmido fue tratado en primer lugar con la enzima AsiSI (New England Biolabs, inc), el material utilizado para la reacción aparece reflejado en la Tabla 11. Esta reacción se dejó actuar durante toda la noche a una temperatura de 37°C.

Tabla 11. Reacción para la enzima AsiSI.

Material	Cantidad
CutSmart Buffer*	3 μ L
AsiSI (10,000 unidades/mL)*	1,5 μ L
pDIV489	3 μ g
H ₂ O mQ estéril	Hasta 30 μ L

* CutSmart Buffer y AsiSI (New England Biolabs, inc.)

Tras la incubación con AsiSI durante la noche, y para continuar con lo descrito en el protocolo se procedió a utilizar la enzima Nb.Bsml (New England Biolabs, inc). Para ello la reacción fue preparada conforme lo que aparece reflejado en la Tabla 12. Esta reacción fue incubada durante 2 h a 65°C.

Tabla 12. Reacción para la enzima Nb.Bsml.

Material	Cantidad
Nb.Bsml (10.000 unidades/mL)*	2 μ L
NEB3.1 Buffer*	10 μ L
H ₂ O mQ estéril	58 μ L

* Nb.Bsml y NEB3.1 Buffer (New England Biolabs, inc.).

Tras el periodo de incubación de 2 h, se añadió 1 μ L extra de Nb.Bsml y se incubó nuevamente durante 1 h a 65°C. Una vez terminados los tiempos de incubación se procedió a purificar con el kit comercial GFX de GE Healthcare y se eluyó el ADN en 50 μ L de H₂O mQ estéril.

6.6 Protocolo de fusión clonación USER

Para unir los dos plásmidos anteriores en uno solo y de forma rápida y funcional, se procedió a realizar el proceso denominado USER cloning, descrito por Geu-Flores *et al.*, 2007. Para ello, se preparó una reacción utilizando los reactivos que aparecen reflejados en la Tabla 13.

Tabla 13. User Cloning.

Material	Cantidad
Purificado PCR (con ARNg)	150 ng
USER vector	50 ng
10x Cutsmart Buffer*	1 μ L
USER Enzyme (1.000 unidades/mL)*	1 μ L
H ₂ O mQ estéril	Hasta 10 μ L

* CutSmart Buffer y USER Enzyme (New England Biolabs, inc.)

La reacción se incubó durante 45 min a 37°C. Tras esto, se volvió a incubar a temperatura ambiente por 25 minutos. Una vez finalizada ambos procesos de incubación se procedió a transformar en células de *E. coli* DH5 α competentes (ThermoFisher 18265017). El protocolo de transformación fue el siguiente:

1. Se añadió al reactivo obtenido anteriormente 100 μ L de células competentes. Se mezcló el ADN con las células de *E. coli* mediante inversión.
2. La mezcla se incubó en hielo por 5-15 min.
3. Tras ello, se procedió a un golpe térmico a 42°C durante 90 s.
4. Se volvió a incubar en hielo durante 5-15 min.
5. Por último, se sembró todo el volumen en placas de LB con ampicilina y se dejaron incubar durante un día a 37°C.

6.7 Verificación del nuevo plásmido obtenido

Se realizó la validación del nuevo plásmido mediante secuenciación Sanger (kit MIX2Seq). Para ello se utilizaron 15 μL del plásmido a una concentración de 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y 2 μL del cebador PR_DIV1052 o PR_DIV1731 (cuyas secuencias aparecen descritas anteriormente en el *Apartado 6.4 de Material y Métodos*).

6.8 Transformación de *C. albicans*

El protocolo de transformación realizado consistió en un protocolo de acetato de litio/PEG descrito en Gietz y Schiestl, 2007. Para llevarlo a cabo, el día anterior a la transformación se inoculó una colonia de levadura en 5 mL de YPD y se mantuvo en agitación durante toda la noche a una temperatura de 28°C y 150 rpm. A la mañana siguiente, se determinó la absorbancia del cultivo ($A_{600\text{nm}}$) y se procedió a inocular un matraz con 50 mL de YPD a $A_{600\text{nm}}$ de 0,5. El matraz con las células fue nuevamente incubado a 28°C y 150 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica de 1. Tras ello, se procedió a centrifugar y posteriormente lavar las células con H_2O mQ estéril a 3.000 rpm durante 5 minutos. Las células fueron resuspendidas en 1 mL de H_2O mQ estéril fría y se mantuvieron en hielo hasta su uso. Una vez obtenidas las células de levadura, se procedió a preparar la mezcla de transformación conforme a lo reflejado en la Tabla 14.

Tabla 14. Mezcla de transformación.

Material	Cantidad
Polietilenglicol 4.000	240 μL
Acetato de litio 1 M	36 μL
ssDNA (10 mg/mL)	10 μL
Plásmido	1 ng
H_2O mQ estéril	* μL

*La cantidad de H_2O mQ añadida dependerá de la cantidad de volumen de plásmido necesario para adicionar 1 ng. El volumen combinado entre plásmido y H_2O mQ debe ser de 74 μL .

Material y Métodos

Adicionalmente se prepararon controles de la transformación para cada gen diana. Estos controles fueron:

- Control negativo sin plásmido.
- Control con el plásmido base y resistencia al antibiótico (pDIV489).
- Control con plásmido y ARNg, pero sin molde de reparación.

Una vez preparadas las mezclas, se procedió a dar un choque térmico de 39°C durante 1 hora. (Nota: La razón de la temperatura de este choque térmico esta explicada en el *Apartado 1 del Capítulo 2 de Resultados*).

Una vez finalizado el choque térmico, se centrifugó la mezcla con las células a 13.000 rpm durante 30 s y se descartó el sobrenadante. Tras esto, las células se resuspendieron en 1 mL de YPD líquido y se mantuvieron en agitación durante al menos 3 h a 28°C y 150 rpm.

Tras las 3 h, se procedió a sembrar 200 µL del medio con las células de levadura en placas de YPD con nourseotricina y se dejó incubar durante 3-5 días a 28°C.

6.9 Comprobación de las mutaciones

Una vez obtenidas las colonias tras la transformación y para comprobar si las mutaciones se han realizado correctamente, se realizó una PCR de cada colonia. Para extraer el ADN de cada colonia, se tomó una muestra individual de cada una con la ayuda de un asa de siembra estéril y se procedió a resuspenderla en un tubo de PCR con 20 µL de una disolución 20 mM de NaOH estéril. El ADN de cada muestra fue extraído mediante el siguiente programa en el termociclador:

- 15 minutos a 100°C para la desnaturalización.
- Mantenido a 12°C.

Una vez obtenido el ADN de cada colonia, se agitó la muestra en un vortex y se centrifugo a 12.000 rpm durante 30 s para precipitar impurezas y restos celulares. Tras esto, se realizó una PCR de cada muestra con unos cebadores diseñados corriente arriba y corriente abajo del gen diana (Tabla 16). Los cebadores utilizados para la verificación

se muestran en la Tabla 15 y fueron diseñados con la herramienta Primer Design Blast del NCBI. Los reactivos utilizados durante la reacción de PCR aparecen reflejados en la Tabla 16.

Tabla 15. Cebadores de verificación.

Genes	Secuencias (5' → 3')
<i>TRK1</i>	F: GAAACGTGGGCCAATCTCAC
	R: ACCAATCAACAGCCAAGGGC
<i>ACU1</i>	F: ACGGCATTGGGTGAATCAGG
	R: TTTGTGCGTGTGTTTTCCGAG
<i>HAK1</i>	F: GGACAACGCCAATAACTTCTAGC
	R: AGCAACCGAGGAAGAAACAGT

Tabla 16. Reactivos para la verificación de mutantes por PCR.

Material	Volumen
Quick-Load Taq 2x *	7,5 µL
Cebador de verificación F (10 nM)	0,5 µL
Cebador de verificación R (10 nM)	0,5 µL
Muestra	8,5 µL
H ₂ O mQ estéril	3,5 µL

* Quick-Load Taq 2x 500 reacciones/50 µL, la composición de la máster mix se encuentra en la web del fabricante (New England Biolabs, inc.)

Tras cargar todos los elementos de la PCR, los tubos se introdujeron en un termociclador MJMini Personal Thermal Cycler de Bio-Rad programado con los siguientes pasos:

Material y Métodos

- 5 minutos a 94°C para la desnaturalización
 - 35 segundos a 94°C para la desnaturalización
 - 45 segundos a 51°C para la hibridación
 - 3 minuto y 30 segundos a 68°C para la extensión
 - 5 minutos a 68°C
 - Mantenido a 10°C
- } 35 ciclos

Una vez realizada la PCR, se cargó 6 μ L del producto de PCR en un gel de electroforesis al 1% de agarosa y tampón TAE con un marcador de 100 pb (New England Biolabs, inc). El programa de los gels fue 100V durante 20 min. Una vez terminada la electroforesis, se procedió a comprobar el tamaño de las bandas en un Gel DocTM XR y el software Image Lab.

7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los diferentes experimentos realizados en esta Tesis doctoral se encuentran recogidos en el *Anexo I: Datos suplementarios y estadística*.

Cuando fue necesario, los datos se sometieron a un análisis estadístico para determinar si existían diferencias significativas entre ellos mediante el software GraphPad Prism v7. Estas diferencias significancias se encuentran recogidas en el anexo y cuando el análisis lo permitía, dentro de las figuras. Para mostrar las diferencias se emplearon los siguientes símbolos: ***, ($p < 0,001$); **, ($p < 0,01$); *, ($p < 0,05$).

Resultados

1.1 Crecimiento en condiciones limitantes de potasio

Las cepas estudiadas en este capítulo se inocularon mediante diluciones seriadas en medio YNB-F sólido con distintas concentraciones de potasio y pH. Tras incubar durante 24 h se observó el crecimiento obtenido en las distintas condiciones. La Figura 17 muestra resultados representativos del crecimiento.

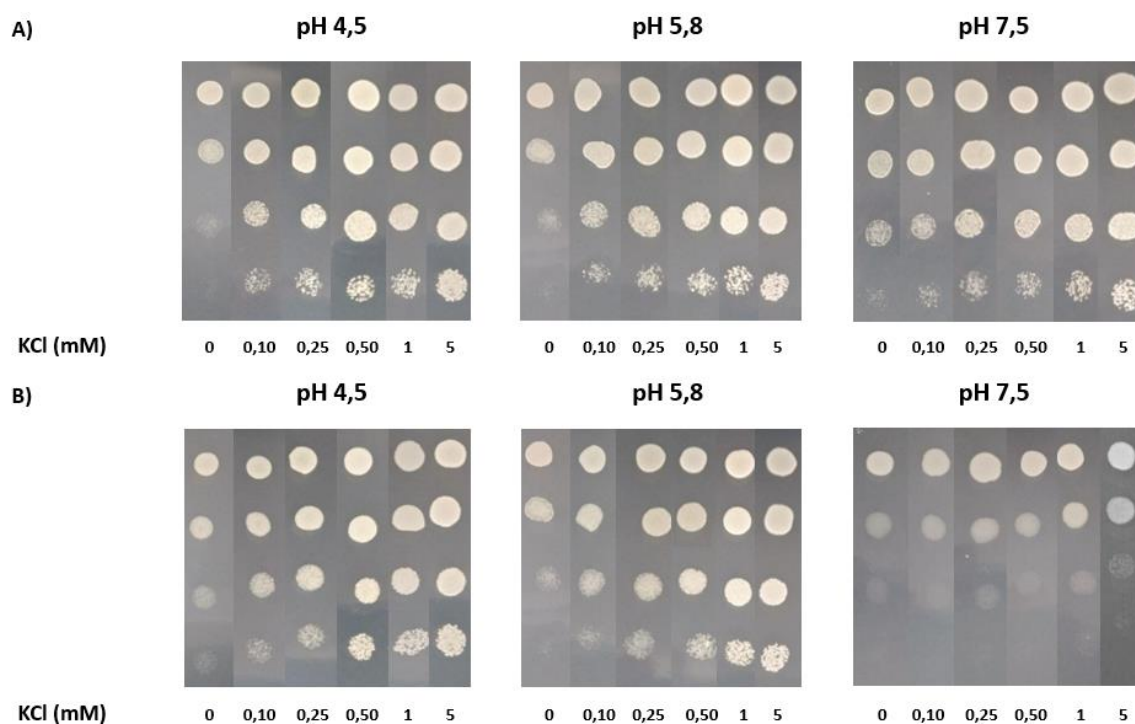


Figura 17. Requerimientos de potasio para el crecimiento de las cepas de *C. albicans* 12 C (A) y SC5314 (B) a diversos pHs. El ensayo se llevó a cabo mediante un test de goteo en el que se inocularon diluciones seriadas de orden 10 partiendo de una suspensión celular ($A_{600nm} = 1$). El medio utilizado fue YNB-F al que se añadieron distintas concentraciones de KCl y cuyo pH fue ajustado al requerido como se describe en el *Apartado 3.1 de Material y Métodos*. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 horas. Los experimentos se repitieron al menos tres veces y se muestran resultados representativos.

Los resultados obtenidos mostraron que ambas levaduras fueron capaces de crecer en concentraciones bajas de potasio. Así, no se observó una diferencia apreciable de crecimiento entre 0,10 y 5 mM de KCl, tanto a pH ligeramente ácido (pH 5,8) como a pH ácido (pH 4,5). Sin embargo, cuando el pH del medio fue básico (pH 7,5), el crecimiento de la cepa SC5314 se vio ligeramente afectado respecto al crecimiento observado en el resto de pHs a todas las concentraciones de potasio ensayadas, tal y como se puede

observar en las distintas diluciones seriadas. En contraposición a este resultado, la cepa 12C no se vio afectada por este aumento del pH en el medio (Figura 17).

Para profundizar en los resultados obtenidos con el medio sólido, se estudiaron las necesidades de potasio en medio YNB-F líquido. La Figura 18 muestra las constantes específicas de crecimiento (μ) calculadas a partir de los datos de absorbancia obtenidos durante el crecimiento.

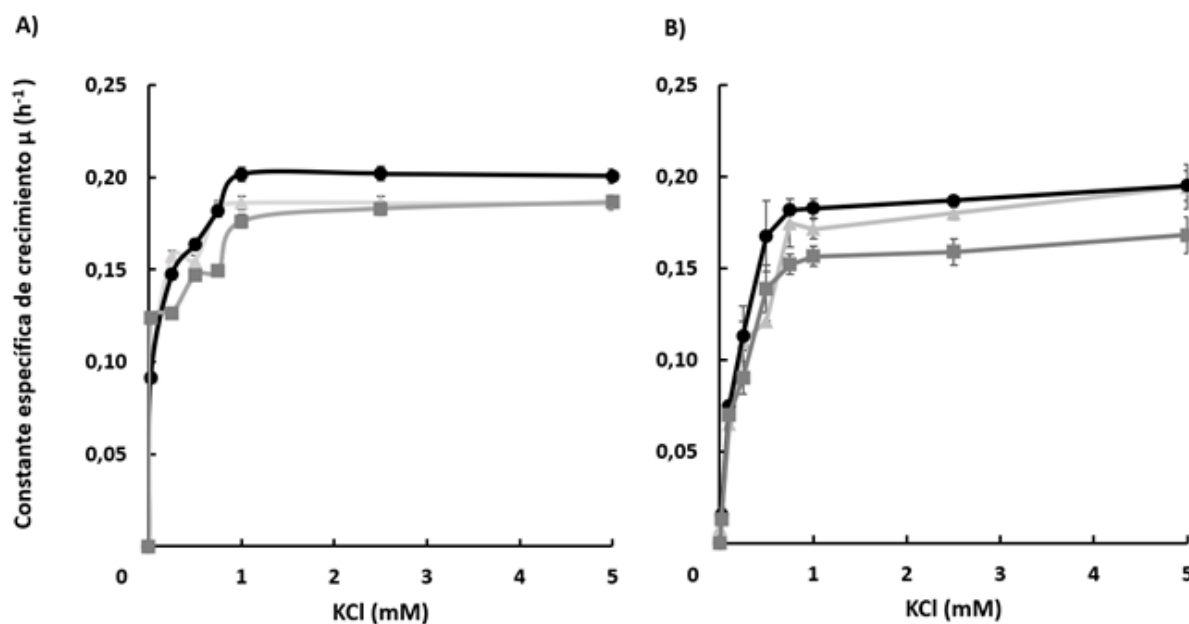


Figura 18. Efecto de la concentración de KCl y el pH sobre la constante específica de crecimiento de las cepas de *C. albicans* 12C (A) y SC5314 (B). Se representan las constantes específicas de crecimiento en diversas concentraciones de potasio y los diferentes pH de estudio 4,5 (\blacktriangle), pH 5,8 (\bullet) y pH 7,5 (\blacksquare). Previamente, se obtuvieron suspensiones celulares que se utilizaron para inocular tubos de 5 mL de YNB-F ($A_{600nm} = 0,05$) con diferentes concentraciones de KCl y pH como se describe en el *Apartado 3.2 de Material y Métodos*. Los tubos se mantuvieron en agitación a una temperatura de 28°C. La absorbancia se midió durante 48 horas. La media y desviación estándar fue estimada a partir de al menos tres réplicas biológicas.

De forma general, los resultados reflejados en la Figura 18 muestran que ambas cepas crecieron de manera muy similar a los distintos pHs aunque el crecimiento fue algo mejor en condiciones ligeramente ácidas (pH 5,8). Cabe destacar que, como se vio en el medio sólido, el crecimiento de la cepa SC5314 se ralentizó cuando el pH del medio fue básico (pH 7,5) respecto a los otros pHs ensayados.

1.2 Crecimiento en presencia de los cationes tóxicos sodio y litio

La toxicidad del sodio y litio en las levaduras se ha relacionado generalmente con su acumulación intracelular y, al mismo tiempo, con concentraciones más bajas de potasio interno en su presencia (Ariño *et al.*, 2010, Gómez *et al.*, 1996). Para observar el efecto que producen estos cationes tóxicos, se realizó un estudio en medio YNB sólido al que se le añadieron distintas concentraciones de NaCl o LiCl. Las cepas se inocularon mediante diluciones seriadas, y tras incubarlas durante 24 h, se observó el crecimiento obtenido. La Figura 19 muestra resultados representativos del crecimiento.

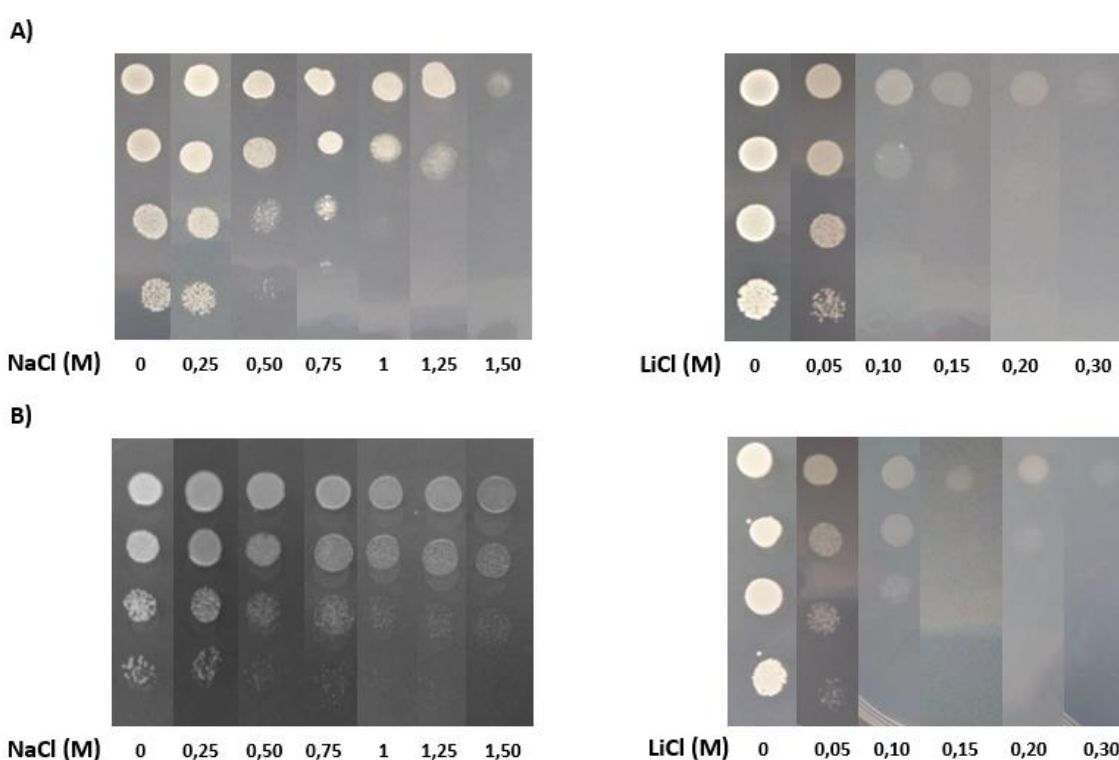


Figura 19. Tolerancia a sodio y litio en las cepas de *C. albicans* 12C (A) y SC5314 (B). El ensayo se llevó a cabo mediante un test de goteo en el que se inocularon diluciones seriadas de orden 10 partiendo de una suspensión celular ($A_{600nm} = 1$) obtenida de células previamente cultivadas. El medio utilizado fue YNB con distintas concentraciones de NaCl y LiCl como se describe en el apartado *Apartado 3.1 de Material y Métodos*. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 horas. Los experimentos se repitieron al menos tres veces y se muestran resultados representativos.

Se puede observar que el crecimiento ante el estrés salino producido por el sodio es cualitativamente similar en las dos cepas (Figura 19). En ambas el crecimiento disminuyó conforme aumentaba en el medio la concentración de NaCl.

Por otro lado, todas las concentraciones estudiadas de LiCl afectaron negativamente el crecimiento. Las dos levaduras fueron capaces de tolerar la concentración más baja de LiCl (0,05 M), pero se produjo una inhibición casi en la totalidad de su crecimiento cuando se incrementó la concentración de este catión tóxico (Figura 19).

Como se hizo anteriormente con el potasio y para profundizar en este estudio, se llevaron a cabo experimentos de crecimiento en medio YNB líquido con distintas concentraciones de NaCl o LiCl. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 20.

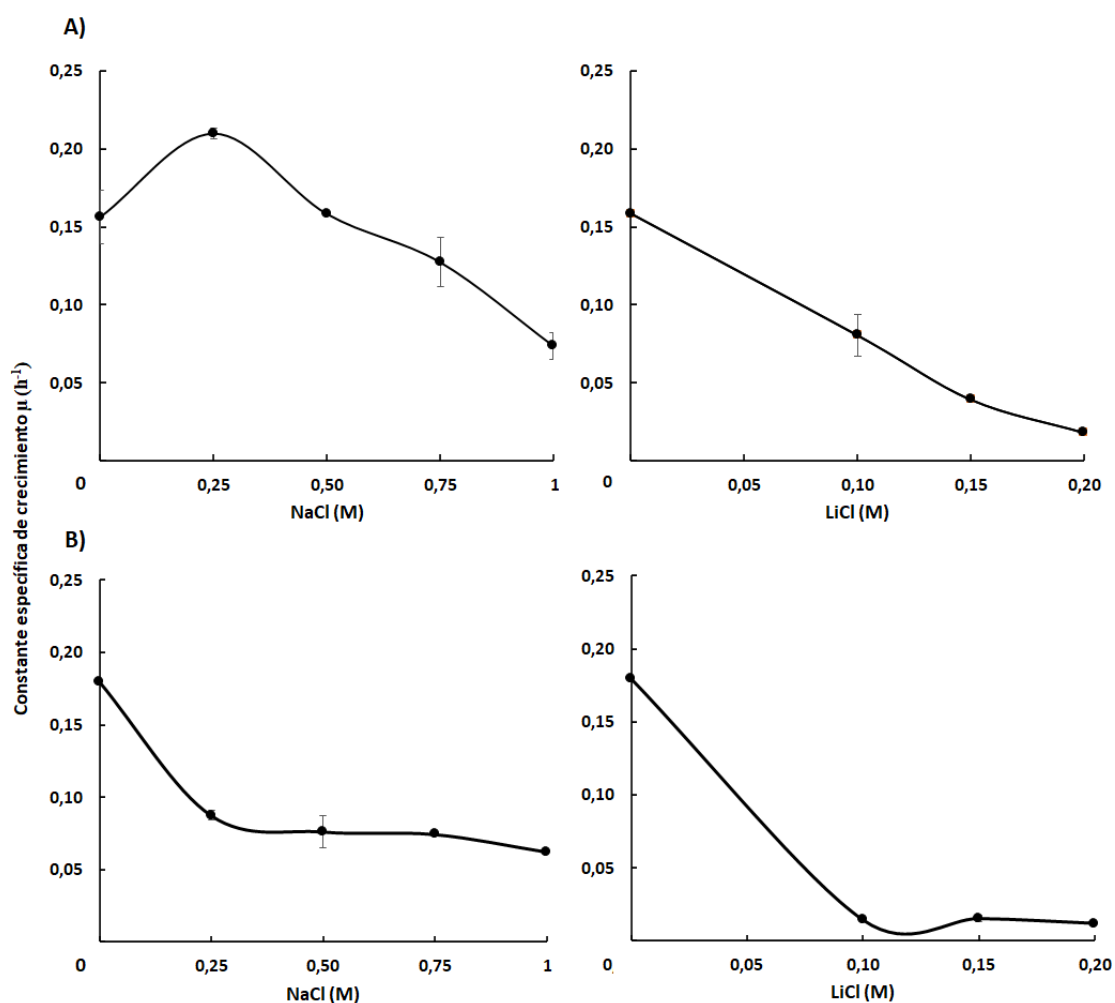


Figura 20. Efecto de la concentración de NaCl y LiCl sobre la constante específica de crecimiento de las cepas de *C. albicans* 12C (A) y SC5314 (B). Se representan las constantes específicas de crecimiento en presencia de los cationes tóxicos sodio y litio. Previamente, se obtuvieron suspensiones celulares que se utilizaron para inocular tubos de 5 mL de YNB ($A_{600nm} = 0,05$) con diferentes concentraciones de NaCl o LiCl como se describe en *Apartado 3.2 de Material y Métodos*. Los tubos se mantuvieron en agitación a una temperatura de 28°C. Los datos de crecimiento se midieron durante 48 horas. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres réplicas biológicas.

Resultados

De forma general, cuando se estudió el efecto que producía el catión tóxico sodio en estas cepas de *C. albicans*, se observó que el crecimiento fue mermado de manera significativa conforme se aumentaba la concentración de NaCl en el medio. Sin embargo, existió una diferencia cuantitativa destacable en el comportamiento ante este catión tóxico entre las 2 cepas. En las primeras concentraciones estudiadas de NaCl (0,25 y 0,50 M), el crecimiento de la cepa 12C apenas fue perjudicado mientras que en la cepa SC5314 se produjo una mayor inhibición, que se mantuvo en todas las concentraciones estudiadas (Figura 20).

Por otra parte, los resultados obtenidos cuando se estudió el efecto que producía el catión tóxico litio en estas cepas de *C. albicans* fueron similares a los observados en el medio sólido: cualquier concentración estudiada de LiCl produjo una fuerte disminución en el crecimiento.

1.3 Crecimiento en presencia de otras sustancias tóxicas

Adicionalmente a los estudios realizados anteriormente con los cationes tóxicos sodio y litio, se quiso estudiar el posible efecto tóxico que podrían tener otras sustancias en estas cepas de *C. albicans*. Para ello, se probaron distintas concentraciones de distintas sustancias tóxicas cuyo efecto es conocido en otros microorganismos. Las sustancias estudiadas fueron: la cafeína ya que afecta al ciclo de división y crecimiento celular (Lucy Hu et al. 2017), la azida sódica, el 2,4-dinitrofenol y la rotenona por el efecto que producen en distintos componentes de la cadena respiratoria de diversos microorganismos (Garret and Grisham: Biochemistry, 4th Edition). Sin embargo, los resultados obtenidos no mostraron diferencias apreciables o significativas en el crecimiento de *C. albicans* tras la exposición a ninguna de las sustancias estudiadas.

2. Contenido intracelular de potasio, sodio y litio

Una vez obtenidos los resultados de los ensayos de crecimiento en condiciones limitantes de potasio y de los ensayos de tolerancia a la presencia de los cationes tóxicos sodio y litio, se decidió analizar el contenido intracelular de estos cationes en estas dos cepas de *C. albicans*.

Para determinar el contenido interno de potasio en condiciones “normales” y conocer como influía el ayuno de potasio, se tomaron muestras de células crecidas en condiciones sin limitación de potasio y muestras de células tras ayunarlas durante tres horas. Los resultados obtenidos fueron similares en las dos cepas de *C. albicans*, con concentraciones internas de potasio cercanas a 400 nmoles mg^{-1} en el caso de las células normales en potasio (12C: 396 ± 20 nmoles mg^{-1} y SC5314: 407 ± 32 nmoles mg^{-1}), y una reducción de cerca de la mitad de la concentración cuando las células fueron recogidas tras el proceso de ayuno (12C: 211 ± 18 nmoles mg^{-1} y SC5314: 218 ± 16 nmoles mg^{-1}).

Una vez analizado el contenido intracelular de potasio, se procedió a comprobar si la concentración de este catión podría encontrarse afectado cuando las células creciesen en presencia de un catión tóxicos como el sodio o litio. Para averiguarlo, se tomaron muestras de células crecidas ($A_{600\text{nm}} \approx 0,6$) en YNB líquido con 0,2 M de NaCl ó 0,1 M de LiCl para posteriormente, medir el contenido interno de los cationes potasio, sodio o litio. La razón de utilizar una concentración más baja de LiCl que de NaCl en estos experimentos se debe a que a que el litio es más tóxico que el sodio (Ariño *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos aparecen resumidos en la Tabla 17.

Tabla 17. Contenido intracelular de sodio/litio y potasio en las cepas de *C. albicans* 12C y SC5314.

Cepa	Condiciones	Catión tóxico ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Potasio ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$)
12C	0,2 M NaCl	$151,76 \pm 31,75$	$348,89 \pm 24,37$
	0,1 M LiCl	$27,57 \pm 2,85$	$478,60 \pm 62,04$
SC5314	0,2 M NaCl	$139,82 \pm 21,42$	$341,71 \pm 29,86$
	0,1 M LiCl	$22,26 \pm 3,34$	$411,87 \pm 57,82$

El contenido interno de potasio en presencia de ambos cationes tóxicos fue parecido en las dos cepas estudiadas, manteniéndose en concentraciones similares a las que se obtuvieron cuando las células crecieron en condiciones normales sin presencia de NaCl o LiCl (Tabla 17). Además, al igual que ocurrió con el potasio, tampoco existieron diferencias significativas en la cantidad de sodio o litio que ambas cepas acumularon en

Resultados

el medio intracelular. El litio se acumuló en menor cantidad que el sodio, pero como se mencionó anteriormente, se debe a que el litio es mucho más tóxico que el sodio (Tabla 17).

3. Absorción del potasio extracelular

Los resultados expuestos anteriormente sugieren que *C. albicans* posee una gran capacidad para transportar potasio cuando este catión se encuentra a niveles bajos en el medio. Con el fin de obtener información más detallada al respecto se resuspendieron células ayunadas de potasio ($A_{600nm} \approx 0,5$) en distintos tampones con concentraciones de potasio en el rango μM y a varios pHs. Los resultados obtenidos de estos experimentos se ilustran en la Figura 21.

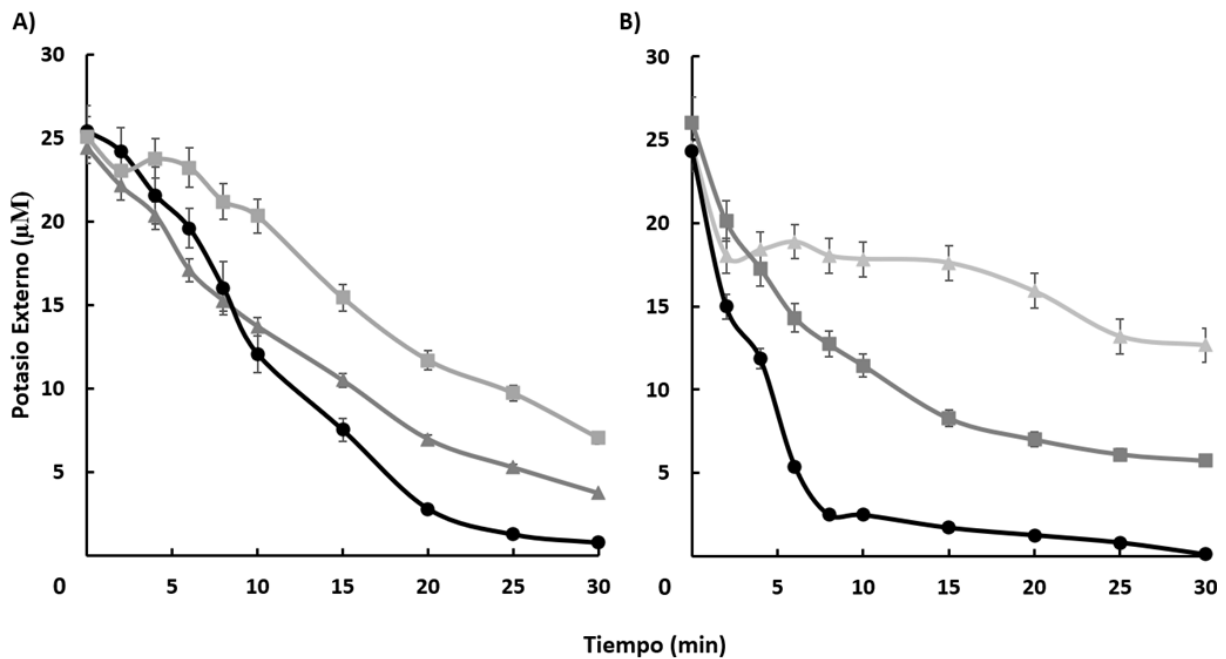


Figura 21. Absorción del potasio externo a diferentes pHs en las cepas de *C. albicans* 12C (A) y SC5314 (B). El ensayo fue realizado en células ayunadas de potasio que fueron resuspendidas ($A_{600nm} = 0,5$) en los tampones Tris a pH 4,5 (\blacktriangle), Mes a pH 5,8 (\bullet) y Hepes a pH 7,5 (\blacksquare) con $25 \mu\text{M}$ de KCl añadido. Se tomaron muestras del potasio del medio externo durante 30 minutos como está descrito en el *Apartado 4.2.2 de Material y Métodos*. La media y la desviación estándar se estimaron a partir de al menos tres réplicas biológicas.

Los resultados obtenidos en los experimentos de absorción de potasio muestran un patrón común: cuando el pH del medio fue ligeramente ácido (pH 5,8), ambas cepas absorbieron de forma extraordinaria el potasio externo, de manera que al final del

experimento quedaron cantidades residuales de este catión en el medio ($\geq 1 \mu\text{M}$). Por otra parte, cualquier modificación del pH afectó negativamente a la velocidad de absorción. Este efecto fue más acusado en la cepa SC5314 cuando el pH fue alterado a pH 4,5 (Figura 21).

4. Transporte de rubidio.

Para determinar los parámetros cinéticos del transporte de rubidio (análogo del K^+) se realizaron experimentos tanto en células normales en potasio como en células ayunadas de potasio. Los valores cinéticos del transporte se dedujeron a partir de las distintas velocidades de entrada del catión de las diferentes concentraciones de RbCl estudiadas (Ramos y Rodríguez-Navarro, 1986). Los parámetros estimados para el transporte de rubidio en estas cepas se resumen en la Tabla 18.

Tabla 18. Parámetros cinéticos del transporte de rubidio en *C. albicans* 12C y SC5314.

Cepa	Condiciones	$V_{\max 1}$ ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	Km_1 (mM)	$V_{\max 2}$ ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	Km_2 (mM)
12C	Células normales en K^+	2,89±0,59	4,87±0,62	-	-
	Células ayunadas de K^+	5,48±0,28	0,05±0,01	7,55±1,71	6,22±0,45
SC5314	Células normales en K^+	1,78±0,52	0,44±0,22	-	-
	Células ayunadas de K^+	11,16±1,44	0,04±0,01	-	-

En el caso de las células normales en potasio, ambas cepas obtuvieron como resultado de los experimentos bajos valores de velocidad y afinidad por el catión. Sin embargo, y aunque existieron diferencias en la afinidad por el rubidio, podemos observar que los valores obtenidos por ambas se encontraban en el rango mM (Tabla 18). Las diferencias más importantes entre cepas se encontraron en el caso de las células ayunadas donde, aunque ambas mostraron un incremento significativo en la velocidad y afinidad por el catión respecto a los valores obtenidos en las células normales en potasio, el cambio en

Resultados

la velocidad máxima fue más acusado en la cepa SC5314, mientras que el descenso en la Km fue mayor en la cepa 12C (Tabla 18).

Cabe destacar que, cuando se representaron los datos obtenidos de la cepa 12C se pudieron ajustar a una representación bifásica (Figura 22). De esta manera, se observó una primera fase con una alta afinidad ($K_m = 0,05$ mM) y una segunda fase con baja afinidad ($K_m = 6,22$ mM). La presencia de bifases en la cinética del transporte de sustratos no es algo inusual puesto que ya se han publicado en otras circunstancias fenómenos parecidos (Ramos y Rodríguez-Navarro, 1985; Ariño y Ramos, 2000; Breton y Surdin-Kerjan, 1977). Las posibles razones de este comportamiento se discuten más adelante en la discusión.

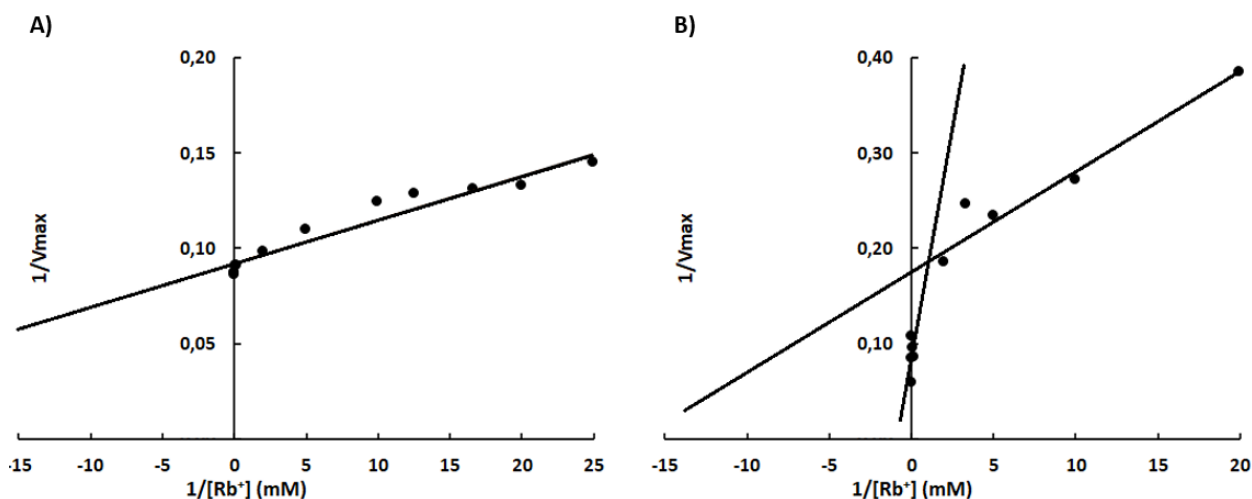


Figura 22. Diagramas de Lineweaver-Burk para el transporte de rubidio. Se muestra un ejemplo representativo de cada tipo. A) Diagrama monofásico (*C. albicans* SC5314). B) Diagrama bifásico (*C. albicans* 12C).

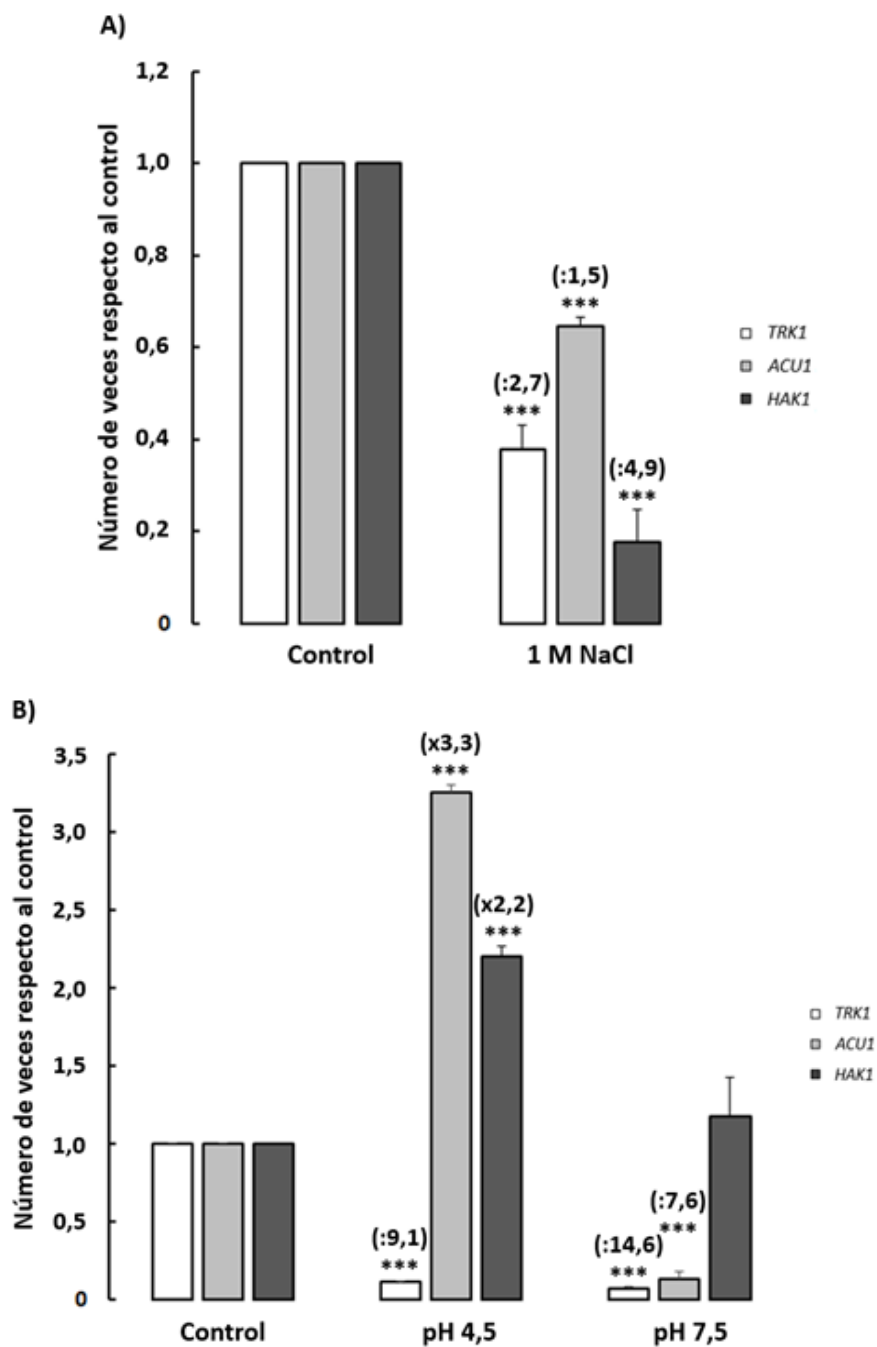
5. Expresión génica de los transportadores de potasio en *C. albicans*.

Como se ha mencionado a lo largo de esta tesis doctoral, *C. albicans* cuenta con tres transportadores de potasio en su membrana plasmática: Trk1, Acu1 y Hak1. Para comprobar si las condiciones estudiadas anteriormente podrían afectar a la expresión de los genes que codifican los transportadores de potasio, se analizaron los niveles de ARNm correspondientes a tres condiciones distintas: estrés salino producido por la presencia del catión sodio, modificación del pH del medio y ayuno de potasio. En todos los casos se realizaron 3 réplicas biológicas y los niveles de transcritos obtenidos se refirieron a los obtenidos en células sin tratar procesadas en paralelo. También se

utilizaron dos cepas “silvestres” de *C. albicans*, 12C que contiene los 3 genes funcionales correspondientes a los 3 transportadores, y SC5314, la cepa normalmente utilizada como “silvestre” en esta especie, que contiene una mutación ámbar en el gen *ACU1* (ver Introducción de este capítulo).

5.1 Análisis transcriptómico en *C. albicans* 12C

En la Figura 23, se resumen los resultados obtenidos en el análisis transcriptómico de la cepa 12C de *C. albicans*.



Resultados

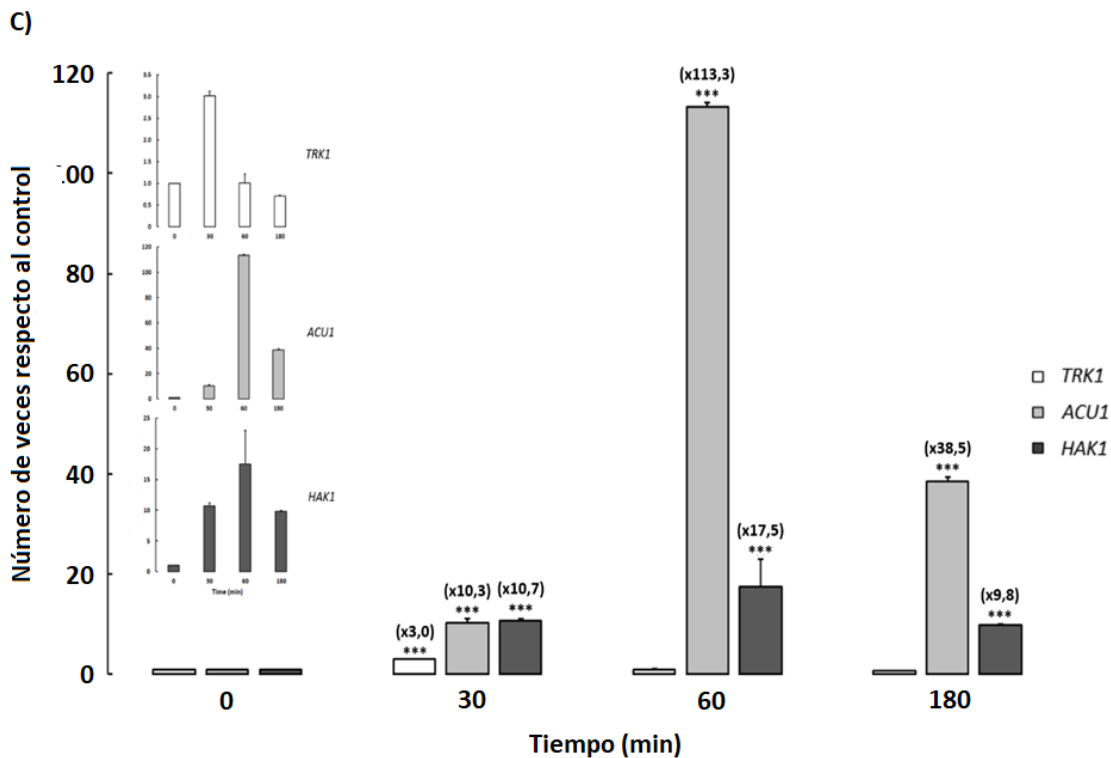


Figura 23. Cambios en los niveles de expresión de los genes que codifican los transportadores de potasio en *C. albicans* 12C. En todos los experimentos las células crecieron hasta obtener una A_{600nm} entre 0,6-0,7 en el medio correspondiente. (A) YNB (Control) y con 1 M NaCl (Estrés salino). (B) YNB a pH 5,8 (Control), pH 4,5 y pH 7,5. (C) Células crecidas en YNB con concentraciones normales en potasio fueron resuspendidas en medio YNB-F sin potasio añadido y se tomaron muestras a distintos tiempos del ayuno, el tiempo cero fue usado como referencia. La media y la desviación estándar fue estimada a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto a su control fueron representados como: ***, $p < 0,001$.

En presencia de estrés salino producido por sodio, la expresión de los tres genes que codifican los distintos transportadores de potasio en esta cepa de *C. albicans* disminuyeron respecto a los niveles obtenidos en células sin tratar, entre 1,5 veces para *ACU1* y 4,5 veces para *HAK1* (Figura 23A).

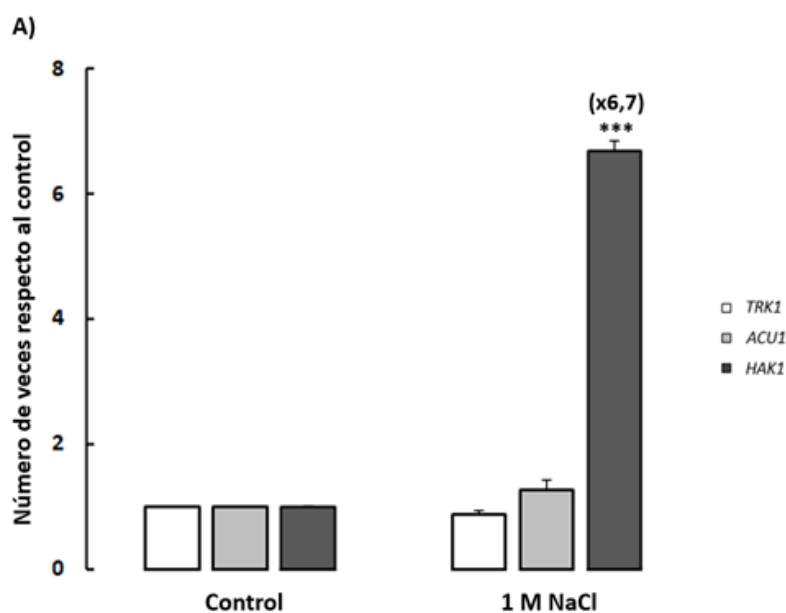
La respuesta a nivel transcripcional a las alteraciones del pH extracelular fue más heterogénea (Figura 23B). Los niveles de ARNm de *TRK1* disminuyeron cuando las condiciones de pH fueron alteradas tanto a pH 4,5 como a pH 7,5 en comparación con las condiciones estándar de crecimiento, bajando 9,1 y 14,6 veces respectivamente. La expresión del gen que codifica el transportador *Acu1* presentó una respuesta mixta a la modificación del pH del medio, viéndose incrementada en condiciones ácidas (3,3

veces), pero disminuyendo cuando las condiciones fueron alcalinas (7,6 veces). Por último, la expresión de *HAK1* sólo presentó cambios significativos cuando el pH fue alterado a condiciones más ácidas (pH 4,5) respecto a la condición control (pH 5,8), aumentando su expresión 2,2 veces.

Cuando las células de la cepa 12C fueron ayunadas de potasio, los niveles de expresión de los genes que codifican para los transportadores de este ion solo presentaron cambios significativos de incremento. Los niveles de ARNm de *TRK1* no sufrieron grandes alteraciones, aumentando ligeramente en los primeros 30 minutos para luego volver a niveles basales en los demás tiempos estudiados. Sin embargo, fue mucho más notable el incremento en los niveles de transcrito del gen *ACU1* en células ayunadas de potasio, donde se observó un aumento en la expresión de hasta 113 veces respecto al control tras la primera hora de ayuno. Finalmente, el gen *HAK1* presentó una respuesta intermedia, ya que aumentó de forma muy significativa en todos los tiempos del ayuno, alcanzando su punto máximo a la hora de haber comenzado el experimento para luego disminuir ligeramente a las tres horas (Figura 23C).

5.2 Análisis transcriptómico de *C. albicans* SC5413

En la Figura 24 se resumen los resultados obtenidos en el análisis transcriptómico de la cepa SC5314 de *C. albicans*.



Resultados

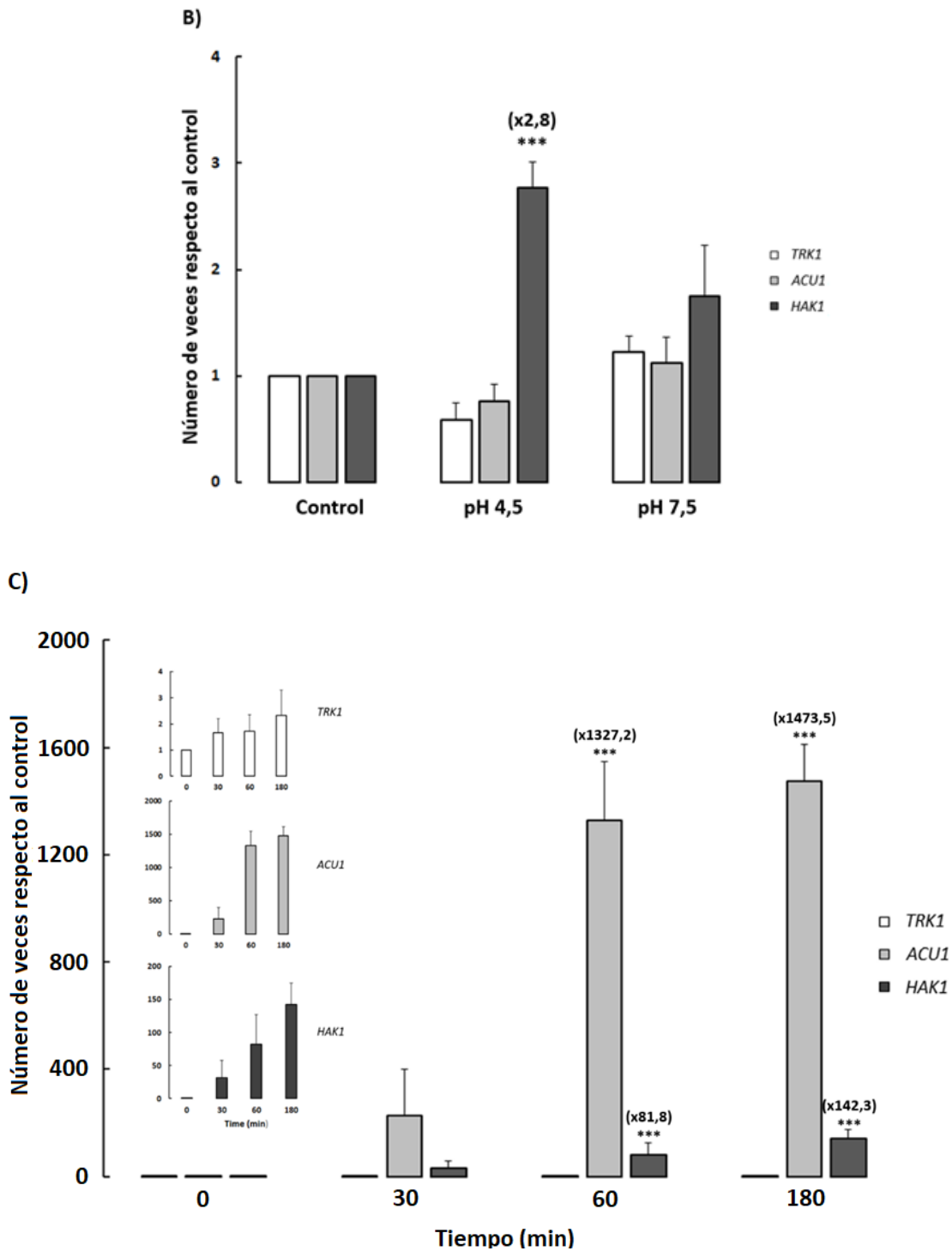


Figura 24. Cambios en los niveles de expresión de los genes que codifican los transportadores de potasio en *C. albicans* SC5314. En todos los experimentos las células crecieron hasta obtener una A_{600nm} entre 0,6-0,7 en el medio correspondiente. (A) YNB (Control) y con 1 M NaCl (Estrés salino). (B) YNB a pH 5,8 (Control), pH 4,5 y pH 7,5. (C) Células crecidas en YNB con concentraciones normales en potasio fueron resuspendidas en medio YNB-F sin potasio añadido y se tomaron muestras a distintos tiempos del ayuno. La media y la desviación estándar se estimaron a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto a su control fueron representados como: ***, $p < 0,001$.

En esta cepa, el estrés salino producido por el sodio no produjo cambios significativos en la expresión de *TRK1* y *ACU1* respecto a los niveles de expresión obtenidos en el control sin sodio. Sin embargo, la expresión de *HAK1* aumentó hasta 6,7 veces respecto al control (Figura 24A).

La alteración del pH externo no evidenció grandes cambios en los niveles de expresión de ninguno de los tres genes estudiados (Figura 24B).

De forma similar a lo obtenido en la cepa anterior, se observó que cuando las células fueron ayunadas de potasio los niveles de expresión de *ACU1* y *HAK1* aumentaron mientras que los niveles de *TRK1* no mostraron grandes cambios. Nuevamente, destaca el enorme aumento producido en la expresión de *ACU1*, donde se obtuvieron valores de 1473,5 veces respecto al control tras las tres horas de ayuno. Por último, el gen que codifica el transportador Hak1 también aumentó su expresión durante el ayuno, alcanzando un valor máximo de 142,3 veces respecto control a las tres horas del ayuno de potasio (Figura 24C).

Capítulo II: CRISPR/Cas9 Mutagénesis en *Candida albicans*

El género *Candida* abarca un grupo diverso de hongos ascomicetos que desde muchos años han captado la atención de la comunidad científica, tanto por su papel en la patogénesis como por sus aplicaciones emergentes en biotecnología. Sin embargo, a pesar de la relevancia de muchas especies de *Candida* en estos contextos, estos organismos siguen encontrándose poco estudiados en comparación con muchos otros géneros microbianos (Uthayakumar *et al.*, 2021).

En concreto, en la levadura patógena *C. albicans*, las razones detrás de este desconocimiento se deben principalmente a varias características únicas de este microorganismo que han obstaculizado el progreso en su comprensión genética, entre estas destacan: el carácter diploide de esta levadura, la pertenencia al clado CTG, por lo que esta levadura hace uso de un sistema de codificación de traducción único para el codón CUG que codifica serina en lugar de leucina (Ohama *et al.*, 1993) y la falta de plásmidos específicos para este microorganismo. Estas peculiaridades convierten a *C. albicans* en un microorganismo difícil de manipular genéticamente debido fundamentalmente a que las herramientas genéticas moleculares de otros organismos modelo como *S. cerevisiae*, no pueden ser empleadas fácilmente en este microorganismo.

Aun con todos estos problemas, los esfuerzos de los investigadores para desarrollar herramientas para manipular el genoma de *C. albicans* no han cesado por lo que, desde finales del siglo XX, se han ido desarrollando distintos métodos cada vez más eficaces y específicos para cumplir con este objetivo. No obstante, y a pesar de este desarrollo, las limitaciones de estas herramientas provocaban que la delección de múltiples genes o la creación de grandes bibliotecas de mutantes se convirtiese en una tarea abrumadora para los investigadores (Uthayakumar *et al.*, 2021).

Sin embargo, con el desarrollo de la revolucionaria herramienta CRISPR/Cas9 y los esfuerzos de investigadores para adaptar esta nueva tecnología en *C. albicans*, se ha logrado obtener una nueva forma de manipular el genoma de esta levadura más

Resultados

eficientemente, lo cual resulta esencial para comprender este microorganismo y para avanzar aún más en el descubrimiento de fármacos antifúngicos (Vyas *et al.*, 2015).

1. Pruebas preliminares

Tras probar distintas modificaciones en los protocolos de transformación y ambas formas del plásmido pDIV066, circular y linealizado con las secuencias teloméricas de *C. albicans*, se obtuvieron los resultados descritos a continuación en este apartado.

Con el objetivo de obtener un mayor número de colonias transformadas con el plásmido pDIV066 y en función a lo descrito en la bibliografía publicada, se estudiaron distintas temperaturas para el choque térmico que oscilaron entre los 39 a los 44°C. La Figura 25 recoge los resultados obtenidos de este estudio.

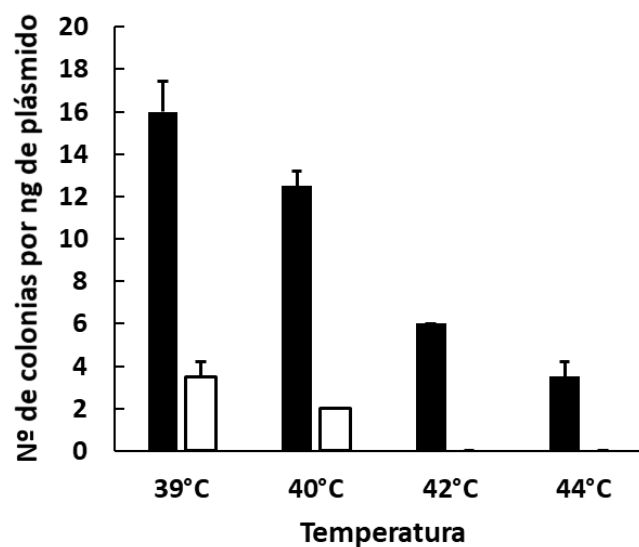


Figura 25. Eficiencia de la transformación de *C. albicans* 12C con diferentes choques térmicos. Se representan en negro las colonias obtenidas con el plásmido pDIV066 y en blanco las colonias obtenidas en el control negativo (transformadas sin el plásmido). La media y la desviación estándar se estimaron a partir de al menos tres experimentos independientes.

Como se pudo comprobar, la temperatura ideal para la transformación de esta cepa de *C. albicans* oscila entre los 39°C y 40°C ya que con estas temperaturas se obtuvo un mayor número de colonias por ng de plásmido utilizado en la transformación mientras

que, conforme la temperatura del choque térmico era aumentada, el número de colonias obtenidas disminuía muy significativamente.

Tras esto y para comprobar cuál de las dos formas del plásmido pDIV066 era más eficaz en la transformación de esta levadura, se procedió a realizar la transformación de la cepa 12C de *C. albicans* utilizando ambas formas: lineal con las secuencias teloméricas de *C. albicans* en los extremos y circular. Los resultados se encuentran resumidos en la Figura 26.

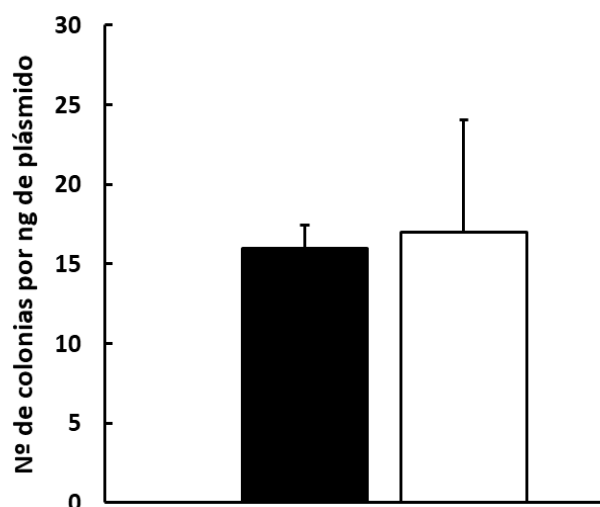


Figura 26. Eficiencia de la transformación de *C. albicans* 12C con las dos formas del plásmido pDIV066. Se representan en negro las colonias obtenidas con el plásmido circular y en blanco las colonias obtenidas con el plásmido lineal y las secuencias teloméricas de *C. albicans*. La media y la desviación estándar se estimaron a partir de al menos tres experimentos independientes.

Tras los distintos experimentos, se comprobó que no existía una diferencia significativa en utilizar uno u otra forma del plásmido. Cabe destacar que, utilizando el plásmido en su forma lineal con las secuencias teloméricas la desviación entre réplicas fue bastante mayor que cuando se utilizó el plásmido pDIV066 circular.

Una vez conocida la temperatura ideal del choque térmico con la que realizar la transformación y tras comprobar que la eficiencia de ambas formas del plásmido era similar, se procedió a comprobar la eficiencia con la cual nuestra cepa de *C. albicans* expulsaba el plásmido y recuperaba el fenotipo sensible al antibiótico. Para esto, las colonias resultantes de la transformación que presentaron un fenotipo resistente al antibiótico fueron cultivadas en medio YPD líquido durante la noche y sembradas

Resultados

nuevamente en medio YPD sólido. Este proceso se repitió tres veces, tras el cual las cepas transformadas fueron nuevamente inoculadas en medio con la presión del antibiótico. Los resultados obtenidos tras este proceso aparecen reflejados en la Figura 27.

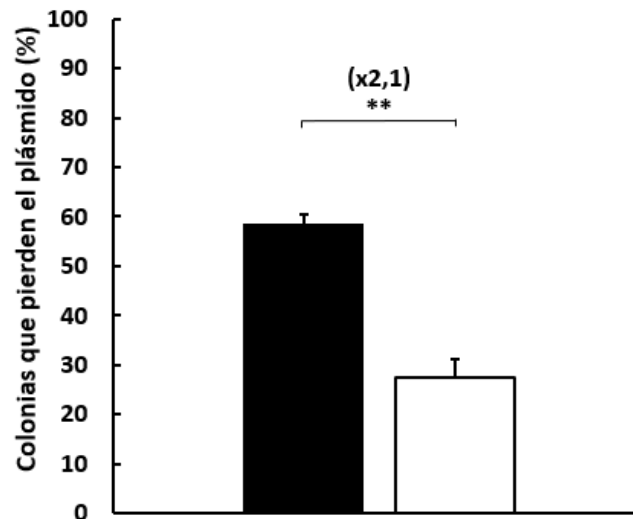


Figura 27. Porcentaje de colonias que pierden del plásmido y recuperan el fenotipo sensible al antibiótico. Las colonias fueron cultivadas tres veces en medio YPD líquido y sólido, tras ello se comprobó si mantuvieron la capacidad de crecer en presencia del antibiótico. En la figura se representa las colonias que recuperaron la sensibilidad al antibiotico tras la transformación con el plásmido circular (negro) y con el plásmido lineal con las regiones teloméricas de *C. albicans* (blanco). La media y la desviación estándar se estimaron a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto a su control fueron representados como: **, $p < 0,01$.

Los resultados muestran que las colonias que habían sido transformadas con el plásmido pDIV066 en forma circular mostraban un porcentaje mayor de recuperación del fenotipo (recuperando la sensibilidad al antibiotico) que las que fueron obtenidas tras la transformación con el plásmido en su forma lineal con la secuencia telomérica.

2. Obtención de mutantes mediante CRISPR/Cas9

Una vez obtenidos los resultados de las pruebas preliminares con el plásmido pDIV066 se procedió a preparar los distintos componentes del sistema CRISPR/Cas9 para realizar las distintas mutaciones en los transportadores de potasio de la membrana plasmática de *C. albicans*.

2.1 Incorporación de ARNg y fusión de plásmidos

Para la obtención de los mutantes mediante CRISPR/Cas9 se necesita integrar los distintos ARNg al plásmido pDIV515 para crear una batería de plásmidos específicos para nuestros genes de interés. Para ello, se llevó a cabo la incorporación del ARNg al plásmido mediante PCR y posterior purificación de las bandas de electroforesis que correspondían a los ARNg (Figura 28).

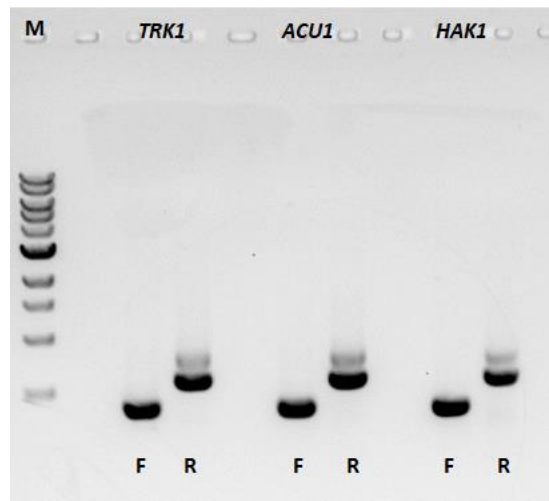


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa con los distintos ARNg tras su incorporación al plásmido pDIV515. Se muestran en orden de izquierda a derecha: el marcador (1kb New England Biolab, inc), los ARNg forward (F) y reverse (R): *TRK1*, *ACU1* y *HAK1*. La banda de mayor tamaño es un producto inespecífico de PCR que fue desechado.

Una vez incorporados los ARNg al plásmido pDIV515 se fusionó cada uno de estos con el plásmido linealizado pDIV489 como esta descrito anteriormente en el *Apartado 6.5 de Material y Métodos*, obteniéndose de esta forma un plásmido distinto para cada gen de interés.

2.2 Colonias obtenidas tras la transformación

Tras la integración de los distintos ARNg en el plásmido con el sistema Cas9, se procedió a realizar la transformación de la cepa 12C de *C. albicans*. Los resultados obtenidos de las distintas transformaciones, así como de sus controles, se encuentran reflejados en la Figura 29.

Resultados

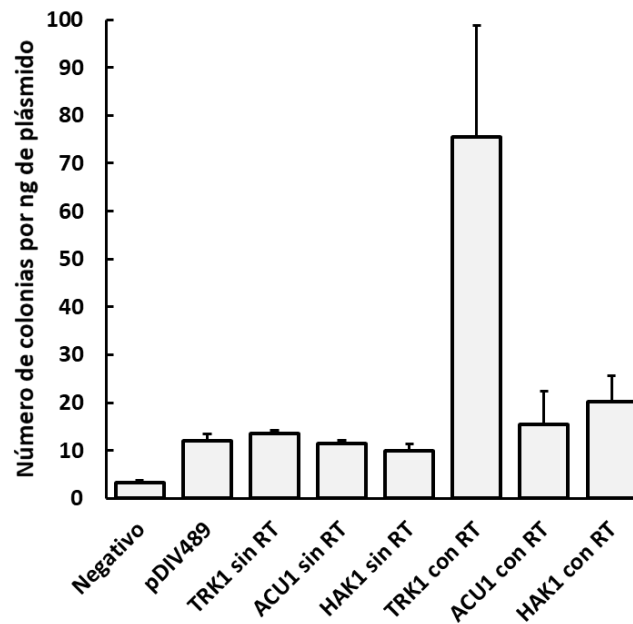


Figura 29. Eficiencia de la transformación. Se muestran los resultados obtenidos tras la transformación sin plásmido ni molde de reparación (negativo), los controles utilizando el plásmido sin ARNg (pDIV489), los controles utilizando el plásmido con los distintos ARNg incorporados, pero sin el molde de reparación (sin RT, por sus siglas en inglés) y las colonias obtenidas utilizando el plásmido con los ARNg y el molde de reparación (con RT, por sus siglas en inglés).

Como se puede observar en la Figura 30, el número de colonias obtenidas al usar el plásmido con la resistencia al antibiótico con y sin adicionar el molde de reparación (RT) fue mayor que el obtenido en los controles negativos sin utilizar el plásmido. Por otra parte, cuando se utilizó el molde de reparación durante la transformación, el número de colonias obtenido aumentó respecto a cuando no fue utilizado. De estos resultados, destacó el gran número de colonias obtenidas cuando se usó el molde de reparación junto al plásmido con Cas9 y el ARNg de *TRK1*.

2.3 Verificación de mutantes

Para comprobar si las colonias resultantes de estos experimentos habían sido resultado de una delección completa de alguno de los genes de interés, se procedió a realizar una PCR para verificar el tamaño de las bandas utilizando los cebadores de verificación descritos en el *Apartado 6.9*. Si el gen había sido deleccionado, las bandas debían tener un tamaño inferior a 600 pb. Los resultados aparecen reflejados en la Figura 31.

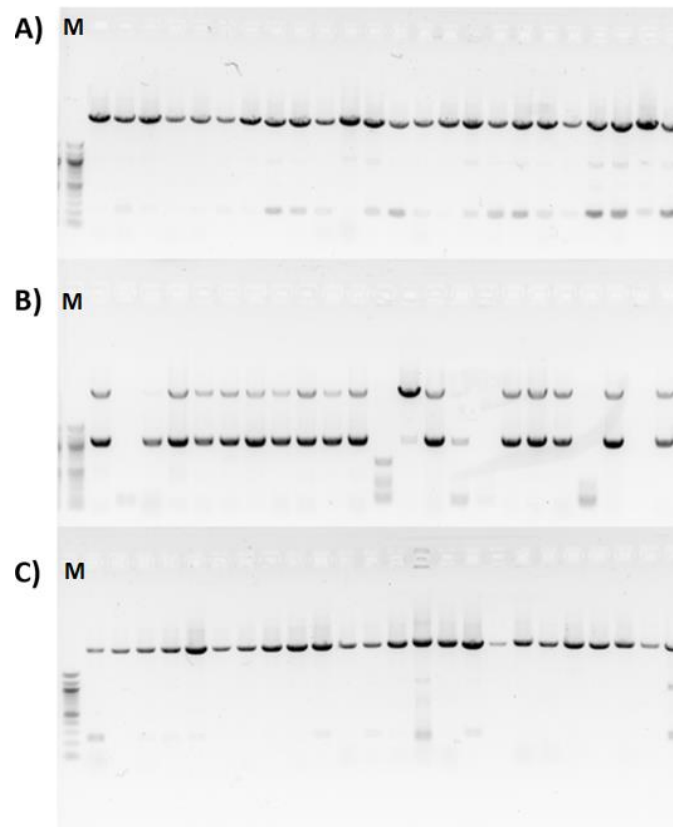


Figura 30. Ejemplos de geles de electroforesis para la verificación de posibles mutantes de *C. albicans* 12C en los genes de interés. A) Electroforesis de verificación para posibles mutantes del gen *TRK1*. B) Electroforesis de verificación para posibles mutantes del gen *ACU1*. C) Electroforesis de verificación para posibles mutantes del gen *HAK1*. El marcador de 100 pb (New England Biolab, inc) fue cargado en el primer pocillo de la izquierda. Como control se amplificó ADN de la cepa silvestre sin transformar en el último pocillo del gel. El resto de los pocillos fueron cargados con ADN obtenido y amplificado de los posibles mutantes para el gen de interés. Se muestra un resultado representativo de todas las electroforesis realizadas.

Tras realizar las distintas electroforesis se observó que, de las posibles colonias que se obtuvieron tras la transformación utilizando el plásmido con el sistema completo CRISPR/Cas9 y los moldes de reparación, todas ellas dieron como resultado bandas de electroforesis de más de 1000 pb. La doble banda obtenida en la electroforesis de *ACU1* fue debido a un segundo producto inespecífico en la amplificación. Estos resultados desafortunadamente descartan que se hayan obtenido los mutantes en los distintos genes de los transportadores de potasio.

Capítulo III: Rol del transportador Hak1 en la homeostasis de potasio de *Candida albicans*.

Hak1 es un transportador de potasio perteneciente a la familia KT/HAK/KUP que ha sido descrito como un homólogo del sistema *KUP* de *E. coli* donde actúa como un simportador $K^{+}::H^{+}$ (Zakharyan y Trchounian, 2001). En levaduras fue identificado por primera vez en *Schwanniomyces occidentalis* (Bañuelos *et al.*, 1995) donde se clonó y describió que este transportador confería la capacidad de transportar potasio con una alta afinidad. Años más tarde, Hak1 fue identificado en otras levaduras no convencionales como *Pichia sorbitophila* (Benito *et al.*, 2004), *Debaryomyces hansenii* (Martínez *et al.*, 2011), *Hansenula polymorpha* (Cabrera *et al.*, 2012) y *C. albicans* (Elicharová *et al.*, 2016). Sin embargo, en esta última levadura la homeostasis de potasio no había sido descrita en detalle, por lo que se desconocía el aporte que este transportador podía tener en la homeostasis de potasio de *C. albicans*.

La falta de información sobre *C. albicans* se deben principalmente a varias características únicas de este microorganismo que han obstaculizado los enfoques genéticos para estudiar este microorganismo: el carácter diploide, la pertenencia al clado CTG, por lo que esta levadura codifica serina en lugar de leucina (Ohama *et al.*, 1993) y la falta de plásmidos específicos para este microorganismo, convierten a *C. albicans* en un microorganismo difícil de manipular genéticamente. Debido a estas características, la obtención de mutantes en este microorganismo ha sido metodológicamente muy difícil y, por tanto, la realización de estudios genéticos ha estado muy limitada. Sin embargo, los esfuerzos de los investigadores por obtener mutantes en *C. albicans* no han cesado, y en un artículo publicado en 2010 (Noble *et al.*, 2010), se logró obtener una gran biblioteca de mutantes a partir de la cepa parental SN152, una cepa derivada de la cepa SC5314. Los autores de este artículo lograron obtener más de 3000 deleciones homocigotas que afectaban a 674 genes distintos mediante la construcción de mutantes “knockouts” con un 64% de tasa de éxito. Además de esto, los autores también realizaron un riguroso control de calidad para verificar la eliminación de ambos alelos, así como la ausencia de una tercera copia del gen diana en el genoma. Una de las deleciones llevadas a cabo con éxito en este artículo afectó al orf 19.6249 que codifica

Resultados

el transportador Hak1 en *C. albicans*. Aunque actualmente no existen muchos mutantes de *C. albicans* en variedades diploides, con el progreso conseguido gracias a las nuevas herramientas *CRISPR/Cas9* se prevé un avance esencial en la obtención de nuevos mutantes de este microorganismo.

Gracias a la ayuda del Dr. Jesús Pla, de la Universidad Complutense de Madrid, nuestro grupo logró conseguir tanto la cepa mutante carente del transportador Hak1 (*hak1-*) como la cepa isogénica con el transportador intacto (*HAK1+*), obtenidas por el grupo de Noble en su artículo de 2010. La obtención de estos mutantes nos permitió estudiar el aporte de este transportador en la homeostasis de potasio en *C. albicans*.

1. Análisis fenotípico en medio sólido y líquido.

Para conocer el comportamiento de estas dos cepas de *C. albicans*, se realizaron distintos experimentos en medio sólido y líquido con distintas concentraciones de potasio o en presencia de los cationes tóxicos sodio y litio. Adicionalmente a estos experimentos, también se estudió el posible efecto que podrían producir en estas cepas de levadura distintas sustancias tóxicas de interés.

1.1 Crecimiento en condiciones limitantes de potasio

Las cepas de *C. albicans* se inocularon mediante diluciones seriadas en medio YNB-F sólido con distintas concentraciones de potasio y a distintos pHs. Tras incubar durante 24 h se observó el crecimiento obtenido en las distintas condiciones. Resultados representativos del crecimiento se muestran en la Figura 31.

Ambas cepas crecieron a concentraciones bajas de potasio (0,10 mM) y superiores en todos los pHs estudiados sin grandes diferencias. Sin embargo, conforme se disminuyó la concentración de KCl (<0,10 mM) y el pH del medio, se observó la existencia de una disminución en el crecimiento en la cepa mutante *hak1-* que no fue observado en el pH básico (7,5) (Figura 31D).

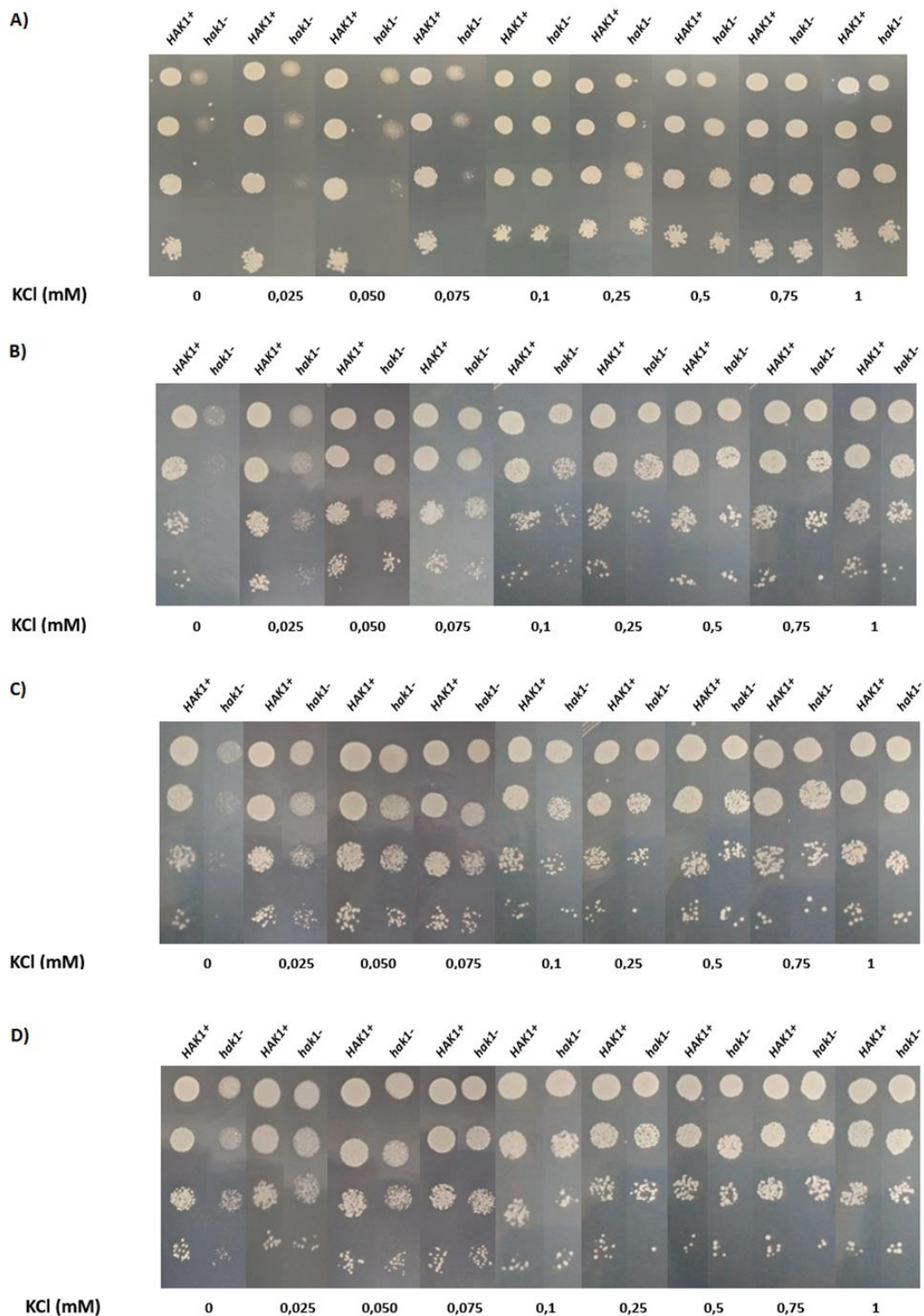


Figura 31. Requerimientos de potasio para el crecimiento de las cepas de *C. albicans* HAK1+ y *hak1-* a diversos pHs. El ensayo se llevó a cabo mediante un test de goteo en el que se inocularon diluciones seriadas de orden 10 partiendo de una suspensión celular ($A_{600nm} = 1$). El medio utilizado fue YNB-F al que se añadieron concentraciones de KCl y cuyo pH fue ajustado a pH 3,0 (A), pH 4,5 (B), pH 5,8 (C) y pH 7,5 (D) como se describe en el *Apartado 3.1 de Material y Métodos*. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 horas. Los experimentos se repitieron al menos tres veces y se muestran resultados representativos.

Resultados

Para profundizar en los resultados obtenidos con el medio sólido, se estudiaron las necesidades de potasio en medio YNB-F líquido. La Figura 32 muestra las constantes específicas de crecimiento (μ) calculadas a partir de los datos de absorbancia obtenidos durante el crecimiento.

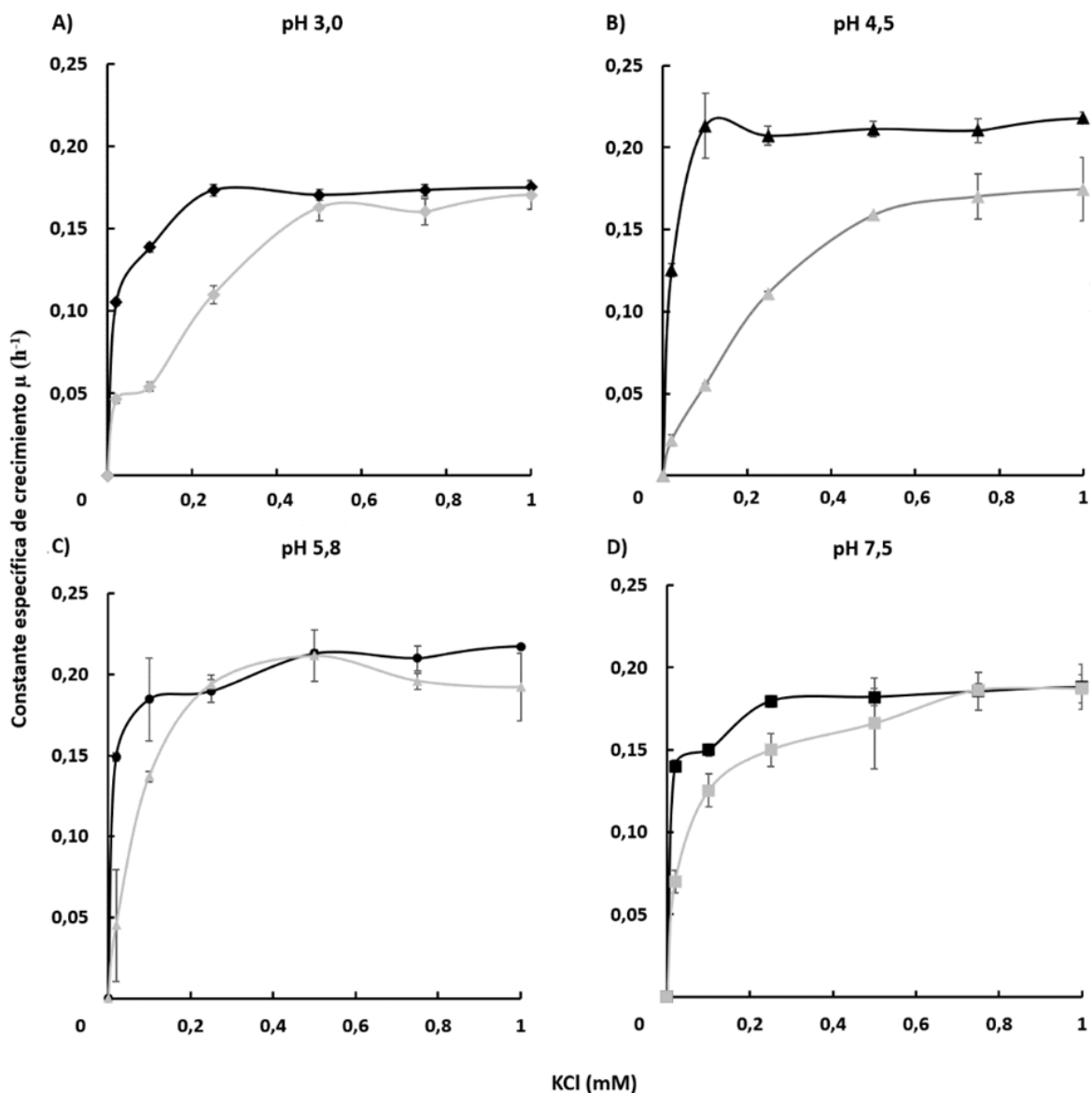


Figura 32. Efecto de la concentración de KCl y pH sobre la constante específica de crecimiento de las cepas de *C. albicans* SN250 *HAK1+* y *hak1-*. Se representan las constantes específicas de crecimiento de la cepa *HAK1+* (negro) y la cepa *hak1-* (gris) en diversas concentraciones de potasio y los diferentes pH de estudio: 3,0 (\blacklozenge), 4,5 (\blacktriangle), pH 5,8 (\bullet) y pH 7,5 (\blacksquare). Previamente, se obtuvieron suspensiones celulares que se utilizaron para inocular tubos de 5 mL de YNB-F ($A_{600\text{nm}} = 0,05$) con diferentes concentraciones de KCl y el pH ajustado al requerido como se describe en el *Apartado 3.2 de Material y Métodos*. Los tubos se mantuvieron en agitación a una temperatura de 28°C. La absorbancia se midió durante 48 horas. La media y desviación estándar fue estimada a partir de al menos tres réplicas biológicas.

De forma similar a lo obtenido en el medio sólido, los resultados del medio líquido reflejaron nuevamente la existencia de un defecto en el crecimiento de la cepa mutante *hak1-* en condiciones limitantes de potasio. Este retardo en el crecimiento fue más evidente en los pH ácidos (3,0 y 4,5) (Figura 32A y 32B) mientras que las diferencias en el crecimiento fueron menores a pHs superiores (5,8 y 7,5) (Figura 32C y 32D).

1.2 Crecimiento en presencia de los cationes tóxicos sodio y litio

Para observar el posible papel que el transportador Hak1 podría tener sobre la tolerancia o sensibilidad a sodio y litio, se realizó un estudio en medio YNB sólido al que se le añadieron distintas concentraciones de NaCl o LiCl. Las cepas se inocularon mediante diluciones seriadas de orden 10, y tras incubarlas durante 24 h, se observó el crecimiento obtenido. La Figura 33 muestra resultados representativos del crecimiento.

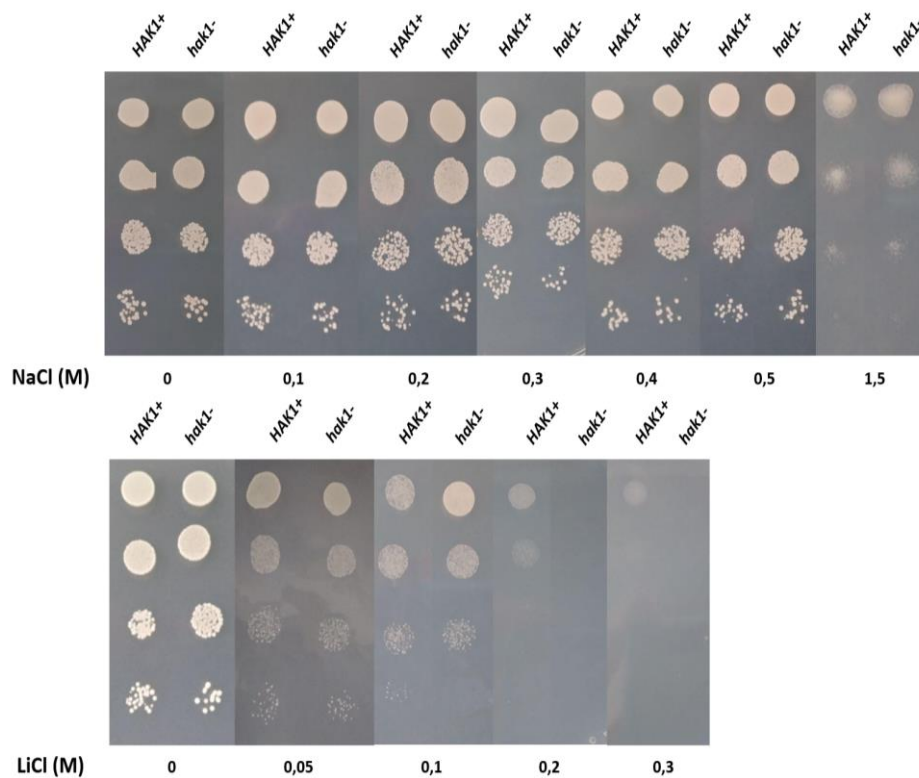


Figura 33. Tolerancia a sodio y litio en las cepas de *C. albicans* SN250 *HAK1+* y *hak1-*. El ensayo se llevó a cabo mediante un test de goteo en el que se inocularon diluciones seriadas de orden 10 partiendo de una suspensión celular ($A_{600nm} = 1$) obtenida de células previamente cultivadas. El medio utilizado fue YNB con distintas concentraciones de NaCl (A) y LiCl (B) como se describe en el Apartado 3.1 de Material y Métodos. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 horas. Los experimentos se repitieron al menos tres veces y se muestran resultados representativos.

Resultados

Cuando se estudió el efecto del catión sodio sobre el crecimiento, se observó que no existieron grandes diferencias entre las dos cepas. Tanto la cepa *HAK1+* como la cepa *hak1-* mostraron una disminución similar en el crecimiento conforme aumentaba en el medio la concentración de NaCl (Figura 33A). Por otro lado, cuando se estudió el efecto que tuvo el LiCl en el crecimiento, al igual que ocurría con las cepas de *C. albicans* del capítulo I, se observó que la presencia de cualquier cantidad estudiada de este catión afectaba negativamente al crecimiento. Como se observa en la (Figura 33B), aunque las dos levaduras fueron capaces de tolerar concentraciones bajas de LiCl (0,05 y 0,10 M), concentraciones superiores afectaron al crecimiento. Sin embargo, cabe señalar que en la concentración de 0,20 M de LiCl la cepa *HAK1+* logra crecer en la primera dilución seriada mientras que el crecimiento de la cepa mutante *hak1-* se encontraba completamente inhibido.

Para profundizar en este estudio, se llevaron a cabo experimentos de crecimiento en medio YNB líquido con distintas concentraciones de NaCl o LiCl. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 34.

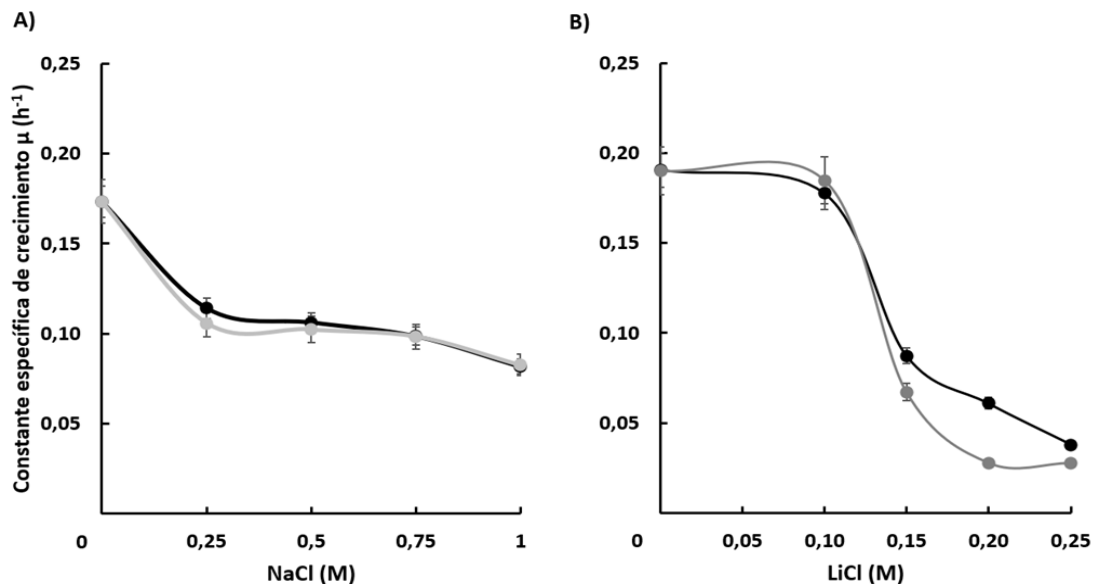


Figura 34. Efecto de la concentración de NaCl y LiCl sobre la constante específica de crecimiento de las cepas de *C. albicans* SN250 *HAK1+* y *hak1-*. Se representan las constantes específicas de crecimiento de la cepa *HAK1+* (negro) y la cepa *hak1-* (gris) en presencia de los cationes tóxicos sodio y litio. Previamente, se obtuvieron suspensiones celulares que se utilizaron para inocular tubos de 5 mL de YNB ($A_{600nm} = 0,05$) con diferentes concentraciones de NaCl o LiCl como se describe en Material y Métodos. Los tubos se mantuvieron en agitación a una temperatura de 28°C. La absorbancia se midió durante 48 horas. La media y la desviación estándar se estimaron a partir de al menos tres réplicas biológicas.

De forma similar a lo ocurrido en los ensayos en medio sólido, aunque la presencia del sodio provocó una disminución en el crecimiento de estas cepas de *C. albicans*, no hubo diferencias significativas entre ellas.

Por otra parte, en presencia del catión litio, las dos cepas se comportaron de forma similar en la primera concentración de LiCl estudiada (0,10 M). Sin embargo, conforme la concentración de LiCl aumentó en el medio, la cepa con el transportador Hak1 intacto en su membrana mostró una ligera mejora en la tolerancia a este catión respecto a la cepa mutante *hak1-*. En resumen, nuestros resultados muestran un efecto del sodio similar en ambas cepas y una ligera pero repetitiva mayor tolerancia a litio en la cepa *HAK1+*.

1.3 Crecimiento en presencia de otras sustancias tóxicas

Para estudiar el posible efecto tóxico que podrían tener distintas sustancias tóxicas (cafeína, azida sódica, 2,4-dinitrofenol y rotenona) en estas dos cepas de *C. albicans*, se realizaron experimentos similares a los realizados en el *Apartado 2.3* del primer capítulo de esta tesis doctoral. Nuevamente, los resultados no mostraron diferencias entre ambas cepas, lo que nos permitió concluir que el transportador Hak1 no está implicado en la tolerancia a estas sustancias.

2. Contenido intracelular de potasio, sodio y litio.

Analizados los requerimientos de potasio y la tolerancia a los cationes tóxicos sodio y litio en *C. albicans*, se decidió analizar el contenido intracelular de estos cationes.

Para determinar cómo afectaba el ayuno al contenido interno de potasio en estas dos cepas, se tomaron muestras de células crecidas en condiciones sin limitación de potasio y muestras de células tras ayunarlas durante tres horas. La cepa *HAK1+* y la cepa *hak1-* mostraron contenidos intracelulares de potasio similares, tanto cuando se crecieron en condiciones normales (*HAK1+*: 378 ± 24 nmoles mg^{-1} y *hak1-*: 364 ± 21 nmoles mg^{-1}), como tras el ayuno de tres horas donde se observó y una reducción cercana a la mitad de la concentración (*HAK1+*: 202 ± 11 nmoles mg^{-1} y *hak1-*: 205 ± 16 nmoles mg^{-1}).

Resultados

Obtenidos los resultados del contenido intracelular de potasio, se decidió analizar si la concentración de este catión podría ser afectada cuando las células creciesen en presencia de alguno de los cationes tóxicos estudiados anteriormente. Para descubrirlo, se tomaron muestras de células que crecieron ($A_{600\text{nm}} \approx 0,6$) en YNB líquido con 0,2 M de NaCl o 0,1 M de LiCl para posteriormente medir el contenido interno de los cationes potasio, sodio o litio. Los resultados de estos experimentos aparecen reflejados en la Figura 35.

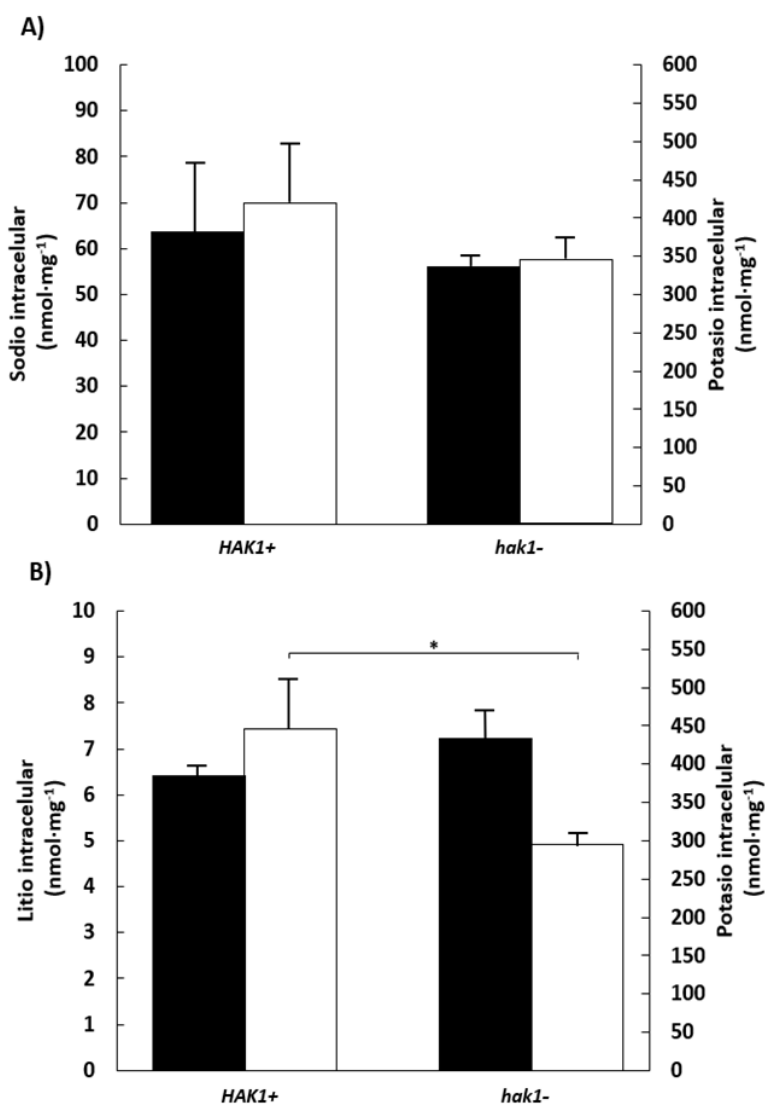


Figura 35. Contenido intracelular de sodio/litio y potasio en las cepas de *C. albicans* SN250 *HAK1+* y *hak1-*. Los cationes tóxicos sodio y litio se encuentran representados con color negro mientras que el catión potasio está representado en color blanco. Las células crecieron en medio YNB líquido con 0,2 M de NaCl (A) o 0,1 M de LiCl (B). La media y la desviación estándar se estimaron a partir de al menos tres réplicas biológicas. Los valores estadísticamente significativos respecto a su control fueron representados como: *, $p < 0,05$.

3. Absorción del potasio extracelular.

Los resultados obtenidos en los ensayos anteriores indican que la mutante *hak1-* de *C. albicans* tiene disminuida su capacidad para transportar potasio cuando el pH externo del medio es ácido respecto a la cepa *HAK1+* con el transportador intacto. Con el objetivo de obtener una información más detallada al respecto se utilizaron células ayunadas de potasio que se resuspendieron ($A_{600nm} \approx 0,5$) en distintos tampones con concentraciones de potasio en el rango μM y a varios pHs. Los resultados obtenidos de estos experimentos se ilustran en la Figura 36.

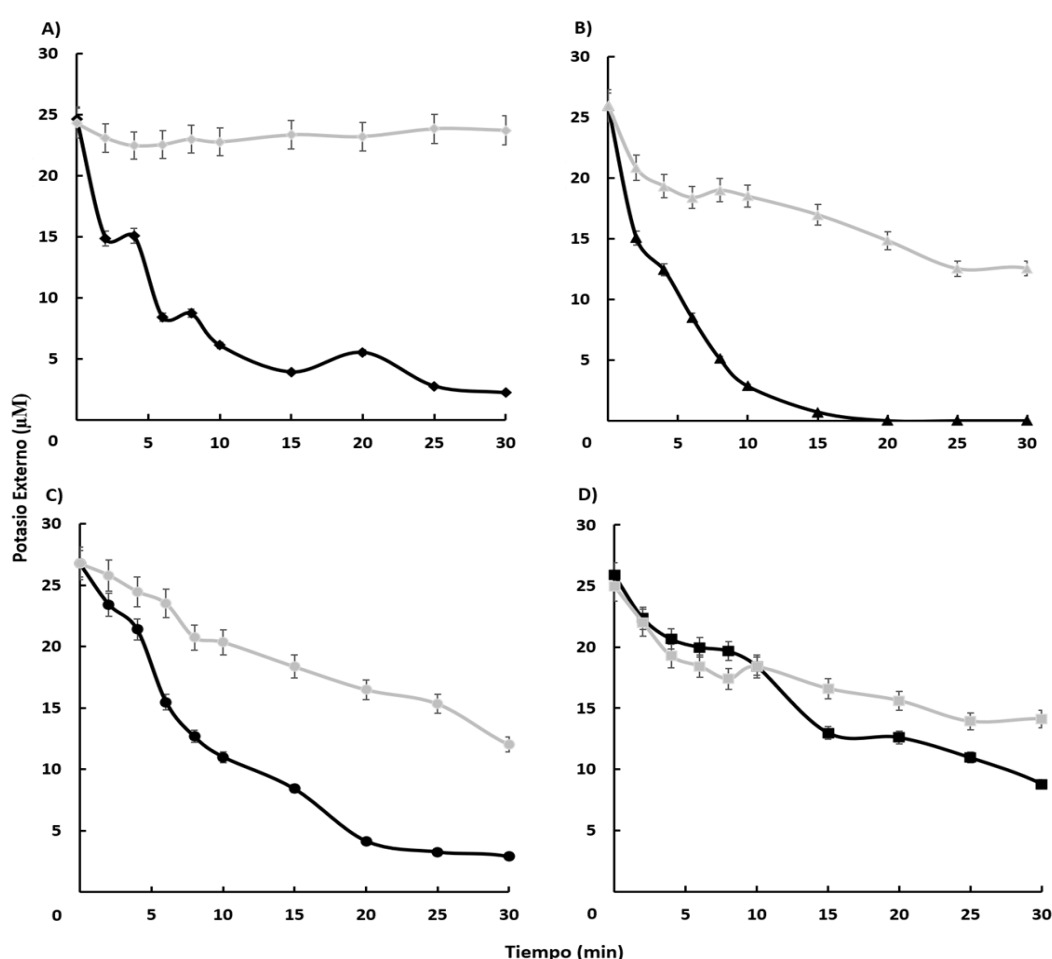


Figura 36. Absorción del potasio externo a diferentes pHs en las cepas de *C. albicans* SN250 *HAK1+* y *hak1-*. El ensayo fue realizado en células ayunadas de potasio que fueron resuspendidas ($A_{600nm} = 0,5$) en los tampones Tris (pH 3,0) (A) Tris (pH 4,5) (B), Mes (pH 5,8) (C) y Hepes (pH 7,5) (D) con aproximadamente 25 μM de KCl añadido. La cepa *HAK1+* se representa de color negro mientras que la cepa mutante *hak1-* se encuentra representada en color gris. Se tomaron muestras del potasio del medio externo durante 30 minutos como está descrito en el apartado. La media y la desviación estándar se estimaron a partir de al menos tres réplicas biológicas.

Resultados

Los resultados obtenidos en los experimentos de absorción de potasio (Figura 36) muestran que ambas cepas absorbieron el potasio externo de forma similar cuando el pH del medio fue básico (pH 7,5) (Figura 36D). Sin embargo, conforme el pH del medio se acidificaba, las diferencias entre estas dos cepas fueron más notables. De esta manera, en el pH más ácido estudiado (pH 3,0) (Figura 36A) después de 15 minutos de incubación la cepa mutante *hak1-* fue incapaz de absorber el potasio externo mientras que la cepa *HAK1+* logró absorber eficazmente el potasio del medio (<5 μM).

4. Transporte de rubidio.

Para determinar si existían diferencias en los parámetros cinéticos del transporte de rubidio (análogo del K^+) (Ramos y Rodríguez-Navarro 1986) entre la cepa mutante *hak1-* y la cepa *HAK1+*, se diseñaron experimentos donde se utilizaron tanto células normales en potasio como células ayunadas de potasio a distintos pHs. La decisión de estudiar el transporte en distintos pHs fue tomada para comprobar si el pH del medio podría influir en la capacidad del transporte de la cepa que carece del transportador Hak1.

Los valores cinéticos del transporte de rubidio se dedujeron a partir de las distintas velocidades de entrada del catión obtenidas de las diferentes concentraciones de RbCl estudiadas. Los resultados obtenidos para el transporte de rubidio se resumen en la Tabla 19.

Tabla 19. Parámetros cinéticos del transporte de rubidio en *C. albicans* SN250 *HAK1+* y *hak1-*.

pH	<i>HAK1</i>	Células normales en potasio		Células ayunadas en potasio	
		V_{\max} ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	K_m (mM)	V_{\max} ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	K_m (mM)
3,0	+	$0,63 \pm 0,20$	$1,63 \pm 0,55$	$11,49 \pm 0,20$	$0,09 \pm 0,02$
	-	$0,45 \pm 0,22$	$1,88 \pm 0,42$	$0,89 \pm 0,07$	$3,75 \pm 0,05$
4,5	+	$0,91 \pm 0,12$	$0,95 \pm 0,04$	$13,71 \pm 0,58$	$0,03 \pm 0,02$
	-	$0,74 \pm 0,09$	$0,87 \pm 0,05$	$3,69 \pm 0,43$	$0,59 \pm 0,06$
5,8	+	$1,96 \pm 0,33$	$0,25 \pm 0,02$	$9,79 \pm 0,43$	$0,09 \pm 0,02$
	-	$1,34 \pm 0,20$	$0,32 \pm 0,03$	$5,57 \pm 1,25$	$0,55 \pm 0,17$
7,5	+	$2,68 \pm 0,27$	$0,36 \pm 0,03$	$9,92 \pm 1,65$	$0,28 \pm 0,08$
	-	$2,01 \pm 0,11$	$0,40 \pm 0,07$	$7,89 \pm 1,79$	$0,74 \pm 0,25$

De forma general, el transporte de rubidio de las células “normales” en potasio no mostró grandes diferencias entre las dos cepas, obteniendo valores similares de velocidad y afinidad por el rubidio (Tabla 19). Sin embargo, no fue el caso de las células ayunadas, donde se evidenciaron algunas diferencias importantes. Los resultados del transporte con las células ayunadas mostraron incrementos significativos tanto en la velocidad de transporte como en la afinidad por el catión respecto a los valores obtenidos en las células “normales” en potasio en todos los pHs estudiados. Además, el proceso de ayuno evidenció algunas diferencias entre la cepa *hak1-* y la cepa *HAK1+*. Estas diferencias fueron mayores en los pH ácidos lo que concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, donde las mayores diferencias entre ambas cepas se obtuvieron en los pHs más ácidos. De esta manera, en las células ayunadas de potasio cuando el pH externo fue básico (pH 7,5), las diferencias observadas entre ambas cepas fueron casi irrelevantes mientras que, conforme el pH externo disminuyó a pHs más ácidos, la disparidad de resultados entre las dos cepas fue incrementando, obteniéndose como resultado una disminución tanto en la velocidad de transporte como en la afinidad por el rubidio en la cepa mutante *hak1-* que no fue observada en la cepa *HAK1+* (Tabla 19).

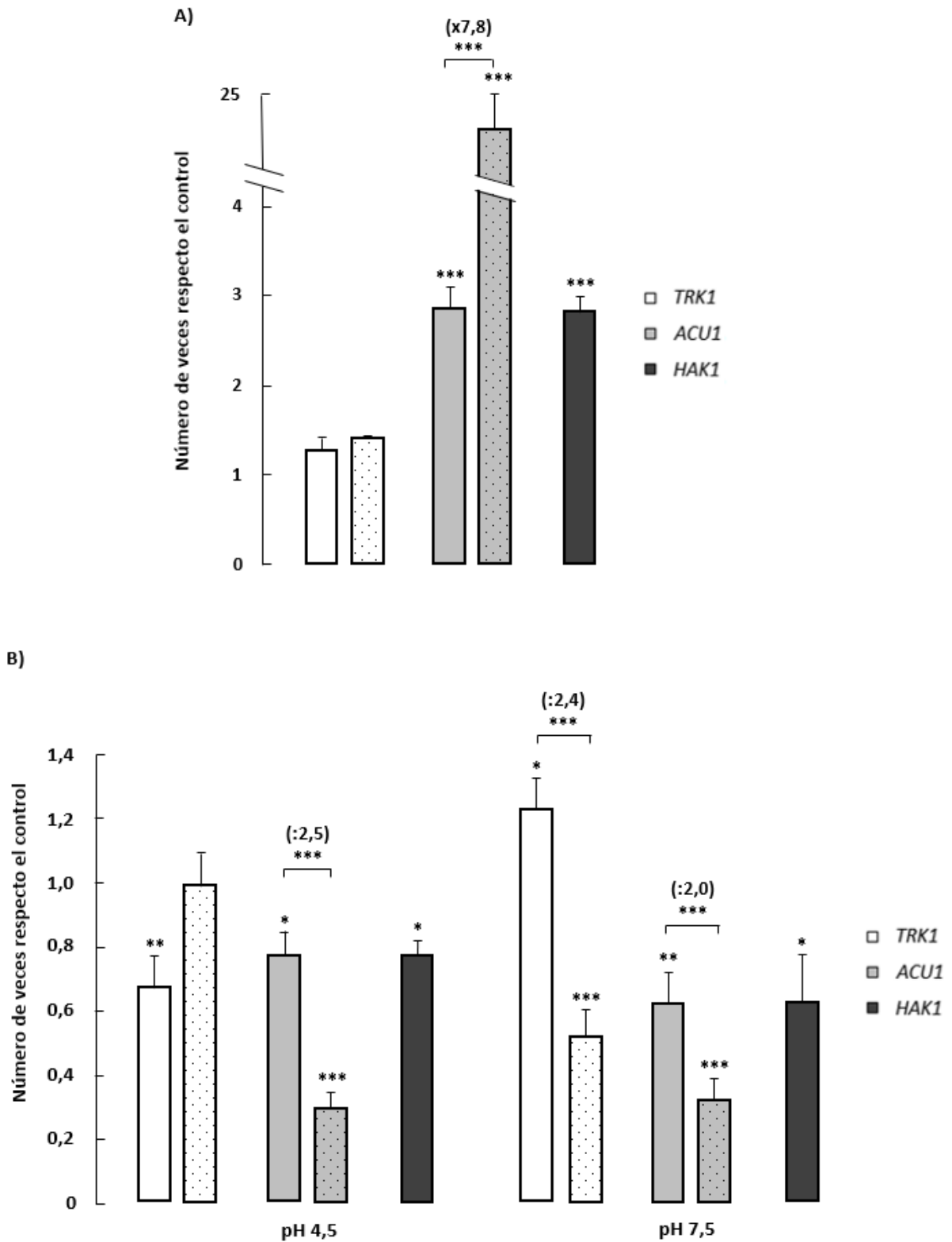
5. Expresión génica de los transportadores de potasio en *C. albicans*.

Como se mencionó anteriormente, en la membrana plasmática de *C. albicans* se han identificado tres tipos de transportadores de potasio: Trk1, Acu1 y Hak1. En este capítulo, para investigar más a fondo la regulación a nivel transcripcional de estos tres transportadores, y el impacto que puede producir la delección de *HAK1* en dicha regulación, se han estudiado dos cepas isogénicas *HAK1* y *hak1-*. Estas cepas son derivadas de la cepa parental SC5314 y, debido a esto, tienen una mutación que provoca un codón de parada ámbar dentro de la región codificante de *ACU1*. Por lo tanto, deben de carecer de proteínas Acu1 viables, aunque los niveles de transcripción de *ACU1* pueden ser determinados en las dos cepas mediante el diseño de cebadores en la región anterior al codón de parada.

La expresión génica de los transportadores de potasio en las cepas *HAK1+* y *hak1-* se ha investigado bajo diferentes condiciones de crecimiento: estrés salino producido por la

Resultados

presencia del catión sodio, modificación del pH del medio y ayuno de potasio. A continuación, en la Figura 37 se resumen los resultados obtenidos en el análisis transcriptómico.



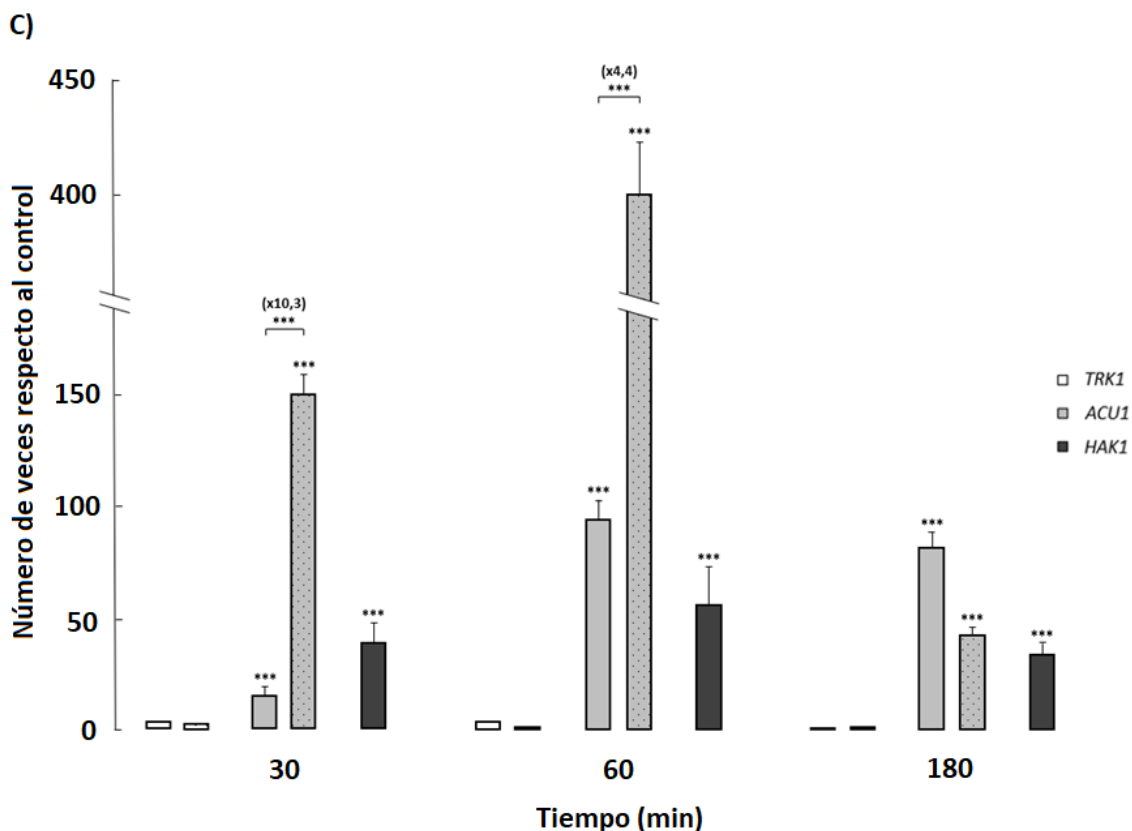


Figura 37. Cambios en los niveles de expresión de los genes que codifican los transportadores de potasio en *C. albicans* SN250 *HAK1+* y *hak1-*. En todos los experimentos las células crecieron hasta obtener una A_{600nm} entre 0,6-0,7 en el medio correspondiente. (A) YNB (Control) y con 1 M NaCl (Estrés salino). (B) YNB a pH 5,8 (Control), pH 4,5 y pH 7,5. (C) Células normales en potasio fueron resuspendidas en medio YNB-F sin potasio añadido y se tomaron muestras a distintos tiempos del ayuno. En las gráficas se representa la cepa *HAK1+* mediante barras sin puntos mientras que la cepa mutante *hak1-* se representa mediante barras con puntos. La media y la desviación estándar se estimaron a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto a su control fueron representados como: *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$.

El estrés salino producido por el sodio (Figura 37A) no produjo cambios significativos en la expresión de *TRK1* en ninguna de las dos cepas estudiadas. Sin embargo, la exposición a estrés salino sí alteró significativamente la expresión de los genes *ACU1* y *HAK1*. En la cepa *HAK1+* se observaron alteraciones en la expresión transcripcional de *ACU1* y *HAK1* que en presencia de NaCl se incrementó aproximadamente 3 veces respecto a los niveles de expresión obtenidos en el control sin sodio. Por otro lado, en la cepa mutante *hak1-* la expresión de *ACU1* aumentó aproximadamente 24 veces en presencia de sodio

Resultados

respecto al control. El incremento en la cepa mutante fue 7,8 veces superior respecto a la cepa *HAK1+*.

Los cambios en el pH del medio (Figura 37B) provocaron ligeras variaciones en la transcripción de los genes que codifican los transportadores de potasio en la cepa *HAK1+*. Sin embargo, los mayores cambios se observaron en la cepa mutante *hak1-* donde la expresión de *ACU1* disminuyó en los dos pHs estudiados (2,5 veces en el pH 4,5 y 2,0 veces en el pH 7,5). Además, también se produjeron cambios en los niveles de expresión de *TRK1*, ya que sus niveles de ARNm disminuyeron hasta 2,4 veces en el pH básico (pH 7,5).

El ayuno de potasio (Figura 37C) no provocó cambios significativos en la expresión de *TRK1*, pero sí produjo cambios en la expresión de los genes *ACU1* de ambas cepas y en el gen *HAK1* de la cepa *HAK1+*. Estos cambios producidos por el ayuno de potasio fueron cualitativamente similares a los obtenidos con las cepas silvestres en el capítulo anterior, observándose nuevamente un incremento en la transcripción tanto del gen que codifica Hak1 como del gen que codifica Acu1 en ambas cepas. Cabe destacar que, el ayuno de potasio provocó una mayor inducción de la transcripción de *ACU1* de la cepa mutante en comparación con los niveles observados en la cepa *HAK1+* (10,3 veces superior a los 30 min y 4,4 veces a los 60 min).

Capítulo IV: Expresión heteróloga de los transportadores de *Candida* en *Saccharomyces cerevisiae*

La expresión heteróloga es un sistema que permite la expresión de un gen o parte de un gen en un organismo huésped que no tiene naturalmente este material genético. La inserción del gen en el huésped se realiza mediante tecnología de ADN recombinante y puede realizarse en muchos tipos de organismos hospedadores que pueden ser bacterias, levaduras, células de mamíferos o células vegetales. Esta tecnología de ADN recombinante ha sido ampliamente utilizada en investigación con múltiples objetivos como, por ejemplo, lograr clonar, secuenciar y expresar canales y transportadores iónicos.

En un artículo publicado por el grupo de investigación de Hana Sychrová (Elicharová *et al.*, 2016) se logró clonar con éxito las secuencias que codifican los tres transportadores de potasio de *C. albicans* en una serie de plásmidos adecuados para producir su expresión heteróloga en una cepa mutante de *S. cerevisiae* que carece de sus propios sistemas de absorción de potasio *ScTrk1* y *ScTrk2* y que fue denominada BYT12 (Navarette *et al.*, 2010; Petrezselyova, Ramos y Sychrova 2011).

En este capítulo aprovechamos la existencia de esta serie de cepas de *S. cerevisiae* que expresan heterológamente cada transportador de potasio de la membrana plásmática de *C. albicans* para determinar la contribución de cada uno de ellos a la homeostasis de potasio.

1. Análisis fenotípico en medio sólido y líquido de *S. cerevisiae*.

Como se hizo en los capítulos anteriores y buscando conocer como la expresión heteróloga de los transportadores de *C. albicans* podrían afectar a esta cepa de *S. cerevisiae*, se realizaron distintos experimentos en medio sólido y líquido con distintas concentraciones de potasio o en presencia de los cationes tóxicos sodio y litio. Adicionalmente a estos experimentos, también se estudió el posible efecto que podrían producir en estas cepas de levadura distintas sustancias tóxicas de interés.

1.1 Crecimiento en condiciones limitantes de potasio

Las distintas cepas se inocularon mediante diluciones seriadas en medio YNB-F sólido con distintas concentraciones de potasio y pH. Tras incubar durante 48 h se observó el crecimiento obtenido en las distintas condiciones. Resultados representativos del crecimiento se muestran en la Figura 38.

De forma general, la expresión heteróloga de *CaTRK1* demostró mejorar el crecimiento de la cepa mutante BYT12 respecto a la expresión de los otros transportadores permitiendo que creciese en condiciones sin adición de potasio en el medio en cualquiera de los pHs estudiados (Figura 38A). Con respecto a la expresión heteróloga de *CaACU1*, se observó una mejora en el crecimiento en condiciones limitantes del catión (1 mM KCl) en todos los pHs estudiados respecto a la cepa control. Sin embargo, la expresión de *CaACU1* no permitió a la cepa mutante BYT12 crecer en condiciones sin adición de potasio el medio (Figura 38B). Por el contrario, la expresión de *CaHAK1* no mostró grandes diferencias respecto a la cepa control en condiciones bajas de potasio (< 5 mM KCl). Sin embargo, cuando el pH del medio fue ácido (pH 4,5 y 5,8) se observó una mejora en el crecimiento en la concentración de 20 mM de KCl que no fue observado a pH básico (pH 7,5) (Figura 38C). Para finalizar, cabe señalar que en todos los casos se observó que la modificación del pH del medio a un pH básico (pH 7,5) provocó un empeoramiento en el crecimiento de las cepas (Figura 38D).

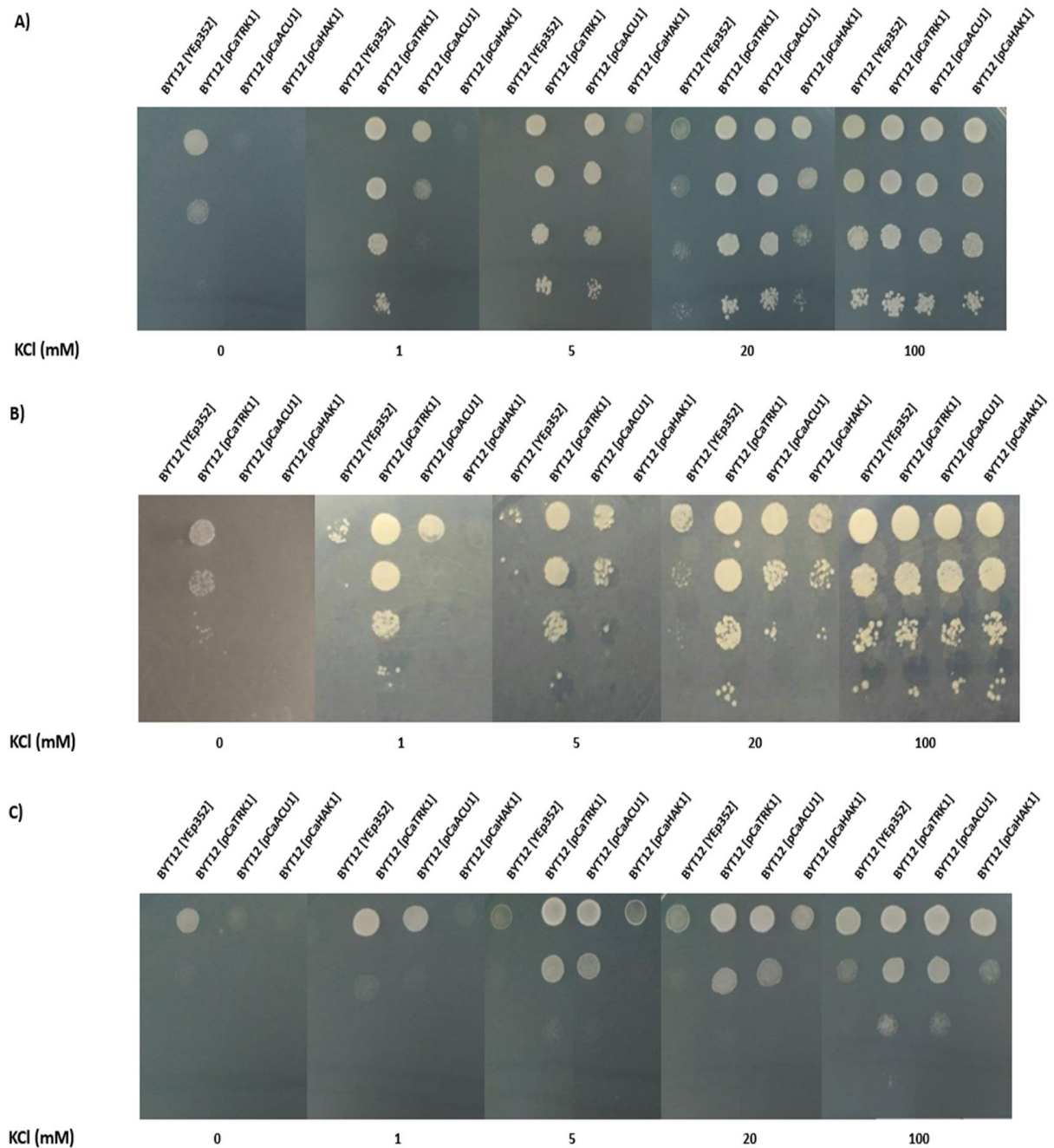


Figura 38. Requerimientos de potasio para el crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los genes de transportadores de *C. albicans* a diversos pHs. El ensayo se llevó a cabo mediante un test de goteo en el que se inocularon diluciones seriadas de orden 10 partiendo de una suspensión celular ($A_{600nm} = 1$). El medio utilizado fue YNB-F al que se añadieron concentraciones de KCl y cuyo pH fue ajustado a pH 4,5 (A), pH 5,8 (B) y pH 7,5 (C) como se describe en el *Apartado 3.1 de Material y Métodos*. Las placas se incubaron a 28°C durante 48 horas. Los experimentos se repitieron al menos tres veces y se muestran resultados representativos.

Resultados

Para profundizar en los resultados obtenidos con el medio sólido, se estudiaron las necesidades de potasio en medio YNB-F líquido. Se determinaron las constantes específicas de crecimiento (μ) a partir de los datos de absorbancia obtenidos durante el crecimiento (Figura 39).

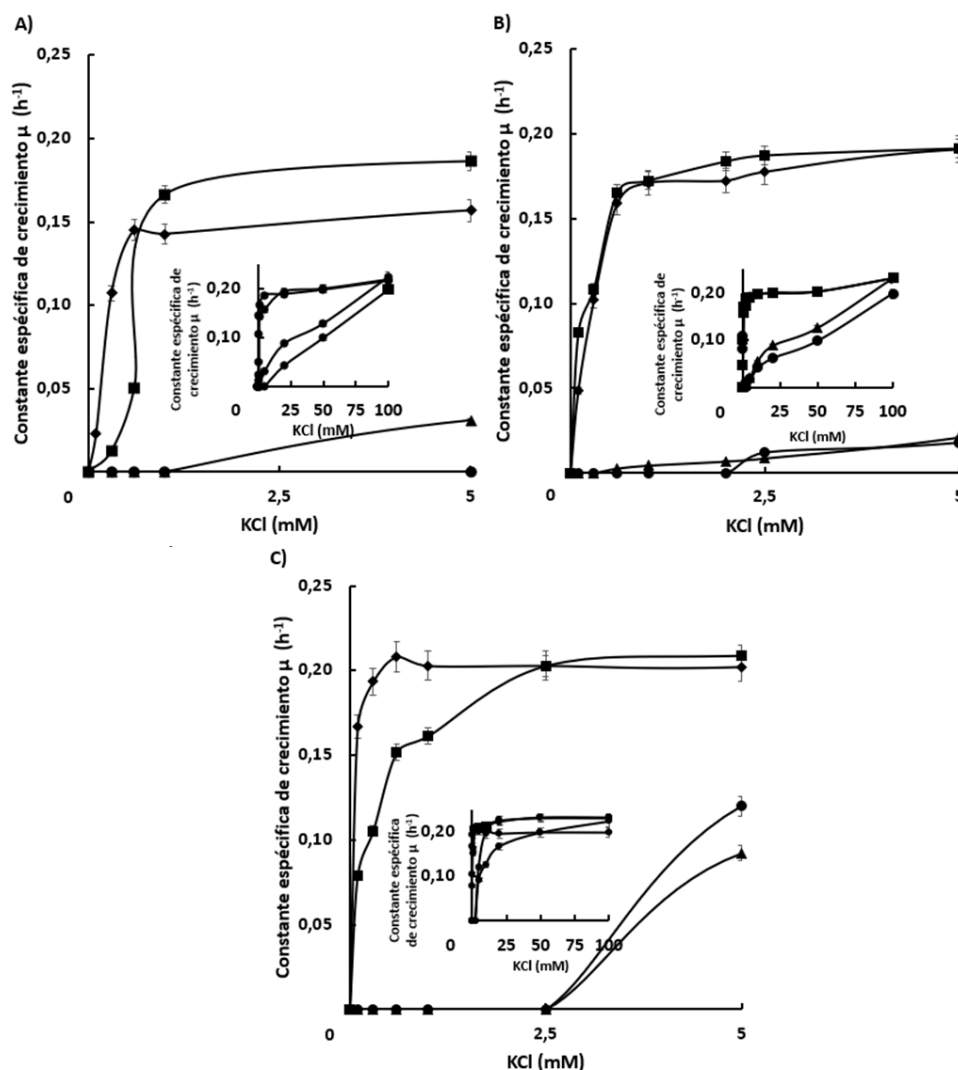


Figura 39. Efecto de la concentración de KCl y el pH sobre el crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los genes de transportadores de *C. albicans*. Se representan las constantes específicas de crecimiento en diversas concentraciones de potasio y los diferentes pH estudiados: 4,5 (A), pH 5,8 (B) y pH 7,5 (C). Previamente, se obtuvieron suspensiones celulares que se utilizaron para inocular tubos de 5 mL de medio YNB-F ($A_{600nm} = 0,05$) suplementado con los requerimientos auxotróficos, con diferentes concentraciones de KCl y ajustado al pH que se quería estudiar cómo se describe en el *Apartado 3.2 de Material y Métodos*. Las cepas se encuentran representadas como: BYT12 [YEp352] (\bullet), BYT12 [pCaTRK1] (\blacksquare), BYT12 [pCaACU1] (\blacklozenge), BYT12 [pCaHAK1] (\blacktriangle). Los tubos se mantuvieron en agitación a una temperatura de 28°C. La absorbancia se midió durante 48 horas. La media y la desviación estándar se estimaron a partir de al menos tres réplicas biológicas.

De forma similar al medio sólido, los resultados del medio líquido reflejaron que las cepas que expresaron los genes *CaTRK1* y *CaACU1* mostraron una mejora en su crecimiento respecto a la cepa control en cualquiera de las condiciones estudiadas. Por otro lado, la cepa que expresó *CaHAK1* mostró un crecimiento similar al que tuvo la cepa control. La expresión de *CaHAK1* solo mejoró el crecimiento a partir de concentraciones superiores de 20 mM en los pHs ácidos (pH 4,5 y 5,8) (Figura 39, Insets A y B).

1.2 Crecimiento en presencia de los cationes tóxicos sodio y litio

Como se hizo en los capítulos anteriores, para observar el efecto tóxico que produce tanto el sodio como el litio, se realizó un estudio en medio YNB-F sólido al que se le añadieron distintas concentraciones de NaCl o LiCl. Las cepas se inocularon mediante diluciones seriadas, y tras incubarlas durante 48 h, se observó el crecimiento obtenido. Resultados representativos del crecimiento se muestran en la Figura 40.

De forma general, la expresión de cualquier transportador de *C. albicans* en la membrana plasmática de la cepa BYT12 de *S. cerevisiae* provocó una mejora en la tolerancia al catión tóxico sodio respecto a la cepa control. Cabe destacar que, la mayor tolerancia a este catión se observó en la cepa que expresó el transportador CaTrk1 (Figura 40A).

Por otro lado, cuando se estudió la tolerancia al catión tóxico litio, se observó que solo las cepas que expresaron *CaTRK1* y *CaACU1* lograron obtener una mayor tolerancia a este catión tóxico. En contraste a este resultado, la expresión de *CaHAK1* no mostró diferencias respecto a la cepa control (Figura 40B).

Resultados

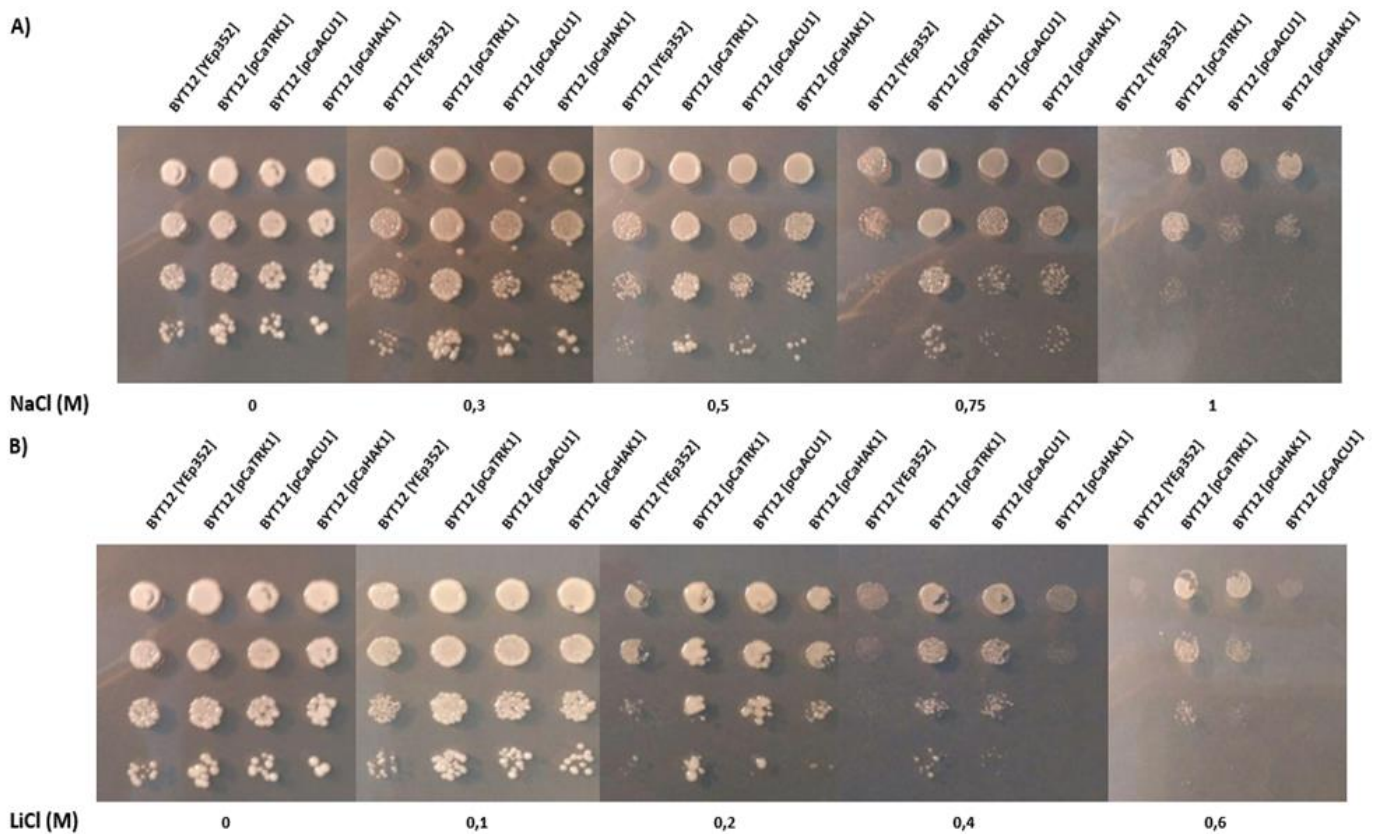


Figura 40. Tolerancia a sodio y litio en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los genes de transportadores de *C. albicans*. El ensayo se llevó a cabo mediante un test de goteo en el que se inocularon diluciones seriadas de orden 10 partiendo de una suspensión celular ($A_{600nm} = 1$) obtenida de células previamente cultivadas. El medio utilizado fue YNB-F suplementado con los requerimientos auxotróficos, 0,1 M de KCl y distintas concentraciones de NaCl (A) y LiCl (B) como se describe en el *Apartado 3.1 de Material y Métodos*. Las placas se incubaron a 28°C durante 48 horas. Los experimentos se repitieron al menos tres veces y se muestran resultados representativos.

Como se hizo anteriormente con el potasio y para profundizar en este estudio, se llevaron a cabo experimentos de crecimiento en medio YNB líquido con distintas concentraciones de NaCl o LiCl. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 41.

Cuando se estudió el efecto del catión tóxico sodio sobre el crecimiento se observó que, la expresión de cualquier transportador de *C. albicans* en la cepa BYT12 logró mejorar la tolerancia de esta cepa al catión tóxico sodio. Además, y como se observó en el medio sólido, la cepa que expresó *CaTRK1* mostró una mayor tolerancia al sodio (Figura 41A). Por otro lado, cuando se realizaron estos experimentos con el catión tóxico litio, se observó que la cepa que expresó *CaTRK1* obtuvo la mayor tolerancia a este catión tóxico

mientras que la expresión de los otros genes no mejoraron la tolerancia de la cepa BYT12 de *S. cerevisiae* (Figura 41B).

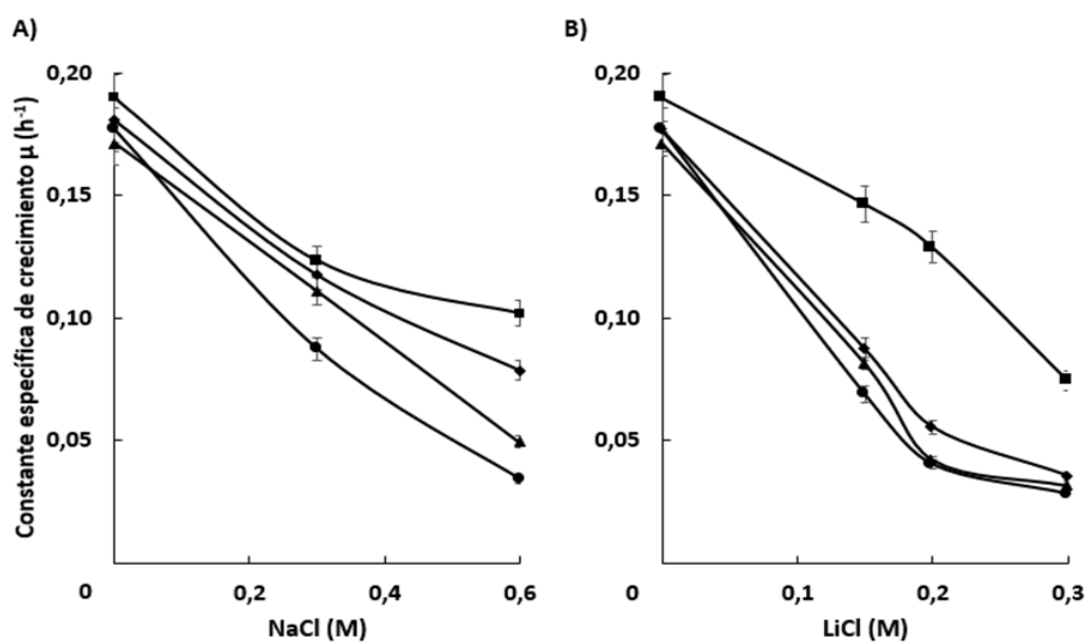


Figura 41. Efecto de la concentración de NaCl y LiCl sobre la constante específica de crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los genes de transportadores de *C. albicans*. Se representan las constantes específicas de crecimiento en presencia de los cationes tóxicos sodio (A) y litio (B). Previamente, se obtuvieron suspensiones celulares que se utilizaron para inocular tubos de 5 mL de YNB-F ($A_{600nm} = 0,05$) suplementado con los requerimientos auxotróficos, 0,1 M KCl y con diferentes concentraciones de NaCl o LiCl como se describe en el *Apartado 3.2 de Material y Métodos*. Las cepas se encuentran representadas como: BYT12 [YEp352] (●), BYT12 [pCaTRK1] (■), BYT12 [pCaACU1] (◆), BYT12 [pCaHAK1] (▲). Los tubos se mantuvieron en agitación a una temperatura de 28°C. La absorbancia se midió durante 48 horas. La media y la desviación estándar se estimaron a partir de al menos tres réplicas biológicas.

1.3 Crecimiento en presencia de otras sustancias tóxicas

Para estudiar el posible efecto tóxico que podrían tener distintas sustancias tóxicas (cafeína, azida sódica, 2,4-dinitrofenol y rotenona) en estas cepas, se realizaron experimentos similares a los realizados en el *Apartado 2.3 Crecimiento en presencia de otras sustancias tóxicas* del primer y tercer capítulo de esta Tesis Doctoral. Se muestran resultados representativos en la Figura 42 y 43.

Resultados

Cuando se estudió el efecto de la cafeína sobre estas cepas transformadas de *S. cerevisiae*, se observó que en la concentración más baja estudiada de cafeína (2 mM) las cepas que expresaron *CaTRK1* y *CaHAK1* mostraban una mayor tolerancia a esta sustancia tóxica respecto a las cepas que expresaron *CaACU1* y el plásmido control. Sin embargo, conforme aumentó la concentración de cafeína en el medio (≥ 4 mM) se observó que la única cepa que logró tolerar la cafeína fue la cepa que expresó *CaTRK1* (Figura 42).

Por otra parte, los resultados obtenidos en la tolerancia al 2,4-dinitrofenol no mostraron grandes diferencias en concentraciones bajas de esta sustancia (≤ 1 mM). Sin embargo, conforme la concentración aumentó en el medio se logró observar una tenue tolerancia en las cepas que expresaron los genes *CaTRK1* y *CaHAK1*. No obstante, esta tolerancia no se observó en concentraciones superiores a 1,3 mM (datos no mostrados), donde el crecimiento de todas las cepas estaba completamente inhibido (Figura 43).

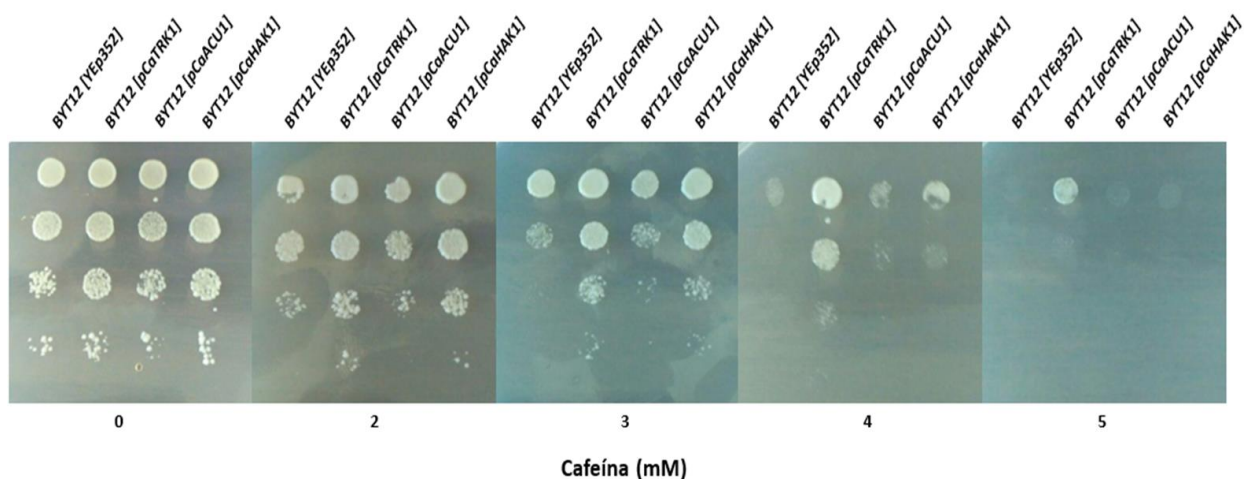


Figura 42. Efecto de los genes de transportadores de *C. albicans* sobre la tolerancia a la cafeína al expresarse heterológamente en la cepa *S. cerevisiae* BYT12. El ensayo se llevó a cabo mediante un test de goteo en el que se inocularon diluciones seriadas de orden 10 partiendo de una suspensión celular ($A_{600nm} = 1$) obtenida de células previamente cultivadas. El medio utilizado fue YNB-F suplementado con los requerimientos auxotróficos, 0,1 M de KCl y distintas concentraciones de cafeína como se describe en el Apartado 3.1 de Material y Métodos. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 horas. Los experimentos se repitieron al menos tres veces y se muestran resultados representativos

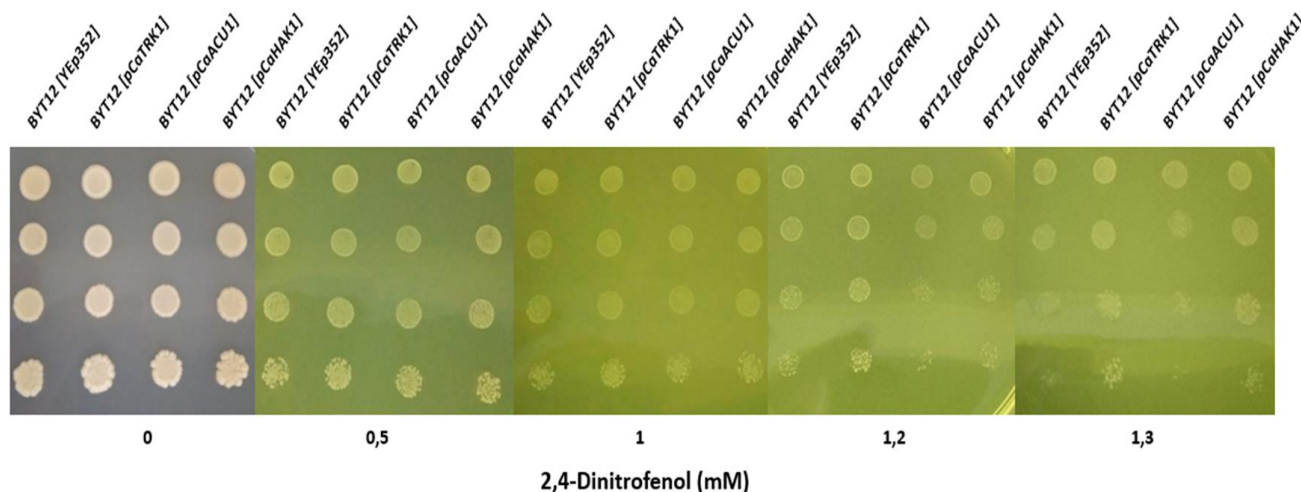


Figura 43. Efecto de los genes de transportadores de *C. albicans* sobre la tolerancia al 2,4-dinitrofenol al expresarse heterológamente en la cepa *S. cerevisiae* BYT12. El ensayo se llevó a cabo mediante un test de goteo en el que se inocularon diluciones seriadas de orden 10 partiendo de una suspensión celular ($A_{600nm} = 1$) obtenida de células previamente cultivadas. El medio utilizado fue YNB-F suplementado con los requerimientos auxotróficos, 0,1 M de KCl y distintas concentraciones de 2,4-Dinitrofenol como se describe en el *Apartado 3.1 de Material y Métodos*. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 horas. Los experimentos se repitieron al menos tres veces y se muestran resultados representativos.

2. Contenido intracelular de potasio, sodio y litio.

Una vez estudiados los requerimientos de potasio y la tolerancia a los cationes tóxicos sodio y litio en las cepas de *S. cerevisiae* que expresaban heterológamente los transportadores de potasio de *C. albicans*, se decidió analizar el contenido intracelular de estos cationes en estas cepas.

En primer lugar y para determinar cómo podría afectar el proceso del ayuno al contenido interno de potasio, se tomaron muestras de células crecidas en condiciones normales de crecimiento y muestras de células tras ayunarlas durante tres horas (*Apartado 4.1 de Material y Métodos*). Los resultados obtenidos de estos experimentos se ilustran en la Figura 44.

Resultados

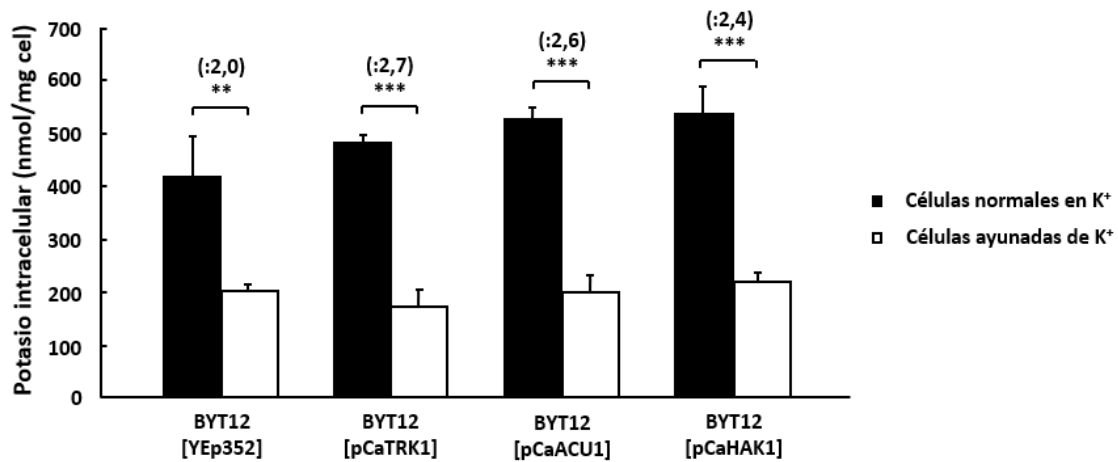


Figura 44. Contenido intracelular de potasio en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los genes de transportadores de *C. albicans*. Las células fueron cultivadas en YNB-F suplementado con los requerimientos auxotróficos y 0,1 M de KCl. Se tomaron muestras de células normales cultivadas en presencia de potasio hasta una $A_{600nm} = 0,6$ y muestras de estas mismas células tras lavarlas, resuspenderlas en YNB-F sin potasio añadido y ayunarlas en este medio durante 3 h. El contenido en cationes fue determinado mediante el espectrofotómetro de absorción atómica. La media y la desviación estándar se estimaron a partir de al menos tres réplicas biológicas. Los valores estadísticamente significativos respecto a su control fueron representados como: *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$.

El contenido intracelular de potasio tanto en células normales como en células ayunadas fue cualitativamente similar en las cuatro cepas, independientemente de que expresasen o no un transportador de *C. albicans* en su membrana plasmática (Figura 44).

Tras estudiar el contenido intracelular de potasio, se decidió analizar si la concentración de este catión podría verse afectada cuando las células creciesen en presencia de alguno de los cationes tóxicos que fueron estudiados en los apartados anteriores. Para ello, se tomaron muestras de células crecidas ($A_{600nm} \approx 0,6$) en YNB líquido con 0,2 M de NaCl ó 0,1 M de LiCl y se determinó su contenido interno de los cationes potasio, sodio ó litio. Los resultados de estos experimentos aparecen reflejados en la Figura 45.

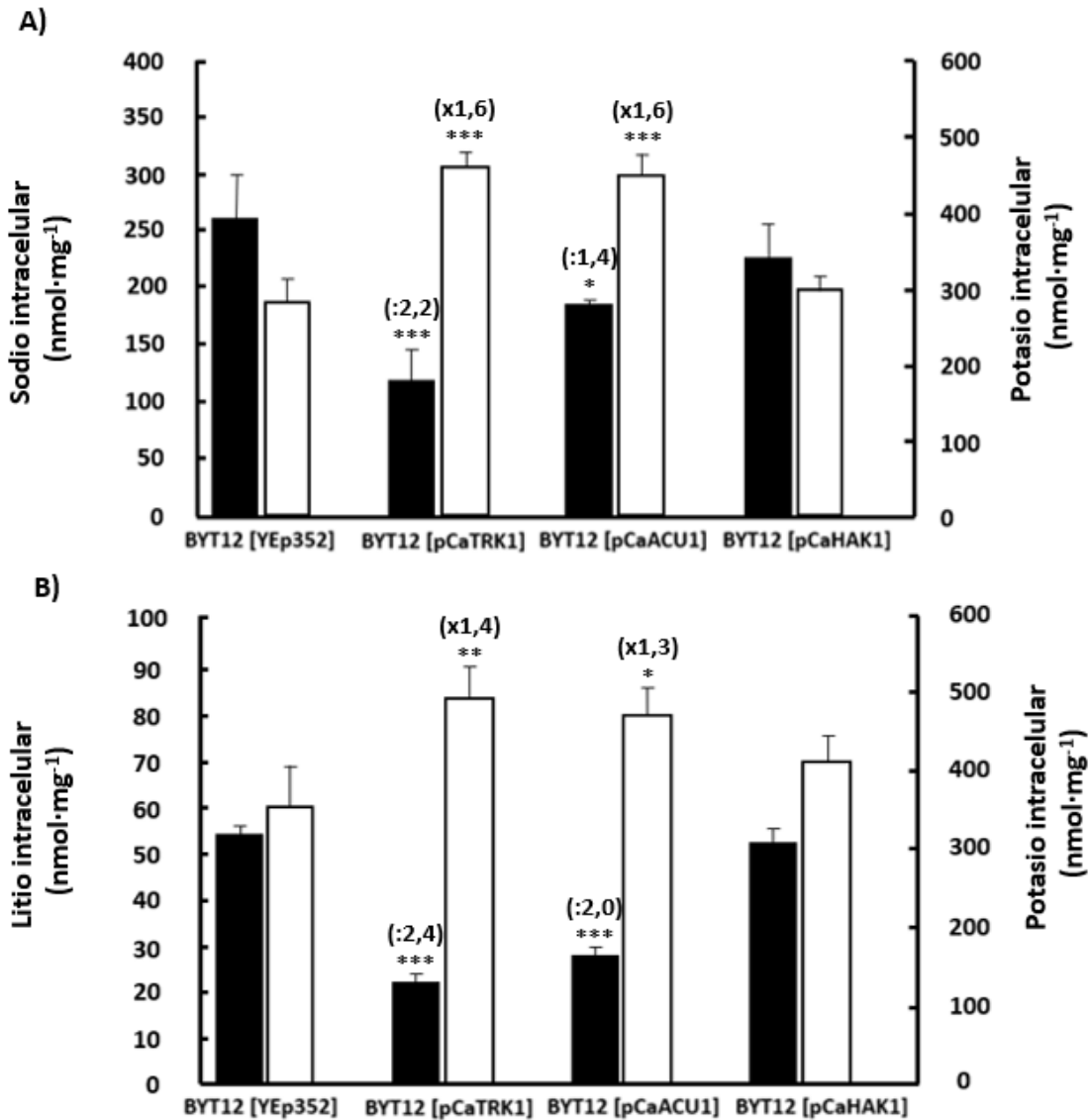


Figura 45. Contenido intracelular de sodio, litio y potasio en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los genes de transportadores de *C. albicans*. Las células fueron cultivadas en YNB-F suplementado con los requerimientos auxotróficos, 0,1 M de KCl y 0,2 M de NaCl o 0,1 M LiCl. Se tomaron muestras de las células a ($A_{600nm}=0,6$) y el contenido en cationes fue determinado mediante el espectrofotómetro de absorción atómica como se describe en el *Apartado 4.2.1 de Material y Métodos*. En las gráficas se representan el contenido intracelular de sodio (negro) y potasio (blanco) (A), y el contenido intracelular de litio (negro) y potasio (blanco) (B). La media y la desviación estándar se estimaron a partir de al menos tres réplicas biológicas. Los valores estadísticamente significativos respecto a su control fueron representados como: *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$.

Como se observa en los resultados obtenidos, la expresión de los transportadores *CaTRK1* y *CaACU1* en *S. cerevisiae* provocó una disminución en la acumulación intracelular de ambos cationes tóxicos y un aumento en la concentración intracelular

Resultados

del potasio. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre la cepa que expresó heterológamente el transportador *CaHAK1* y la cepa que contenía el plásmido control (Figura 45).

3. Absorción del potasio extracelular.

Los resultados anteriores sugieren que la expresión de cualquiera de los transportadores de potasio de *C. albicans* en la cepa mutante BYT12 de *S. cerevisiae* (carente de sus transportadores endógenos) otorgó a esta cepa la capacidad para adquirir potasio cuando este catión se encuentra a niveles bajos en el medio. Con el objetivo de obtener información más detallada sobre esta capacidad, se resuspendieron células ayunadas de potasio ($A_{600nm} \approx 0,5$) en distintos tampones con concentraciones de potasio en el rango μM y diferentes pHs. Los resultados obtenidos de estos experimentos se resumen en la Figura 46.

De forma general, se puede observar que en cualquiera de los pHs estudiados la cepa que expresó *CaTRK1* logró absorber más eficientemente el potasio externo que las cepas que expresaron *CaACU1*, *CaHAK1* y el plásmido control (Figura 46). Por otro lado, la expresión de *CaACU1* en la cepa mutante BYT12 de *S. cerevisiae* incrementó la capacidad de absorción de potasio cuando el pH del medio fue básico o ligeramente ácido (7,5 y 5,8) (Figura 46B y 46C). La cepa que expresó *CaHAK1* no mostró grandes diferencias en su capacidad de absorción de potasio externo ni a pH 7,5 ni a pH 5,8 respecto a la cepa control (Figura 46B y 46C). Sin embargo, cuando el pH del medio fue más ácido (pH 4,5) esta cepa logró absorber eficazmente el potasio externo, superando los valores obtenidos por la cepa que expresó *CaACU1* y los obtenidos por la cepa con el plásmido control (Figura 46A).

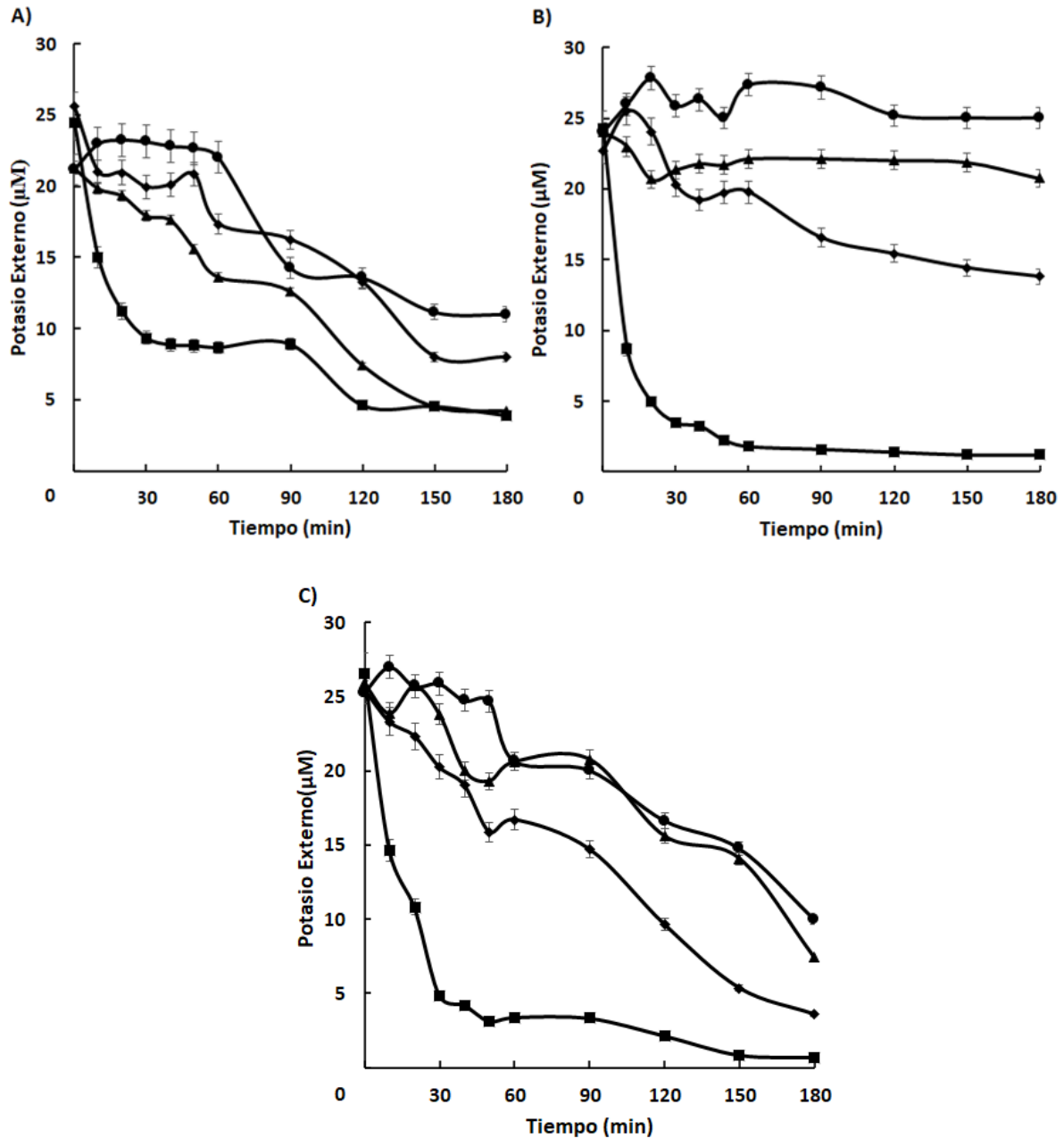


Figura 46. Variación del potasio externo a diferentes pHs en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los genes de transportadores de *C. albicans*. El ensayo fue realizado en células ayunadas de potasio que fueron resuspendidas ($A_{600\text{nm}} = 0,5$) en los tampones Tris (pH 4,5) (A), Mes (pH 5,8) (B) y Hepes (pH 7,5) (C) con 25 μM de KCl añadido. Se tomaron muestras del potasio del medio externo durante 180 minutos como esta descrito en el Apartado 4.2.2 de Material y Métodos. Las cepas se encuentran representadas como: BYT12 [YEp352] (●), BYT12 [pCaTRK1] (■), BYT12 [pCaACU1] (◆), BYT12 [pCaHAK1] (▲). La media y la desviación estándar se estimaron a partir de al menos tres réplicas biológicas.

4. Inhibición de la absorción del potasio por los cationes tóxicos sodio y litio en *S. cerevisiae*

Tras los resultados obtenidos anteriormente en los experimentos de tolerancia y contenido intracelular de los cationes tóxicos sodio y litio, se decidió estudiar el posible efecto del potasio sobre la velocidad de entrada de estos cationes en células ayunadas de potasio en presencia o ausencia de KCl. Para llevar a cabo este ensayo, se resuspendieron células ayunadas de potasio ($A_{600nm} \approx 0,3$) en tampón Mes con 100 mM de NaCl o LiCl y con un pH de 5,8. Tras resuspender las células, y a tiempo cero, se adicionó 10 mM de KCl y se procedió a tomar muestras a distintos tiempos. Paralelamente y como control, se realizó el mismo procedimiento, pero sin adicionar KCl al tampón. Los resultados de estos experimentos aparecen reflejados en las Figuras 47 (Sodio) y 48 (Litio).

Los resultados obtenidos muestran que, solamente en la cepa de *S. cerevisiae* que expresó *CaTRK1* se observó una disminución apreciable en la entrada del catión tóxico sodio en presencia de potasio en el medio. En contraste, cuando la cepa BYT12 de *S. cerevisiae* expresó *CaACU1* ó *CaHAK1* apenas se observaron diferencias en presencia y ausencia de sodio (Figura 47).

Por otra parte y, de forma similar a lo ocurrido anteriormente con el catión tóxico sodio, los resultados obtenidos tras suplementar el medio externo con 100 mM de LiCl muestran que solamente en la cepa que expresó *CaTRK1* se logró observar una inhibición de la absorción de este ion asociada a la presencia de potasio en el medio, obteniéndose como resultado una disminución significativa de la entrada de este catión tóxico que no fue observada en ninguna de las otras cepas que expresaron un transportador de la membrana plasmática de *C. albicans* (Figura 48).

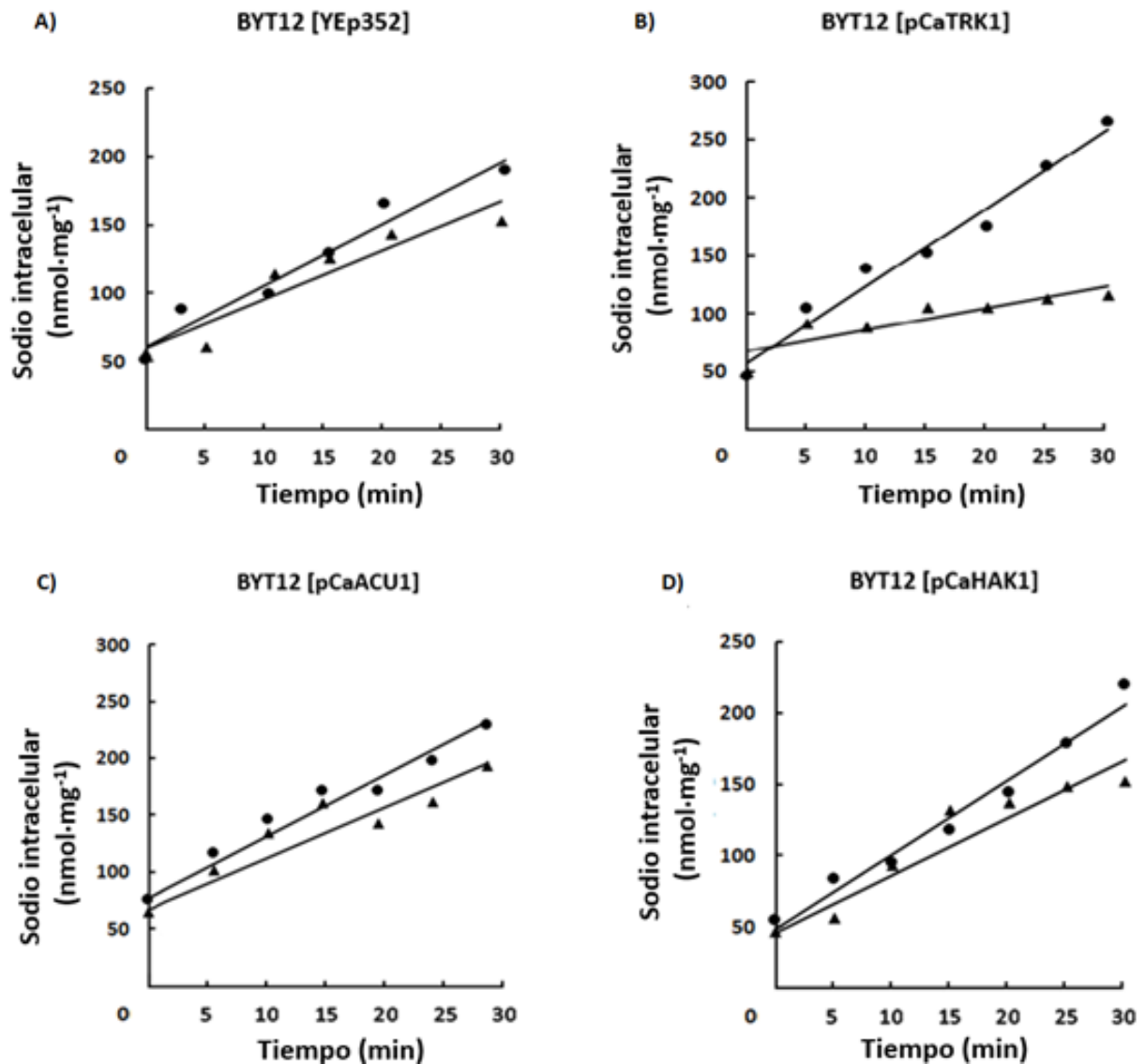


Figura 47. Inhibición de la absorción del sodio por el catión potasio en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los genes de transportadores de *C. albicans*. El ensayo fue realizado en células ayunadas de potasio que fueron resuspendidas ($A_{600nm} \approx 0,3$) en Mes a pH 5,8 con 100 mM de NaCl en ausencia (●) o presencia de 10 mM de KC (▲). Se tomaron muestras a distintos tiempos hasta 30 minutos y se determinó el contenido intracelular de sodio como está descrito en el Apartado 4.2.4 de Material y Métodos.

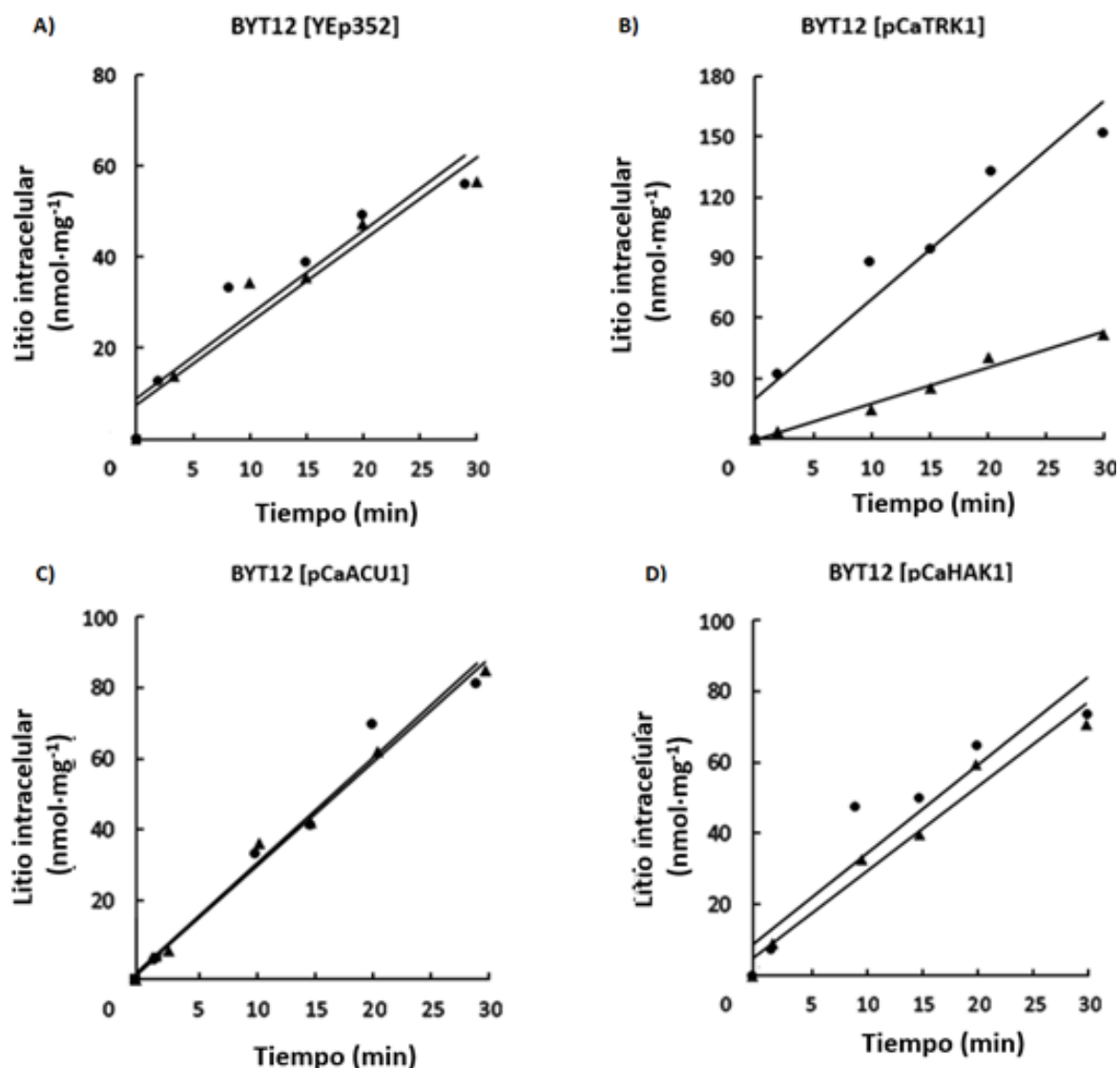


Figura 48. Inhibición de la absorción del litio por el catión potasio en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los genes de transportadores de *C. albicans*. El ensayo fue realizado en células ayunadas de potasio que fueron resuspendidas ($A_{600nm} \approx 0,3$) en Mes a pH 5,8 con 100 mM de LiCl en ausencia (●) o presencia de 10 mM de KCl (▲). Se tomaron muestras a distintos tiempos hasta 30 minutos y se determinó el contenido intracelular de sodio como está descrito en el *Apartado 4.2.4 de Material y Métodos*.

5. Determinación del volumen celular en *S. cerevisiae*

Para investigar si la expresión heteróloga de alguno de los transportadores de *C. albicans* en la cepa BYT12 de *S. cerevisiae* podía influir sobre el tamaño celular se decidió estudiar este parámetro con distintas condiciones de potasio: condiciones normales de

crecimiento (100 mM de KCl), a concentraciones bajas de KCl (30 mM) y tras tres horas de ayuno del catión. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Volumen celular en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los transportadores de *C. albicans* en diferentes concentraciones de KCl añadido.

Cepa	100 mM KCl (μm)	30 mM KCl (μm)	0 mM KCl (μm)
BYT12 [YEp352]	4,94 \pm 0,02	4,93 \pm 0,01	4,92 \pm 0,01
BYT12 [pCaTRK1]	4,99 \pm 0,01	4,99 \pm 0,01	4,96 \pm 0,01
BYT12 [pCaACU1]	4,95 \pm 0,01	4,94 \pm 0,01	4,92 \pm 0,02
BYT12 [pCaHAK1]	4,97 \pm 0,01	4,96 \pm 0,01	4,94 \pm 0,02

De forma general, se observó que el proceso de ayuno provocó una disminución en el volumen celular en todas las cepas. Además de este resultado, se observó que solamente la cepa que expresó *CaTRK1* aumentó de forma significativa el volumen celular respecto a la cepa control en todas las condiciones estudiadas. Asimismo, esta cepa fue la única que no vio afectado su volumen celular cuando el potasio externo disminuyó a una concentración de 30 mM de KCl (Tabla 20).

6. Transporte de rubidio en *S. cerevisiae*

Para determinar los parámetros cinéticos del transporte de rubidio (análogo del K^+) (Ramos y Rodríguez-Navarro 1986) se realizaron varios experimentos tanto en células normales en potasio como en células ayunadas de potasio. Las células fueron resuspendidas ($A_{600\text{nm}} \approx 0,3$) en tampón Mes a pH 5,8, y a tiempo cero, se le añadió la concentración requerida de RbCl. A partir de los resultados obtenidos se pudieron calcular las velocidades iniciales de entrada del catión en las diferentes concentraciones de RbCl estudiadas y con ello, deducir los valores cinéticos del transporte mediante representaciones de Lineweaver-Burk. Los resultados obtenidos para el transporte de rubidio se resumen en la Tabla 21.

Resultados

Tabla 21. Parámetros cinéticos del transporte de rubidio en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los transportadores de *C. albicans*.

Cepa	Condiciones	V_{max1} (nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	Km_1 (mM)	V_{max2} (nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	Km_2 (mM)
BYT12	Células normales en K ⁺	9,29 ± 0,01	24,82 ± 0,01	-	-
[YEp352]	Células ayunadas de K ⁺	11,90 ± 0,30	20,97 ± 0,40	-	-
BYT12	Células normales en K ⁺	7,64 ± 0,13	0,74 ± 0,14	-	-
[pCaTRK1]	Células ayunadas de K ⁺	49,11 ± 4,59	0,13 ± 0,02	-	-
BYT12	Células normales en K ⁺	12,87 ± 0,05	6,77 ± 0,11	-	-
[pCaACU1]	Células ayunadas de K ⁺	6,43 ± 0,05	0,70 ± 0,11	16,13 ± 0,85	7,90 ± 0,01
BYT12	Células normales en K ⁺	6,11 ± 0,96	8,48 ± 0,20	-	-
[pCaHAK1]	Células ayunadas de K ⁺	0,94 ± 0,05	0,03 ± 0,01	5,43 ± 0,50	7,84 ± 0,50

Los resultados obtenidos del transporte de rubidio en las células normales en potasio mostraron que, independientemente de la expresión o no de un transportador de *C. albicans* en la cepa BYT12, las velocidades (V_{max}) alcanzada por todas las cepas fueron similares. Sin embargo, la expresión de estos transportadores de *C. albicans* si otorgó a la cepa BYT12 diferencias en la afinidad (K_m) por el catión obteniéndose como resultado una mejora en su afinidad por el rubidio respecto a la cepa control (Tabla 21). Tras someter estas cepas al ayuno de potasio, todas ellas incrementaron tanto la velocidad como la afinidad por el catión. Cabe destacar que, el mayor cambio se observó en la cepa que expresó *CaTRK1*, que incrementó tanto la velocidad como la afinidad por el catión, 6,4 y 5,7 veces respectivamente. Además, y como sucedió anteriormente con la cepa de *C. albicans* 12C, las cepas que expresaron los genes *CaHAK1* y *CaACU1* mostraron curvas bifásicas en el diagrama de Lineweaver-Burk en sus todas las

repeticiones experimentales. De esta forma, en estas cepas se observó una primera fase con una alta afinidad ($CaACU1: 0,70 \pm 0,11$ y $CaHAK1: 0,03 \pm 0,01$), y una segunda fase con una baja afinidad ($CaACU1: 7,90 \pm 0,01$ y $CaHAK1: 7,84 \pm 0,50$) (Tabla 21).

Discusión

C. albicans es una levadura diploide y patógeno oportunista que se encuentra presente como comensal en la mayoría de los individuos sanos de forma inofensiva. Sin embargo, bajo ciertas condiciones ambientales como cambios en el pH o en la concentración de cationes (Krauke y Sychrová, 2010) o cambios inmunológicos del hospedador (Martins *et al.*, 2014) puede convertirse en un microorganismo patógeno provocando desde enfermedades leves hasta enfermedades posiblemente letales en humanos, siendo una de las causas más comunes de infecciones en el torrente circulatorio (Wisplinghoff *et al.*, 2004). Como ocurre en todos los seres vivos, el potasio es un elemento que es indispensable para la vida y por ello las células de *C. albicans* necesitan de este catión para cumplir diversas funciones fisiológicas. Para asegurar la obtención de este catión de forma eficiente, *C. albicans* contiene tres sistemas de transporte de potasio en su membrana plasmática que permiten a las células de esta especie competir con las células del hospedador por el potasio extracelular que suele estar presente a baja concentración (nmol/L) en el medio extracelular del huésped (Watanabe *et al.*, 2006). Por todo esto, conocer en profundidad estos transportadores, y con ello, cómo funciona la homeostasis de potasio en esta levadura es de vital importancia para el desarrollo de nuevos tratamientos en la lucha contra este patógeno.

Hasta la fecha de realización de esta Tesis Doctoral, existía poca información sobre la homeostasis de potasio en *C. albicans*. En un artículo de 2004 (Benito *et al.*, 2004) fueron identificados los tres transportadores de potasio en la membrana plasmática de *C. albicans* (Trk1, Acu1 y Hak1) donde se describió para la cepa SC5314, el gen *ACU1* como un pseudogen. Tras esto, solo en otro artículo en 2016 (Elicharová *et al.*, 2016), se describió con éxito la clonación de las secuencias que codifican los tres transportadores de potasio de la membrana plasmática de *C. albicans* en una serie de plásmidos para su expresión en la cepa mutante de *S. cerevisiae* BYT12, carente de sus transportadores endógenos de potasio, pero no fue caracterizado en profundidad el aporte que estos transportadores realizan en la homeostasis de potasio.

Homeostasis de cationes en cepas “silvestres” de *C. albicans*

En esta Tesis Doctoral se han caracterizado dos cepas silvestres de *C. albicans* (SC5314 y 12C). La cepa SC5314 de *C. albicans* es la cepa mayormente utilizada por los laboratorios de todo el mundo, debido a que fue la primera cepa de *C. albicans* en ser secuenciada (Jonas *et al.*, 2004) y de ella derivan la mayoría de las cepas que son utilizadas en investigación. Sin embargo, esta cepa contiene solo dos tipos de transportadores de potasio funcionales en su membrana plasmática (Trk1 y Hak1), debido a que el gen *ACU1* incluye una mutación ámbar en su secuencia codificante (Benito *et al.*, 2004). Por esta razón, la cepa SC5314 no puede ser utilizada como una cepa “silvestre” cuando se trata de estudiar la homeostasis de potasio y por ello, en esta Tesis Doctoral se ha utilizado además la cepa de *C. albicans* 12C, que cuenta en su genoma con una copia funcional de todos los genes que codifican para los transportadores de potasio en su membrana plasmática (Hizoka *et al.*, 2015).

Aunque estas cepas no son isogénicas y una de ellas no contiene el transportador *Acu1* de forma funcional, nuestros estudios parecen indicar que ambas cepas se comportan de forma similar. Ambas levaduras demostraron ser capaces de adquirir el potasio del medio externo y crecer en condiciones limitantes de este catión en un amplio rango de pHs sin mostrar muchas diferencias. Además de esto, fueron capaces de tolerar de forma similar concentraciones tóxicas de los cationes sodio y litio. Los resultados observados sobre la capacidad de captar potasio a distintas condiciones de pH coinciden con la capacidad de este microorganismo para adaptarse a distintos nichos con una amplia variedad de pHs como el estómago (pH 2), la vagina (pH 4-5) o la boca (pH 6) (Zwolińska-Wciso *et al.*, 1998; Gunther *et al.*, 2014; Cannon y Chaffin, 1999). Aunque la cepa SC5314 no cuenta con el transportador *Acu1*, sí cuenta con otros dos transportadores de potasio en su membrana plasmática (Trk1 y Hak1). La contribución de estos dos transportadores a la homeostasis de potasio parece ser suficiente para que la cepa SC5314 de *C. albicans* pueda adquirir el potasio necesario para sobrevivir en las condiciones ensayadas. Esto se encuentra en consonancia con los resultados obtenidos en otras levaduras o incluso en otras especies de *Candida*, como *C. glabrata*, una levadura que es capaz de crecer en condiciones limitantes de este catión contando únicamente con un solo transportador (Trk1) en su membrana (Caro *et al.*, 2020).

Por otra parte, y de forma similar con lo observado anteriormente, las cinéticas del transporte de rubidio en las dos cepas “silvestres” de *C. albicans* parecen indicar que ambas cuentan con un sistema de alta afinidad de transporte de potasio que se pone de manifiesto cuando las células se encuentran en condiciones limitantes de potasio en el medio mientras que, en condiciones con suficiencia de este catión, estaría más inhibido. Esto se puede observar en los resultados obtenidos en los distintos experimentos de transporte de rubidio, ya que someter a estas cepas al proceso de ayuno reflejó un aumento muy significativo en los valores obtenidos en el transporte de rubidio respecto a los valores que se obtuvieron cuando se utilizaron células en condiciones “normales” sin ayunar. Este cambio debido al ayuno se debe a que, de forma general y como se ha descrito anteriormente en otras publicaciones (*e.g.* Navarrete *et al.*, 2010), el proceso de ayuno de potasio activa las características de transporte en las levaduras y, en *C. albicans*, esto no es una excepción. Cabe señalar que, cuando se analizaron los resultados del transporte en la cepa 12C de *C. albicans*, existió lo que se denomina como “doble componente”. Esta cinética bifásica del transporte de potasio o rubidio se ha descrito previamente en otros organismos como plantas (Epstein, 1966), hongos (Ramos y Rodríguez-Navarro, 1985; Cabello-Hurtado, Blasco y Ramos, 2000) y levaduras (Ramos y Rodríguez-Navarro, 1986). Este doble componente se manifiesta cuando, en las representaciones de Lineweaver-Burk, aparecen curvas bifásicas (Figura 22), que parecen indicar la presencia de dos componentes distintos durante el transporte: un primer componente de alta afinidad y un segundo componente de baja afinidad. La existencia de varios componentes no es de extrañar, ya que esta cepa de *C. albicans* cuenta en su membrana con los tres transportadores de potasio (Trk1, Acu1 y Hak1), por lo que durante los experimentos de transporte y debido a la activación de estos transportadores provocada por el proceso de ayuno, podrían estar funcionando varios de ellos a la vez.

Otro aspecto fundamental para comprender estas dos cepas “silvestres” de *C. albicans* fue el estudio de su perfil transcriptómico. Para entender como las distintas condiciones de estrés abiótico podían afectar a los niveles de transcripción de los tres transportadores de potasio de la membrana plasmática de *C. albicans*, se sometió a ambas cepas a distintos factores de estrés abiótico como la salinidad, el pH o el ayuno

Discusión

de potasio. Los resultados obtenidos en condiciones de estrés salino y pH entre ambas cepas fueron dispares, lo cual hemos atribuido principalmente a que, aun tratándose del mismo microorganismo, siguen siendo cepas no isogénicas y, por lo tanto, puede existir diferencias en la respuesta a estos estreses abióticos. Sin embargo y aun teniendo en cuenta este factor, logramos observar comportamientos similares en la regulación transcripcional. De forma general, logramos observar que la expresión del gen *TRK1*, tanto en la cepa 12C como en la cepa SC5314, prácticamente no está regulada en las condiciones experimentales estudiadas. Este resultado coincide con lo observado anteriormente en otras levaduras como *S. cerevisiae* (Ariño *et al.*, 2010), *S. occidentalis* (Bañuelos *et al.*, 2000), *D. hansenii* (Prista *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2011) o *C. glabrata* (Caro *et al.*, 2019) donde no se ha encontrado evidencia experimental de la regulación transcripcional de *TRK1* bajo condiciones de estrés relacionadas con los cationes o el ayuno de éstos. Tampoco en el caso del hongo *Neurospora crassa* se ha podido demostrar la expresión constitutiva de este gen (Rivetta *et al.*, 2013). Por otra parte, también se ha podido observar que cuando el pH fue alterado a un pH más ácido (pH 4,5) ambas cepas respondieron de forma similar: incrementado la regulación transcripcional del gen que codifica el transportador *HAK1*. Esto concuerda con la función descrita de este transportador en otras levaduras como *S. occidentalis* donde se observó que Hak1 era funcional a pH ácido (Bañuelos *et al.*, 2000). Además de esto, ambas cepas coincidieron en un incremento en la expresión tanto de *ACU1* como de *HAK1* en condiciones de ayuno de potasio. Aunque los niveles de regulación difieren entre ellas, ambas cepas concuerdan en una enorme activación transcripcional de *ACU1*.

Tras estos experimentos, el camino lógico para poder estudiar la función de estos tres transportadores sería la obtención de una batería de mutantes en la cepa 12C de *C. albicans*, ya que esta cepa cuenta con los tres transportadores en su membrana plasmática. Sin embargo y hasta hace poco, la obtención de mutantes en este microorganismo ha sido considerada toda una odisea por parte de los investigadores debido principalmente a algunas peculiaridades que hacen a este microorganismo difícil de manipular genéticamente (Vyas *et al.*, 2015). Sin embargo, con la aparición en escena del sistema CRISPR/Cas9 se ha abierto una ventana a la edición y obtención de mutantes en este microorganismo. Para intentar obtener estos mutantes se ha realizado una

estancia internacional en la Universidad Técnica de Dinamarca donde se ha intentado adaptar esta tecnología a este microorganismo para intentar de esta forma obtener mutantes de los distintos transportadores de potasio de la membrana plasmática de *C. albicans*. Para ello, y como se ha descrito anteriormente, hemos hecho uso de un sistema CRISPR/Cas9 que ha sido utilizado con éxito en la manipulación genética de la levadura *D. hansenii* (Strucko *et al.*, 2021). Las principales razones tras esta decisión se deben principalmente a dos características principales de esta levadura: *D. hansenii* perteneciente al clado CTG y es muy cercana evolutivamente a *C. albicans* (Figura 8) y al poco tiempo para poner a punto esta metodología (3 meses).

Para adaptar esta tecnología a *C. albicans* hemos llevado a cabo varios intentos de transformación con el plásmido en su forma nativa (circular) y con el plásmido en forma lineal y adicionando las secuencias teloméricas de *C. albicans* en sus extremos. La idea de usar este plásmido de forma lineal se basa en que *C. albicans* es capaz de integrar en su genoma el plásmido lo que no permitiría eliminar, en la mayoría de los casos, el plásmido tras realizar la mutación (Bijlani *et al.*, 2019). Aun con esto, nuestra cepa de *C. albicans* integraba en la mayoría de los casos el plásmido, tanto en su forma circular como lineal, por lo que no había una diferencia significativa en usar una u otra forma. Este resultado puede deberse a que los autores de este artículo trabajaban con otro tipo de cepas de *C. albicans* (BWP17 y SN76) que, aunque son derivadas de la cepa SC5314, no son isogénicas de la cepa 12C que se utilizó en estos ensayos. Aún con estos problemas, se llevaron a cabo varios intentos para adaptar esta tecnología a esta cepa de *C. albicans* pero, pese a nuestros esfuerzos, y debido al poco tiempo de la estancia no se logró obtener finalmente estos mutantes.

Papel de los transportadores Trk1, Acu1 y Hak1 en la homeostasis de cationes

Debido a los problemas comentados en el apartado anterior, para poder caracterizar el papel que tienen estos tres genes en la homeostasis de potasio de forma individual, hemos dirigido nuestros esfuerzos a caracterizarlos mediante la expresión heteróloga en la cepa mutante de *S. cerevisiae* BYT12, carente de sus transportadores endógenos. Adicionalmente, hemos utilizado la única cepa disponible hasta la fecha de *C. albicans* que carece de un transportador de potasio de su membrana plasmática: Hak1 (Noble *et*

Discusión

al., 2010). Esta cepa deriva de la cepa SC5314 por lo que tampoco cuenta con el transportador *Acu1* debido a la mutación descrita por en el artículo de Benito *et al.*, 2004, por lo tanto, resulta ser una cepa ideal para determinar la función del transportador Trk1.

Todos los resultados obtenidos parecen indicar que el transportador Trk1 es el transportador con mayor influencia en la homeostasis de potasio. La expresión heteróloga de este transportador en la cepa BYT12 de *S. cerevisiae* resultó ser la más eficaz de los tres transportadores de *C. albicans* en la restauración de la capacidad de crecimiento, absorción y transporte de potasio, así como en otorgarle a la cepa BYT12 la capacidad de tolerar cationes tóxicos. Por otra parte, hemos encontrado que este transportador parece estar relacionado con otros fenotipos adicionales ya que, la expresión heteróloga de este transportador parece otorgar a la cepa BYT12 un aumento en la tolerancia a sustancias tóxicas como el 2,4 Dinitrofenol y la cafeína. Esta influencia en la homeostasis de potasio en levaduras sugiere que los transportadores Trk son de suma importancia para estos organismos, ya que se encuentran en la membrana plasmática de todas las levaduras conocidas, mientras que otros transportadores pueden estar o no presentes (Ramos *et al.*, 2011). Aunque Trk1 parece ser fundamental para la correcta homeostasis de potasio, esto no significa que sea un gen completamente esencial. En una publicación anterior fue descrito que *TRK1* debía ser un gen esencial para *C. albicans* debido a la dificultad encontrada por los autores en la obtención de mutantes homocigotos para este gen (Baev *et al.*, 2004). Sin embargo, *TRK1* ha sido delecionado con éxito en otras levaduras como *S. cerevisiae* o *C. glabrata* (Pretezselyova *et al.*, 2010; Llopis-Torregrosa *et al.*, 2016) lo que hace difícil presuponer que este gen sea esencial para *C. albicans*. Además de esto, los resultados publicados en otro artículo más reciente describen *TRK1* como un gen no esencial para *C. albicans* (Segal *et al.*, 2018). Tras analizar los datos de ambos artículos, llegamos a la conclusión de que *TRK1* no es un gen esencial y que todo parece indicar que, en el artículo de 2004 (Baev *et al.*, 2004), los autores al intentar obtener mutantes del gen *TRK1* afectaron en el proceso al gen *IMP4*, un gen que se encuentra localizado corriente arriba a pocas pb de *TRK1* y que ha sido descrito como esencial (Segal *et al.*, 2018).

En cuanto al transportador *Acu1*, hemos podido comprobar que aun siendo un pseudogen para *C. albicans*, cuando es expresado de forma heteróloga en la cepa BYT12 de *S. cerevisiae*, es el segundo transportador en mejorar eficazmente las características de crecimiento, absorción y transporte de potasio en esta cepa. Además, este transportador parece otorgar, aunque en menor medida que *Trk1*, tolerancia a los cationes tóxicos sodio y litio.

Respecto al transportador *Hak1* y, como hemos mencionado anteriormente, la información que hemos obtenido ha sido mediante dos vías diferentes. Por una parte, mediante la expresión heteróloga y por otra mediante la caracterización de una cepa mutante de *C. albicans* de *Hak1*. Nuestros resultados apoyan la idea dada por otros autores (Bañuelos *et al.*, 1995; Haro *et al.*, 1999) de que este transportador actúa como un simportador de $K^{+}::H^{+}$, ya que hemos podido comprobar que su carencia en *C. albicans* parece afectar negativamente al crecimiento en condiciones limitantes de potasio cuando el pH es muy ácido (pH 3,0) respecto a la cepa con el transportador *Hak1* intacto. Los resultados de las cinéticas de transporte de la cepa mutante *hak1*- apoyan esta idea ya que, cuando se estudió el transporte de rubidio a distintos pHs, se pudo observar que la cepa mutante carente del transportador *Hak1* y, por tanto, solo con *Trk1* en su membrana plasmática, vio afectada su capacidad de transporte conforme el pH del medio disminuía a un pH más ácido (Tabla 19). Por otra parte, cuando fue expresado de forma heteróloga, este transportador mejoró las capacidades de crecimiento y absorción de potasio (sobre todo en condiciones ácidas) y transporte de potasio de la cepa BYT12 de *S. cerevisiae* aunque en menor medida que lo observado con los otros dos transportadores de *C. albicans* (Tabla 21).

Tanto la cepa que expresó *CaACU1* como la cepa que expresó *CaHAK1* muestran curvas bifásicas en su cinética de transporte de rubidio cuando las células fueron sometidas previamente al proceso de ayuno. Una explicación para estos resultados, aunque no demostrada hasta ahora, puede deberse a la capacidad de la cepa BYT12 de transportar potasio. Esta capacidad puede observarse en los resultados obtenidos en las cinéticas de transporte de rubidio, donde esta cepa aun sin expresar ningún transportador de potasio en su membrana todavía es capaz de transportar potasio, pero con una baja afinidad (Tabla 21). Además, esta cepa aun careciendo de sus transportadores *Trk1* y

Discusión

Trk2 puede crecer bajo condiciones con suficiente potasio externo (Figura 120). Por lo tanto, estas curvas bifásicas en las cinéticas de transporte podrían deberse a una primera fase de alta afinidad producida por la expresión heteróloga de los transportadores que estamos expresando en la cepa BYT12 mientras que la segunda fase con peor afinidad puede deberse al transporte endógeno original que la cepa BYT12 (Tabla 21).

Finalmente cabe mencionar que, los estudios de esta Tesis Doctoral pueden ayudarnos a comprender mejor la homeostasis de potasio de esta levadura y con ello, entender mejor el proceso por el cual las células de *C. albicans* son capaces de adquirir el potasio necesario para su supervivencia. Aún con estos resultados, es de vital importancia avanzar en el desarrollo de la edición genética en *C. albicans* y lograr de esta forma obtener mutantes de estos transportadores de potasio, que mediante su estudio y caracterización permitan comprender mejor el rol que tiene cada transportador de la membrana plasmática de *C. albicans* en la homeostasis de potasio de este microorganismo.

Conclusiones

1. Las cepas “silvestres” de la levadura *C. albicans* son capaces de crecer en un amplio rango de concentraciones de potasio, gracias a unos sistemas de transporte que funcionan de manera coordinada. Este comportamiento se ve muy poco afectado por cambios de pH del medio.
2. La presencia de Trk1 como único transportador funcional en *C. albicans* es suficiente para proporcionar a este microorganismo el potasio necesario para su crecimiento en condiciones estándar.
3. El transportador Hak1 de *C. albicans* le otorga ventajas en el crecimiento en condiciones limitantes de potasio cuando el medio externo es ácido.
4. El estudio de la regulación transcripcional de los transportadores de potasio de la membrana plasmática de *C. albicans* refleja que el nivel de transcrito de *TRK1* no está regulado transcripcionalmente de manera importante mientras que, tanto *HAK1* como *ACU1*, se estimulan principalmente por ayuno de potasio. La expresión de *ACU1* es activada de manera muy importante en estas condiciones.
5. La expresión de los transportadores de potasio de *C. albicans* en la cepa mutante BYT12 de *S. cerevisiae*, produce una mejora en el crecimiento en condiciones limitantes de potasio y absorción del potasio externo, incrementa la tolerancia al estrés salino y produce cambios en las características cinéticas del transporte. Los resultados obtenidos con la cepa que expresó *CaTRK1* indican, que este es el transportador más eficaz de *C. albicans* en todos estos aspectos.
6. Los transportadores Trk1, Acu1 y Hak1 contribuyen en diversa medida a la tolerancia a los cationes tóxicos sodio y litio.
7. La adaptación del sistema CRISPR en *C. albicans* es un proceso complejo y dada su complejidad requiere de muchos más esfuerzos para su puesta a punto.

Conclusions

1. The "wild type" strains of the yeast *C. albicans* are able to grow in a wide range of potassium concentrations, thanks to transport systems that work in a coordinated manner. This behavior is very little affected by changes in the pH of the medium.
2. The presence of Trk1 as the only functional transporter in *C. albicans* is sufficient to provide this microorganism with the potassium necessary for its growth under standard conditions.
3. The Hak1 transporter of *C. albicans* increases its growth in potassium-limiting conditions when the external medium is acidic.
4. The study of transcriptional regulation of plasma membrane potassium transporters in *C. albicans* reflects that the level of *TRK1* transcript is not significantly transcriptionally regulated while both *HAK1* and *ACU1* are mainly stimulated by potassium starvation. The expression of *ACU1* is activated in a very important way in these conditions.
5. The expression of the potassium transporters of *C. albicans* in the BYT12 mutant strain of *S. cerevisiae*, produces an improvement in growth in potassium-limiting conditions and absorption of external potassium, improve the tolerance to salt stress and produces changes in the kinetic characteristics of transport. Results obtained with the strain that expressed *CaTRK1* indicate that this is the most efficient transporter of *C. albicans* in all these aspects.
6. Trk1, Acu1, and Hak1 transporters contribute to varying degrees to tolerance to toxic sodium and lithium cations.
7. The adaptation of the CRISPR system in *C. albicans* is a complex process and, given its complexity, requires much more effort.

Bibliografía

- Achkar, J. M., & Fries, B. C. (2010). *Candida* infections of the genitourinary tract. *Clinical microbiology reviews*, 23(2), 253–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00076-09>
- Albuquerque, P., & Casadevall, A. (2012). Quorum sensing in fungi—a review. *Medical mycology*, 50(4), 337–345. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.652201>
- Almeida, R. S., Brunke, S., Albrecht, A., Thewes, S., Laue, M., Edwards, J. E., Filler, S. G., & Hube, B. (2008). The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS pathogens*, 4(11), e1000217. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000217>
- Andes, D., Nett, J., Oschel, P., Albrecht, R., Marchillo, K., & Pitula, A. (2004). Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infection and immunity*, 72(10), 6023–6031. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.6023-6031.2004>
- Ariño, J., Aydar, E., Drulhe, S., Ganser, D., Jorrín, J., Kahm, M., Krause, F., Petrezsélyová, S., Yenush, L., Zimmermannová, O., van Heusden, G. P., Kschischo, M., Ludwig, J., Palmer, C., Ramos, J., & Sychrová, H. (2014). Systems biology of monovalent cation homeostasis in yeast: the translucent contribution. *Advances in microbial physiology*, 64, 1–63. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800143-1.00001-4>
- Ariño, J., Ramos, J., & Sychrová, H. (2010). Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 74(1), 95–120. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00042-09>
- Armstrong, W. M., & Rothstein, A. (1964). Discrimination between alkali metal cations by yeast. I. effect of pH on uptake. *The Journal of general physiology*, 48(1), 61–71. <https://doi.org/10.1085/jgp.48.1.61>
- Armstrong, W. M., & Rothstein, A. (1967). Discrimination between alkali metal cations by yeast. II. Cation interactions in transport. *The Journal of general physiology*, 50(4), 967–988. <https://doi.org/10.1085/jgp.50.4.967>
- Ashraf, K. U., Josts, I., Mosbahi, K., Kelly, S. M., Byron, O., Smith, B. O., & Walker, D. (2016). The potassium binding protein Kbp is a cytoplasmic potassium sensor. *Structure (London, England: 1993)*, 24(5), 741–749. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.03.017>
- Baev, D., Rivetta, A., Vylkova, S., Sun, J. N., Zeng, G. F., Slayman, C. L., & Edgerton, M. (2004). The TRK1 potassium transporter is the critical effector for killing of *Candida albicans* by the cationic protein, Histatin 5. *The Journal of biological chemistry*, 279(53), 55060–55072. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411031200>
- Bailey, D. A., Feldmann, P. J., Bovey, M., Gow, N. A., & Brown, A. J. (1996). The *Candida albicans* HYR1 gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. *Journal of bacteriology*, 178(18), 5353–5360. <https://doi.org/10.1128/jb.178.18.5353-5360.1996>

Bibliografía

- Baker, C. R., Tuch, B. B., & Johnson, A. D. (2011). Extensive DNA-binding specificity divergence of a conserved transcription regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(18), 7493–7498. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019177108>
- Bamford, C. V., Nobbs, A. H., Barbour, M. E., Lamont, R. J., & Jenkinson, H. F. (2015). Functional regions of *Candida albicans* hyphal cell wall protein Als3 that determine interaction with the oral bacterium *Streptococcus gordonii*. *Microbiology (Reading, England)*, 161(Pt 1), 18–29. <https://doi.org/10.1099/mic.0.083378-0>
- Bañuelos, M. A., Klein, R. D., Alexander-Bowman, S. J., & Rodríguez-Navarro, A. (1995). A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *The EMBO journal*, 14(13), 3021–3027. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07304.x>
- Bañuelos, M. A., Madrid, R., & Rodríguez-Navarro, A. (2000). Individual functions of the HAK and TRK potassium transporters of *Schwanniomyces occidentalis*. *Molecular microbiology*, 37(3), 671–679. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02040.x>
- Barwell, K. J., Boysen, J. H., Xu, W., & Mitchell, A. P. (2005). Relationship of DFG16 to the Rim101p pH response pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Eukaryotic cell*, 4(5), 890–899. <https://doi.org/10.1128/EC.4.5.890-899.2005>
- Benito, B., Garciadeblás, B., Fraile-Escanciano, A., & Rodríguez-Navarro, A. (2011). Potassium and sodium uptake systems in fungi. The transporter diversity of *Magnaporthe oryzae*. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 48(8), 812–822. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.03.002>
- Benito, B., Garciadeblás, B., Schreier, P., & Rodríguez-Navarro, A. (2004). Novel p-type ATPases mediate high-affinity potassium or sodium uptake in fungi. *Eukaryotic cell*, 3(2), 359–368. <https://doi.org/10.1128/EC.3.2.359-368.2004>
- Bensasson, D., Dicks, J., Ludwig, J. M., Bond, C. J., Elliston, A., Roberts, I. N., & James, S. A. (2019). Diverse lineages of *Candida albicans* live on old oaks. *Genetics*, 211(1), 277–288. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301482>
- Berkhout C M. (1923). *De Schimmelgelschten Monilia, Oidium, Oospora en Torula*. Thesis, Rijksuniversiteit te Utrecht, 1923.
- Berman, J., & Sudbery, P. E. (2002). *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature reviews' Genetics*, 3(12), 918–930. <https://doi.org/10.1038/nrg948>
- Biochemistry 4th Edition by Garrett, Reginald H., Grisham, Charles M. [Hardcover] (4th ed.). Brooks/Cole, Hardcover (2008).
- Borst-Pauwels G. W. (1981). Ion transport in yeast. *Biochimica et biophysica acta*, 650(2-3), 88–127. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(81\)90002-2](https://doi.org/10.1016/0304-4157(81)90002-2)
- Breton, A., & Surdin-Kerjan, Y. (1977). Sulfate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: biochemical and genetic study. *Journal of bacteriology*, 132(1), 224–232. <https://doi.org/10.1128/jb.132.1.224-232.1977>

- Brock M. Fungal metabolism in host niches. *Current opinion in microbiology*. 2009 Aug;12(4):371-6. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.05.004>
- Brown, A. J., Budge, S., Kaloriti, D., Tillmann, A., Jacobsen, M. D., Yin, Z., Ene, I. V., Bohovych, I., Sandai, D., Kastora, S., Potrykus, J., Ballou, E. R., Childers, D. S., Shahana, S., & Leach, M. D. (2014). Stress adaptation in a pathogenic fungus. *The journal of experimental biology*, 217(Pt 1), 144–155. <https://doi.org/10.1242/jeb.088930>
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Science translational medicine*, 4(165), 165rv13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>
- Buffo, J., Herman, M. A., & Soll, D. R. (1984). A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia*, 85(1-2), 21–30. <https://doi.org/10.1007/BF00436698>
- Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A., Sakthikumar, S., Munro, C. A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J. L., Agrafioti, I., Arnaud, M. B., Bates, S., Brown, A. J., Brunke, S., Costanzo, M. C., Fitzpatrick, D. A., de Groot, P. W., Harris, D., Hoyer, L. L., ... Cuomo, C. A. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, 459(7247), 657–662. <https://doi.org/10.1038/nature08064>
- Cabello-Hurtado, F., Blasco, G. J., & Ramos, J. (2000). Potassium and sodium fluxes in the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* var. lini. *Current microbiology*, 41(5), 363–367. <https://doi.org/10.1007/s002840010150>
- Cabrera, E., Álvarez, M. C., Martín, Y., Siverio, J. M., & Ramos, J. (2012). K(+) uptake systems in the yeast *Hansenula polymorpha*. Transcriptional and post-translational mechanisms involved in high-affinity K(+) transporter regulation. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 49(9), 755–763. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.06.008>
- Calero, F., Gómez, N., Ariño, J., & Ramos, J. (2000). Trk1 and Trk2 define the major K(+) transport system in fission yeast. *Journal of bacteriology*, 182(2), 394–399. <https://doi.org/10.1128/JB.182.2.394-399.2000>
- Cannon, R. D., & Chaffin, W. L. (1999). Oral colonization by *Candida albicans*. *Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 10(3), 359–383. <https://doi.org/10.1177/10454411990100030701>
- Chen, H., Zhou, X., Ren, B., & Cheng, L. (2020). The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*, 11(1), 337–348. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1748930>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Conway, E. J., & Duggan, F. (1958). A cation carrier in the yeast cell wall. *The Biochemical journal*, 69(2), 265–274. <https://doi.org/10.1042/bj0690265>
- Conway, E. J., & O'malley, E. (1946). The nature of the cation exchanges during yeast fermentation, with formation of 0.02n-H ion. *The biochemical journal*, 40(1), 59–67.

Bibliográfia

- Corratgé-Faillie, C., Jabnoue, M., Zimmermann, S., Véry, A. A., Fizames, C., & Sentenac, H. (2010). Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 67(15), 2511–2532. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0317-7>
- Davis, D., Wilson, R. B., & Mitchell, A. P. (2000). RIM101-dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Molecular and cellular biology*, 20(3), 971–978. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.3.971-978.2000>
- de Groot, P. W., Bader, O., de Boer, A. D., Weig, M., & Chauhan, N. (2013). Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. *Eukaryotic cell*, 12(4), 470–481. <https://doi.org/10.1128/EC.00364-12>
- d'Enfert, C., Kaune, A. K., Alaban, L. R., Chakraborty, S., Cole, N., Delavy, M., Kosmala, D., Marsaux, B., Fróis-Martins, R., Morelli, M., Rosati, D., Valentine, M., Xie, Z., Emritloll, Y., Warn, P. A., Bequet, F., Bougnoux, M. E., Bornes, S., Gresnigt, M. S., Hube, B., ... Brown, A. (2021). The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS microbiology reviews*, 45(3), fuaa060. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa060>
- Dongari-Bagtzoglou, A., Kashleva, H., Dwivedi, P., Diaz, P., & Vasilakos, J. (2009). Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. *PloS one*, 4(11), e7967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007967>
- Douglas L. J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in microbiology*, 11(1), 30–36. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(02\)00002-1](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(02)00002-1)
- Durell, S. R., Hao, Y., Nakamura, T., Bakker, E. P., & Guy, H. R. (1999). Evolutionary relationship between K(+) channels and symporters. *Biophysical journal*, 77(2), 775–788. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)76931-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)76931-6)
- Elicharová, H., Hušeková, B., & Sychrová, H. (2016). Three *Candida albicans* potassium uptake systems differ in their ability to provide *Saccharomyces cerevisiae* trk1trk2 mutants with necessary potassium. *FEMS yeast research*, 16(4), fow039. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow039>
- Ene, I. V., & Bennett, R. J. (2009). Hwp1 and related adhesins contribute to both mating and biofilm formation in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell*, 8(12), 1909–1913. <https://doi.org/10.1128/EC.00245-09>
- Enfert, C., & Hube, B. (2007). *Candida*: Comparative and functional genomics. Wymondham, Norfolk, U.K: Caister Academic Press.
- Epstein, E. (1966). Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants, *Nature* 212, 1324–1327. <https://doi.org/10.1038/2121324a0>.
- Epstein, W., & Kim, B. S. (1971). Potassium transport loci in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 108(2), 639–644. <https://doi.org/10.1128/jb.108.2.639-644.1971>
- Fanning, S., & Mitchell, A. P. (2012). Fungal biofilms. *PLoS pathogens*, 8(4), e1002585. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002585>
- Finkel, J. S., & Mitchell, A. P. (2011). Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature reviews. Microbiology*, 9(2), 109–118. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2475>

- Frohner IE, Bourgeois C, Yatsyk K, Majer O, Kuchler K. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Molecular microbiology*. 2009 Jan;71(1):240-52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06528.x>
- Gaber, R. F., Styles, C. A., & Fink, G. R. (1988). *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 8(7), 2848–2859. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.7.2848-2859.1988>
- Ganguly, S., & Mitchell, A. P. (2011). Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology*, 14(4), 380–385. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.06.001>
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., & Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular biology of the cell*, 11(12), 4241–4257. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4241>
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(39), E2579–E2586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
- Ghannoum, M. A., Jurevic, R. J., Mukherjee, P. K., Cui, F., Sikaroodi, M., Naqvi, A., & Gillevet, P. M. (2010). Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS pathogens*, 6(1), e1000713. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000713>
- Ghosh S, Navarathna DH, Roberts DD, Cooper JT, Atkin AL, Petro TM, Nickerson KW. Arginine-induced germ tube formation in *Candida albicans* is essential for escape from murine macrophage line RAW 264.7. *Infection and immunity*. 2009 Apr;77(4):1596-605. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01813.x>
- Gierth, M., & Mäser, P. (2007). Potassium transporters in plants--involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS letters*, 581(12), 2348–2356. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.035>
- 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., & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5287), 546–567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>
- Gómez, M. J., Luyten, K., & Ramos, J. (1996). The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology letters*, 135(2-3), 157–160. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb07982.x>
- Greiner, T., Ramos, J., Alvarez, M. C., Gurnon, J. R., Kang, M., Van Etten, J. L., Moroni, A., & Thiel, G. (2011). Functional HAK/KUP/KT-like potassium transporter encoded by *Chlorella* viruses. *The plant journal: for cell and molecular biology*, 68(6), 977–986. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04748.x>
- Gunther, L. S., Martins, H. P., Gimenes, F., Abreu, A. L., Consolaro, M. E., & Svidzinski, T. I. (2014). Prevalence of *Candida albicans* and non-albicans isolates from vaginal secretions: comparative

Bibliografía

- evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina*, 132(2), 116–120. <https://doi.org/10.1590/1516-3180.2014.1322640>
- Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F., & Nelson, K. E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS computational biology*, 1(6), e60. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010060>
 - Haro, R., Sainz, L., Rubio, F., & Rodríguez-Navarro, A. (1999). Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology*, 31(2), 511–520. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01192.x>
 - Haro, R., Sainz, L., Rubio, F., & Rodríguez-Navarro, A. (1999). Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology*, 31(2), 511–520. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01192.x>
 - Harriott, M. M., Lilly, E. A., Rodriguez, T. E., Fidel, P. L., & Noverr, M. C. (2010). *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 12), 3635–3644. <https://doi.org/10.1099/mic.0.039354-0>
 - Hirakawa, M. P., Martinez, D. A., Sakthikumar, S., Anderson, M. Z., Berlin, A., Gujja, S., Zeng, Q., Zisson, E., Wang, J. M., Greenberg, J. M., Berman, J., Bennett, R. J., & Cuomo, C. A. (2015). Genetic and phenotypic intra-species variation in *Candida albicans*. *Genome research*, 25(3), 413–425. <https://doi.org/10.1101/gr.174623.114>
 - Holtmann, G., Bakker, E. P., Uozumi, N., & Bremer, E. (2003). KtrAB and KtrCD: two K⁺ uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *Journal of bacteriology*, 185(4), 1289–1298. <https://doi.org/10.1128/JB.185.4.1289-1298.2003>
 - Horie, T., Yoshida, K., Nakayama, H., Yamada, K., Oiki, S., & Shinmyo, A. (2001). Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *The plant journal: for cell and molecular biology*, 27(2), 129–138. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01077.x>
 - Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5962), 167–170. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>
 - Hromatka BS, Noble SM, Johnson AD. Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the *YHB1* gene in nitrosative stress and virulence. *Molecular biology of the cell*. 2005 Oct;16(10):4814-26. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-05-0435>
 - Hu, L., Taekkeun, T. J., Kim, J. K., & Liu, G. (2017). Effect of caffeine concentration and incubation time on the cell concentration of wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *The expedition*, 6.
 - Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M., & Schäfer, W. (2000). Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Archives of microbiology*, 174(5), 362–374. <https://doi.org/10.1007/s002030000218>

- Hwang, C.S., Rhie, G.E., Oh, J.H., Huh, W.K., Yim, H.S., & Kang, S.O. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology (Reading)*. 2002 Nov;148(Pt 11):3705-3713. doi: 10.1099/00221287-148-11-3705. PMID: 12427960.
- Jacobsen, I. D., Wilson, D., Wächtler, B., Brunke, S., Naglik, J. R., & Hube, B. (2012). *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert review of anti-infective therapy*, 10(1), 85–93. <https://doi.org/10.1586/eri.11.152>
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., & Marraffini, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature biotechnology*, 31(3), 233–239. <https://doi.org/10.1038/nbt.2508>
- Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B. B., Newport, G., Thorstenson, Y. R., Agabian, N., Magee, P. T., Davis, R. W., & Scherer, S. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(19), 7329–7334. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401648101>
- Kabir, M. A., Hussain, M. A., & Ahmad, Z. (2012). *Candida albicans*: A model organism for studying fungal pathogens. *ISRN microbiology*, 2012, 538694. <https://doi.org/10.5402/2012/538694>
- Kale, D., Spurny, P., Shamayeva, K., Spurna, K., Kahoun, D., Ganser, D., Zayats, V., & Ludwig, J. (2019). The *S. cerevisiae* cation translocation protein Trk1 is functional without its "long hydrophilic loop" but LHL regulates cation translocation activity and selectivity. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, 1861(8), 1476–1488. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2019.06.010>
- Kennedy, M. J., & Volz, P. A. (1985). Ecology of *Candida albicans* gut colonization: inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. *Infection and immunity*, 49(3), 654–663. <https://doi.org/10.1128/iai.49.3.654-663.1985>
- Kioshima, E. S., Shinobu-Mesquita, C. S., Abadio, A., Felipe, M., Svidzinski, T., & Maignet, B. (2019). Selection of potential anti-adhesion drugs by *in silico* approaches targeted to ALS3 from *Candida albicans*. *Biotechnology letters*, 41(12), 1391–1401. <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02747-6>
- Ko, C. H., & Gaber, R. F. (1991). *TRK1* and *TRK2* encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 11(8), 4266–4273. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.8.4266-4273.1991>
- Kuroda, T., Bihler, H., Bashi, E., Slayman, C. L., & Rivetta, A. (2004). Chloride channel function in the yeast TRK-potassium transporters. *The Journal of membrane biology*, 198(3), 177–192. <https://doi.org/10.1007/s00232-004-0671-1>
- Leigh, R. A., & Wyn Jones, R. G. (1984). A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *The new phytologist*, 97(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1984.tb04103.x>
- Li, W., & Mitchell, A. P. (1997). Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics*, 145(1), 63–73. <https://doi.org/10.1093/genetics/145.1.63>

Bibliografía

- Lichtenberg-Fraté, H., Reid, J. D., Heyer, M., & Höfer, M. (1996). The *SpTRK* gene encodes a potassium-specific transport protein TKHp in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of membrane biology*, *152*(2), 169–181. <https://doi.org/10.1007/s002329900095>
- Liu, W., Fairbairn, D. J., Reid, R. J., & Schachtman, D. P. (2001). Characterization of two *HKT1* homologues from *Eucalyptus camaldulensis* that display intrinsic osmosensing capability. *Plant physiology*, *127*(1), 283–294. <https://doi.org/10.1104/pp.127.1.283>
- Llopis-Torregrosa, V., Hušková, B., & Sychrová, H. (2016). Potassium uptake mediated by Trk1 is crucial for *Candida glabrata* growth and fitness. *PloS one*, *11*(4), e0153374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153374>
- Lorenz, M.C., Bender, J.A., & Fink, G.R. (2004). Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryotic Cell*, *3*(5), 1076-87. <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1076-1087.2004>
- Marc, G., Araniciu, C., Oniga, S. D., Vlase, L., Pîrnău, A., Duma, M., Măruțescu, L., Chifiriuc, M. C., & Oniga, O. (2018). New *N*-(oxazolylmethyl)-thiazolidinedione active against *Candida albicans* biofilm: potential als proteins inhibitors. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *23*(10), 2522. <https://doi.org/10.3390/molecules23102522>
- Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2010). CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature reviews Genetics*, *11*(3), 181–190. <https://doi.org/10.1038/nrg2749>
- Martchenko, M., Alarco, A.M., Harcus, D., & Whiteway M. (2004) Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Molecular biology of the cell*, *15*(2), 456-67. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-03-0179>
- Martínez, J. L., Sychrova, H., & Ramos, J. (2011). Monovalent cations regulate expression and activity of the Hak1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal genetics and biology: FG & B*, *48*(2), 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.06.013>
- Mavor, A. L., Thewes, S., & Hube, B. (2005). Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Current drug targets*, *6*(8), 863–874. <https://doi.org/10.2174/138945005774912735>
- McCreight, M. C., Warnock, D. W., & Martin, M. V. (1985). Resistogram typing of *Candida albicans* isolates from oral and cutaneous sites in irradiated patients. *Sabouraudia*, <https://doi.org/10.1080/00362178585380591>
- Melkikh, A., & Sutormina, M. (2008). Model of active transport of ions in cardiac cell. *Journal of Theoretical Biology*, *252*(2), 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.02.006>
- Miranda, L. N., van der Heijden, I. M., Costa, S. F., Sousa, A. P., Sienna, R. A., Gobara, S., Santos, C. R., Lobo, R. D., Pessoa, V. P., Jr, & Levin, A. S. (2009). *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *The Journal of hospital infection*, *72*(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.02.009>
- Miranda, M., Bashi, E., Vylkova, S., Edgerton, M., Slayman, C., & Rivetta, A. (2009). Conservation and dispersion of sequence and function in fungal TRK potassium transporters: focus on *Candida albicans*. *FEMS yeast research*, *9*(2), 278–292. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00471.x>

- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, *60*(2), 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Mojica, F., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology (Reading, England)*, *155*(Pt 3), 733–740. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023960-0>
- Monika, S., Małgorzata, B., & Zbigniew, O. (2017). Contribution of aspartic proteases in *Candida* virulence. Protease inhibitors against *Candida* Infections. *Current protein & peptide science*, *18*(10), 1050–1062. <https://doi.org/10.2174/1389203717666160809155749>
- Morio, F., Lombardi, L., & Butler, G. (2020). The CRISPR toolbox in medical mycology: State of the art and perspectives. *PLoS pathogens*, *16*(1), e1008201. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008201>
- Naglik, J. R., Challacombe, S. J., & Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews*, *67*(3), 400–428. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.400-428.2003>
- Nakamura, T., Yuda, R., Unemoto, T., & Bakker, E. P. (1998). KtrAB, a new type of bacterial K(+)-uptake system from *Vibrio alginolyticus*. *Journal of bacteriology*, *180*(13), 3491–3494. <https://doi.org/10.1128/JB.180.13.3491-3494.1998>
- Nash, A. K., Auchtung, T. A., Wong, M. C., Smith, D. P., Gesell, J. R., Ross, M. C., Stewart, C. J., Metcalf, G. A., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., Ajami, N. J., & Petrosino, J. F. (2017). The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome*, *5*(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0373-4>
- Navarrete, C., Petrezsélyová, S., Barreto, L., Martínez, J. L., Zahrádka, J., Ariño, J., Sychrová, H., & Ramos, J. (2010). Lack of main K⁺ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS yeast research*, *10*(5), 508–517. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00630.x>
- Nett, J. E., Lepak, A. J., Marchillo, K., & Andes, D. R. (2009). Time course global gene expression analysis of an *in vivo Candida* biofilm. *The journal of infectious diseases*, *200*(2), 307–313. <https://doi.org/10.1086/599838>
- Niewerth, M., & Korting, H. C. (2001). Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses*, *44*(9-10), 361–367. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2001.00685.x>
- Nobile, C. J., Schneider, H. A., Nett, J. E., Sheppard, D. C., Filler, S. G., Andes, D. R., & Mitchell, A. P. (2008). Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Current biology*, *18*(14), 1017–1024. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.06.034>
- Noble, S. M., French, S., Kohn, L. A., Chen, V., & Johnson, A. D. (2010). Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nature genetics*, *42*(7), 590–598. <https://doi.org/10.1038/ng.605>
- Odds, F. C. (1979). *Candida and candidosis*. Leicester University Press.

Bibliografía

- Ohama, T., Suzuki, T., Mori, M., Osawa, S., Ueda, T., Watanabe, K., & Nakase, T. (1993). Non-universal decoding of the leucine codon CUG in several *Candida* species. *Nucleic acids research*, 21(17), 4039–4045. <https://doi.org/10.1093/nar/21.17.4039>
- Orejas, M., Espeso, E. A., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst, H. N., Jr, & Peñalva, M. A. (1995). Activation of the *Aspergillus PacC* transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes & development*, 9(13), 1622–1632. <https://doi.org/10.1101/gad.9.13.1622>
- Petrezsélyová, S., Ramos, J., & Sychrová, H. (2011). Trk2 transporter is a relevant player in K⁺ supply and plasma-membrane potential control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia microbiologica*, 56(1), 23–28. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0009-1>
- Petrezselyova, S., Zahradka, J., & Sychrova, H. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance. *Fungal biology*, 114(2-3), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2009.11.002>
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews*, 20(1), 133–163. <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-06>
- Phan, Q. T., Myers, C. L., Fu, Y., Sheppard, D. C., Yeaman, M. R., Welch, W. H., Ibrahim, A. S., Edwards, J. E., Jr, & Filler, S. G. (2007). Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS biology*, 5(3), e64. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050064>
- Porta, A., Ramon, A. M., & Fonzi, W. A. (1999). PRR1, a homolog of *Aspergillus nidulans palF*, controls pH-dependent gene expression and filamentation in *Candida albicans*. *Journal of bacteriology*, 181(24), 7516–7523. <https://doi.org/10.1128/JB.181.24.7516-7523.1999>
- Pourcel, C., Salvignol, G., & Vergnaud, G. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 3), 653–663. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27437-0>
- Prista, C., González-Hernández, J. C., Ramos, J., & Loureiro-Dias, M. C. (2007). Cloning and characterization of two K⁺ transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology (Reading, England)*, 153(Pt 9), 3034–3043. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/006080-0>
- Ramos, J. & Rodríguez-Navarro, A. (1985). Rubidium transport in *Neurospora crassa*. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, 815, 97-101. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90479-1](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90479-1)
- Ramos, J. & Rodríguez-Navarro, A. (1986). Regulation and interconversion of the potassium transport systems of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium transport. *European journal of biochemistry*, 154 (2), 307-311. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09398.x>
- Ramos, J., & Rodríguez-Navarro, A. (1986). Regulation and interconversion of the potassium transport systems of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium transport. *European journal of biochemistry*, 154(2), 307–311. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09398.x>

- Ramos, J., Ariño, J., & Sychrová, H. (2011). Alkali-metal-cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species. *FEMS microbiology letters*, 317(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02214.x>
- Ramos, J., Haro, R., & Rodríguez-Navarro, A. (1990). Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta*, 1029(2), 211–217. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90156-i](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90156-i)
- Ramos, J., Rodríguez-Navarro, A. (1985). Rubidium transport in *Neurospora crassa*, *Biochimica et biophysica acta* 815, 97–101. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90479-1](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90479-1).
- Ramos, J., Sychrová, H., & Kschischo, M. (2015). Yeast membrane transport. Springer Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6>
- Rhoads, D. B., Waters, F. B., & Epstein, W. (1976). Cation transport in *Escherichia coli*. VIII. Potassium transport mutants. *The journal of general physiology*, 67(3), 325–341. <https://doi.org/10.1085/jgp.67.3.325>
- Robin, C. (1821-1885). A. du texte. (1853). *Histoire naturelle des végétaux parasites qui croissent sur l'homme et sur les animaux vivants / par Charles Robin*, Paris. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.59045>
- Rodríguez-Navarro, A., & Ramos, J. (1984). Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 159(3), 940–945. <https://doi.org/10.1128/jb.159.3.940-945.1984>
- Ruiz-Castilla, F. J., Bieber, J., Caro, G., Michán, C., Sychrova, H., & Ramos, J. (2021). Regulation and activity of CaTrk1, CaAcu1 and CaHak1, the three plasma membrane potassium transporters in *Candida albicans*. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, 1863(1), 183486. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183486>
- Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology*, 32(4), 347–355. <https://doi.org/10.1038/nbt.2842>
- Santos, M. A., & Tuite, M. F. (1995). The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic acids research*, 23(9), 1481–1486. <https://doi.org/10.1093/nar/23.9.1481>
- Sapranauskas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 39(21), 9275–9282. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr606>
- Sashital, D. G., Wiedenheft, B., & Doudna, J. A. (2012). Mechanism of foreign DNA selection in a bacterial adaptive immune system. *Molecular cell*, 46(5), 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.03.020>
- Saville, S. P., Lazzell, A. L., Monteagudo, C., & Lopez-Ribot, J. L. (2003). Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryotic cell*, 2(5), 1053–1060. <https://doi.org/10.1128/EC.2.5.1053-1060.2003>
- Schachtman, D. P., & Schroeder, J. I. (1994). Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature*, 370(6491), 655–658. <https://doi.org/10.1038/370655a0>

Bibliografía

- Schleyer, M., & Bakker, E. P. (1993). Nucleotide sequence and 3'-end deletion studies indicate that the K(+)-uptake protein kup from *Escherichia coli* is composed of a hydrophobic core linked to a large and partially essential hydrophilic C terminus. *Journal of bacteriology*, 175(21), 6925–6931. <https://doi.org/10.1128/jb.175.21.6925-6931.1993>
- Schlösser, A., Kluttig, S., Hamann, A., & Bakker, E. P. (1991). Subcloning, nucleotide sequence, and expression of *trkG*, a gene that encodes an integral membrane protein involved in potassium uptake via the Trk system of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 173(10), 3170–3176. <https://doi.org/10.1128/jb.173.10.3170-3176.1991>
- Segal, E. S., Gritsenko, V., Levitan, A., Yadav, B., Dror, N., Steenwyk, J. L., Silberberg, Y., Mielich, K., Rokas, A., Gow, N., Kunze, R., Sharan, R., & Berman, J. (2018). Gene essentiality analyzed by *in vivo* transposon mutagenesis and machine learning in a stable haploid isolate of *Candida albicans*. *mBio*, 9(5), e02048-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02048-18>
- Shabala, S., Demidchik, V., Shabala, L., Cuin, T. A., Smith, S. J., Miller, A. J., Davies, J. M., & Newman, I. A. (2006). Extracellular Ca²⁺ ameliorates NaCl-induced K⁺ loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane K⁺-permeable channels. *Plant physiology*, 141(4), 1653–1665. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082388>
- Stříbný, J., Kinclová-Zimmermannová, O., & Sychrová, H. (2012). Potassium supply and homeostasis in the osmotolerant non-conventional yeasts *Zygosaccharomyces rouxii* differ from *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*, 58(5-6), 255–264. <https://doi.org/10.1007/s00294-012-0381-7>
- Sudbery P. E. (2011). Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature reviews. Microbiology*, 9(10), 737–748. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2636>
- Swidergall, M., & Ernst, J. F. (2014). Interplay between *Candida albicans* and the antimicrobial peptide armory. *Eukaryotic cell*, 13(8), 950–957. <https://doi.org/10.1128/EC.00093-14>
- Takase, K., Kakinuma, S., Yamato, I., Konishi, K., Igarashi, K., & Kakinuma, Y. (1994). Sequencing and characterization of the *ntp* gene cluster for vacuolar-type Na(+)-translocating ATPase of *Enterococcus hirae*. *The Journal of biological chemistry*, 269(15), 11037–11044. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)78088-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)78088-0)
- Tascón, I., Sousa, J. S., Corey, R. A., Mills, D. J., Griwatz, D., Aumüller, N., Mikusevic, V., Stansfeld, P. J., Vonck, J., & Hänel, I. (2020). Structural basis of proton-coupled potassium transport in the KUP family. *Nature communications*, 11(1), 626. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14441-7>
- Tholema, N., Bakker, E. P., Suzuki, A., & Nakamura, T. (1999). Change to alanine of one out of four selectivity filter glycines in KtrB causes a two orders of magnitude decrease in the affinities for both K⁺ and Na⁺ of the Na⁺ dependent K⁺ uptake system KtrAB from *Vibrio alginolyticus*. *FEBS letters*, 450(3), 217–220. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00504-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00504-9)
- Uozumi, N., Kim, E. J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker, E. P., Nakamura, T., & Schroeder, J. I. (2000). The *Arabidopsis HKT1* gene homolog mediates inward Na(+) currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na(+) uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant physiology*, 122(4), 1249–1259. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1249>

- Uppuluri, P., Chaturvedi, A. K., Srinivasan, A., Banerjee, M., Ramasubramaniam, A. K., Köhler, J. R., Kadosh, D., & Lopez-Ribot, J. L. (2010). Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS pathogens*, 6(3), e1000828. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000828>
- Uthayakumar, D., Sharma, J., Wensing, L., & Shapiro, R. S. (2021). CRISPR-Based Genetic Manipulation of *Candida* Species: historical perspectives and current approaches. *Frontiers in genome editing*, 2, 606281. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2020.606281>
- Verstrepen, K. J., & Klis, F. M. (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular microbiology*, 60(1), 5–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05072.x>
- Villa, S., Hamideh, M., Weinstock, A., Qasim, M. N., Hazbun, T. R., Sellam, A., Hernday, A. D., & Thangamani, S. (2020). Transcriptional control of hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. *FEMS yeast research*, 20(1), foaa005. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa005>
- Vyas, V. K., Barrasa, M. I., & Fink, G. R. (2015). A *Candida albicans* CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families. *Science advances*, 1(3), e1500248. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500248>
- Wächtler, B., Citiulo, F., Jablonowski, N., Förster, S., Dalle, F., Schaller, M., Wilson, D., & Hube, B. (2012). *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PloS one*, 7(5), e36952. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036952>
- Wang, J., Li, J., Zhao, H., Sheng, G., Wang, M., Yin, M., & Wang, Y. (2015). Structural and mechanistic basis of PAM-Dependent spacer acquisition in CRISPR-Cas systems. *Cell*, 163(4), 840–853. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.008>
- Watanabe, H., Azuma, M., Igarashi, K., & Ooshima, H. (2006). Relationship between cell morphology and intracellular potassium concentration in *Candida albicans*. *The Journal of antibiotics*, 59(5), 281–287. <https://doi.org/10.1038/ja.2006.39>
- Wysong, D.R., Christin, L., Sugar, A.M., Robbins, P.W., & Diamond, R.D. (1998). Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infection immunology*, 66(5):1953-61. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.5.1953-1961.1998>
- Xie, Z., Thompson, A., Sobue, T., Kashleva, H., Xu, H., Vasilakos, J., & Dongari-Bagtzoglou, A. (2012). *Candida albicans* biofilms do not trigger reactive oxygen species and evade neutrophil killing. *The journal of infectious diseases*, 206(12), 1936–1945. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis607>
- Zayats, V., Stockner, T., Pandey, S. K., Wörz, K., Ettrich, R., & Ludwig, J. (2015). A refined atomic scale model of the *Saccharomyces cerevisiae* K⁺-translocation protein Trk1p combined with experimental evidence confirms the role of selectivity filter glycines and other key residues. *Biochimica et biophysica acta*, 1848(5), 1183–1195. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.02.007>
- Zwolińska-Wcisło, M., Budak, A., Trojanowska, D., Bogdał, J., & Stachura, J. (1998). Fungal colonization of the stomach and its clinical relevance. *Mycoses*, 41(7-8), 327–334. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1998.tb00346.x>

ANEXO I: Datos
suplementarios y estadística

Capítulo I: Homeostasis de potasio en cepas “silvestres” de *Candida albicans*.

Efecto de la concentración de KCl y el pH sobre la constante específica de crecimiento de las cepas de *C. albicans* 12C y SC5314 (Figura 18).

Crecimiento (μ) <i>C. albicans</i> 12C			
Concentración KCl (mM)	pH 4,5	pH 5,8	pH 7,5
0,02	0,092 \pm 0,001	0,091 \pm 0,008	0,124 \pm 0,002
0,10	0,152 \pm 0,010	0,166 \pm 0,001	0,127 \pm 0,002
0,25	0,157 \pm 0,017	0,147 \pm 0,001	0,147 \pm 0,002
0,50	0,155 \pm 0,006	0,164 \pm 0,001	0,150 \pm 0,002
0,75	0,184 \pm 0,009	0,182 \pm 0,001	0,176 \pm 0,003
1,00	0,186 \pm 0,001	0,202 \pm 0,001	0,183 \pm 0,003
2,50	0,186 \pm 0,001	0,202 \pm 0,001	0,187 \pm 0,004
5,00	0,186 \pm 0,002	0,201 \pm 0,002	0,187 \pm 0,004

Crecimiento (μ) <i>C. albicans</i> SC5314			
Concentración KCl (mM)	pH 4,5	pH 5,8	pH 7,5
0,02	0,015 \pm 0,001	0,015 \pm 0,004	0,013 \pm 0,001
0,10	0,065 \pm 0,001	0,075 \pm 0,002	0,070 \pm 0,001
0,25	0,110 \pm 0,020	0,113 \pm 0,008	0,090 \pm 0,009
0,50	0,121 \pm 0,001	0,168 \pm 0,019	0,139 \pm 0,013
0,75	0,175 \pm 0,013	0,182 \pm 0,003	0,152 \pm 0,006
1,00	0,171 \pm 0,005	0,183 \pm 0,005	0,157 \pm 0,005
2,50	0,180 \pm 0,003	0,187 \pm 0,001	0,159 \pm 0,007
5,00	0,194 \pm 0,012	0,195 \pm 0,008	0,168 \pm 0,010

Efecto de la concentración de NaCl y LiCl sobre la constante específica de crecimiento de las cepas de *C. albicans* 12C y SC5314 (Figura 20).

Crecimiento (μ)		
Concentración NaCl (M)	<i>C. albicans</i> 12C	<i>C. albicans</i> SC5314
0,00	0,170 \pm 0,017	0,173 \pm 0,004
0,25	0,159 \pm 0,003	0,087 \pm 0,003
0,50	0,158 \pm 0,004	0,076 \pm 0,011
0,75	0,127 \pm 0,016	0,074 \pm 0,001
1,00	0,0735 \pm 0,009	0,062 \pm 0,001

Crecimiento (μ)		
Concentración LiCl (M)	<i>C. albicans</i> 12C	<i>C. albicans</i> SC5314
0,00	0,159 \pm 0,002	0,173 \pm 0,003
0,10	0,081 \pm 0,013	0,014 \pm 0,001
0,15	0,039 \pm 0,003	0,015 \pm 0,002
0,20	0,018 \pm 0,001	0,012 \pm 0,002

Contenido de potasio intracelular en *C. albicans* 12C y SC5314 (Apartado 2, Capítulo 1 de Resultados).

Condiciones	12C	SC5314
Células normales vs. Células ayunadas	(:1,9) ***	(:1,9) ***

Contenido intracelular de sodio/litio y potasio en las cepas de *C. albicans* 12C y SC5314 (Tabla 17).

Condiciones	12C	SC5314
0,2 M NaCl	(:1,1) ns	(:1,2) ns
0,1 M LiCl	(x1,2) ns	(1,0) ns

Nota: Se muestra la diferencia de potasio interno entre las distintas condiciones.

Absorción del potasio externo a diferentes pHs en las cepas de *C. albicans* 12C y SC5314 (Figura 21).

Potasio externo (μM) <i>C. albicans</i> 12C			
Tiempo (min)	pH 4,5	pH 5,8	pH 7,5
00:00	24,432 \pm 1,466	25,418 \pm 1,525	25,049 \pm 2,254
02:00	22,144 \pm 1,329	24,198 \pm 1,452	23,040 \pm 1,382
04:00	20,363 \pm 1,629	21,561 \pm 1,725	23,773 \pm 1,664
06:00	17,081 \pm 1,025	19,588 \pm 1,175	23,232 \pm 0,929
08:00	15,253 \pm 1,525	16,021 \pm 1,602	21,200 \pm 2,544
10:00	13,723 \pm 1,372	12,062 \pm 1,086	20,346 \pm 1,628
15:00	10,497 \pm 1,050	7,519 \pm 0,677	15,432 \pm 0,309
20:00	7,000 \pm 0,695	2,792 \pm 0,251	12,001 \pm 0,468
25:00	5,266 \pm 0,527	1,255 \pm 0,088	9,724 \pm 0,681
30:00	3,731 \pm 0,373	0,781 \pm 0,078	7,038 \pm 0,704

Potasio externo (μM) <i>C. albicans</i> SC5314			
Tiempo (min)	pH 4,5	pH 5,8	pH 7,5
00:00	24,559 \pm 1,228	24,302 \pm 1,458	26,002 \pm 1,300
02:00	18,042 \pm 1,263	15,001 \pm 1,200	20,121 \pm 1,006
04:00	18,421 \pm 1,474	11,873 \pm 1,069	17,267 \pm 1,727
06:00	19,001 \pm 0,756	6,659 \pm 0,600	14,310 \pm 1,860
08:00	18,042 \pm 0,541	2,499 \pm 0,250	12,732 \pm 1,528
10:00	17,839 \pm 1,784	2,483 \pm 0,248	11,452 \pm 1,374
15:00	17,613 \pm 1,761	1,711 \pm 0,154	8,260 \pm 0,991
20:00	15,929 \pm 1,434	1,240 \pm 0,112	7,017 \pm 0,491
25:00	13,210 \pm 1,321	0,796 \pm 0,056	6,103 \pm 0,549
30:00	12,668 \pm 1,520	0,110 \pm 0,010	5,738 \pm 0,574

Parámetros cinéticos del transporte de rubidio en *C. albicans* 12C y SC5314 (Tabla 19).

		<i>C. albicans</i> 12C			
Condiciones	V_{max1}	K_{m1}	V_{max2}	K_{m2}	
Células normales vs. Células ayunadas	(x1,9) **	(:97,4) ***	(x2,6) *	(x1,3) *	
	(x6,27) ***	(x11,0) *	-	-	

Cambios en los niveles de expresión de los genes que codifican los transportadores de potasio en *C. albicans* 12C (Figura 23).

<i>C. albicans</i> 12C	
Condiciones	Transcritos
<i>TRK1</i> 1M Sodio vs. <i>TRK1</i> Control	(:2,7) ***
<i>ACU1</i> 1M Sodio vs. <i>ACU1</i> 1M control	(:1,5) ***
<i>HAK1</i> 1M Sodio vs. <i>HAK1</i> control	(:4,9) ***

<i>C. albicans</i> 12C	
Condiciones	Transcritos
<i>TRK1</i> pH 4,5 vs. <i>TRK1</i> pH 5,8	(:9,1) ***
<i>ACU1</i> pH 4,5 vs. <i>ACU1</i> pH 5,8	(x3,3) ***
<i>HAK1</i> pH 4,5 vs. <i>HAK1</i> pH 5,8	(x2,2) ***
<i>TRK1</i> pH 7,5 vs. <i>TRK1</i> pH 5,8	(:14,6) ***
<i>ACU1</i> pH 7,5 vs. <i>ACU1</i> pH 5,8	(:7,6) ***
<i>HAK1</i> pH 7,5 vs. <i>HAK1</i> pH 5,8	(x1,4) ns

<i>C. albicans</i> 12C	
Condiciones	Significancia
<i>TRK1</i> 30 min vs. <i>TRK1</i> 0 min	(x3,0) ***
<i>TRK1</i> 60 min vs. <i>TRK1</i> 0 min	(x1,1) ns
<i>TRK1</i> 180 min vs. <i>TRK1</i> 0 min	(:1,4) ns
<i>ACU1</i> 30 min vs. <i>ACU1</i> 0 min	(x10,3) ***
<i>ACU1</i> 60 min vs. <i>ACU1</i> 0 min	(x113,3) ***
<i>ACU1</i> 180 min vs. <i>ACU1</i> 0 min	(x38,5) ***
<i>HAK1</i> 30 min vs. <i>HAK1</i> 0 min	(x10,7) ***
<i>HAK1</i> 60 min vs. <i>HAK1</i> 0 min	(x17,5) ***
<i>HAK1</i> 180 min vs. <i>HAK1</i> 0 min	(x9,8) ***

Cambios en los niveles de expresión de los genes que codifican los transportadores de potasio en *C. albicans* SC5314 (Figura 24).

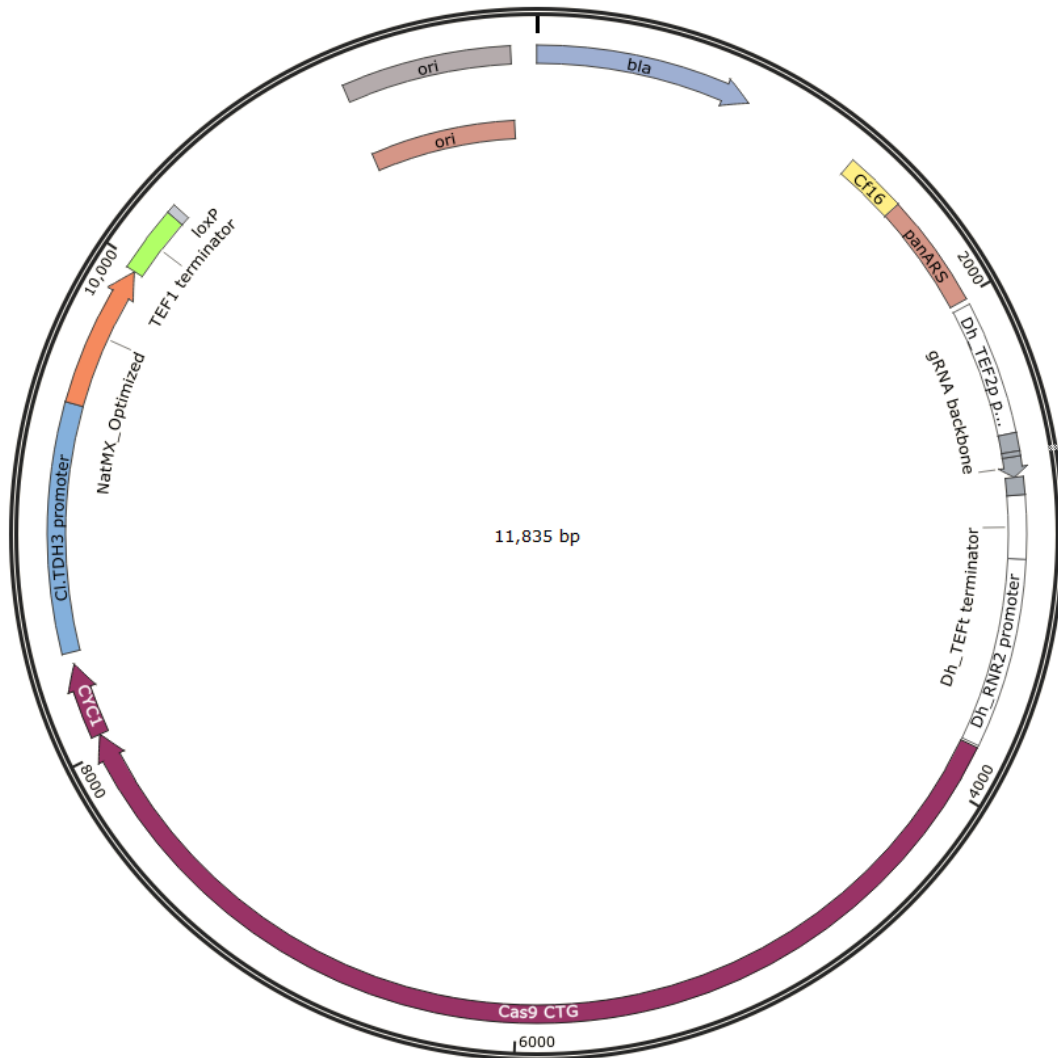
<i>C. albicans</i> SC5314	
Condiciones	Significancia
<i>TRK1</i> 1M Sodio vs. <i>TRK1</i> Control	(:1,1) ns
<i>ACU1</i> 1M Sodio vs. <i>ACU1</i> 1M control	(x1,2) ns
<i>HAK1</i> 1M Sodio vs. <i>HAK1</i> control	(x6,7) ***

<i>C. albicans</i> SC5314	
Condiciones	Significancia
<i>TRK1</i> pH 4,5 vs. <i>TRK1</i> pH 5,8	(:1,9) ns
<i>ACU1</i> pH 4,5 vs. <i>ACU1</i> pH 5,8	(:1,3) ns
<i>HAK1</i> pH 4,5 vs. <i>HAK1</i> pH 5,8	(x2,8) ***
<i>TRK1</i> pH 7,5 vs. <i>TRK1</i> pH 5,8	(x1,2) ns
<i>ACU1</i> pH 7,5 vs. <i>ACU1</i> pH 5,8	(x1,1) ns
<i>HAK1</i> pH 7,5 vs. <i>HAK1</i> pH 5,8	(x1,7) ns

<i>C. albicans</i> SC5314	
Condiciones	Significancia
<i>TRK1</i> 30 min vs. <i>TRK1</i> 0 min	(x1,6) ns
<i>TRK1</i> 60 min vs. <i>TRK1</i> 0 min	(x1,7) ns
<i>TRK1</i> 180 min vs. <i>TRK1</i> 0 min	(x2,3) ns
<i>ACU1</i> 30 min vs. <i>ACU1</i> 0 min	(x227,0) ns
<i>ACU1</i> 60 min vs. <i>ACU1</i> 0 min	(x1327,2) ***
<i>ACU1</i> 180 min vs. <i>ACU1</i> 0 min	(x1473,5) ***
<i>HAK1</i> 30 min vs. <i>HAK1</i> 0 min	(x31,4) ns
<i>HAK1</i> 60 min vs. <i>HAK1</i> 0 min	(x81,8) ***
<i>HAK1</i> 180 min vs. <i>HAK1</i> 0 min	(x142,3) ***

Capítulo II: CRISPR/Cas9 Mutagénesis en *C. albicans*

Plásmido pDIV066 utilizado como base para la edición con CRISPR/Cas9



Eficiencia de la transformación con diferentes choques térmicos (Figura 25).

Temperatura	
Comparaciones	Significancia
39°C vs. 40°C	(x1,3) **
39°C vs. 42°C	(x2,7) ***
39°C vs. 44°C	(x4,6) ***
40°C vs. 42°C	(x2,1) ***
40°C vs. 44°C	(x3,6) ***
42°C vs. 44°C	(x1,7) *

Eficiencia de la transformación con las dos formas del plásmido pDIV066 (Figura 26).

Comparación	Significancia
pDIV066 circular vs. pDIV066 lineal	(x1,0) ns

Porcentaje de colonias que pierden del plásmido y recuperan el fenotipo sensible al antibiótico (Figura 27).

Comparación	Significancia
pDIV066 circular vs. pDIV066 lineal	(x2,1) **

Número de colonias obtenidas tras la transformación. (Figura 29).

Comparaciones	Significancia
pDIV489 vs. <i>TRK1</i> sin RT	(x1,1) ns
pDIV489 vs. <i>TRK1</i> con RT	(x6,3) ***
<i>TRK1</i> sin RT vs. <i>TRK1</i> con RT	(x5,6) ***
pDIV489 vs. <i>ACU1</i> sin RT	(:1,0) ns
pDIV489 vs. <i>ACU1</i> con RT	(x1,3) ns
<i>ACU1</i> sin RT vs. <i>ACU1</i> con RT	(x1,3) ns
pDIV489 vs. <i>HAK1</i> sin RT	(:0,8) ns
pDIV489 vs. <i>HAK1</i> con RT	(x1,7) *
<i>HAK1</i> sin RT vs. <i>HAK1</i> con RT	(x2,0) **

Nota: En esta tabla el número de veces representa la variación del número de colonias obtenidas sin el molde de reparación (sin RT) o con el molde de reparación (con RT) respecto al número de colonias obtenidas con el plásmido control pDIV489 y la variación del número de colonias obtenidas utilizando el molde de reparación (con RT) respecto al número de colonias obtenidas sin utilizar el molde de reparación (sin RT).

Capítulo III: Rol del transportador Hak1 en la homeostasis de potasio de *C. albicans*.

Efecto de la concentración de KCl y pH sobre la constante específica de crecimiento de las cepas de *C. albicans* SN250 HAK1+ y *hak1*- (Figura 32).

Crecimiento (μ) <i>C. albicans</i> SN250 HAK1+				
Concentración KCl (mM)	pH 3,0	pH 4,5	pH 5,8	pH 7,5
0,02	0,105 \pm 0,002	0,125 \pm 0,004	0,149 \pm 0,003	0,140 \pm 0,004
0,10	0,139 \pm 0,003	0,213 \pm 0,020	0,185 \pm 0,026	0,150 \pm 0,004
0,25	0,173 \pm 0,004	0,207 \pm 0,006	0,190 \pm 0,007	0,180 \pm 0,003
0,50	0,171 \pm 0,003	0,211 \pm 0,005	0,213 \pm 0,002	0,182 \pm 0,005
0,75	0,173 \pm 0,004	0,210 \pm 0,007	0,211 \pm 0,008	0,186 \pm 0,011
1,00	0,175 \pm 0,004	0,218 \pm 0,004	0,217 \pm 0,001	0,188 \pm 0,014

Crecimiento (μ) <i>C. albicans</i> SN250 <i>hak1</i>-				
Concentración KCl (mM)	pH 3,0	pH 4,5	pH 5,8	pH 7,5
0,02	0,046 \pm 0,001	0,022 \pm 0,001	0,045 \pm 0,035	0,070 \pm 0,007
0,10	0,054 \pm 0,003	0,055 \pm 0,003	0,137 \pm 0,003	0,13 \pm 0,012
0,25	0,110 \pm 0,006	0,111 \pm 0,006	0,193 \pm 0,006	0,152 \pm 0,018
0,50	0,163 \pm 0,008	0,159 \pm 0,008	0,212 \pm 0,016	0,166 \pm 0,027
0,75	0,160 \pm 0,008	0,170 \pm 0,009	0,196 \pm 0,005	0,186 \pm 0,004
1,00	0,171 \pm 0,009	0,174 \pm 0,011	0,192 \pm 0,021	0,187 \pm 0,008

Efecto de la concentración de NaCl y LiCl sobre la constante específica de crecimiento de las cepas de *C. albicans* SN250 HAK1+ y *hak1*- (Figura 24).

Crecimiento (μ)		
Concentración NaCl (M)	<i>C. albicans</i> SN250 HAK1+	<i>C. albicans</i> SN250 <i>hak1</i>-
0,00	0,173 \pm 0,009	0,173 \pm 0,012
0,25	0,114 \pm 0,006	0,106 \pm 0,007
0,50	0,106 \pm 0,005	0,102 \pm 0,007
0,75	0,099 \pm 0,005	0,098 \pm 0,007
1,00	0,082 \pm 0,004	0,083 \pm 0,006

Crecimiento (μ)		
Concentración LiCl (M)	<i>C. albicans</i> SN250 <i>HAK1+</i>	<i>C. albicans</i> SN250 <i>hak1-</i>
0,00	0,191 \pm 0,010	0,190 \pm 0,013
0,10	0,178 \pm 0,009	0,185 \pm 0,013
0,15	0,087 \pm 0,004	0,067 \pm 0,005
0,20	0,061 \pm 0,003	0,028 \pm 0,002

Contenido intracelular de potasio en *C. albicans* SN250 *HAK1+* y SN250 *hak1-* (Apartado 2 del Capítulo 3 de Resultados).

<i>C. albicans</i> SN250		
Comparaciones	<i>HAK1+</i>	<i>hak1-</i>
Células normales vs. Células ayunadas	(:1,9) ***	(:1,8) ***

<i>C. albicans</i> SN250		
Comparaciones	Células normales	Células ayunadas
<i>HAK1+</i> vs. <i>hak1-</i>	(x1,0) ns	(x1,0) ns

Contenido intracelular de sodio/litio y potasio en *C. albicans* SN250 *HAK1+* y SN250 *hak1-* (Figura 35).

<i>C. albicans</i> SN250				
Comparaciones	0,2 M NaCl		0,1 M LiCl	
	Sodio	Potasio	Litio	Potasio
<i>HAK1+</i> vs. <i>hak1-</i>	(:1,1) ns	(:1,2) ns	(:1,2) ns	(x1,5) *

Absorción del potasio externo a diferentes pHs en las cepas de *C. albicans* SN250 *HAK1+* y *hak1-* (Figura 36).

Potasio Externo (μM) <i>C. albicans</i> SN250 <i>HAK1+</i>				
Tiempo (min)	pH 3,0	pH 4,5	pH 5,8	pH 7,5
00:00	24,647 \pm 1,232	25,960 \pm 1,298	26,757 \pm 1,070	25,889 \pm 1,553
02:00	14,861 \pm 0,743	15,045 \pm 1,354	23,407 \pm 0,936	22,370 \pm 1,342
04:00	15,087 \pm 0,905	12,429 \pm 1,119	21,389 \pm 0,856	20,654 \pm 1,239
06:00	8,402 \pm 0,840	8,492 \pm 0,764	15,470 \pm 0,619	19,982 \pm 1,200
08:00	8,728 \pm 0,873	5,092 \pm 0,458	12,685 \pm 0,507	19,675 \pm 1,181
10:00	6,108 \pm 0,611	2,857 \pm 0,223	10,987 \pm 0,440	18,440 \pm 1,106
15:00	3,916 \pm 0,313	0,681 \pm 0,055	8,421 \pm 0,337	12,973 \pm 1,168
20:00	5,528 \pm 0,387	0,102 \pm 0,010	4,152 \pm 0,166	12,608 \pm 1,135
25:00	2,762 \pm 0,138	0,099 \pm 0,023	3,250 \pm 0,130	10,957 \pm 0,986
30:00	2,226 \pm 0,111	0,070 \pm 0,037	2,912 \pm 0,117	8,788 \pm 0,791

Potasio Externo (μM) <i>C. albicans</i> SN250 <i>hak1-</i>				
Tiempo (min)	pH 3,0	pH 4,5	pH 5,8	pH 7,5
00:00	24,299 \pm 1,215	25,96 \pm 1,298	26,757 \pm 1,873	24,992 \pm 1,749
02:00	23,085 \pm 1,152	20,831 \pm 1,875	25,780 \pm 1,805	22,000 \pm 1,540
04:00	22,461 \pm 1,123	19,333 \pm 1,740	24,465 \pm 1,713	19,280 \pm 1,928
06:00	23,000 \pm 0,902	18,393 \pm 1,656	23,504 \pm 1,645	18,433 \pm 1,843
08:00	22,987 \pm 0,920	18,996 \pm 1,710	20,732 \pm 1,451	17,401 \pm 1,740
10:00	23,011 \pm 1,365	18,510 \pm 1,481	20,350 \pm 1,425	18,411 \pm 1,289
15:00	23,345 \pm 1,167	16,952 \pm 1,356	18,377 \pm 1,286	16,617 \pm 1,163
20:00	23,204 \pm 1,044	14,838 \pm 1,187	16,476 \pm 1,153	15,609 \pm 1,249
25:00	23,837 \pm 1,192	12,533 \pm 1,002	15,321 \pm 1,072	13,924 \pm 0,975
30:00	23,705 \pm 1,185	12,539 \pm 1,033	12,023 \pm 0,842	14,134 \pm 1,272

Parámetros cinéticos del transporte de rubidio en *C. albicans* SN250 *HAK1+* y *hak1-* (Tabla 19).

<i>C. albicans</i> SN250 <i>HAK1+</i> vs. <i>hak1-</i>				
Condiciones	Normales		Ayunadas	
	Vmax	Km	Vmax	Km
pH 3,0	(:1,4) Ns	(x1,2) ns	(:12,9) ***	(x41,7) ***
pH 4,5	(:1,2) Ns	(:1,1) ns	(:3,7) ***	(x19,7) ***
pH 5,8	(:1,5) *	(:0,8) ns	(:1,8) **	(x6,1) **
pH 7,5	(:1,3) *	(:0,9) ns	(:1,3) ns	(x2,7) **

Nota: Esta tabla muestra una comparación de los valores obtenidos en cada pH en células normales y células ayunadas. Los valores de significancia reflejan el número de veces de la cepa *hak1-* respecto a la cepa *HAK1+*.

Cambios en los niveles de expresión de los genes que codifican los transportadores de potasio en *C. albicans* SN250 *HAK1+* y *hak1-* (Figura 37).

<i>C. albicans</i> SN250 <i>HAK1+</i>	
Condiciones	Transcritos
<i>TRK1</i> 1M Sodio vs. <i>TRK1</i> Control	(x1,3) ns
<i>ACU1</i> 1M Sodio vs. <i>ACU1</i> 1M control	(x2,9) ***
<i>HAK1</i> 1M Sodio vs. <i>HAK1</i> control	(x2,8) ***

<i>C. albicans</i> SN250 <i>hak1-</i>	
Condiciones	Transcritos
<i>TRK1</i> 1M Sodio vs. <i>TRK1</i> Control	(:1,1) ns
<i>ACU1</i> 1M Sodio vs. <i>ACU1</i> control	(x22,6) ***
<i>HAK1</i> 1M Sodio vs. <i>HAK1</i> control	-

<i>C. albicans</i> SN250 <i>HAK1</i> - vs. <i>hak1</i> -	
Condiciones	Transcritos
<i>TRK1</i> 1M Sodio	(x1,3) ns
<i>ACU1</i> 1M Sodio	(x7,8) ***
<i>HAK1</i> 1M Sodio	-

<i>C. albicans</i> SN250 <i>HAK1</i> +	
Condiciones	Transcritos
<i>TRK1</i> pH 4,5 vs. <i>TRK1</i> pH 5,8	(:1,5) **
<i>ACU1</i> pH 4,5 vs. <i>ACU1</i> pH 5,8	(:1,3) *
<i>HAK1</i> pH 4,5 vs. <i>HAK1</i> pH 5,8	(:1,3) *
<i>TRK1</i> pH 7,5 vs. <i>TRK1</i> pH 5,8	(x1,2) *
<i>ACU1</i> pH 7,5 vs. <i>ACU1</i> pH 5,8	(:1,6) **
<i>HAK1</i> pH 7,5 vs. <i>HAK1</i> pH 5,8	(:1,6) *

<i>C. albicans</i> SN250 <i>hak1</i> -	
Condiciones	Transcritos
<i>TRK1</i> pH 4,5 vs. <i>TRK1</i> pH 5,8	(:1,5) ns
<i>ACU1</i> pH 4,5 vs. <i>ACU1</i> pH 5,8	(:3,3) ***
<i>HAK1</i> pH 4,5 vs. <i>HAK1</i> pH 5,8	-
<i>TRK1</i> pH 7,5 vs. <i>TRK1</i> pH 5,8	(x2,0) ***
<i>ACU1</i> pH 7,5 vs. <i>ACU1</i> pH 5,8	(:3,2) ***
<i>HAK1</i> pH 7,5 vs. <i>HAK1</i> pH 5,8	-

<i>C. albicans</i> SN250 <i>HAK1</i> - vs. <i>hak1</i> -	
Condiciones	Transcritos
<i>TRK1</i> pH 4,5	(:1,2) ns
<i>ACU1</i> pH 4,5	(:2,5) ***
<i>HAK1</i> pH 4,5	-
<i>TRK1</i> pH 7,5	(:2,4) ***
<i>ACU1</i> pH 7,5	(:2,0) ***
<i>HAK1</i> pH 7,5	-

<i>C. albicans</i> SN250 <i>HAK1</i> +	
Condiciones	Transcritos
<i>TRK1</i> 30 min vs. <i>TRK1</i> 0 min	(x1,2) ns
<i>TRK1</i> 60 min vs. <i>TRK1</i> 0 min	(x1,1) ns
<i>TRK1</i> 180 min vs. <i>TRK1</i> 0 min	(:2,3) ns
<i>ACU1</i> 30 min vs. <i>ACU1</i> 0 min	(x14,6) ***
<i>ACU1</i> 60 min vs. <i>ACU1</i> 0 min	(x92,6) ***
<i>ACU1</i> 180 min vs. <i>ACU1</i> 0 min	(x78,6) ***
<i>HAK1</i> 30 min vs. <i>HAK1</i> 0 min	(x37,7) ***
<i>HAK1</i> 60 min vs. <i>HAK1</i> 0 min	(x54,5) ***
<i>HAK1</i> 180 min vs. <i>HAK1</i> 0 min	(x33,7) ***

<i>C. albicans</i> SN250 <i>hak1</i>-	
Condiciones	Transcritos
<i>TRK1</i> 30 min vs. <i>TRK1</i> 0 min	(x1,0) ns
<i>TRK1</i> 60 min vs. <i>TRK1</i> 0 min	(:5,0) ns
<i>TRK1</i> 180 min vs. <i>TRK1</i> 0 min	(x2,1) ns
<i>ACU1</i> 30 min vs. <i>ACU1</i> 0 min	(x150,5) ***
<i>ACU1</i> 60 min vs. <i>ACU1</i> 0 min	(x403,6) ***
<i>ACU1</i> 180 min vs. <i>ACU1</i> 0 min	(x72,2) ***
<i>HAK1</i> 30 min vs. <i>HAK1</i> 0 min	-
<i>HAK1</i> 60 min vs. <i>HAK1</i> 0 min	-
<i>HAK1</i> 180 min vs. <i>HAK1</i> 0 min	-

<i>C. albicans</i> SN250 <i>HAK1</i>- vs. <i>hak1</i>-	
Condiciones	Transcritos
<i>TRK1</i> 30 min	(x1,1) ns
<i>TRK1</i> 60 min	(x7,0) ns
<i>TRK1</i> 180 min	(:4,7) ns
<i>ACU1</i> 30 min	(x10,3) ***
<i>ACU1</i> 60 min	(x4,4) ***
<i>ACU1</i> 180 min	(x1,1) ns
<i>HAK1</i> 30 min	-
<i>HAK1</i> 60 min	-
<i>HAK1</i> 180 min	-

Capítulo III: Expresión heteróloga de los transportadores de *Candida* en *Saccharomyces cerevisiae*

Efecto de la concentración de KCl y el pH sobre el crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los genes de transportadores de *C. albicans* (Figura 39).

Crecimiento (μ) <i>S. cerevisiae</i> pH 4,5				
Concentración KCl (mM)	<i>CaTRK1</i>	<i>CaACU1</i>	<i>CaHAK1</i>	YEp352
0,1	-	-	-	-
0,3	0,014 \pm 0,000	0,107 \pm 0,005	-	-
0,6	0,051 \pm 0,002	0,145 \pm 0,006	-	-
1,0	0,166 \pm 0,005	0,143 \pm 0,006	-	-
2,5	0,179 \pm 0,005	0,151 \pm 0,006	-	-
5,0	0,186 \pm 0,006	0,157 \pm 0,007	0,031 \pm 0,004	-
10,0	0,187 \pm 0,006	0,173 \pm 0,007	0,053 \pm 0,002	-
20,0	0,188 \pm 0,007	0,193 \pm 0,008	0,087 \pm 0,004	0,042 \pm 0,002
50,0	0,200 \pm 0,006	0,199 \pm 0,009	0,128 \pm 0,006	0,099 \pm 0,005
100,0	0,215 \pm 0,007	0,218 \pm 0,008	0,224 \pm 0,011	0,198 \pm 0,09

Crecimiento (μ) <i>S. cerevisiae</i> pH 5,8				
Concentración KCl (mM)	<i>CaTRK1</i>	<i>CaACU1</i>	<i>CaHAK1</i>	YEp352
0,1	0,083 \pm 0,003	0,049 \pm 0,002	-	-
0,3	0,109 \pm 0,003	0,102 \pm 0,004	-	-
0,6	0,165 \pm 0,005	0,159 \pm 0,007	0,003 \pm 0,001	-
1,0	0,172 \pm 0,005	0,171 \pm 0,007	0,004 \pm 0,001	-
2,5	0,187 \pm 0,006	0,178 \pm 0,008	0,008 \pm 0,001	0,011 \pm 0,001
5,0	0,191 \pm 0,006	0,191 \pm 0,008	0,020 \pm 0,001	0,018 \pm 0,001
10,0	0,198 \pm 0,007	0,197 \pm 0,007	0,056 \pm 0,003	0,042 \pm 0,002
20,0	0,199 \pm 0,006	0,201 \pm 0,008	0,088 \pm 0,004	0,062 \pm 0,003
50,0	0,203 \pm 0,006	0,203 \pm 0,009	0,126 \pm 0,006	0,099 \pm 0,005
100,0	0,231 \pm 0,007	0,231 \pm 0,009	0,231 \pm 0,012	0,198 \pm 0,010

Crecimiento (μ) <i>S. cerevisiae</i> pH 7,5				
Concentración KCl (mM)	<i>CaTRK1</i>	<i>CaACU1</i>	<i>CaHAK1</i>	YEp352
0,1	0,079 \pm 0,002	0,167 \pm 0,007	-	-
0,3	0,105 \pm 0,003	0,193 \pm 0,008	-	-
0,6	0,152 \pm 0,003	0,208 \pm 0,009	-	-
1,0	0,161 \pm 0,007	0,203 \pm 0,009	-	-
2,5	0,202 \pm 0,006	0,203 \pm 0,009	-	-
5,0	0,209 \pm 0,006	0,203 \pm 0,008	0,092 \pm 0,005	0,112 \pm 0,006
10,0	0,211 \pm 0,006	0,213 \pm 0,009	0,126 \pm 0,006	0,195 \pm 0,010
20,0	0,222 \pm 0,007	0,223 \pm 0,009	0,167 \pm 0,008	0,195 \pm 0,010
50,0	0,230 \pm 0,007	0,229 \pm 0,010	0,198 \pm 0,010	0,198 \pm 0,010
100,0	0,231 \pm 0,007	0,231 \pm 0,009	0,224 \pm 0,011	0,198 \pm 0,010

Efecto de la concentración de NaCl y LiCl sobre la constante específica de crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los genes de transportadores de *C. albicans* (Figura 41).

Crecimiento (μ) <i>S. cerevisiae</i>				
Concentración NaCl (M)	<i>CaTRK1</i>	<i>CaACU1</i>	<i>CaHAK1</i>	YEp352
0,00	0,190 \pm 0,010	0,181 \pm 0,009	0,171 \pm 0,009	0,177 \pm 0,009
0,30	0,123 \pm 0,006	0,118 \pm 0,006	0,111 \pm 0,006	0,087 \pm 0,004
0,60	0,102 \pm 0,005	0,051 \pm 0,004	0,049 \pm 0,002	0,034 \pm 0,002

Crecimiento (μ) <i>S. cerevisiae</i>				
Concentración LiCl (M)	<i>CaTRK1</i>	<i>CaACU1</i>	<i>CaHAK1</i>	YEp352
0,00	0,190 \pm 0,010	0,177 \pm 0,009	0,171 \pm 0,009	0,177 \pm 0,009
0,15	0,147 \pm 0,007	0,087 \pm 0,004	0,081 \pm 0,004	0,069 \pm 0,003
0,20	0,129 \pm 0,006	0,055 \pm 0,003	0,042 \pm 0,002	0,040 \pm 0,002
0,30	0,074 \pm 0,004	0,036 \pm 0,002	0,032 \pm 0,002	0,028 \pm 0,002

Contenido intracelular de potasio en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los transportadores de potasio de la membrana plasmática de *C. albicans* (Figura 44).

<i>S. cerevisiae</i> BYT12		
Comparaciones	Células normales	Células ayunadas
BYT12 [pCaTRK1] vs. BYT12 [pYEp352]	(x1,2) ns	(:1,2) ns
BYT12 [pCaACU1] vs. BYT12 [pYEp352]	(x1,3) ns	(:1,0) ns
BYT12 [pCaHAK1] vs. BYT12 [pYEp352]	(x1,3) ns	(x1,1) ns

Nota: En esta tabla el número de veces representa la variación del contenido intracelular de la cepa control YEp352 respecto a las cepas que expresaron algún transportador de *C. albicans*.

<i>S. cerevisiae</i> BYT12	
Cepa	Células normales vs. Células ayunadas
BYT12 [pYEp352]	(:2,0) **
BYT12 [pCaTRK1]	(:2,7) ***
BYT12 [pCaACU1]	(:2,6) ***
BYT12 [pCaHAK1]	(:2,4) ***

Contenido intracelular de sodio, litio y potasio en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los transportadores de potasio de la membrana plasmática de *C. albicans* (Figura 45).

<i>S. cerevisiae</i> BYT12				
Comparaciones	0,2 M NaCl		0,1 M LiCl	
	Sodio	Potasio	Litio	Potasio
BYT12 [pCaTRK1] vs. BYT12 [pYEp352]	(:2,2) ***	(x1,6) ***	(:2,4) ***	(x1,4) **
BYT12 [pCaACU1] vs. BYT12 [pYEp352]	(:1,4) *	(x1,6) ***	(:2,0) ***	(x1,3) *
BYT12 [pCaHAK1] vs. BYT12 [pYEp352]	(:1,1) ns	(x1,0) ns	(:1,1) ns	(x1,2) ns

Variación del potasio externo a diferentes pHs en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los genes de transportadores de *C. albicans* (Figura 46).

Potasio Externo (μM) <i>S. cerevisiae</i> pH 4,5				
Tiempo (min)	<i>CaTRK1</i>	<i>CaACU1</i>	<i>CaHAK1</i>	YEp352
00:00	24,412 \pm 1,221	25,571 \pm 1,279	21,273 \pm 1,063	21,162 \pm 1,058
10:00	14,968 \pm 0,750	20,992 \pm 1,050	19,837 \pm 0,991	22,957 \pm 1,148
20:00	11,180 \pm 0,560	20,951 \pm 1,048	19,320 \pm 0,966	23,225 \pm 1,161
30:00	9,337 \pm 0,520	19,925 \pm 0,997	17,933 \pm 0,897	23,102 \pm 1,155
40:00	8,860 \pm 0,443	20,088 \pm 1,044	17,632 \pm 0,882	22,800 \pm 1,140
50:00	8,800 \pm 0,440	20,815 \pm 1,041	15,600 \pm 0,781	22,652 \pm 1,133
60:00	8,668 \pm 0,433	17,327 \pm 0,866	13,623 \pm 0,682	22,021 \pm 1,100
90:00	8,892 \pm 0,445	16,246 \pm 0,812	12,599 \pm 0,630	14,251 \pm 0,713
120:00	4,616 \pm 0,231	13,263 \pm 0,663	7,439 \pm 0,372	13,567 \pm 0,678
150:00	4,543 \pm 0,227	8,011 \pm 0,401	4,517 \pm 0,226	11,157 \pm 0,558
180:00	3,901 \pm 0,196	7,981 \pm 0,399	4,217 \pm 0,253	10,980 \pm 0,549

Potasio Externo (μM) <i>S. cerevisiae</i> pH 5,8				
Tiempo (min)	<i>CaTRK1</i>	<i>CaACU1</i>	<i>CaHAK1</i>	YEp352
00:00	24,268 \pm 1,213	22,683 \pm 1,134	23,985 \pm 1,198	23,985 \pm 1,199
10:00	8,658 \pm 0,433	25,499 \pm 1,275	22,98 \pm 1,149	25,980 \pm 1,299
20:00	4,943 \pm 0,250	24,031 \pm 1,202	20,671 \pm 1,034	27,819 \pm 1,391
30:00	3,493 \pm 0,262	20,301 \pm 1,016	21,346 \pm 1,067	25,871 \pm 1,294
40:00	3,249 \pm 0,175	19,215 \pm 0,961	21,768 \pm 1,088	26,299 \pm 1,315
50:00	2,240 \pm 0,163	19,731 \pm 0,987	21,671 \pm 1,084	25,003 \pm 1,250
60:00	1,806 \pm 0,112	19,781 \pm 1,023	22,121 \pm 1,107	27,368 \pm 1,368
90:00	1,602 \pm 0,102	16,548 \pm 0,989	22,121 \pm 1,099	27,165 \pm 1,358
120:00	1,422 \pm 0,120	15,417 \pm 0,827	22,000 \pm 1,102	25,206 \pm 1,260
150:00	1,200 \pm 0,144	14,420 \pm 0,781	21,870 \pm 1,093	25,113 \pm 1,252
180:00	1,189 \pm 0,137	13,802 \pm 0,691	20,750 \pm 1,047	25,107 \pm 1,240

Potasio Externo (μM) <i>S. cerevisiae</i> pH 7,5				
Tiempo (min)	<i>CaTRK1</i>	<i>CaACU1</i>	<i>CaHAK1</i>	YEp352
00:00	26,589 \pm 1,329	25,492 \pm 1,275	25,887 \pm 1,294	25,282 \pm 1,264
10:00	14,671 \pm 0,741	23,312 \pm 1,166	23,856 \pm 1,193	27,020 \pm 1,350
20:00	10,823 \pm 0,541	22,343 \pm 1,117	25,697 \pm 1,285	25,701 \pm 1,285
30:00	4,864 \pm 0,243	20,242 \pm 1,121	23,805 \pm 1,190	25,870 \pm 1,294
40:00	4,219 \pm 0,211	19,018 \pm 0,951	20,009 \pm 1,202	24,731 \pm 1,237
50:00	3,131 \pm 0,157	15,878 \pm 0,794	19,304 \pm 0,965	24,681 \pm 1,235
60:00	3,401 \pm 0,170	16,714 \pm 0,834	20,605 \pm 1,032	20,647 \pm 1,032
90:00	3,343 \pm 0,168	14,727 \pm 0,736	20,781 \pm 1,039	20,037 \pm 1,002
120:00	2,161 \pm 0,108	9,650 \pm 0,483	15,609 \pm 0,780	16,631 \pm 0,941
150:00	0,858 \pm 0,043	5,3535 \pm 0,268	14,086 \pm 0,704	14,756 \pm 0,738
180:00	0,702 \pm 0,035	3,575 \pm 0,179	7,414 \pm 0,370	9,956 \pm 0,498

Volumen celular de las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los transportadores de potasio de la membrana plasmática de *C. albicans* (Tabla 20).

<i>S. cerevisiae</i> BYT12		
Cepas	Condiciones	
	30 mM KCl vs. 100 mM KCl	0 mM KCl vs. 100 mM KCl
BYT12 [pYEp352]	ns	ns
BYT12 [pCaTRK1]	ns	*
BYT12 [pCaACU1]	ns	ns
BYT12 [pCaHAK1]	ns	ns

<i>S. cerevisiae</i> BYT12			
Comparaciones	Condiciones		
	100 mM KCl	30 mM KCl	0 mM KCl
BYT12 [pCaTRK1] vs. BYT12 [pYEp352]	**	***	*
BYT12 [pCaACU1] vs. BYT12 [pYEp352]	ns	ns	ns
BYT12 [pCaHAK1] vs. BYT12 [pYEp352]	ns	**	ns

Inhibición de la absorción del sodio por el catión potasio en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los genes de transportadores de *C. albicans* (Figura 47).

Tiempo (min)	YEp352		CaTRK1	
	0 mM KCl (nmol·mg ⁻¹)	10 mM KCl (nmol·mg ⁻¹)	0 mM KCl (nmol·mg ⁻¹)	10 mM KCl (nmol·mg ⁻¹)
00:00	50,781 ± 2,539	52,347 ± 2,817	44,688 ± 2,234	46,384 ± 2,469
05:00	87,800 ± 4,250	60,673 ± 3,034	104,025 ± 5,201	91,113 ± 4,556
10:00	98,881 ± 2,470	114,146 ± 5,707	137,772 ± 6,889	88,095 ± 4,404
15:00	128,918 ± 6,445	125,484 ± 5,274	150,984 ± 4,555	104,343 ± 5,217
20:00	165,283 ± 8,264	143,016 ± 7,151	174,652 ± 5,733	102,975 ± 5,248
25:00	-	-	225,946 ± 11,297	112,034 ± 5,602
30:00	189,759 ± 9,488	153,090 ± 7,655	264,946 ± 12,247	115,863 ± 5,793

Tiempo (min)	CaACU1		CaHAK1	
	0 mM KCl (nmol·mg ⁻¹)	10 mM KCl (nmol·mg ⁻¹)	0 mM KCl (nmol·mg ⁻¹)	10 mM KCl (nmol·mg ⁻¹)
00:00	75,411 ± 3,771	64,033 ± 3,202	54,622 ± 2,731	46,429 ± 2,321
05:00	117,537 ± 4,877	100,912 ± 5,146	83,195 ± 4,160	50,727 ± 3,224
10:00	146,373 ± 6,319	135,443 ± 7,772	94,403 ± 4,072	92,723 ± 4,636
15:00	166,876 ± 9,744	155,056 ± 4,053	117,585 ± 5,879	131,435 ± 6,571
20:00	163,885 ± 9,194	139,216 ± 6,161	143,738 ± 7,187	136,955 ± 6,847
25:00	197,992 ± 10,899	152,456 ± 7,123	178,581 ± 8,929	148,497 ± 7,429
30:00	225,169 ± 10,501	184,386 ± 6,719	219,689 ± 10,985	148,571 ± 7,428

Inhibición de la absorción del litio por el catión potasio en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los genes de transportadores de *C. albicans* (Figura 48).

Tiempo (min)	YEp352		CaTRK1	
	0 mM KCl (nmol·mg ⁻¹)	10 mM KCl (nmol·mg ⁻¹)	0 mM KCl (nmol·mg ⁻¹)	10 mM KCl (nmol·mg ⁻¹)
00:00	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
01:30	12,753 ± 1,231	13,914 ± 1,452	32,416 ± 1,620	3,705 ± 0,191
10:00	33,150 ± 1,125	34,392 ± 2,782	87,870 ± 2,391	14,118 ± 0,721
15:00	38,837 ± 2,671	35,451 ± 2,466	93,968 ± 3,390	25,190 ± 1,264
20:00	49,315 ± 3,528	47,211 ± 3,486	132,877 ± 4,721	40,165 ± 2,682
30:00	56,082 ± 3,293	56,638 ± 3,781	151,566 ± 5,581	52,025 ± 2,675

Tiempo (min)	<i>CaACU1</i>		<i>CaHAK1</i>	
	0 mM KCl (nmol·mg ⁻¹)	10 mM KCl (nmol·mg ⁻¹)	0 mM KCl (nmol·mg ⁻¹)	10 mM KCl (nmol·mg ⁻¹)
00:00	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
01:30	5,253 ± 0,260	7,575 ± 0,432	7,331 ± 0,386	9,156 ± 0,831
10:00	33,804 ± 1,69	36,411 ± 1,421	47,505 ± 1,652	32,704 ± 0,968
15:00	41,400 ± 2,070	41,980 ± 1,892	50,021 ± 1,974	39,637 ± 1,245
20:00	68,291 ± 3,210	61,235 ± 2,746	64,717 ± 2,029	59,213 ± 2,374
30:00	79,382 ± 3,672	82,713 ± 3,984	73,4922 ± 2,425	70,700 ± 2,104

Parámetros cinéticos del transporte de rubidio en las cepas de *S. cerevisiae* BYT12 expresando los transportadores de *C. albicans* (Tabla 21).

<i>S. cerevisiae</i> BYT12				
Cepa	Células Normales vs. Células Ayunadas			
	V _{max1}	K _{m1}	V _{max2}	K _{m2}
BYT12 [pYE _p 352]	(x1,3) ***	(:1,2) ***	-	-
BYT12 [pCaTRK1]	(x6,4) ***	(:5,7) **	-	-
BYT12 [pCaACU1]	(:2,0) ***	(:9,7) ***	(x1,3) ***	(x1,2) ***
BYT12 [pCaHAK1]	(:6,5) ***	(:282,7) ***	(:1,1) ns	(:1,6) ***

Nota: En esta tabla el número de veces representa la variación de los datos obtenidos entre las células ayunadas respecto a las células normales.

<i>S. cerevisiae</i> BY12						
Comparaciones	Normales		Ayunadas			
	V _{max}	K _m	V _{max1}	K _{m1}	V _{max2}	K _{m2}
BYT12 [pCaTRK1] vs. BYT12 [pYE _p 352]	(:1,3) **	(:33,5) ***	(x4,1) ***	(:161,3) ***		
BYT12 [pCaACU1] vs. BYT12 [pYE _p 352]	(x1,4) ***	(:3,7) ***	(:1,9) *	(:30,0) ***	(x1,4) ns	(:2,7) ***
BYT12 [pCaHAK1] vs. BYT12 [pYE _p 352]	(:1,5) ***	(:2,9) ***	(:12,7) ***	(:699,0) ***	(:2,2) **	(:3,9) ***

Nota: En esta tabla el número de veces representa la variación de los datos obtenidos de cada cepa expresando un transportador de *C. albicans* respecto la cepa control YE_p352.

ANEXO II: Publicaciones

Article

The Potassium Transporter Hak1 in *Candida Albicans*, Regulation and Physiological Effects at Limiting Potassium and under Acidic Conditions

Francisco J. Ruiz-Castilla ¹, Elisa Rodríguez-Castro ¹, Carmen Michán ²  and José Ramos ^{1,*}

¹ Department of Agricultural Chemistry, Edaphology and Microbiology, University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain; a32rucaf@uco.es (F.J.R.-C.); q72rocae@uco.es (E.R.-C.)

² Department of Biochemistry and Molecular Biology, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario CeiA3, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain; bb2midoc@uco.es

* Correspondence: mi1raruj@uco.es

Abstract: The three families of yeast plasma membrane potassium influx transporters are represented in *Candida albicans*: Trk, Acu, and Hak proteins. Hak transporters work as K⁺-H⁺ symporters, and the genes coding for Hak proteins are transcriptionally activated under potassium limitation. This work shows that *C. albicans* mutant cells lacking *CaHAK1* display a severe growth impairment at limiting potassium concentrations under acidic conditions. This is the consequence of a defective capacity to transport K⁺, as indicated by potassium absorption experiments and by the kinetics parameters of Rb⁺ (K⁺) transport. Moreover, *hak1*– cells are more sensitive to the toxic cation lithium. All these phenotypes became much less robust or even disappeared at alkaline growth conditions. Finally, transcriptional studies demonstrate that the *hak1*– mutant, in comparison with *HAK1+* cells, activates the expression of the K⁺/Na⁺ ATPase coded by *CaACU1* in the presence of Na⁺ or in the absence of K⁺.

Keywords: *Candida albicans*; potassium transporters; Hak1; lithium; pH



Citation: Ruiz-Castilla, F.J.; Rodríguez-Castro, E.; Michán, C.; Ramos, J. The Potassium Transporter Hak1 in *Candida Albicans*, Regulation and Physiological Effects at Limiting Potassium and under Acidic Conditions. *J. Fungi* **2021**, *7*, 362. <https://doi.org/10.3390/jof7050362>

Academic Editors: Margarida Casal, Sandra Paiva and Isabel Soares-Silva

Received: 25 March 2021

Accepted: 4 May 2021

Published: 6 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Potassium is of pivotal importance in living cells. It is an essential macronutrient that fulfils critical functions related to enzyme activation, osmotic adjustment, turgor generation, cell expansion, regulation of membrane electric potential, or pH homeostasis [1]. In the case of yeast cells, potassium is taken up and accumulated against high concentration gradients with the help of processes that involve the movement of the cation mediated by different transport systems embedded in the plasma membrane [2,3]. Most of the yeast species are endowed with several plasma membrane potassium-specific transporters that can be grouped into three families: Trk (Transport of potassium (kalium)), Hak (High-affinity potassium (kalium)), or Acu (Alkali cation uptake) [2]. While the members of the Trk family are present in all yeasts, Hak and Acu transporters have been found only in some non-conventional yeast species [4–7]. Hak transporters have been widely associated with K⁺ transport across membranes. The presence of Hak proteins has been reported also in mycelial fungi, e.g., *Neurospora crassa* [8,9]. Among other organisms, homologous proteins are encoded by the KT/HAK/KUP family of genes in plants [10–12]. In *Escherichia coli*, Kup is a constitutive low-affinity uptake system that operates as K⁺:H⁺ symporter [13].

The first report of a Hak transporter in yeasts described the expression of a KUP homologue from the soil yeast *Schwanniomyces occidentalis*. The gene was cloned into a *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking its endogenous potassium transport systems and conferred the capacity to mediate high-affinity K⁺ transport that exhibited an enormous concentrative capacity [14]. Later, HAK genes were identified in other non-conventional yeasts, such as *Hansenula polymorpha* [7], *Debaryomyces hansenii* [6], *Pichia sorbitophila* [4], or *Candida albicans* [5]. Fungal HAK genes and some members of the KT/HAK/KUP family in

plants are strongly induced by K^+ starvation [6,11,14]. Such high-affinity K^+ transporters are expected to be $K^+ : H^+$ symporters, although our knowledge about their molecular mechanisms is far from complete [15–17].

Candida albicans is an important opportunistic yeast pathogen. It is present in most healthy persons but, under certain circumstances, can cause a wide range of diseases [18,19]. Potassium homeostasis in this organism has not been studied in detail and deserves much more attention due to the importance of the cation in cell physiology and, thus, in pathogenesis. *C. albicans* belongs to the group endowed with the three types of plasma membrane potassium transporters mentioned above [5]. CaTrk1 has been partly characterized and it was proposed to be the major potassium transporter in *C. albicans* [20,21]. Recently, potassium requirements and transport characteristics in wild-type *C. albicans* cells were characterized and transcriptional regulation of the genes coding for the transporters was studied [22]. In addition, CaTrk1, CaHak1, and CaAcu1 were heterologously expressed in a mutant *S. cerevisiae* strain lacking its own potassium uptake systems. All three transporters were able to provide cells with the ability to grow with low amounts of external potassium, and their capacity to transport potassium was demonstrated [5,22].

The main objective of this work was to identify the physiological roles of Hak1 transporter in *C. albicans*. For that purpose, we took advantage of the availability of a homozygous deletion strain carrying a disrupted version of *CaHAK1* (ORF 19.6249). That mutant was previously reported to show a defect in infectivity but no effect in morphogenesis or proliferation [23]. Here we have analyzed potassium homeostasis in the Hak defective strain, and our results show that CaHak1 is an important factor influencing growth and cation transport at acidic pHs. Furthermore, we show that lack of the *CaHAK1* gene increases transcription of *CaACU1*, but it does not affect *CaTRK1*. Finally, we demonstrate that CaHak1 transporter is involved in tolerance to toxic lithium at low pH.

2. Materials and Methods

2.1. Yeast Strains and Cultivation

SN250 *HAK1+* and SN250 *hak1*– strains were used in this study [23]. Cells were grown in YNB based medium (0.17% YNB or 0.17% YNB-F, Formedium™, Norfolk, UK) supplemented with 2% glucose, 0.4% ammonium sulphate, and the auxotrophic supplements (60 mg/L L-Leucine, 40 mg/L L-Histidine and 40 mg/L L-Arginine). The pH of the media was usually adjusted at pH 5.8 with NH_4OH . When a different pH was required, the medium was buffered at pH 3.0, 4.5, or 7.5 with citric acid or HEPES. Solid media were prepared by adding 2% (*w/v*) agar to the previously described recipes. Cells were routinely grown at 28 °C. To obtain normal K^+ cells, yeasts were grown in YNB supplemented with 30 mM KCl. For K^+ starvation experiments, normal K^+ cells were washed with sterile water and resuspended in K^+ -free medium (YNB-F) without added potassium for 3 h.

2.2. Growth Assays

Potassium requirements were determined both in solid and liquid media and the required pH was adjusted as mentioned above. Drop tests were performed with fresh cells resuspended in sterile water and adjusted to the same 1.0 initial A_{600} . Ten-fold serial dilutions were prepared, and 5 μ L aliquots of each dilution were spotted on the appropriate plates containing several potassium concentrations. Plates were then incubated for 24–48 h at 28 °C.

Growth curves at different KCl or LiCl concentrations were assayed in tubes of 10 mL with 5 mL of YNB-F medium supplemented with the corresponding amounts of salts. Cultures were inoculated at A_{600} 0.05 and the absorbance at 600 nm was followed for 24–48 h using a Spectronic 20 (Bausch and Lomb, Bridgewater, NJ, USA). Specific growth rates were calculated from the potassium growth curves [24].

2.3. Cation Content and Transport

Changes in extracellular potassium and the characteristics of Rb^+ uptake were studied at several pHs. For pH 3.0 and pH 4.5 experiments, TRIS (10 mM) buffer was supplemented with 0.1 mM MgCl_2 , 0.1 mM CaCl_2 , and adjusted at pH 3.0 or 4.5, respectively, with citric acid. For pH 5.8 or 7.5 experiments, MES (10 mM) or HEPES (10 mM) buffer was supplemented with 0.1 mM MgCl_2 and adjusted at the required pH with $\text{Ca}(\text{OH})_2$. In all cases, the buffers were supplemented with 2% glucose.

Variation of external potassium was determined after transferring K^+ -starved cells ($A_{600} \approx 0.5$) to the corresponding uptake buffer. For these experiments, the buffers were supplemented with 25–28 μM K^+ . To determine the time course of the uptake, K^+ changes were followed by taking samples at different times. The samples were then immediately filtered (Millipore, AAWP 0.8 μm pore size, Darmstadt, Germany) to separate cells, and potassium levels were measured in the remaining liquid fraction by atomic absorption spectrometry.

To study the characteristics of Rb^+ uptake, normal K^+ cells or K^+ -starved cells were washed and suspended ($A_{600} \approx 0.3$) in uptake buffers prepared as previously described. Eight to twelve concentrations of RbCl ranging from 20 μM to 100 mM were used to deduce the kinetic parameters of transport. The corresponding amount of RbCl was added to the buffer at time zero and aliquots were withdrawn at various times. To estimate intracellular alkali-metal-cation content, cell samples were collected from liquid media or buffers on Millipore filters (0.8 μm pore size) and rapidly washed with 20 mM MgCl_2 . The cells were then treated with 0.2 M HCl and 10 mM MgCl_2 and the extracts were analyzed by atomic emission spectrophotometry [25].

Extracellular potassium is expressed in micromolar units. All intracellular cation values are expressed as nmols of cation per mg dry weight of cells [26].

2.4. RNA Isolation and Reverse Transcription

Total RNA from SN250 *HAK1+* and SN250 *hak1-* strains was extracted using the TRI-REAGENT reactive (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Cells grown or incubated under different conditions (cells starved for potassium in YNB-F medium, cells grown in YNB medium with 1 M NaCl, cells grown in YNB medium adjusted at pH 4.5, 5.8, or 7.5 as described above) were collected, washed with sterile cold water, and resuspended in 1 mL of TRI-REAGENT plus approximately 200 μL 0.5-mm glass beads. For disruption, yeasts were vortexed 10 times for 1 min with intervals of at least 1 min on ice, incubated 5 min at 70 °C, and followed by another 10 times of 1 min vortexing with cooling intervals. Afterward, the standard TRI-REAGENT protocol for RNA isolation was followed. Isolated RNA samples were treated using DNase I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) to remove contaminating DNA until no PCR amplification was observed without prior cDNA synthesis. RNA sample quality and quantification were performed spectrophotometrically. At least two RNA preparations were isolated for each experimental condition. A total of 1 μg from each RNA sample was retrotranscribed with Kit iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) on three separate occasions that were pooled together before PCR amplification.

2.5. Real-Time PCR

The primers sequences used for the amplification of *TRK1*, *ACU1*, and *HAK1* genes were described and their quality was tested in a previous published article [22].

The PCR amplification was carried out in a mixture (25 μL final volume) with IQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 1 μL of cDNA, plus 0.1 μM of the specific primers. PCR reactions were performed at least in triplicate. Real-time PCR conditions were an initial denaturation step, 95 °C for 3 min, followed by forty PCR cycles consisting of 15 s of denaturation at 95 °C, and 30 s of annealing plus elongation at 70 °C. Finally, melting curves were determined, and no primer dimers were detected.

2.6. Statistics

All experiments were repeated at least three times and three technical replicates for each sample were performed. Data were analyzed with Microsoft Excel 2016 software and the significance of differences between mean values was determined by GraphPad Prism 7. Significant differences are indicated with asterisks (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3. Results and Discussion

The evolution of Hak transporters is a very interesting topic since they are present in many different organisms, widely distributed along the evolutionary scale [27]. A phylogenetic tree of Hak in main Fungi has been constructed (Figure 1 and Table S1). About one third of the HAK genes identified belong to yeast and most of them are *Candida* species. Despite being present in many fungi, many others have lost their corresponding genes during evolutionary history and, in fact, neither the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* nor the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* carries genes belonging to the family [2]. Hak transporters are members of the amino acid-polyamine organocation (APC) superfamily. Although the molecular bases for transport in the potassium importer KimA from *Bacillus subtilis* have been recently unravelled [28], the detailed structural information of KT/HAK/KUP transport mechanisms remains largely unknown.

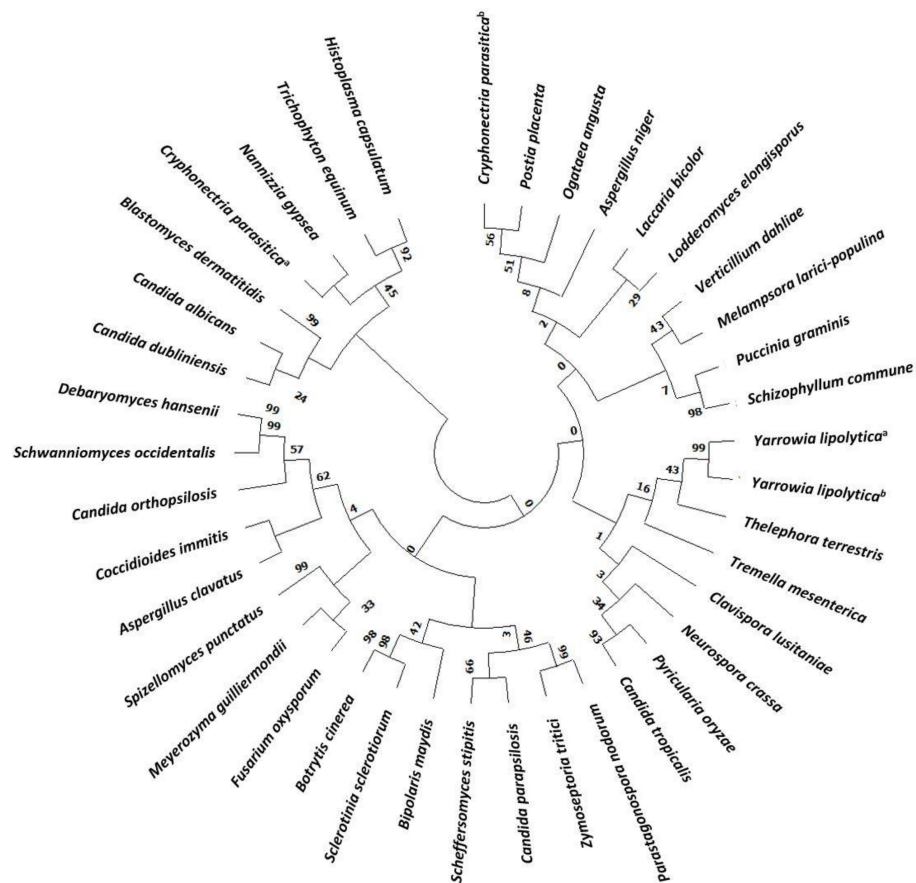


Figure 1. Phylogenetic tree of Hak family proteins in main fungi. Databases used for identification were: National Center for Biotechnology Information (NCBI) and Joint Genome Institute (JGI). Evolutionary relationships were assessed using the MEGA X software (<https://www.megasoftware.net>, accessed on 5 March 2021). Parameters were preserved by default. Phylogenetic tree was constructed with the Neighbor joining likelihood approach. The Bootstrap consensus tree was inferred from 500 sampling replicates. Protein sequences with more than 30% homology to CaHAK1 and that putative belong to the KT/HAK/KUP family were selected. Protein IDs are included in Supplementary Table S1 (TS1).

3.1. Potassium Requirements and Transport Characteristics in *HAK1+* and *hak1*– *Candida albicans*

Experiments in YNB-F solid media showed that *Candida albicans* SN250 *HAK1+* strain was able to grow with low potassium concentrations at a wide range of pHs (Figure 2A). On the other hand, growth of the corresponding *hak1*– strain was severely affected when both the potassium concentration and pH in the medium were low (Figure 2A). The differences between both strains were more notable at pH 3.0, where the strain with the complete potassium transporter Hak1 (*HAK1+*) showed a much better growth than the strain with the disrupted gene. Nevertheless, these differences decreased as the pH increased and were almost non-existent at pH 7.5 (Figure 2A).

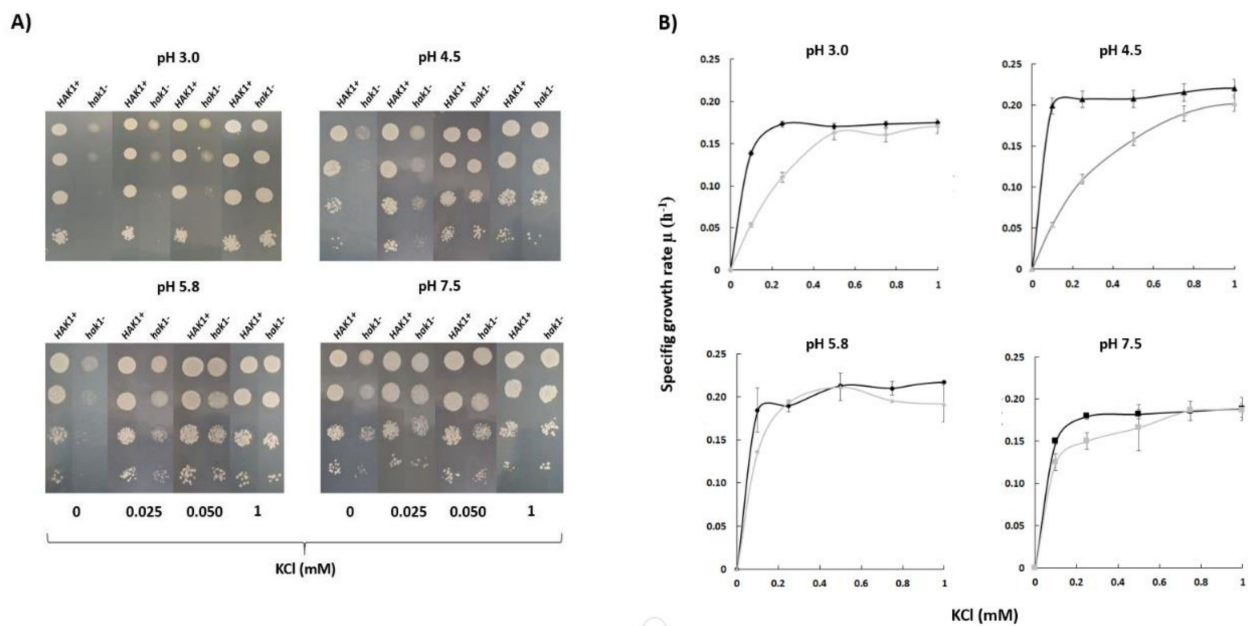


Figure 2. Potassium requirements for growth at different pHs in *C. albicans* *HAK1+* and *hak1*– strain. (A) Serial dilutions of yeast suspensions were inoculated on YNB-F plates containing the indicated concentrations of KCl and adjusted at the required pH as described in the Materials and Methods. The pictures were taken after 48 h incubation at 28 °C. Drop tests were repeated three times and a representative experiment is shown. (B) Specific growth rate of *C. albicans* *HAK1+* (Black) and *hak1*– (Gray) at different K⁺ concentrations in liquid YNB-F medium supplemented with the indicated amounts of KCl and adjusted at the required pH as described in the Materials and Methods. Cultures were inoculated at A₆₀₀ 0.05, growth was monitored during 48 h, and specific growth rates were deduced from data in growth curves. Mean values ± standard deviation obtained in three independent experiments are plotted.

To quantify in more detail the potassium requirements of both strains, growth experiments in YNB-F liquid medium supplemented with several KCl concentrations were also performed and specific growth rates were calculated (Figure 2B). The results obtained showed a similar trend with those obtained in the solid medium. Under conditions of pH 7.5 or 5.8, no great differences between the *HAK1+* and *hak1*– strains were observed. On the other hand, the behaviour of both strains was different when the pH of the media was decreased. Under these conditions, the *hak1*– strain showed lower specific growth rates at limiting potassium concentrations compared to the *HAK1+* (Figure 2B), which is consistent with results in Figure 2A. These results would agree with a previous work describing that, in *Schwanniomyces occidentalis*, the Hak1 transporter is functional at low pH but fails at high pH, and that the Trk1 transporter functions at neutral and high pH but shows a more defective work at low pH [29].

Our results suggest that the *C. albicans* strain containing the complete *HAK1* gene has a greater capacity to absorb potassium from the external environment than the *hak1* defective one and that this is especially relevant at low concentrations of the cation and at acidic pHs. To confirm this idea, potassium-starved *HAK1+* and *hak1*– cells were suspended in

uptake buffers adjusted at different pHs containing micromolar concentration of potassium. Then, changes in the extracellular potassium levels were determined. Results obtained from these experiments are shown in Figure 3. The extracellular potassium levels showed a sharp decrease when cells of the *HAK1+* strain were present, suggesting an immediate uptake from the medium under the conditions studied. On the other hand, the *hak1-* strain showed some difficulties in taking up potassium, as the extracellular levels showed a smoother descent or even no changes, particularly at low environmental pHs. For example, after ten minutes of incubation at pH 3.0, the differences observed between the strains were remarkable, showing that the *HAK1+* strain absorbed almost all the potassium from the extracellular medium while the *hak1-* strain was not able to decrease external potassium. However, these differences decreased when the pH increased. This can be observed in the results obtained at pH 7.5, where after ten minutes of incubation both strains had a similar behaviour. These results confirm the relevance of the potassium transporter Hak1 for *C. albicans* cells to take up extracellular potassium in acidic environments.

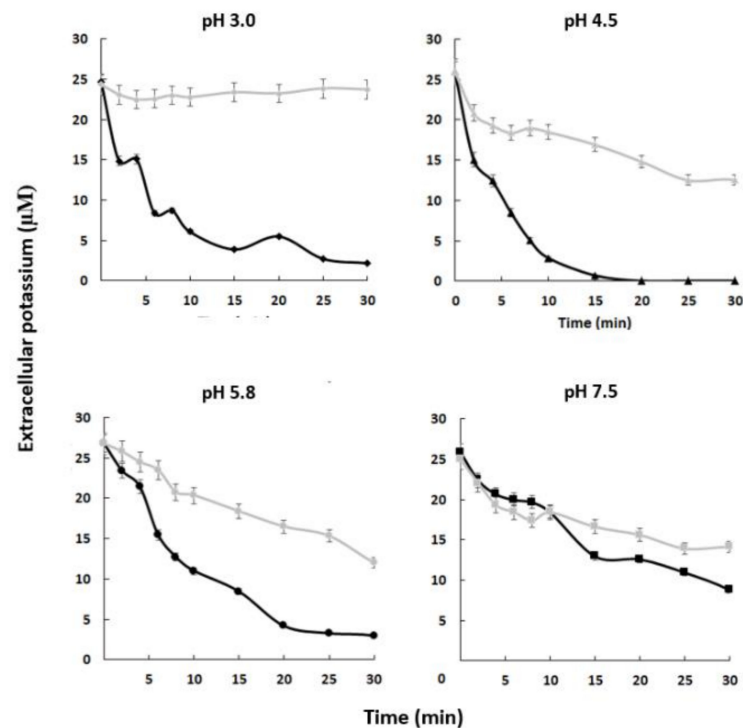


Figure 3. Absorption of external potassium in *C. albicans* *HAK1+* and *hak1-* strains. K^+ -starved cells were resuspended (A_{600} 0.5) in uptake buffer adjusted at the required pH (see the Materials and Methods) and containing 25–28 $\mu M K^+$ approx. Samples of *HAK1+* (black) and *hak1-* (gray) cells were taken at the indicated times, filtered, and K^+ in the medium was measured. Mean values \pm standard deviation obtained in three independent experiments are plotted.

To further characterise potassium uptake, we performed a detailed analysis of the kinetics of Rb^+ uptake (a commonly used K^+ transport analogue) in cells grown under normal K^+ conditions and in K^+ -starved cells at the different pHs previously tested (Table 1). We found minor differences in the apparent kinetic constants for rubidium transport between strains in normal potassium cells indicating that under these conditions the relevance of Hak1 transporter is not very important. However, when the kinetics of Rb^+ transport were studied in potassium-starved cells, we found significant differences, specially at low pH. It should be noted that as the pH decreased, the differences between the strains became more evident both in their V_{max} and in their K_m . For example, the estimated kinetic constants for rubidium transport at pH 3.0 showed great differences between the strains. Specifically, in the *HAK1+* strain vs. the *hak1-*, the V_{max} of rubidium

transport was 12.9-fold higher and the K_m for the cation was 41.6-fold lower. However, these differences changed when pH increased and almost disappeared at pH 7.5 (V_{max} was only 1.3-fold higher and K_m 2.6-fold lower in the strain with *HAK1* complete vs. the defective mutant).

Table 1. Apparent kinetic parameters for rubidium transport in normal K^+ cells and K^+ -starved cells of *Candida albicans* strains.

pH	<i>HAK1</i>	Normal K^+ Cells		K^+ -Starved Cells	
		V_{max} ($nmol \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$)	K_m (mM)	V_{max} ($nmol \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$)	K_m (mM)
3.0	+	0.63 ± 0.20	1.63 ± 0.55	11.49 ± 0.20	0.09 ± 0.02
	–	0.45 ± 0.22	1.88 ± 0.42	$0.89 \pm 0.07^{***}$	$3.75 \pm 0.05^{***}$
4.5	+	0.91 ± 0.12	0.95 ± 0.04	13.71 ± 0.58	0.03 ± 0.02
	–	0.74 ± 0.09	0.87 ± 0.05	$3.69 \pm 0.43^{***}$	$0.59 \pm 0.06^{***}$
5.8	+	1.96 ± 0.33	0.25 ± 0.02	9.79 ± 0.43	0.09 ± 0.02
	–	$1.34 \pm 0.20^*$	0.32 ± 0.03	$5.57 \pm 1.25^{**}$	$0.55 \pm 0.17^{**}$
7.5	+	2.68 ± 0.27	0.36 ± 0.03	9.92 ± 1.65	0.28 ± 0.08
	–	$2.01 \pm 0.11^*$	0.40 ± 0.07	7.89 ± 1.79	$0.74 \pm 0.25^{**}$

Kinetic parameters of rubidium transport were calculated after plotting data using GraphPad Prism v7. Mean values \pm standard deviations were obtained from three independent experiments. Statistically significant data were expressed as: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

All together these results suggest that the expression of *HAK1* gene or the activity of the corresponding protein is much higher in potassium-starved cells and, once again, point to the fact that the extracellular proton levels may play a role in the transport process.

The results shown above are in agreement with the hypothesis of a potassium:proton symporter working with high affinity for the cation as previously proposed in *Schwanniomyces occidentalis* [2,29,30]. At this point it is important to highlight that it has been proposed that, in addition to their cation transport activities, some potassium transporters can influence other important processes. In fact, several studies carried out in *Arabidopsis* have shown that members of the HAK/KUP/KT family are involved in the regulation of cell size, auxin distribution, or osmotic stress adaptation [31,32]. Moreover, in the case of *C. albicans*, the *hak1*– mutant was isolated and partially characterized, not because of its potassium transport characteristics, but on the basis of a defective infectivity [23].

3.2. Transcriptional Regulation of the *C. albicans* Plasma Membrane Potassium Transporters

As mentioned throughout this work, three types of plasma membrane potassium transporters have been identified in *C. albicans*: Trk1, Hak1, and Acu1 [5]. The two strains used in this work are derivatives of *C. albicans* SC5314, widely used as a wild-type reference strain. Regarding potassium transporters, SC5314 has an amber stop codon mutation inside *ACU1* coding region and, thus, should lack viable Acu1 proteins although *ACU1* transcript levels could be determined in that strain [5,22,33].

To further investigate the regulation of the three transport mechanisms at transcriptional level, and the impact of *HAK1* deletion on that regulation, the expression of their corresponding genes was studied in the isogenic *HAK1*+ and *hak1*– strains used in this work, under different growth conditions (Figure 4).

Changes in the pH of the media only provoked very slight variations on the transcription of *TRK1*, *ACU1*, and *HAK1* genes in both strains studied (Elisa Rodríguez-Castro and José Ramos, Final Bachelor's degree thesis, under progress). On the other hand, exposure to saline stress or potassium-limiting conditions triggered major changes in *ACU1* and *HAK1* transcription levels, particularly in the former where huge increments (>400-fold) could be observed upon potassium starvation (Figure 4).

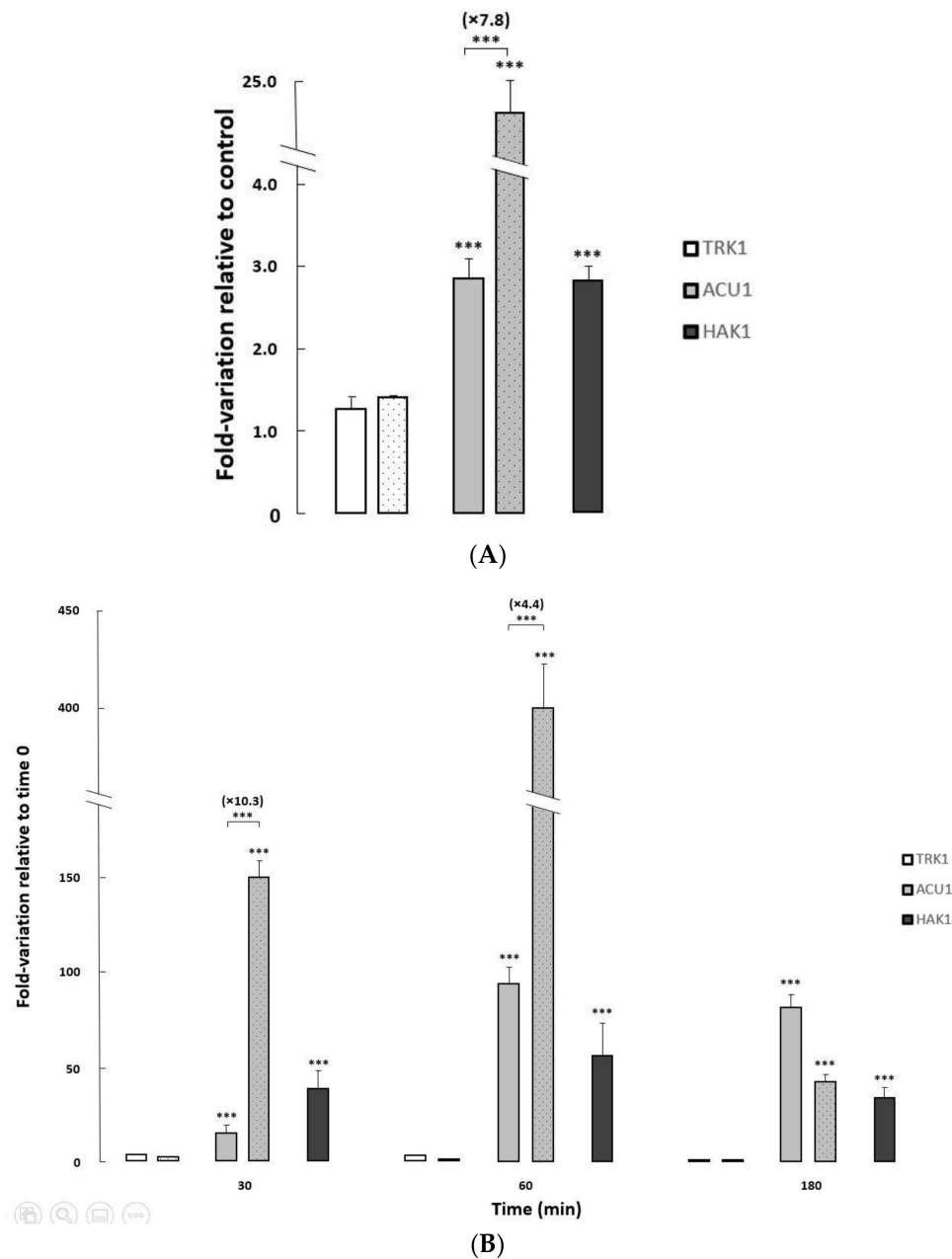


Figure 4. Changes in expression levels of potassium transporter genes in *C. albicans* *HAK1*⁺ and *hak1*[−] strains. **(A)** The cells were grown overnight in YNB liquid medium (Control) and in YNB medium supplemented with 1 M NaCl to an A_{600} of 0.6–0.7. **(B)** Normal- K^+ cells were grown to exponential phase, washed and resuspended in YNB-F without KCl, and further incubated. Samples were taken at different times during potassium starvation (0, 30, 60 and 180 min). All transcript levels are referred to those for the controls **(A)** or time 0 **(B)**. The *HAK1*⁺ strain was represented by filled bars while the mutant strain was represented by dotted bars. Mean values \pm standard deviations were obtained from at least three independent experiments. Statistically significant compared to the controls/time 0 and comparing the strains (square brackets) expressed as: *** $p < 0.001$.

Both *ACU1* and *HAK1* mildly increased their mRNA when the control *HAK1*⁺ strain was grown on media supplemented with sodium chloride. Furthermore, salt-induced *ACU1* transcription was further fueled in cells lacking the Hak1 transporter (Figure 4A), suggesting a compensation mechanism.

To study the effect of potassium deprivation, cells were grown to exponential phase in regular media, then changed to limiting potassium conditions, and the transcriptional levels of the three potassium transporter genes were followed at different times after the

change (Figure 4B). In the *HAK1*⁺ control strain, and in concordance with a previous work [22], *ACU1* and *HAK1* genes increased their expression upon potassium starvation with a peak at 60 min after the deprivation, although the induction was larger for *ACU1*. As observed for the saline stress response, induction of *ACU1* transcription upon potassium deprivation stress was further increased (up to 10.3-fold) in the *hak1*[−] strain compared to the *HAK1*⁺, additionally supporting that the lack of Hak1 could affect the level of *ACU1* transcripts.

It is usually reported that *TRK* genes are not significantly regulated at transcriptional level [2,3]. In our case, *CaTRK1* mRNA presented very moderate changes upon saline stress or upon potassium deprivation (Figure 4).

3.3. Role of Hak1 in Tolerance to the Toxic Lithium Cation

Lithium is a toxic alkali cation that uses potassium transporters in the yeast plasma membrane to enter the cell. Therefore, it is conceivable that *C. albicans* transporters may play a role in salt tolerance, most likely by interfering with the accumulation of toxic cations. For this reason, we tested the tolerance of our *HAK1*⁺ and *hak1*[−] strains to this toxic cation in liquid media adjusted at different pHs and supplemented with several LiCl concentrations.

The growth curve of both strains was very similar in the absence of the toxic cation. When lithium chloride was added to the medium, the growth of both strains was affected but the mutant was more sensitive under some specific conditions. Differences between the *HAK1*⁺ strain and the one with the disrupted gene were more significant at pH 3.0. At acidic conditions, 0.15 M LiCl impaired growth of the mutant much more strongly than in the case of *HAK1*⁺ cells. At pH 7.5, the differences in tolerance between strains were much less important (Figure 5).

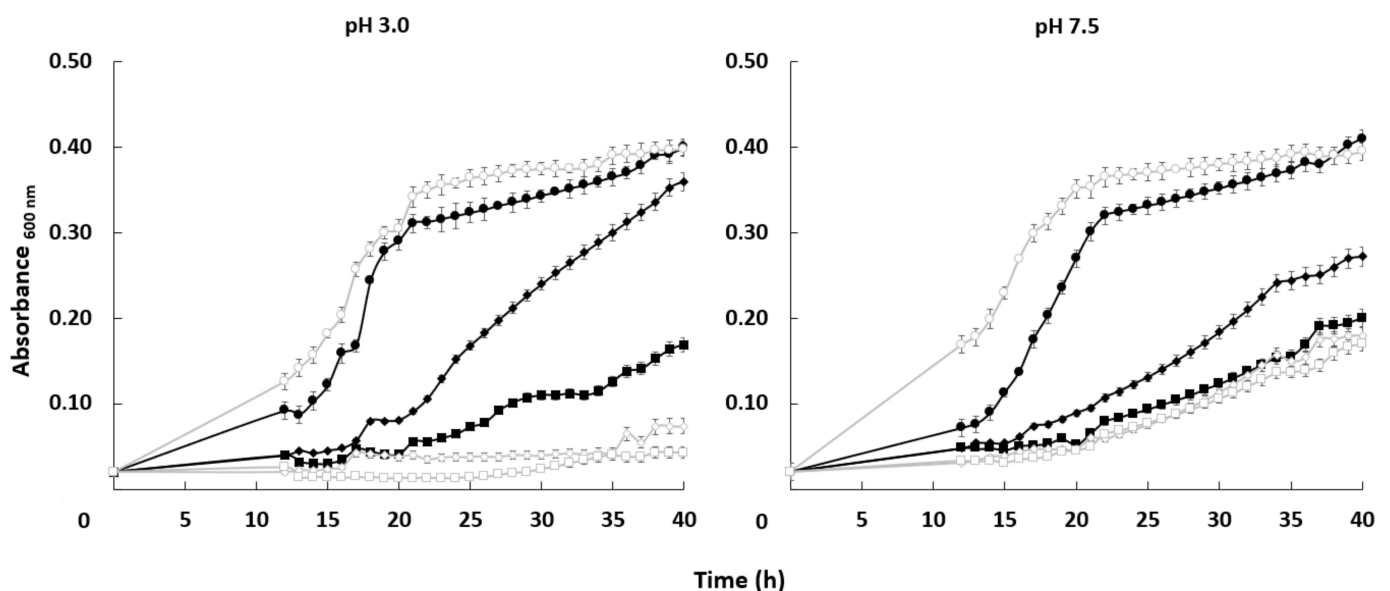


Figure 5. Effect of LiCl on the growth of *C. albicans* *HAK1*⁺ and *hak1*[−] strains at different pHs. Cells were grown in liquid YNB medium supplemented with the indicated amounts of LiCl and adjusted at pH 3.0 or 7.5 as described in the Materials and Methods. The concentrations of LiCl studied were: 0 (circle), 0.15 (diamond) or 0.30 (square) M LiCl. Cultures were inoculated at A_{600} 0.05 and growth of *HAK1*⁺ (filled symbols) and *hak1*[−] (open symbols) strains was monitored during 40 h. Mean values \pm standard deviation obtained in three independent experiments are plotted.

To obtain further information on the reasons behind the lithium tolerance due to the activity of Hak1 transporter, we measured intracellular lithium and potassium content in cells of both strains grown under the same conditions used for the lithium toxicity growth assays (Table 2). Lithium and sodium toxicity in yeasts has been usually linked

to a higher intracellular accumulation of the toxic cation and, at the same time, to lower concentrations of internal potassium [2,34]. We did not find differences in intracellular lithium content between strains under any condition studied. However, the *HAK1+* strain was able to keep moderately higher amounts of potassium than the mutant when grown at pH 3.0, both in the presence of 0.15 or 0.30 M LiCl. These differences disappeared when the experiment was performed at pH 7.5 (Table 2 and Elisa Rodríguez-Castro and José Ramos, Final Bachelor's degree thesis, under progress). Our results indicate that the role of the CaHak1 transporter in lithium tolerance can be indirect since it does not affect the accumulation of the toxic cation, but it helps to keep an appropriate potassium homeostasis [22].

Table 2. Intracellular lithium and potassium in *Candida albicans* strains.

pH	<i>HAK1</i>	0.30 M LiCl	
		Lithium (nmol·mg ⁻¹)	Potassium (nmol·mg ⁻¹)
3.0	+	13.9 ± 0.4	242.7 ± 12.5
	–	14.8 ± 0.5	185.9 ± 10.4 **
7.5	+	13.1 ± 3.8	126.3 ± 12.8
	–	14.3 ± 4.6	122.3 ± 7.3

Cells were grown in YNB medium adjusted at pH 3.0 or 7.5 and supplemented with 0.15 or 0.30 M LiCl. Mean values ± standard deviations were obtained from three independent experiments. Statistically significant data were expressed as: ** $p < 0.01$.

In conclusion, we show in this research that Hak1 is a crucial potassium transporter in *C. albicans*. This transporter is fully required to provide potassium for growth under some specific conditions such as low external potassium and acidic pHs. Furthermore, Hak1 contributes to avoid lithium toxicity at low pH. Further studies are needed to determine the overlapping functions of the different potassium transporters under variable environmental conditions.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof7050362/s1>. Table S1: Proteins included in the Phylogenetic tree of Hak family in Fungi.

Author Contributions: Conceptualization, F.J.R.-C. and J.R.; methodology, F.J.R.-C., C.M. and J.R.; software, F.J.R.-C. and C.M.; validation, F.J.R.-C., C.M. and J.R.; formal analysis, F.J.R.-C., C.M. and J.R.; investigation, F.J.R.-C. and E.R.-C.; resources, J.R.; writing—original draft preparation, F.J.R.-C., C.M. and J.R.; writing—review and editing, F.J.R.-C., C.M. and J.R.; visualization, J.R.; supervision, J.R.; project administration, J.R.; funding acquisition, J.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by The University of Córdoba, XXII Plan Propio Investigación (Group BIO-202), and Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities grant number RTI2018-097935-B-I00.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Acknowledgments: Jesús Pla is acknowledged for the *C. albicans* strains.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Hawkesford, M.; Horst, W.; Kichey, T.; Lambers, H.; Schjoerring, J.; Møller, I.S.; White, P. Functions of macronutrients. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, 3rd ed.; Marschner, P., Ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2011; pp. 135–189. ISBN 9780123849052.
- Ramos, J.; Ariño, J.; Sychrová, H. Alkali-metal-cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species. *FEMS Microbiol. Lett.* **2011**, *317*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Ariño, J.; Ramos, J.; Sychrova, H. Monovalent cation transporters at the plasma membrane in yeasts. *Yeast* **2019**, *36*, 177–193. [[CrossRef](#)]
4. Benito, B.; Garcíadeblás, B.; Schreier, P.; Rodríguez-Navarro, A. Novel p-type ATPases mediate high-affinity potassium or sodium uptake in fungi. *Eukaryot. Cell* **2004**, *3*, 359–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Elicharová, H.; Hušeková, B.; Sychrová, H. Three *Candida albicans* potassium uptake systems differ in their ability to provide *Saccharomyces cerevisiae* *trk1trk2* mutants with necessary potassium. *FEMS Yeast Res.* **2016**, *16*, 39. [[CrossRef](#)]
6. Martínez, J.L.; Sychrova, H.; Ramos, J. Monovalent cations regulate expression and activity of the Hak1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Genet. Biol.* **2011**, *48*, 177–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Cabrera, E.; Álvarez, M.C.; Martín, Y.; Siverio, J.M.; Ramos, J. K⁺ uptake systems in the yeast *Hansenula polymorpha*. Transcriptional and post-translational mechanisms involved in high-affinity K⁺ transporter regulation. *Fungal Genet. Biol.* **2012**, *49*, 755–763. [[CrossRef](#)]
8. Haro, R.; Sainz, L.; Rubio, F.; Rodríguez-Navarro, A. Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **1999**, *31*, 511–520. [[CrossRef](#)]
9. Rivetta, A.; Allen, K.E.; Slayman, C.W.; Slayman, C.L. Coordination of K⁺ Transporters in *Neurospora*: TRK1 Is Scarce and Constitutive, while HAK1 Is Abundant and Highly Regulated. *Eukaryot. Cell* **2013**, *12*, 684–696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Nieves-Cordones, M.; Alemán, F.; Martínez, V.; Rubio, F. K⁺ uptake in plant roots. The systems involved, their regulation and parallels in other organisms. *J. Plant Physiol.* **2014**, *171*, 688–695. [[CrossRef](#)]
11. Santa-María, G.E.; Oliferuk, S.; Moriconi, J.I. KT-HAK-KUP transporters in major terrestrial photosynthetic organisms: A twenty years tale. *J. Plant Physiol.* **2018**, *226*, 77–90. [[CrossRef](#)]
12. Ragel, P.; Raddatz, N.; Leidi, E.O.; Quintero, F.J.; Pardo, J.M. Regulation of K⁺ Nutrition in Plants. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 281. [[CrossRef](#)]
13. Zakharyan, E.; Trchounian, A. K⁺ influx by Kup in *Escherichia coli* is accompanied by a decrease in H⁺ efflux. *FEMS Microbiol. Lett.* **2001**, *204*, 61–64. [[CrossRef](#)]
14. Bañuelos, M.; Klein, R.; Alexander-Bowman, S.; Rodríguez-Navarro, A. A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *EMBO J.* **1995**, *14*, 3021–3027. [[CrossRef](#)]
15. Rodríguez-Navarro, A.; Blatt, M.R.; Slayman, C.L. A potassium-proton symport in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Physiol.* **1986**, *87*, 649–674. [[CrossRef](#)]
16. Maathuis, F.J.; Sanders, D. Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 9272–9276. [[CrossRef](#)]
17. Benito, B.; Garcíadeblás, B.; Fraile-Escanciano, A.; Rodríguez-Navarro, A. Potassium and sodium uptake systems in fungi. The transporter diversity of *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* **2011**, *48*, 812–822. [[CrossRef](#)]
18. Schulze, J.; Sonnenborn, U. Yeasts in the gut: From commensals to infectious agents. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2009**, *106*, 837–842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Witherden, E.A.; Shoaie, S.; Hall, R.A.; Moyes, D.L. The Human Mucosal Mycobiome and Fungal Community Interactions. *J. Fungi* **2017**, *3*, 56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Baev, D.; Rivetta, A.; Vylkova, S.; Sun, J.N.; Zeng, G.-F.; Slayman, C.L.; Edgerton, M. The TRK1 Potassium Transporter Is the Critical Effector for Killing of *Candida albicans* by the Cationic Protein, Histatin 5. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 55060–55072. [[CrossRef](#)]
21. Miranda, M.; Bashi, E.; Vylkova, S.; Edgerton, M.; Slayman, C.; Rivetta, A. Conservation and dispersion of sequence and function in fungal TRK potassium transporters: Focus on *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* **2009**, *9*, 278–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ruiz-Castilla, F.J.; Bieber, J.; Caro, G.; Michán, C.; Sychrova, H.; Ramos, J. Regulation and activity of CaTrk1, CaAcu1 and CaHak1, the three plasma membrane potassium transporters in *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta BBA Biomembr.* **2021**, *1863*, 183486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Noble, S.M.; French, S.; Kohn, L.A.; Chen, V.; Johnson, A.D. Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nat. Genet.* **2010**, *42*, 590–598. [[CrossRef](#)]
24. Prista, C.; Almagro, A.; Loureiro-Dias, M.C.; Ramos, J. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 4005–4009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ramos, J.; Haro, R.; Rodríguez-Navarro, A. Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta BBA Biomembr.* **1990**, *1029*, 211–217. [[CrossRef](#)]
26. Navarrete, C.; Petrezsélyová, S.; Barreto, L.; Martínez, J.L.; Zahrádka, J.; Ariño, J.; Sychrová, H.; Ramos, J. Lack of main K⁺ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res.* **2010**, *10*, 508–517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Grabov, A. Plant KT/KUP/HAK Potassium Transporters: Single Family—Multiple Functions. *Ann. Bot.* **2007**, *99*, 1035–1041. [[CrossRef](#)]
28. Tascón, I.; Sousa, J.S.; Corey, R.A.; Mills, D.J.; Griwatz, D.; Aumüller, N.; Mikusevic, V.; Stansfeld, P.J.; Vonck, J.; Hänel, I. Structural basis of proton-coupled potassium transport in the KUP family. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–10. [[CrossRef](#)]
29. Bañuelos, M.A.; Madrid, R.; Rodríguez-Navarro, A. Individual functions of the HAK and TRK potassium transporters of *Schwanniomyces occidentalis*. *Mol. Microbiol.* **2002**, *37*, 671–679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

30. Rodríguez-Navarro, A. Potassium transport in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Rev. Biomembr.* **2000**, *1469*, 1–30. [[CrossRef](#)]
31. Véry, A.-A.; Nieves-Cordones, M.; Daly, M.; Khan, I.; Fizames, C.; Sentenac, H. Molecular biology of K⁺ transport across the plant cell membrane: What do we learn from comparison between plant species? *J. Plant Physiol.* **2014**, *171*, 748–769. [[CrossRef](#)]
32. Nieves-Cordones, M.; Ródenas, R.; Chavanieu, A.; Rivero, R.M.; Martínez, V.; Gaillard, I.; Rubio, F. Uneven HAK/KUP/KT Protein Diversity Among Angiosperms: Species Distribution and Perspectives. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Jones, T.; Federspiel, N.A.; Chibana, H.; Dungan, J.; Kalman, S.; Magee, B.B.; Newport, G.; Thorstenson, Y.R.; Agabian, N.; Magee, P.T.; et al. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 7329–7334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gómez, M.J.; Luyten, K.; Ramos, J. The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1996**, *135*, 157–160. [[CrossRef](#)]



Regulation and activity of *CaTrk1*, *CaAcu1* and *CaHak1*, the three plasma membrane potassium transporters in *Candida albicans*

Francisco J. Ruiz-Castilla^a, Jan Bieber^b, Gabriel Caro^a, Carmen Michán^c, Hana Sychrova^b, José Ramos^{a,*}

^a Department of Microbiology, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain

^b Laboratory of Membrane Transport, Institute of Physiology, Czech Academy of Sciences, 142 20 Prague 4, Czech Republic

^c Department of Biochemistry and Molecular Biology, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario CeiA3, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Candida albicans
Potassium transport
Trk1
Acu1
Hak1
Heterologous expression

ABSTRACT

Wild-type cells of *Candida albicans*, the most common human fungal pathogen, are able to grow at very low micromolar concentrations of potassium in the external milieu. One of the reasons behind that behaviour is the existence of three different types of K⁺ transporters in their plasma membrane: Trk1, Acu1 and Hak1. This work shows that the transporters are very differently regulated at the transcriptional level upon exposure to saline stress, pH alterations or K⁺ starvation. We propose that different transporters take the lead in the diverse environmental conditions, Trk1 being the “house-keeping” one, and Acu1/Hak1 dominating upon K⁺ limiting conditions. Heterologous expression of the genes coding for the three transporters in a *Saccharomyces cerevisiae* strain lacking its endogenous potassium transporters showed that all of them mediated cation transport but with very different efficiencies. Moreover, expression of the transporters in *S. cerevisiae* also affected other physiological characteristics such as sodium and lithium tolerance, membrane potential or intracellular pH, being, in general, *CaTrk1* the most effective in keeping these parameters close to the usual wild-type physiological levels.

1. Introduction

Potassium is absolutely required for life. This cation is accumulated at high concentrations by living cells, fulfilling multiple major physiological functions. It works as an enzyme cofactor and contributes to the regulation of intracellular pH, membrane potential or cell turgor [1–5]. Since potassium is scarce in most of external environments, cells have developed efficient transport systems to internally concentrate the ion. In the case of yeasts, three families of plasma membrane K⁺ transporters can coexist: Trk uniporters, Hak potassium-proton symporters and Acu ATPases. While in some yeast species such as *Saccharomyces cerevisiae* or *Schizosaccharomyces pombe*, only transporters belonging to the Trk family are found, Trk and Hak proteins are present in quite a good number of non-conventional yeasts, and, finally, members of the three families of transporters have been described in only a few species [5,6].

Candida albicans is an important opportunistic fungal pathogen. This yeast can be defined as a fungal pathobiont present in most healthy individuals that, under certain circumstances, can become pathogenic and cause disease ranging from superficial to invasive lethal infections

in humans [7,8]. In fact, it can be isolated from oral-pharyngeal, gastrointestinal, and urogenital tracts [9], and has emerged as one of the most common causes of nosocomial bloodstream infections [10].

Potassium homeostasis in *C. albicans* has been neither studied in detail nor properly addressed even though it has been reported that pathogenic *Candida* species differ in the ability to grow at limiting potassium concentrations [11]. The plasma membrane of *C. albicans* is endowed with potassium transporters belonging to the three families mentioned above [12] and although these proteins have been proposed to be good putative targets in the search of new antifungal drugs, the contribution of the different potassium transporters to the whole homeostatic process has not been analyzed in terms of gene expression or transport capacities. So far, only *CaTrk1* has been partly characterized [13,14]. It was proposed that *CaTrk1* protein is the critical effector for the cationic protein Histatin 5 toxicity and that it mediates candidacidal activities of cysteine-free peptides in *C. albicans* [13,15]. It was suggested also that *CaTrk1* is the major potassium transporter in *C. albicans* and that *CaTRK1* is an essential gene [13]. However, later on, a transposon mutagenesis approach did not confirm the essentiality of the gene

* Corresponding author.

E-mail address: milraruj@uco.es (J. Ramos).

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183486>

Received 7 July 2020; Received in revised form 25 September 2020; Accepted 2 October 2020

Available online 15 October 2020

0005-2736/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

[16]. In addition, the primary function of Trk proteins, transport of K⁺ cations, is conserved between *C. albicans* and *S. cerevisiae* but, the secondary function, chloride efflux channeling, is present but poorly conserved between the two species [14]. Finally, the fact that several so-called *C. albicans* wild-type strains possess interrupted *CaACU1* introduces a new problem in the approaches to the unraveling potassium homeostasis in this organism. For example, in the first *C. albicans* sequenced genome, the SC5314 strain [17], the putative *CaACU1* gene is interrupted by a nonsense point mutation [12].

In a first systematic attempt to understand the role of *CaTrk1*, *CaHak1* and *CaAcu1* in potassium transport, their corresponding genes were expressed in *S. cerevisiae* lacking their own potassium uptake systems. The study showed that all three transporters were able to provide cells with the ability to grow with low amounts of external potassium suggesting the activity of a high affinity and capacity potassium transport process due to the expression of the transporters [12].

In this research we analyzed potassium requirements and transport characteristics in a real wild-type *C. albicans* strain carrying the three functional potassium transporters. We studied the transcriptional regulation of the three genes coding for the corresponding transporters under several physiological conditions. In addition, we took advantage of the existence of a series of *S. cerevisiae* strains expressing only one of the three *C. albicans* potassium uptake systems to determine their potassium transport characteristics. We propose also that the level of sodium and lithium tolerance provided by the different transporters is related to their capacity to discriminate between alkali cations during the transport process. Finally, we show that *CaTrk1*, *CaHak1* and *CaAcu1* can confer different levels of membrane potential and intracellular pH when expressed in *S. cerevisiae* cells.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strains and cultivation

Yeast strains used in this study are listed in Table 1. YNB based media adjusted at pH 5.8 with NH₄OH were used (0.17% YNB or 0.17% YNB-F, Formedium™). The media were supplemented with 2% glucose, 0.4% ammonium sulphate, auxotrophic supplements and the indicated amounts of KCl. The K⁺ and Na⁺ contents were, in our hands, around 9 and 14 mM in YNB and 0.02 and 1.3 mM in YNB-F respectively. Solid media were prepared by adding 2% (w/v) agar to the previously described recipes [12,18]. Cells were routinely grown at 28 °C. To obtain normal K⁺ cells, yeasts were grown in YNB supplemented with 100 mM KCl. For K⁺ starvation experiments, normal K⁺ cells were washed with sterile water and resuspended in K⁺-free medium (YNB-F) without added potassium for 3 h. For the estimation of relative membrane potential, cells were grown in YNB supplemented with 50 mM KCl to absorbance at 600 nm (A₆₀₀) 0.2–0.25, and for the intracellular pH measurements, cells were grown in filter-sterilised YNB-F^{pH} medium (Formedium™) supplemented with 100 mM KCl.

Table 1
Yeast strains used in this study.

Strain	Feature/plasmid	Origin/reference
<i>C. albicans</i> 12C	Wild type	Broad Institute, USA
<i>C. albicans</i> SC5314	Wild type	[17]
<i>S. cerevisiae</i> BYT12	YEp352	[12]
<i>S. cerevisiae</i> BYT12	pCaTRK1	[12]
<i>S. cerevisiae</i> BYT12	pCaACU1	[12]
<i>S. cerevisiae</i> BYT12	pCaHAK1	[12]
<i>S. cerevisiae</i> BYT4741 ^{pH}	YEp352	[27]
<i>S. cerevisiae</i> BYT12 ^{pH}	YEp352	[27]
<i>S. cerevisiae</i> BYT12 ^{pH}	pCaTRK1	This work
<i>S. cerevisiae</i> BYT12 ^{pH}	pCaACU1	This work
<i>S. cerevisiae</i> BYT12 ^{pH}	pCaHAK1	This work

2.2. Growth assays

Potassium requirements, and sodium and lithium tolerances were determined in solid and liquid media. Drug tolerance was tested in solid media.

Drop tests were performed with fresh cells resuspended in water and adjusted to the same 1.0 initial A₆₀₀. Tenfold serial dilutions were prepared, and 3 μl aliquots of each dilution were spotted on the appropriate media containing salts or drugs as indicated in the text. Plates were incubated for 24–48 h.

Growth curves at several KCl, NaCl or LiCl concentrations were performed in tubes with 5 ml of YNB-F medium supplemented with the indicated amounts of salts. A₆₀₀ of cultures was followed for 24–48 h using a Spectronic 20 (Bausch and Lomb). Specific growth rates were calculated from the growth curves [19].

2.3. Cation content and transport

Variation of external potassium was measured by transferring K⁺-starved cells (A₆₀₀ 0.5) to uptake buffer (10 mM MES buffer supplemented with 2% (w/v) glucose, 0.1 mM MgCl₂ and adjusted at pH 5.8 with Ca(OH)₂) containing 23–28 μM K⁺. The time course of K⁺ changes was followed by taking samples at different times, the samples were immediately filtered (Millipore, AAWP 0.8 μm pore size), and potassium was measured in the liquid fraction.

To study the characteristics of Rb⁺ uptake, normal K⁺ cells or K⁺-starved cells were washed and suspended (A₆₀₀ 0.3) in the uptake buffer. The required amount of RbCl was added to the buffer at time zero and aliquots were withdrawn at various times. Eight to twelve concentrations of RbCl ranging from 20 μM to 100 mM were used to deduce the kinetic parameters of transport. Cells were treated as described below to estimate cation content.

The effect of potassium on the time course of sodium or lithium transport was studied in K⁺-starved cells suspended in uptake buffer. At time 0, NaCl or LiCl (100 mM) were added to the buffer in the absence or in the presence of 10 mM KCl and sodium or lithium accumulation was followed for 30 min approximately.

To estimate intracellular alkali-metal-cation content, cell samples were collected from liquid media or buffers on Millipore filters (0.8 μm pore size), which were rapidly washed with 20 mM MgCl₂. The cells were then extracted with 0.2 M HCl and 10 mM MgCl₂ and the extracts were analyzed by atomic emission spectrophotometry [20–22].

Extracellular potassium is expressed in micromolar units. All intracellular cation values are expressed as nmols of cation per mg dry weight of cells [18].

2.4. Measurement of relative membrane potential (diS-C3(3) assay)

The relative membrane potential of yeast cells was estimated by a fluorescence assay based on the potential-dependent redistribution of the fluorescence probe diS-C3(3) (3,3'-dipropylthiacarbocyanine iodide) [23], as described in [24]. The probe was added to a final concentration of 0.02 μM to the yeast suspension in 10 mM MES-TEA buffer (pH 6.0). Fluorescence emission spectra (λ_{ex} = 531 nm, λ_{em} = 560–590 nm) of the cell suspensions were measured in a FluoroMax-4 spectrofluorometer (Horiba Scientific). Scattered light was eliminated by a colored-glass alternative filter with a cut-off wavelength of 550 nm. The staining curves represented the dependence of the fluorescence emission maximum wavelength λ_{max} on the time of staining.

2.5. Measurement of the intracellular pH

For intracellular pH measurements, yeast strains with chromosomally integrated pHluorin sequence (Table 1) were used. The fluorescence intensities were recorded using a SynergyHT microplate reader (BioTek Instruments) with emission filter 516/20 nm and excitation

filters 400/30 and 485/20 nm according to [25] and the intracellular pH was calculated as described in [26].

2.6. RNA isolation and reverse transcription

Total RNA was extracted using the TRI-REAGENT (Sigma-Aldrich). The cells were collected from the different conditions studied (cells starved for potassium in YNB-F medium, cells grown YNB medium with 1 M NaCl, cells grown in YNB medium buffered at pH 4.5 or 7.5 with citric acid or HEPES respectively), washed with sterile cold water and resuspended in 1 ml of TRI-REAGENT plus approximately 200 μ l 0.5-mm glass beads. For disruption, yeasts were vortexed 10 times for 1 min with intervals of at least 1 min on ice, incubated 5 min at 70 °C, and followed by other 10 times 1 min vortexing with cooling intervals. Afterward, the standard TRI-REAGENT protocol for RNA isolation was followed. Isolated RNA samples were treated using DNase I (New England Biolabs) to remove contaminating DNA until no PCR amplification was observed without prior cDNA synthesis. RNA sample quality and quantification were performed spectrophotometrically. At least two RNA preparations were isolated for each experimental condition. 1 μ g from each RNA sample was retrotranscribed with Kit iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) on three separate occasions that were pooled together before PCR amplification.

2.7. Real-time PCR

The sequences of *C. albicans* *HAK1*, *ACU1* and *TRK1* genes for primer design were obtained from the National Center for Biotechnology Information Search database (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Primers were designed with OLIGO 7.60 program (Molecular Biology Insights, Cascade, CO) with high T_m (>68.2 °C) and appropriate internal stability of the 3'G end. If possible, the same set of primers was used for both strains. (Supplementary Table 1). Quality of the primers was tested; efficiencies were close to 100% and no primer dimers were observed.

The PCR amplification was carried out in a mixture (25 μ l final volume) with IQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), 1 μ l of cDNA, plus 0.1 μ M of the specific primers. PCR reactions were performed at least in triplicate. Real-time PCR conditions were an initial denaturation step, 95 °C 3 min, followed by forty PCR cycles consisting of 15 s of denaturation at 95 °C, and 30 s of annealing plus elongation at 70 °C. Finally, melting curves were determined, and no primer dimers were detected.

2.8. Statistics

At least, two biological replicates for each experiment, and three technical replicates for each sample were performed. Data were analyzed in Microsoft Excel software 2013 and the significance of differences between mean values was determined by GraphPad Prism 7. Significant differences are indicated with asterisks (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

3. Results

3.1. Potassium requirements and transport characteristics in *C. albicans*

Experiments in solid media showed that 12C *C. albicans* wild type strain was able to grow at the different external potassium concentrations tested, even in the absence of KCl added to the medium (20 μ M in YNB-F) (Fig. S1). To quantify in more detail potassium requirements of this *C. albicans* strain, experiments in YNB-F liquid medium supplemented with several KCl concentrations were also performed. Results show that increasing KCl levels improved *C. albicans* growth rate, and that the maximum μ values were reached at concentrations close to 1 mM KCl (Fig. 1). All experiments in Fig. 1 were performed at pH 5.8,

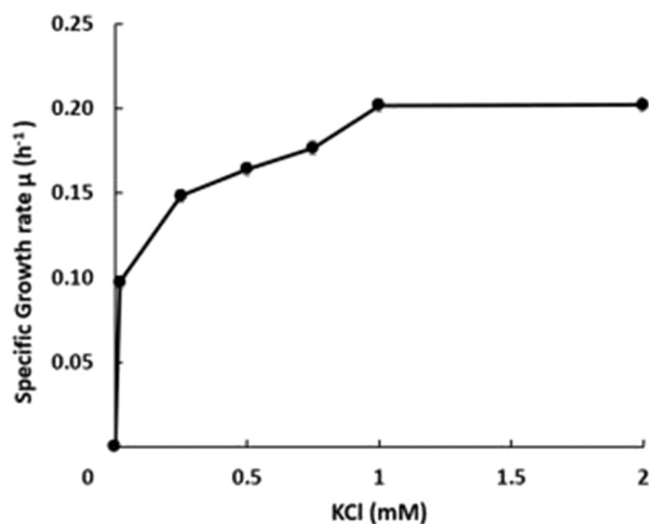


Fig. 1. Potassium requirements for growth of *C. albicans* 12C strain. Specific growth rate of *C. albicans* at different K^+ concentrations in liquid YNB-F medium supplemented with the indicated amounts of KCl. Cultures were inoculated at A_{600} 0.05 and growth was monitored during 48 h. Mean values \pm standard deviation obtained in three independent experiments are plotted.

similar tests were then performed at lower (4.5) and higher (7.5) pHs, and comparable results were obtained both in plates and in liquid media (not shown). Altogether, these results suggest that *C. albicans* has a high capacity to absorb potassium from the external medium even at low concentrations. To confirm this capacity, external potassium variation was monitored after resuspending K^+ -starved cells in an uptake buffer containing low concentrations of potassium ($\approx 28 \mu$ M). Cells immediately took K^+ from the medium, and external potassium decreased to values close to 1 μ M (Fig. S2). Moreover, we performed a detailed analysis of the kinetics of Rb^+ (a K^+ transport analogue) uptake in cells grown under normal K^+ conditions, and in K^+ -starved cells (Table 2). During the 3 h of starvation period, cells lost almost half of their intracellular potassium (396 ± 20 vs. 211 ± 18 nmol mg^{-1}). As a consequence of the starvation, the low affinity and velocity system of Rb^+ transport working in normal K^+ cells changed to a more complex biphasic mode of uptake showing a high affinity component (Table 2).

3.2. Transcriptional regulation of the *C. albicans* plasma membrane potassium transporters

As mentioned before, three types of plasma membrane potassium transporters have been identified in *C. albicans*: Trk1, Hak1 and Acu1 [12]. The expression of their corresponding genes was investigated in strain 12C using qRT-PCR under 3 different growth or incubation

Table 2

Kinetic parameters for rubidium transport in *Candida albicans* 12C with a normal potassium content and in potassium starved cells.

Conditions	V_{max1} (nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	K_{m1} (mM)	V_{max2} (nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	K_{m2} (mM)
Normal K^+ Cells	2.89 ± 0.59	4.87 ± 0.62	–	–
K^+ -Starved Cells	5.48 ± 0.28	0.05 ± 0.01	7.55 ± 1.71	6.22 ± 0.45

Cells grown in YNB-F supplemented with KCl (100 mM) or K^+ -starved were resuspended in uptake buffer. Initial rates of uptake were determined as described in Materials and methods after addition of different concentrations of RbCl. Kinetic parameters of transport were deduced using GraphPad Prism v7 (nonlinear least-squares). Mean values \pm standard deviations were obtained from three independent experiments.

conditions that can alter the cell ion balance: increasing salt levels, altering the pH of the media, and under potassium deprivation (Fig. 2). The presence of high sodium levels in the growth medium diminished expression of all three genes that encode the potassium transporters, ranging from a 1.5-fold decrease for *ACU1* to almost 5-folds for *HAK1* (Fig. 2A). *TRK1* mRNA levels also diminished when pH was altered, either to acidic or to basic conditions, compared to cells grown in standard conditions (Fig. 2B). But, when cells were K^+ -starved, *TRK1* expression mildly increased though its level quickly returned to those in the control (Fig. 2C). *HAK1* expression was clearly upregulated at acidic pH (Fig. 2B) and during incubation in the absence of potassium that provoked the larger changes, > 17-fold rise (Fig. 2C). Finally, changes in external pH significantly affected *ACU1* mRNA levels, increasing in acidic conditions but decreasing in alkaline ones (Fig. 2B). However, much more relevant was the unexpected huge activation in *ACU1* expression measured during the K^+ starvation process, for example,

after one-hour K^+ starvation, *ACU1* transcript levels increased more than one hundred times (Fig. 2C).

C. albicans SC5314 is widely used as a wild-type reference strain. Regarding potassium transporters, this strain has an amber stop codon mutation inside *ACU1* coding region and, thus, should lack viable *Acu1* proteins [12,17]. It should be mentioned that *ACU1* transcript levels could be determined in this strain from cells grown under standard conditions although they were very low (data not shown). Even though both strains are not isogenic, potassium requirements for growth, potassium absorption capacity or salt tolerance levels in SC5314 showed no significant differences with 12C strain (data not shown). Transcript levels for all potassium transporters coding genes in SC5314 presented some differences with 12C and, in general, were less regulated upon conditions tested in this work (Fig. S3). The main disparities between both strains were observed at the saline stress conditions, with a general transcriptional repression for all three genes in 12C, while in SC5314

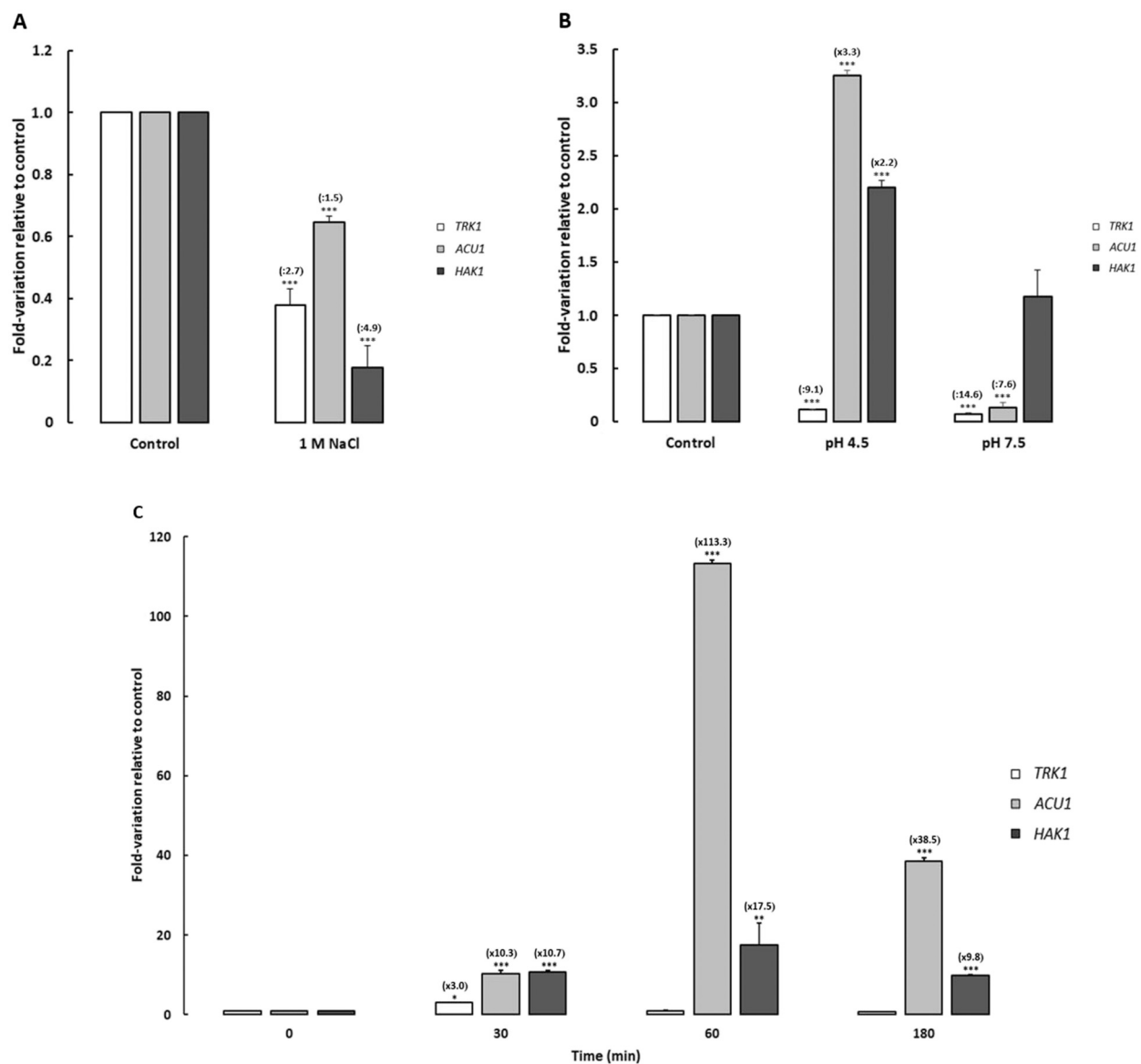


Fig. 2. Changes in expression levels of potassium transporter genes in *C. albicans* 12C. (A) The cells were grown overnight in YNB liquid medium (Control) and in YNB medium supplemented with 1 M NaCl to an A_{600} of 0.6–0.7. (B) Cells were grown overnight to an A_{600} of 0.6–0.7 in YNB liquid medium buffered at pH 5.8 (Control), YNB medium buffered at pH 4.5, and YNB medium buffered at pH 7.5. (C) Cells were grown overnight in YNB-F buffered at pH 5.8 supplemented with KCl 30 mM to A_{600} of 0.6–0.7, washed and resuspended in the same medium without KCl, and further grown. Samples were then taken at different times after potassium starvation (0, 30, 60 and 180 min). All transcript levels are referred to those for the controls (A and B) or time 0 (C). Mean values \pm standard deviations were obtained from at least three independent experiments. Statistically significant compared to the controls/time 0 expressed as: *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$.

TRK1 and *ACU1* transcripts were not affected and *HAK1* was clearly upregulated (Fig. 2A and Fig. S3A). These disparities are probably influenced by the SC5314 *Acu1*-less phenotype. However, potassium starvation also notably increased *ACU1* and *HAK1* mRNA levels in SC5314. Actually, when potassium starved, SC5314 *ACU1* transcripts increased dramatically almost 1500-folds (Fig. S3C).

3.3. *C. albicans* plasma-membrane potassium transporters mediate potassium and rubidium transport when expressed in *Saccharomyces cerevisiae* BYT12 cells

Saccharomyces cerevisiae BYT12 strain lacks its endogenous potassium transporters (*Trk1* and *Trk2*) and consequently shows defective growth at limiting potassium. We have used BYT12 heterologously expressing the *C. albicans* potassium transporters to quantify their specific role on potassium requirements and transport characteristics. The three genes encoding *Candida* transporters were cloned into multicopy plasmids behind a weak and constitutive promoter of the *S. cerevisiae* *NHA1* gene [12]. Under these conditions, any of the transporters was able to improve growth at limiting potassium both in solid (Fig. 3A) and in liquid media (Fig. 3B), being *Trk1* the most efficient one and *Hak1* the less one. While *S. cerevisiae* strains expressing *CaTrk1* or *CaAcu1* reached growth rates close to the maximum at concentrations like those found in the *C. albicans* wild type (1 mM KCl), the *S. cerevisiae* strain expressing *CaHak1* required much higher KCl amounts (Fig. 3). These results fit with those published by Elicharová et al. [12] showing that the *S. cerevisiae* strain expressing *CaTrk1* grew in plates similarly to the corresponding *S. cerevisiae* wild type expressing its own potassium transporters *Trk1* and *Trk2*.

To determine K^+ uptake capacities, changes in external values of the ion were determined when K^+ -starved cells of *S. cerevisiae* strains expressing the *C. albicans* potassium transporters, were suspended in low potassium concentrations buffer. *S. cerevisiae* strain carrying *CaTrk1* efficiently and rapidly took potassium to levels comparable to those for the *C. albicans*. On the other hand, strains expressing *CaAcu1*, and specially *CaHak1*, were much less efficient in decreasing external

potassium at micromolar levels (Fig. 4A). These results agree with the role of the different transporters in potassium requirements for *S. cerevisiae* BYT12 growth described above.

S. cerevisiae strains expressing *CaTrk1*, *CaAcu1* or *CaHak1* were used to study Rb^+ transport. Cells of these strains contained relatively similar amounts of intracellular potassium both in cells grown under normal K^+ levels (441 ± 39 , 480 ± 24 and 511 ± 50 nmol mg^{-1}) and in K^+ -starved cells (220 ± 19 , 243 ± 20 and 264 ± 14 nmol mg^{-1}). In cells grown under normal K^+ conditions, the initial rates of Rb^+ transport could be fitted to Michaelis-Menten kinetics. Under these conditions, *S. cerevisiae* strains expressing the different transporters showed not so different V_{max} values when compared to BYT12 control strain, but affinity for the cation improved in the strains expressing any of the *C. albicans* potassium transporters, being the strain with *CaTrk1* the one showing higher affinity (Fig. 4B). On the other hand, in the case of K^+ -starved cells, the behaviour of the strains was more heterogeneous. In strain expressing *CaTrk1*, Rb^+ uptake kinetic, once again, could be fitted to a Michaelis-Menten curve with high velocity and high affinity for Rb^+ . However, the strains expressing *CaAcu1* or *CaHak1*, showed a biphasic kinetics of transport, and Rb^+ uptake kinetic could be fitted to a rate equation resulting from the addition of two processes, both following Michaelis-Menten equations, one with high affinity (in the micromolar range) and the other with low affinity (in the millimolar range) (Fig. 4B). Despite all the differences observed, it is possible to affirm that, in general, the heterologous expression of any of the *C. albicans* transporters improved rubidium transport.

3.4. *C. albicans* plasma membrane potassium transporters confer different levels of salt and drug tolerance when expressed in *S. cerevisiae* BYT12 cells

Sodium and lithium are toxic alkali cations that use the yeast plasma membrane potassium transporters to enter the cell; therefore, it is conceivable that *C. albicans* transporters may affect salt tolerance, most probably by interfering with the accumulation of the toxic cations. Fig. 5 shows the effect of NaCl or LiCl on the growth of *S. cerevisiae* BYT12

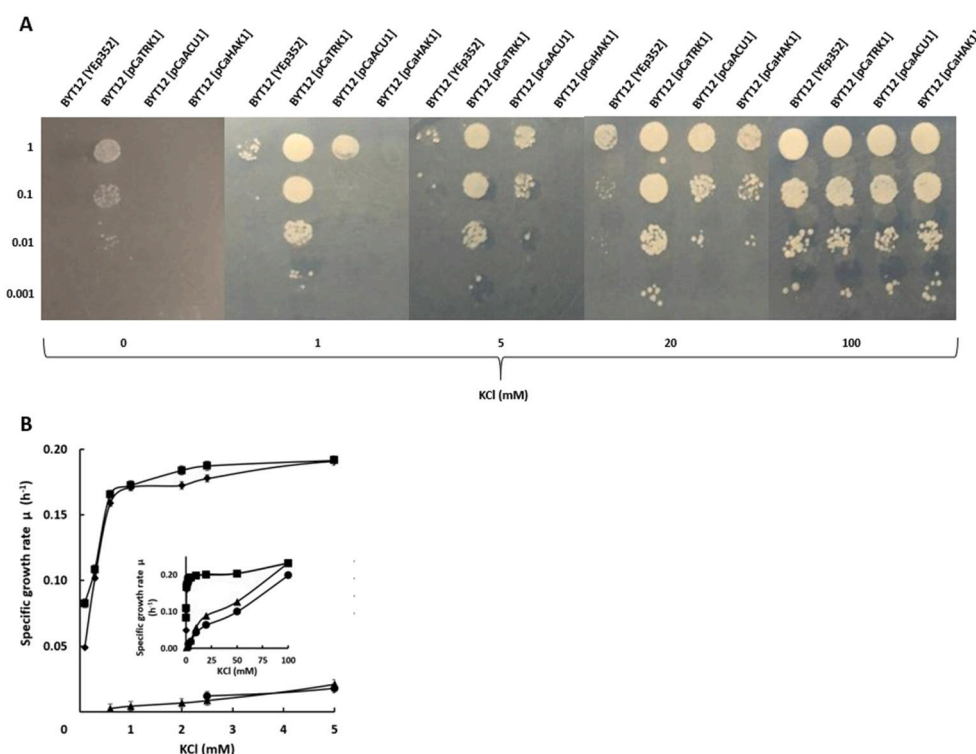


Fig. 3. Potassium requirement of *S. cerevisiae* BYT12 expressing *C. albicans* potassium transporters. (A) Serial dilutions of yeast suspensions were inoculated on YNB-F plates containing the indicated concentrations of added KCl. The pictures were taken after 48 h incubation at 28 °C. Drop tests were repeated three times and a representative experiment is shown. (B) Specific growth rate of *S. cerevisiae* BYT12 strains at different K^+ concentrations in liquid YNB-F medium. KCl concentrations used from 0.1 to 5 mM. Inset: up to 100 mM KCl. BYT12 transformed with an empty vector (●) or expressing *CaTRK1* (■), *CaACU1* (◆), *CaHAK1* (▲). Cultures were inoculated at A_{600} 0.05 and growth was monitored during 48 h. Mean values \pm standard deviation obtained in three independent experiments are plotted.

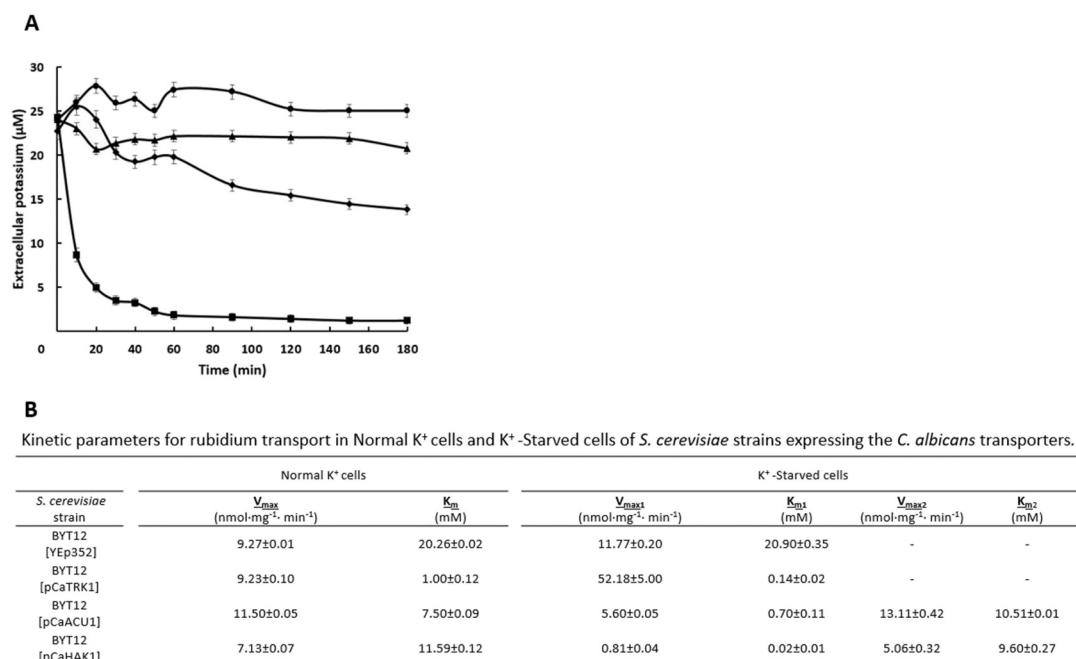


Fig. 4. Absorption of external potassium and kinetic parameters for rubidium transport in *S. cerevisiae* BYT12 expressing the *C. albicans* potassium transporters. (A) K^+ -starved cells were resuspended (A_{600} 0.5) in uptake buffer. Samples were taken at the indicated times, filtered and K^+ in the medium was measured. BYT12 transformed with an empty vector (●) or expressing *CaTRK1* (■), *CaACU1* (◆), *CaHAK1* (▲). Mean values \pm standard deviation obtained in three independent experiments are plotted. (B) Kinetic parameters for rubidium transport in cells with a normal potassium content and in K^+ -starved cells. Cells grown in YNB-F supplemented with KCl (100 mM) or K^+ -starved were resuspended in uptake buffer. Initial rates of uptake were determined as described in Materials and methods after addition of different concentrations of RbCl. Kinetic parameters of transport were deduced by using GraphPad Prism v7 (nonlinear least-squares). Mean values \pm standard deviations were obtained from three independent experiments.

expressing the *C. albicans* potassium transporters both in solid (A) and liquid (B and C) media. All three transporters improved sodium tolerance, being *CaTrk1* the most effective one under any experimental condition (Fig. 5A and B). Similar experiments were performed using LiCl instead of NaCl. Once again yeasts carrying *CaTrk1* were the most tolerant to the toxic cation in solid and liquid media, *CaAcu1* showed an intermediate behaviour and *CaHak1* hardly improved lithium tolerance (Fig. 5A and C). To obtain further details on the reasons behind the sodium and lithium tolerance due to the activity of the different transporters, we measured intracellular sodium, lithium and potassium in cells of the different strains grown in YNB-F supplemented with 0.1 M KCl and in the presence of NaCl or LiCl. Fig. 6A shows the Na^+ and K^+ contents in cells grown in the presence of 0.2 M NaCl. Strains expressing any of the transporters accumulated less sodium and more potassium than the control sensitive BYT12 strain, and this fact was especially relevant for strain expressing *CaTRK1* ($p < 0.001$) (Fig. 6A). Results in Fig. 6B show lithium and potassium contents in cells of the different strains when grown in 0.1 M LiCl. The higher tolerance to lithium due to *CaTrk1* fits with the lower lithium and higher potassium values measured inside the cells ($p < 0.05$). It is also interesting that the lack of effect of *CaHak1* in Li^+ tolerance was reflected in a lithium and potassium content similar to the control strain (Fig. 6B). In fact, we did not find significant differences in intracellular Li^+ and K^+ between BYT12 transformed with an empty vector or expressing *CaHAK1* (Fig. 6B).

Furthermore, results of experiments studying the effect of external K^+ on the influx rate of Na^+ and Li^+ uptake supported the notion that the salt tolerance changes in *Saccharomyces* strains expressing the *Candida* transporters can be related to their potassium transport capacity and to the discrimination between cations during the transport process. Table 3 shows that while 10 mM KCl importantly inhibited the influx of sodium (100 mM NaCl) or, more importantly, lithium (100 mM LiCl) in the K^+ -starved cells of the strain carrying *CaTRK1*, this inhibitory effect, if any, was much less pronounced in all the other strains.

We also tested the tolerance of BYT12 cells expressing *C. albicans* potassium transporters to cationic drugs. It has been shown previously, that absence of *TRK1* and *TRK2* genes renders the *S. cerevisiae* cells very sensitive to cationic drugs [18]. To elucidate whether the presence of heterologous potassium uptake systems, differing in their activity and mechanism of K^+ transport, may complement the cationic-drug sensitivity, we tested the growth of cells in the presence of two widely used cationic drugs with different mode of actions in the cells, tetramethylammonium (TMA) and Hygromycin B. Fig. 7A shows that the presence of *CaTRK1* and *CaACU1* rendered the cells almost as tolerant as is the *S. cerevisiae* BY4741 wild type possessing its own *TRK1* and *TRK2* genes. The presence of *CaHAK1* had a weaker phenotype, nevertheless, cells expressing *CaHak1* could grow slightly better in the presence of both drugs than cells transformed with the empty vector (BYT12^{pH}[YEp352]). The uptake of cationic drugs into yeast cell is a non-specific process driven by the negative-inside potential of the plasma membrane. The observed different contribution of *C. albicans* potassium transporters to *S. cerevisiae* drug tolerance prompted us to compare the relative membrane potential of our strains.

3.5. *C. albicans* plasma-membrane potassium transporters confer different levels of membrane potential and intracellular pH when expressed in *S. cerevisiae* BYT12 cells

Deletion of the *TRK1* and *TRK2* genes in *Saccharomyces cerevisiae*, induces a plasma-membrane hyperpolarization which is kept even if the cells have enough of potassium to grow [18]. To estimate the relative membrane potential, we used a cationic probe (diS-C3(3)) which enters cells proportionally to the membrane potential, inside the cells it binds to intracellular components and this binding increases its λ_{max} . In our experiments (Fig. 7B) we could clearly see a difference in the staining curves of *S. cerevisiae* cells with (BY4741) and without (BYT12) Trk transporters, confirming the relative hyperpolarization of BYT12 cells

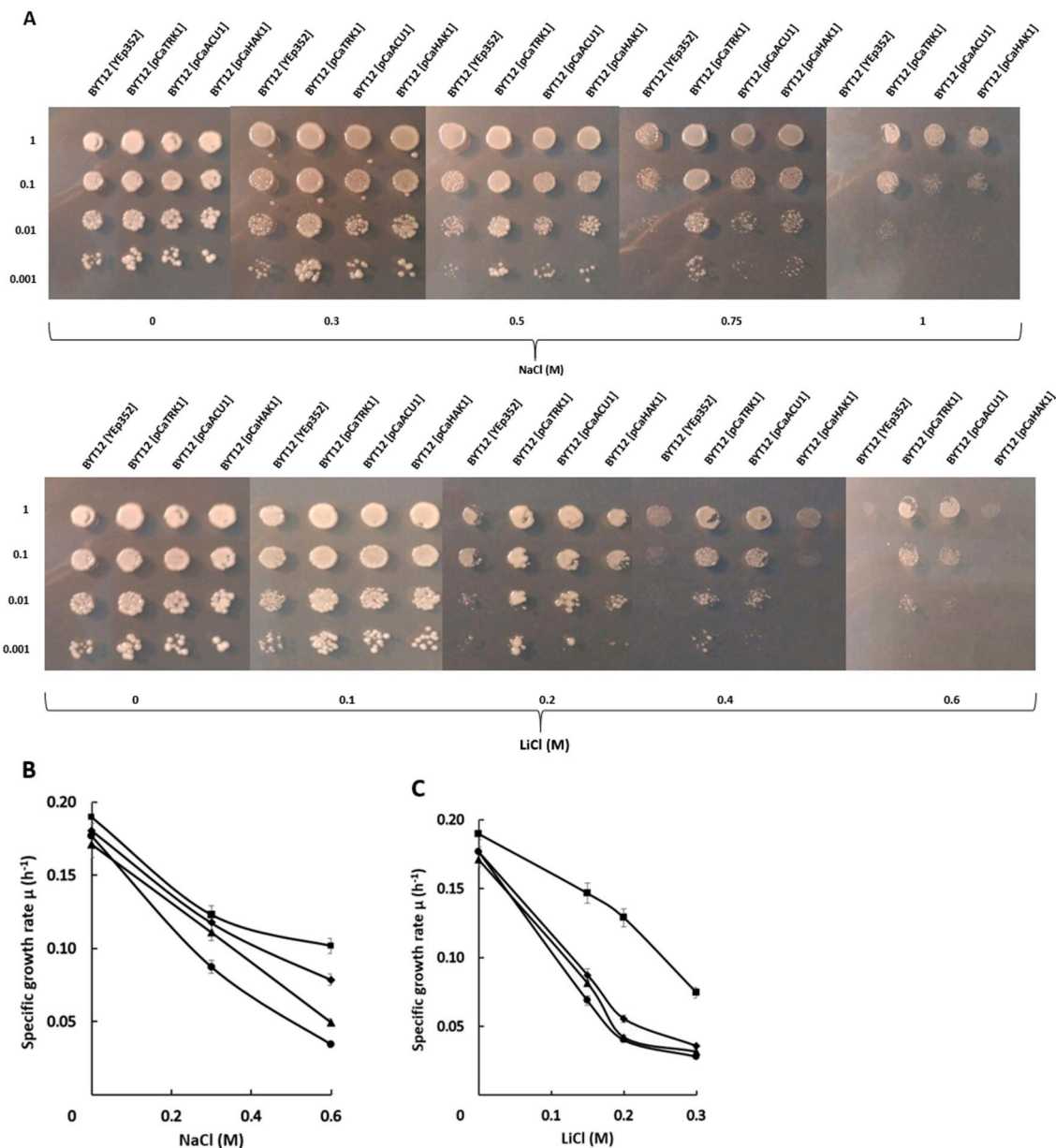


Fig. 5. Growth of *S. cerevisiae* BYT12 expressing the *C. albicans* potassium transporters in the presence of different concentrations of NaCl or LiCl. (A) Experiments performed in plates of YNB supplemented with 100 mM KCl plus the indicated concentrations of NaCl or LiCl. Serial dilutions of yeast suspensions were inoculated and incubated at 28 °C during 48 h. Drop tests were repeated three times and a representative experiment is shown. Effect of sodium (B) or lithium (C) on the specific growth rate of *S. cerevisiae* BYT12 strains at different K^+ concentrations in liquid YNB-F medium supplemented with 100 mM KCl and the indicated amounts of NaCl or LiCl. BYT12 transformed with an empty vector (●) or expressing *CaTRK1* (■), *CaACU1* (◆), *CaHAK1* (▲). Cultures were inoculated at A_{600} 0.05 and growth was monitored during 48 h. Mean values \pm standard deviation obtained in three independent experiments are plotted.

(staining to a higher level). The expression of *CaTRK1* diminished the staining curve almost to the level of the BY4741 wild type, and also the presence of *CaACU1* significantly diminished the relative membrane potential. On the other hand, the expression of *CaHAK1* did not change the staining curve compared to the cells transformed only with the empty vector. Altogether, obtained results corresponded well with the results of cation-drug tolerance tests and showed that only the presence of *CaTRK1* fully complements the hyperpolarization of the plasma membrane caused by the deletion of *S. cerevisiae* own *TRK1* and *TRK2*.

As the activity of potassium importers is also indispensable for the yeast intracellular pH homeostasis [5], we also measured and compared the intracellular pH in BY4741 wild type and in BYT12 cells expressing *Candida* potassium transporters. For this purpose we used BYT12 cells expressing chromosomally encoded pH-sensitive variant of GFP,

pHluorin [27]. Deletion of *TRK1* and *TRK2* in *S. cerevisiae* cells led to a significant ($p < 0.05$) decrease in intracellular pH ([18]; and cf. black and dotted columns in Fig. 8), and the expression of none of the *C. albicans* potassium transporters could restore it to the wild-type level (Fig. 8, grey, white and striped columns). Nevertheless, the presence of any of the three *C. albicans* potassium transporters increased the intracellular pH compared to the BYT12 cells without any transporter (Fig. 8, dotted column).

4. Discussion

Potassium homeostasis is a critical and complex process for cell physiology and the metabolism of living cells. Thus, cell depends on specific plasma-membrane transport systems to accumulate high

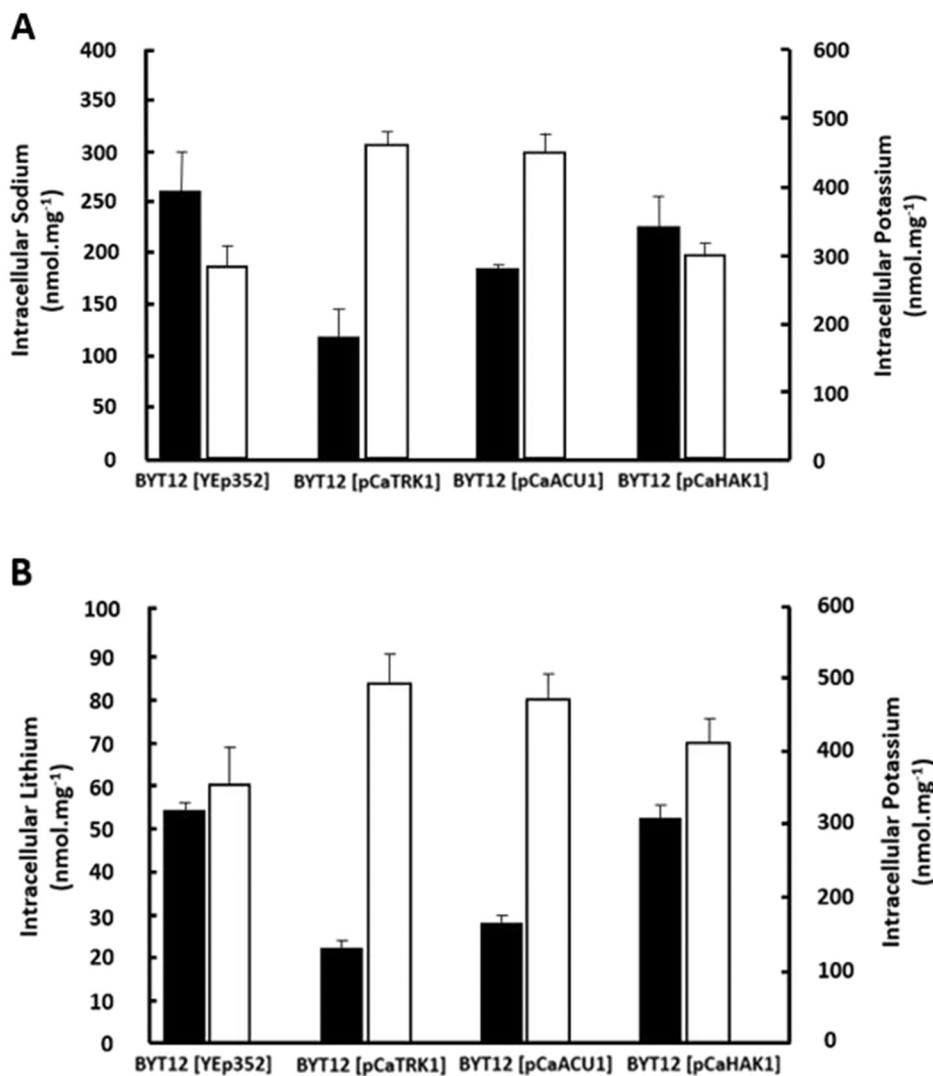


Fig. 6. Sodium, lithium and potassium content in *S. cerevisiae* BYT12 expressing the *C. albicans* potassium transporters. (A) Sodium (black) and potassium (white) content in *S. cerevisiae* BYT12 strains grown in YNB-F supplemented with 0.1 M KCl and 0.2 M NaCl. (B) Lithium (black) and potassium (white) content in *S. cerevisiae* BYT12 strains grown in YNB-F supplemented with 0.1 M KCl and 0.1 M LiCl. Samples of cells were taken at A_{600} 0.6 and the cations were determined. Mean values \pm standard deviation obtained in three independent experiments are plotted.

Table 3
Velocity of sodium or lithium uptake (100 mM) in the absence or presence of potassium (10 mM).

<i>S. cerevisiae</i> strain	Sodium		Lithium	
	0 mM KCl	10 mM KCl	0 mM KCl	10 mM KCl
BYT12 [YEp352]	8.59 \pm 0.40	8.37 \pm 0.21	2.59 \pm 0.12	2.36 \pm 0.18
BYT12 [pCaTRK1]	10.07 \pm 0.27	6.96 \pm 0.42	6.27 \pm 0.20	1.68 \pm 0.13
BYT12 [pCaACU1]	14.33 \pm 1.25	12.07 \pm 1.31	2.76 \pm 0.23	2.80 \pm 0.14
BYT12 [pCaHAK1]	8.84 \pm 0.17	8.76 \pm 0.11	3.33 \pm 0.31	2.94 \pm 0.25

K^+ -starved cells of *S. cerevisiae* BYT12 expressing the *C. albicans* potassium transporters ($A_{600} = 0.3$) were suspended in uptake buffer in the absence or the presence of KCl. At time 0, NaCl or LiCl were added to buffer. The velocity is expressed in $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$.

amounts of potassium against concentration gradients [28,29]. Although these systems have been extensively studied in model yeast *S. cerevisiae* [4,5,30], no much attention has been paid to the understanding of potassium transport in *C. albicans* and the process is far from well known. *C. albicans* is the most common opportunistic fungal pathogen in humans and has a growing medical importance [10]. We

undertook this research to clarify several aspects of potassium homeostasis in *C. albicans* due to the importance of the process for multiple cellular functions.

4.1. Functions of *C. albicans* Trk1, Acu1 and Hak1

This work shows that *C. albicans* wild-type cells were able to grow at low potassium external levels. Yeast cells were able to absorb the cation from the medium even at low micromolar concentrations in the media, as a consequence of a high affinity transport process. Three families of plasma membrane potassium transporters have been reported in yeast [6]. Members of the Trk and Hak families are distributed widely in plants and fungi but *C. albicans* is one of the few yeasts also endowed with a gene coding for Acu transporters [12]. Miranda et al. [14] have partially described the role of CaTrk1 but no report provided a homogeneous overview on the contributions of the different carriers to the entire process of homeostasis. The heterologous expression of any of the three *C. albicans* potassium transporters in an *S. cerevisiae* strain lacking its endogenous potassium transporters, improved cell physiology and cell performance under multiple conditions such as limiting potassium, salt stress or presence of cationic drugs (Figs. 3, 5 and 7). However, the three transporters were not equally effective and, in general, CaTrk1 was the most efficient one in substituting *S. cerevisiae* transporters. In fact, the presence of CaTrk1 greatly improved the defective *S. cerevisiae* BYT12 growth at low potassium due to its high capacity to absorb

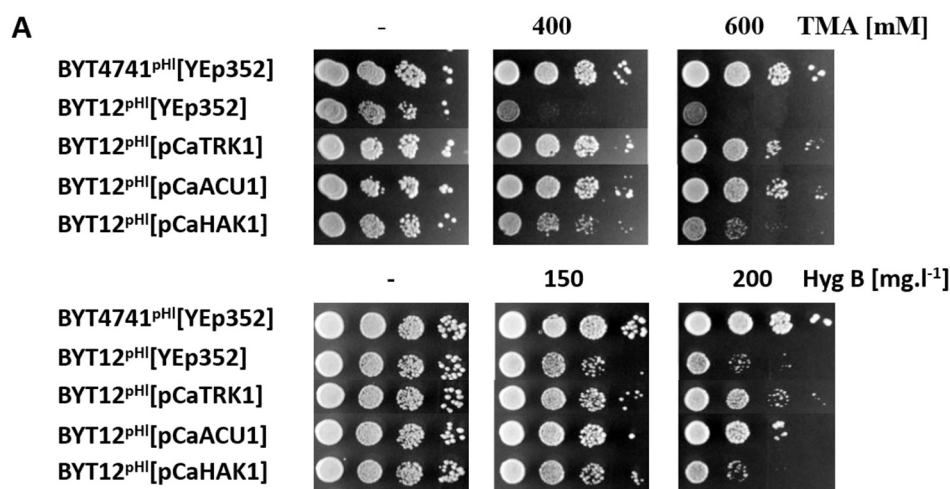
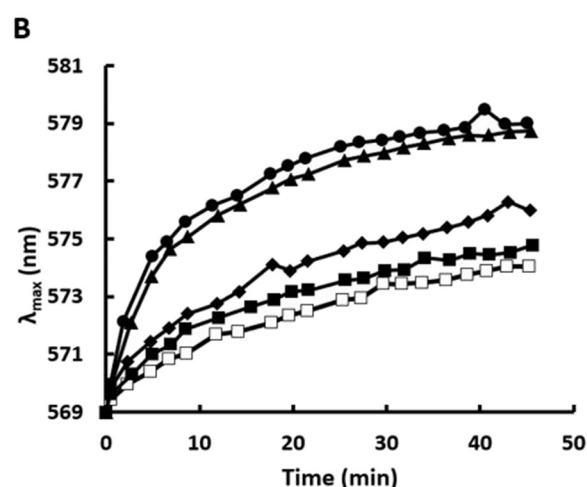


Fig. 7. Sensitivity to cationic drugs (A) and relative membrane potential (B) of *S. cerevisiae* cells (with chromosomally integrated sequence encoding pHluorin). BY4741^{pHI}, wild type transformed with an empty vector (□); BYT12^{pHI} expressing *CaTRK1* (■), *CaACU1* (◆), *CaHAK1* (▲), or transformed with an empty vector (●). The staining curves of cells pre-grown in YNB supplemented with 50 mM KCl with the potentiometric probe were obtained as described in Materials and methods. The experiments were repeated three times, representative results are shown. TMA, tetramethylammonium; Hyg B, hygromycin B.



extracellular amounts of the cation. In this sense, potassium starvation triggered an increase in the velocity and the affinity of the Rb⁺ (K⁺) transport process in those cells. In potassium starved cells of strains expressing *CaAcu1* or *CaHak1* we observed a dual uptake isotherm. These cells showed a biphasic kinetics of Rb⁺ uptake, which could be explained by the addition of two Michaelis-Menten functions. At low-Rb⁺, K⁺-starved cells showed high-affinity transport. Nevertheless, when Rb⁺ concentrations reached the millimolar range, K⁺-starved cells showed a second phase of Rb⁺ transport with low-affinity for Rb⁺. It is worth to mention that in the case of *CaHak1*, the high affinity process showed very low V_{max}. Biphasic kinetics of potassium or rubidium transport have been previously reported in plants [31], fungi [32,33] and yeasts [34]. They could be the consequence of two systems working with different affinities or, most probably in this case, the biphasic pattern of Rb⁺ uptake could be explained by the intrinsic behaviour of the uptake system with different affinities for the cation in the binding or catalytic sites of the transporter [35]. The mentioned differences in the kinetics of transport in BYT12 expressing the *Candida* transporters can also be taken as a clue that illustrates differences in the intrinsic transport mechanism mediated by the Trk uniporters or the Hak symporters and Acu ATPases.

A previously described pleiotropic effect of the lack of specific potassium transporters is an increased salt sensitivity [36]. Any of the three *C. albicans* transporters enhanced cell performance in the presence of salt but once again *CaTrk1* was the most efficient improving sodium and lithium tolerance. *S. cerevisiae* cells expressing *CaTrk1* accumulated less amounts of sodium or lithium most probably because this transporter

was able to discriminate between potassium and the toxic cations during the transport process, thus provoking the higher tolerance. While *CaAcu1* has a positive effect on sodium and lithium tolerance (Fig. 5) it does not affect short-term sodium and lithium influx in the presence of potassium (Table 3). We should keep in mind that *Acu1* can also alter potassium influx as can be observed in Fig. 6, indicating a long-term effect of this transporter on sodium/lithium and potassium accumulation during growth.

It has been reported that Trk1 transporters regulate membrane potential and intracellular pH in several yeast species [18,22,27]. Present results indicate that these effects may not be specifically dependent on Trk1 and that *Acu* and/or *Hak* proteins can also modulate membrane potential or pH although with important nuances and different levels of efficiency. While heterologous expression of *CaTRK1* and *CaACU1* clearly decreased hyperpolarization of BYT12 cells and improved growth in the presence of cationic drugs, little effect, if any, was due to the expression of *CaHAK1*. Moreover, the three potassium transporters were able to increase intracellular pH.

Altogether, these results support the notion of Trk1 being the major K⁺ uptake system in *C. albicans* [13]. However, the amount of proteins that reaches the plasma membrane during the heterologous expression in *S. cerevisiae* is not the same for all the transporters [12]. So, while the affinity constants for the cation are independent of this fact, we should keep in mind that, among other parameters, the V_{max} values reported here can be influenced by the protein properly localized at the plasma membrane.

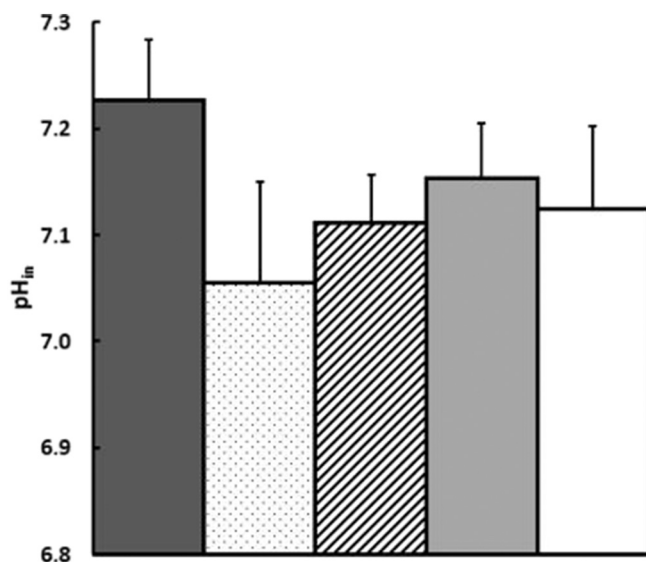


Fig. 8. Intracellular pH of *S. cerevisiae* cells (with chromosomally integrated sequence encoding pHluorin) growing in YNB-F^{pHl} supplemented with 100 mM KCl. BY4741^{pHl}, wild type transformed with an empty vector (black); BYT12^{pHl} expressing *CaTRK1* (stripped), *CaACU1* (grey), *CaHAK1* (white) or transformed with an empty vector (dotted). Mean values \pm standard deviation obtained in three independent experiments (8 parallels per each strain and each experiment) are plotted.

4.2. Learning from transcriptomic profiles

Maintaining potassium homeostasis not only requires different transporters but also, they should be tightly controlled and coordinated. Among the processes probably influencing this transport we have investigated the effect of salt, pH and potassium starvation in regulating *C. albicans* *TRK1*, *HAK1* and *ACU1* at the transcriptional level. The two strains used in this work for transcriptional studies showed similar behaviour regarding cation requirements or tolerance. Transcript profiles were also similar but not identical, and more work is needed to determine if subtle changes observed are due to *ACU1* inactivation in SC5314 or to other genetic differences.

Previous work showed that *TRK1* mRNA was poorly modulated by salt stress, pH changes or K⁺ starvation in other yeasts [4,37], in agreement with the data reported in this work for SC5314 strain. On the other hand, strain 12C *TRK1* transcription showed a significant regulation at the transcriptional level not described before for other yeasts, from a moderate decrease in the presence of salts to a deep repression upon pH changes, suggesting that the concentration of salts and protons in the media are able to modulate *TRK1* mRNA in this strain. Further investigations on 12C genetic background needs to be done to explain this phenomenon. The pattern for *CaHAK1* transcription regulation is more complex, as it is repressed in the presence of salt for 12C strain or induced upon pH alteration or K⁺ starvation for both strains. The increase in *HAK1* mRNA levels under K⁺ limiting conditions have been previously described in yeasts as *Schwanniomyces occidentalis*, *Debaromyces hansenii* or *Hansenula polymorpha* [37–39], or both upon K⁺ starvation and low pH in other fungi as *Neurospora crassa* [40]. We starved the cells for potassium up to 3 h and we report here the corresponding effect on *HAK1* transcription. However, we cannot rule out additional or more complex effects when the cells are K⁺-starved for longer times. Finally, and as previously mentioned, the information about *ACU1* is scarce and almost nothing is known about its physiological function and the regulation of its expression. Unfortunately, none of the three yeasts previously mentioned in which transcriptional regulation of *TRK* and *HAK* genes has been studied in detail is endowed with *ACU* genes and this fact has hampered its knowledge. Only in the

case of the fungus *Magnaporthe oryzae* a significant increase in the number of *ACU* transcripts after potassium starvation has been reported [41]. A preliminary analysis of the *ACU1* promoter using the tool Pathoextract (<http://pathoextract.org/calbicans/findregulators.php>) predicted putative binding sites for several regulators: Efg1, Tye7, Nrg1, Rap1, Hap5 and Mrr1, in both 12C and SC5314 strains, while a binding site for Hap43 was predicted only in 12C, and for Tec1 only in SC5314. These regulators are involved in multiple processes as hyphal development, stress response, or regulation of MDR1 (a plasma membrane multidrug efflux pump), but unrelated to cation fluxes what would suggest a complex regulatory pattern. This work shows that while *CaACU1* expression in *C. albicans* seems to be mostly unaffected by salts, it has a mixed regulation pattern when pH media is altered. The most striking result is the huge increase in *CaACU1* transcript levels observed upon K⁺ starvation, suggesting that this transporter has a pivotal role in those conditions. Nevertheless, the proportion of the rises could also be influenced by the fact that *CaACU1* mRNA were scarce at control conditions, with an approximate 30-threshold cycle in RT-qPCR (data not shown).

Globally, repression of all three 12C K⁺ transporters transcripts in the presence of salt suggest an inhibition in the K⁺ transport process by Na⁺, similar to what previously described for *D. hansenii* [38]. Also, our results suggest that different transporters take the lead in the different environmental conditions, Trk1 being the “house-keeping” one, Hak1 and/or Acu1 at altered pH environments, and Hak1 and Acu1 when cells are grown in very low K⁺ concentrations.

In conclusion, we show in this work that wild-type *C. albicans* cells grow at low potassium and transport the cation with high efficiency due to the coordinated activity of *CaTrk1*, *CaAcu1* and *CaHak1* that are differentially regulated at transcriptional level. In addition, the heterologous expression of the corresponding genes in *S. cerevisiae* revealed transport processes with very different kinetic constants and pleiotropic effects on other physiological processes such as salt tolerance or membrane potential and intracellular pH regulation.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

Prof. Patrick van Dijk is acknowledged for the *C. albicans* 12C strain. This work was supported by Grant Nos. XXII Plan Propio Investigación, University of Córdoba and RTI2018-097935-B-I00 (MICIU) (JR) and by the Ministry of Education, Youth and Sports of CR within the LQ1604 National Sustainability Program II (Project BIOCEV-FAR) and by the projects “BIOCEV” (CZ.1.05/1.1.00/02.0109) and Inter-COST LTC20006. This work contributes to the COST Action CA18113 EuroMicropH.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2020.183486>.

References

- [1] M. Lubin, H.L. Ennis, On the role of intracellular potassium in protein synthesis, *Biochim. Biophys. Acta* 80 (1964) 614–631, [https://doi.org/10.1016/0926-6550\(64\)90306-8](https://doi.org/10.1016/0926-6550(64)90306-8).
- [2] M.R. Blatt, C.L. Slayman, Role of “active” potassium transport in the regulation of cytoplasmic pH by non-animal cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 2737–2741, <https://doi.org/10.1073/pnas.84.9.2737>.
- [3] A. Rodríguez-Navarro, Potassium transport in fungi and plants, *Biochim. Biophys. Acta* 1469 (2000) 1–30, [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(99\)00013-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(99)00013-1).

- [4] J. Ariño, J. Ramos, H. Sychrová, Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74 (2010) 95–120, <https://doi.org/10.1128/MMBR.00042-09>.
- [5] J. Ariño, J. Ramos, H. Sychrova, Monovalent cation transporters at the plasma membrane in yeasts, *Yeast* 36 (2019) 177–193, <https://doi.org/10.1002/yea.3355>.
- [6] J. Ramos, J. Ariño, H. Sychrová, Alkali-metal-cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species, *FEMS Microbiol. Lett.* 317 (2011) 1–8, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02214.x>.
- [7] J. Schulze, U. Sonnenborn, Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents, *Dtsch. Arztebl. Int.* 106 (2009) 837–842, <https://doi.org/10.3238/arztebl.2009.0837>.
- [8] E.A. Witherden, S. Shoaie, R.A. Hall, D.L. Moyes, The human mucosal mycobiome and fungal community interactions, *J. Fungi (Basel)* 3 (2017) 56–67, <https://doi.org/10.3390/jof3040056>.
- [9] R.A. Calderone, W.A. Fonzi, Virulence factors of *Candida albicans*, *Trends Microbiol.* 9 (2001) 327–335, [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02094-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02094-7).
- [10] H. Wisplinghoff, T. Bischoff, S.M. Tallent, H. Seifert, R.P. Wenzel, M.B. Edmond, Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study, *Clin. Infect. Dis.* 39 (2004) 309–317, <https://doi.org/10.1086/421946>.
- [11] B. Hušková, H. Elicharová, H. Sychrová, Pathogenic *Candida* species differ in the ability to grow at limiting potassium concentrations, *Can. J. Microbiol.* 62 (2016) 394–401, <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0766>.
- [12] H. Elicharová, B. Hušková, H. Sychrová, Three *Candida albicans* potassium uptake systems differ in their ability to provide *Saccharomyces cerevisiae* *trk1trk2* mutants with necessary potassium, *FEMS Yeast Res.* 16 (2016) 1–10, <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow039>.
- [13] D. Baev, A. Rivetta, S. Vylkova, J.N. Sun, G.F. Zeng, C. Slayman, M. Edgerton, The TRK1 potassium transporter is the critical effector for killing of *Candida albicans* by the cationic protein, Histatin 5, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 55060–55072, <https://doi.org/10.1074/jbc.M411031200>.
- [14] M. Miranda, E. Bashi, S. Vylkova, M. Edgerton, C. Slayman, A. Rivetta, Conservation and dispersion of sequence and function in fungal TRK potassium transporters: focus on *Candida albicans*, *FEMS Yeast Res.* 9 (2009) 278–292, <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00471.x>.
- [15] S. Vylkova, X.S. Li, J.C. Berner, M. Edgerton, Distinct antifungal mechanisms: β -Defensins require *Candida albicans* Ssa1 protein, while Trk1p mediates activity of cysteine-free cationic peptides, *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (2006) 324–331, <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.324-331.2006>.
- [16] E.S. Segal, V. Gritsenko, A. Levitan, B. Yadav, N. Dror, J.L. Steenwyk, Y. Silberberg, K. Mielich, A. Rokas, N.A.R. Gow, R. Kunze, R. Sharan, J. Berman, Gene essentiality analyzed by *in vivo* transposon mutagenesis and machine learning in a stable haploid isolate of *Candida albicans*, *mBio* 9 (2018), <https://doi.org/10.1128/mBio.02048-18> e02048-18.
- [17] T. Jones, N.A. Federspiel, H. Chibana, J. Dungan, S. Kalman, B.B. Magee, G. Newport, Y.R. Thorstenson, N. Agabian, P.T. Magee, R.W. Davis, S. Scherer, The diploid genome sequence of *Candida albicans*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 7329–7334, <https://doi.org/10.1073/pnas.0401648101>.
- [18] C. Navarrete, S. Petrezselyova, L. Barrett, J. Martínez, J. Zahrádka, J. Ariño, H. Sychrová, J. Ramos, Lack of main K^+ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance both in potassium sufficient and limiting conditions, *FEMS Yeast Res.* 10 (2010) 508–517, <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00630.x>.
- [19] C. Prista, A. Almagro, M.C. Loureiro-Dias, J. Ramos, Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 4005–4009, <https://doi.org/10.1128/aem.63.10.4005-4009.1997>.
- [20] J. Ramos, R. Haro, A. Rodríguez-Navarro, Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta* 1029 (1990) 211–217, [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90156-1](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90156-1).
- [21] R. Herrera, M.C. Alvarez, S. Gelis, M. Kodedová, H. Sychrová, M. Kschischo, J. Ramos, Role of *Saccharomyces cerevisiae* Trk1 in stabilization of intracellular potassium content upon changes in external potassium levels, *Biochim. Biophys. Acta* 1838 (2014) 127–133, <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2013.08.022>.
- [22] G. Caro, J. Bieber, F.J. Ruiz-Castilla, C. Michán, H. Sychrova, J. Ramos, Trk1, the sole potassium-specific transporter in *Candida glabrata*, contributes to the proper functioning of various cell processes, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 35 (2019) 1–12, <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2698-6>.
- [23] D. Gášková, B. Brodská, P. Heřman, J. Vecer, J. Malinský, K. Sigler, O. Benada, J. Plásek, Fluorescent probing of membrane potential in walled cells: diS-C3(3) assay in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 14 (1998) 1189–1197, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980930\)14:13<1189::AID-YEA320>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980930)14:13<1189::AID-YEA320>3.0.CO;2-K).
- [24] M. Kodedová, H. Sychrová, Changes in the sterol composition of the plasma membrane affect membrane potential, salt tolerance and the activity of multidrug resistance pumps in *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS One* 10 (2015), e0139306, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139306>.
- [25] L. Marešová, B. Hošková, E. Urbánková, R. Chaloupka, H. Sychrová, New applications of pHluorin—measuring intracellular pH of prototrophic yeasts and determining changes in the buffering capacity of strains with affected potassium homeostasis, *Yeast* 27 (2010) 317–325, <https://doi.org/10.1002/yea.1755>.
- [26] K. Felcmanova, P. Neveceralova, H. Sychrova, O. Zimmermannova, Yeast Kch1 and Kch2 membrane proteins play a pleiotropic role in membrane potential establishment and monovalent cation homeostasis regulation, *FEMS Yeast Res.* 17 (5) (2017) 17, fox053, <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox053>.
- [27] O. Zimmermannova, A. Salazar, H. Sychrova, J. Ramos, The *Zygosaccharomyces rouxii* Trk1 is an efficient potassium transporter providing yeast cells with high lithium tolerance, *FEMS Yeast Res.* 15 (2015) fov029, <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov029>.
- [28] A. Siebers, K. Altendorf, K^+ -translocating Kdp-ATPases and other bacterial P-type ATPases, in: E.P. Bakker (Ed.), *Alkali Cation Transport Systems in Prokaryotes*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1993, pp. 225–252.
- [29] C.L. Slayman, Electrogenic Ion Pumps, in: J.F. Hoffman, G. Giebisch (Eds.), *Current Topics in Membranes and Transport*, Academic Press, New York, 1993, pp. 63–64, [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(93\)90059-V](https://doi.org/10.1016/0968-0004(93)90059-V).
- [30] L. Yenush, Potassium and sodium transport in yeast, in: J. Ramos, H. Sychrová, M. Kschischo (Eds.), *Yeast Membrane Transport*, Springer, 2016, pp. 187–228, https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6_8.
- [31] E. Epstein, Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants, *Nature* 212 (1966) 1324–1327, <https://doi.org/10.1038/2121324a0>.
- [32] J. Ramos, A. Rodríguez-Navarro, Rubidium transport in *Neurospora crassa*, *Biochim. Biophys. Acta* 815 (1985) 97–101, [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90479-1](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90479-1).
- [33] F. Cabello-Hurtado, G.J. Blasco, J. Ramos, Potassium and sodium fluxes in the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* var. *liri*, *Curr. Microbiol.* 41 (2000) 363–367, <https://doi.org/10.1007/s002840010150>.
- [34] J. Ramos, A. Rodríguez-Navarro, Regulation and interconversion of the potassium transport systems of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium transport, *Eur. J. Biochem.* 154 (1986) 307–311, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09398.x>.
- [35] A. Rodríguez-Navarro, J. Ramos, Two systems mediate rubidium uptake in *Neurospora crassa*: one exhibits the dual-uptake isotherm, *Biochim. Biophys. Acta* 857 (1986) 229–237, [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(86\)90351-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(86)90351-2).
- [36] M.J. Gómez, K. Luyten, J. Ramos, The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol. Lett.* 135 (1996) 157–160, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb07982.x>.
- [37] M.A. Bañuelos, R. Madrid, A. Rodríguez-Navarro, Individual functions of the HAK and TRK potassium transporters of *Schwanniomyces occidentalis*, *Mol. Microbiol.* 37 (2000) 671–679, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02040.x>.
- [38] J.L. Martínez, H. Sychrová, J. Ramos, Monovalent cations regulate expression and activity of the HAK1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*, *Fungal Genet. Biol.* 48 (2011) 177–184, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.06.013>.
- [39] E. Cabrera, M.C. Álvarez, Y. Martín, J.M. Siverio, J. Ramos, K^+ uptake systems in the yeast *Hansenula polymorpha*. Transcriptional and post-translational mechanisms involved in high-affinity K^+ transporter regulation, *Fungal Genet. Biol.* 49 (2012) 755–763, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.06.008>.
- [40] R. Haro, L. Sainz, F. Rubio, A. Rodríguez-Navarro, Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Microbiol.* 31 (1999) 511–520, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01192.x>.
- [41] B. Benito, B. Garciadeblás, A. Fraile-Escanciano, A. Rodríguez-Navarro, Potassium and sodium uptake systems in fungi. The transporter diversity of *Magnaporthe oryzae*, *Fungal Genet. Biol.* 48 (2011) 812–822, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.03.002>.



Trk1, the sole potassium-specific transporter in *Candida glabrata*, contributes to the proper functioning of various cell processes

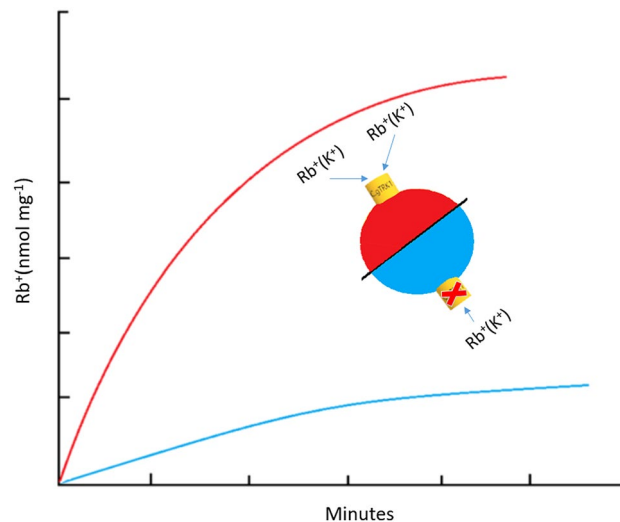
Gabriel Caro¹ · Jan Bieber² · Francisco J. Ruiz-Castilla¹ · Carmen Michán³ · Hana Sychrova² · José Ramos¹

Received: 30 April 2019 / Accepted: 17 July 2019
© Springer Nature B.V. 2019

Abstract

Candida glabrata is a haploid yeast that is considered to be an emergent pathogen since it is the second most prevalent cause of candidiasis. Contrary to most yeasts, this species carries only one plasma membrane potassium transporter named CgTrk1. We show in this work that the activity of this transporter is regulated at the posttranslational level, and thus Trk1 contributes to potassium uptake under very different external cation concentrations. In addition to its function in potassium uptake, we report a diversity of physiological effects related to this transporter. *CgTRK1* contributes to proper cell size, intracellular pH and membrane-potential homeostasis when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Moreover, lithium influx experiments performed both in *C. glabrata* and *S. cerevisiae* indicate that the salt tolerance phenotype linked to CgTrk1 can be related to a high capacity to discriminate between potassium and lithium (or sodium) during the transport process. In summary, we show that *CgTRK1* exerts a diversity of pleiotropic physiological roles and we propose that the corresponding protein may be an attractive pharmacological target for the development of new antifungal drugs.

Graphic abstract



Keywords *Candida glabrata* · Potassium transport · Trk1 · Salt tolerance · *Saccharomyces cerevisiae* · Membrane potential

Introduction

Potassium is a crucial element for life. This alkali cation is accumulated against high concentration gradients and intervenes in the regulation of multiple factors such as

✉ José Ramos
mi1raruj@uco.es

Extended author information available on the last page of the article

enzymatic activities, intracellular pH, osmotic pressure or membrane potential in yeast. (Ariño et al. 2010, 2018; Ramos et al. 2011). Most of the yeast species, are endowed with several plasma-membrane potassium-specific transporters that assure its appropriate influx and intracellular accumulation. These transporters may be grouped into three families: transport of potassium (Trk), high affinity potassium (Hak) or Alkali cation uptake (Acu) (Ramos et al. 2011). While the members of Trk family are present in all yeasts, including the model *Saccharomyces cerevisiae*, Hak and Acu transporters have been found only in some non-conventional yeast species such as *Debaryomyces hansenii* (Hak) (Martínez et al. 2011), *Pichia sorbitophila* or *Candida albicans* (Hak and Acu) (Benito et al. 2004; Elicharová et al. 2016).

Candida glabrata is a haploid yeast that is part of the human microbiome. Although classified into the genus, this yeast is more phylogenetically related to *S. cerevisiae* than to *C. albicans* (Dujon et al. 2004; Fitzpatrick et al. 2006; Gabaldón et al. 2013). This yeast may behave as an opportunistic pathogen and, in fact is considered to be an emergent pathogen since it is the second most prevalent cause of candidiasis (Bolotin-Fukuhara and Fairhead 2014; Hazen 1995; Perloth et al. 2007; Ribeiro de Carvalho et al. 2018). In relation to cation homeostasis, *C. glabrata* is one of the few yeast species that contains only one plasma-membrane potassium transporter but the information on potassium homeostasis in this yeast, although exciting is very scarce (Hušeková et al. 2016; Llopis-Torregrosa et al. 2016). It was shown that *CgTrk1* has a higher level of identity with *ScTrk1* than with the corresponding *C. albicans* *Trk1* (54 and 32% respectively), that *CgTrk1* is a plasma membrane protein and deletion of the corresponding gene impaired growth at limiting potassium concentrations. *C. glabrata* mutant lacking the *TRK1* gene also showed phenotypes related to disturbance of basic physiological parameters, such as intracellular pH and plasma-membrane potential. Heterologous expression of the *CgTRK1* gene in a *S. cerevisiae* mutant lacking its endogenous *Trk1* and *Trk2* potassium transporters suppressed the

growth deficiency of cells at low external potassium (Llopis-Torregrosa et al. 2016).

In this work we have performed a detailed study of the characteristics of potassium transport mediated by *CgTrk1*, we show that the activity of the transporter is highly regulated being able to contribute to potassium uptake under very different conditions (low or high potassium or the presence of toxic amounts of salts) and its presence in *S. cerevisiae* cells contributes to the intracellular pH and membrane-potential regulation. In addition, we show that the involvement of *CgTrk1* in salt tolerance is directly related to a higher inhibition of lithium or sodium influx by potassium in the presence of the *CgTrk1* transporter.

Materials and methods

Yeast strains and cultivation

Yeast strains used in this study are listed in Table 1. YNB based media adjusted at pH 5.8 with NH_4OH were used (0.17% YNB or 0.17% YNB-F, Formedium™). For intracellular pH measurements, a filter-sterilised YNB-F^{pH} medium (0.17% YNB-F without amino acids, ammonium sulphate, riboflavin, folic acid; Formedium™) or YNB^{pH} medium (0.17% YNB without amino acids, ammonium sulphate, riboflavin and folic acid; MP Biomedicals) were used. The media were supplemented with 2% glucose, auxotrophic supplements and the indicated amounts of KCl. Solid media were prepared by adding 2% (w/v) agar to the previously described recipes (Navarrete et al. 2010; Llopis-Torregrosa et al. 2016).

Growth assays

Growth curves at several potassium concentrations were performed in tubes with 5 ml of YNB-F medium supplemented with the indicated amounts of KCl. Absorbance at 600 nm (A_{600}) of cultures was followed for 24–48 h using a

Table 1 Yeast strains used in this study

Strain	Feature	References
<i>C. glabrata</i>	Wild type	Llopis-Torregrosa et al. (2016)
<i>C. glabrata</i>	ATCC 2001 <i>trk1</i> Δ::FRT	Llopis-Torregrosa et al. (2016)
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	Wild type. <i>MATa his3</i> Δ1 <i>leu2</i> Δ <i>met15</i> Δ <i>ura3</i> Δ	Navarrete et al. (2010)
<i>S. cerevisiae</i> BYT12	YE _p -CgTRK1	Llopis-Torregrosa et al. (2016)
<i>S. cerevisiae</i> BYT12	YE _p 352	Llopis-Torregrosa et al. (2016)
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	YE _p 352	EUROSCARF
<i>S. cerevisiae</i> BY4741 ^{pHI}	YE _p 352	Zimmermannova et al. (2015)
<i>S. cerevisiae</i> BYT12 ^{pHI}	YE _p 352	Zimmermannova et al. (2015)
<i>S. cerevisiae</i> BYT12 ^{pHI}	YE _p -CgTRK1	This work

Spectronic 20 (Bausch and Lomb) (Prista et al. 1997). Specific growth rates were calculated from the growth curves. To obtain normal K^+ cells, yeasts were grown in YNB supplemented with 100 mM KCl. For K^+ starvation experiments, normal K^+ cells were washed with sterile water and resuspended in synthetic K^+ -free medium (YNB-F) without added potassium. Cells were potassium starved for 3 h.

Lithium, sodium and drug tolerances were determined in solid and liquid media. Drop tests were performed with fresh cells resuspended in water and adjusted to the same initial A_{600} 1.0. Tenfold serial dilutions were prepared, and 3 μ l aliquots of each dilution were spotted on the appropriate media containing salts and drugs as indicated in the text. The effect of LiCl or NaCl on growth in liquid media was analysed measuring A_{600} after an overnight growth in media supplemented with indicated amount of salts.

Cation content and transport

To estimate intracellular K^+ , Li^+ and Na^+ content, cell samples were collected from liquid media on Millipore filters, which were rapidly washed with 20 mM $MgCl_2$. The cells were then extracted with 0.2 M HCl and 10 mM $MgCl_2$ and the extracts were analysed by atomic emission spectrophotometry (Ramos et al. 1990).

To study the characteristics of Rb^+ uptake, cell samples were washed and suspended (A_{600} 0.3) in the uptake buffer (MES 10 mM supplemented with 2% glucose, $MgCl_2$ 0.1 mM at pH 5.8 adjusted with $Ca(OH)_2$). The required amount of $RbCl$ (0–100 mM) was added to the buffer at time zero and aliquots were withdrawn at various times. Cells were treated as described above.

The effect of potassium on lithium transport was studied in potassium starved cells suspended in uptake buffer. At time 0, LiCl or LiCl with KCl were added and lithium accumulation was followed for 10–15 min approx.

All values are expressed as nanomols of cation per milligram dry weight of cells (Navarrete et al. 2010).

Real-time PCR

The sequences of *CgTRK1* gene for primer design was obtained from Gene Ontology Consortium (www.geneontology.org). Primers were designed with OLIGO 7.60 program (Molecular Biology Insights, Cascade, CO). The selection used included high T_m (> 82.9 °C) and optimal $3'\Delta G$ (> 6.8 kcal mol $^{-1}$) values, as detailed (Pueyo et al. 2002). Sequence for forward (F) primer was: 5'-GAGCTC TTTCAATCGGGCAGCCTATCCACT-3', and reverse (R) was: 5'-AGAAGGCCAGACTCTCCCTCAGTTGTGACA-3'. No primer dimers were detected, and amplification efficiency was close to 100%.

The PCR amplification was carried out in a mixture (20 μ l final volume) with IQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad), 1 μ l of cDNA, plus 0.1 μ M of the specific primers. PCR reactions were performed in triplicate. Real-time PCR conditions were an initial denaturation step, 95 °C 3 min, followed by forty PCR cycles consisting of 15 s of denaturation at 95 °C, and 30 s of annealing plus elongation at 70 °C. Finally, melting curves were determined.

Estimation of cell size

Cell volume was analysed in a Cell Counter Z2 (Beckman-Coulter) and expressed in micrometres (μ m). The experiment was repeated at least five times, each time 6×10^4 cells were analysed for each strain and each condition (Navarrete et al. 2010).

Measurement of relative membrane potential (diS-C₃(3) assay)

The relative membrane potential of yeast cells was estimated by a fluorescence assay based on the potential-dependent redistribution of the fluorescence probe diS-C₃(3) (3,3'-dipropylthiacarbocyanine iodide) (Gášková et al. 1998), as described in (Kodedová and Sychrová 2015). The probe was added to a final concentration of 0.02 μ M to the yeast suspension in 10 mM MES-TEA buffer (pH 6.0). Fluorescence emission spectra (λ_{ex} = 531 nm, λ_{em} = 560–590 nm) of the cell suspensions were measured in a FluoroMax-4 spectrofluorimeter (Horiba Scientific). Scattered light was eliminated by a colored-glass alternative filter with a cut-off wavelength of 550 nm. The staining curves represented the dependence of the fluorescence emission maximum wavelength λ_{max} on the time of staining.

Measurement of the intracellular pH

For intracellular pH measurements, yeast strains with chromosomally integrated pHluorin sequence (Table 1) were grown in YNB-F^{pH} or YNB^{pH} media supplemented with the indicated amount of KCl to $A_{600} \sim 0.5$. The fluorescence intensities were recorded using a Cytation 3 microplate reader (BioTek Instruments) with emission filter 516/20 nm and excitation filters 400/30 and 485/20 nm according to (Marešová et al. 2010) and the intracellular pH was calculated as described in Felcmanova et al. (2017).

Statistics

All experiments were repeated at least two times. Data were analysed in Microsoft Excel software 2013 and the significance of differences between mean values was determined

by GraphPad Prism 7. Significant differences are indicated with asterisks (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

Results

Potassium requirements and transport characteristics

To investigate in detail the role of Trk1 in *C. glabrata* potassium requirements, we determined specific growth rates in liquid YNB-F medium supplemented with several KCl amounts. Figure 1a shows that while *C. glabrata* wild type grew at very low potassium concentrations, the *trk1* mutant required 40 mM KCl to reach maximum growth rate. Additionally, similar experiments were performed in a *Saccharomyces cerevisiae* strain lacking its endogenous transporters and expressing the *CgTRK1* gene, to determine the impact of this transporter in the model yeast. As in *C. glabrata*, the presence of the Trk1 transporter greatly improved growth and decreased external potassium requirements (Fig. 1b). These results are in accordance with those previously published (Llopis-Torregrosa et al. 2016). All together they suggest that *CgTrk1* plays a pivotal role in potassium transport, therefore we decided to characterize this transporter biochemically and physiologically.

It is known that the kinetic characteristics of potassium fluxes are highly regulated by the previous history of the cell

(Navarrete et al. 2010). For this reason, we used normal K^+ cells and K^+ -starved cells of *C. glabrata* wild-type and *trk1* mutant strains to determine the kinetic constants of transport. Normal K^+ cells were grown in 100 mM KCl and K^+ starved cells were prepared from normal K^+ cells by an incubation in YNB-F medium without added KCl for 3 h (see “Materials and methods” section). Under these conditions, the intracellular K^+ content of *C. glabrata* wild type and *trk1* mutant was 388 ± 32 and 240 ± 7 nmol/mg, respectively, in the case of normal K^+ cells, and 116 ± 15 and 97 ± 15 nmol/mg, respectively, for K^+ -starved cells.

Further, we used rubidium as a potassium transport analogue to be able to perform zero-trans experiments (Navarrete et al. 2010; Martínez et al. 2011) and to determine the kinetic constants of Rb^+ transport. We performed these Rb^+ transport experiments both in *C. glabrata* cells and in *S. cerevisiae* expressing or not *CgTRK1* (Table 2). In normal K^+ cells, the presence of *CgTrk1* improved transport characteristics both in *C. glabrata* and *S. cerevisiae* by increasing V_{max} of transport and decreasing the K_m . Interestingly the K_m values dependent on the transporter were very similar and in the same range in both yeasts (0.39 and 0.24 mM, respectively). K^+ starvation is a usual procedure to activate transport characteristics and to observe high affinity potassium transport modes in yeast (Rodríguez-Navarro and Ramos 1984; Navarrete et al. 2010). In our case, starvation highlighted differences due to the activity of *CgTrk1* and these yeasts showed much higher affinity for rubidium,

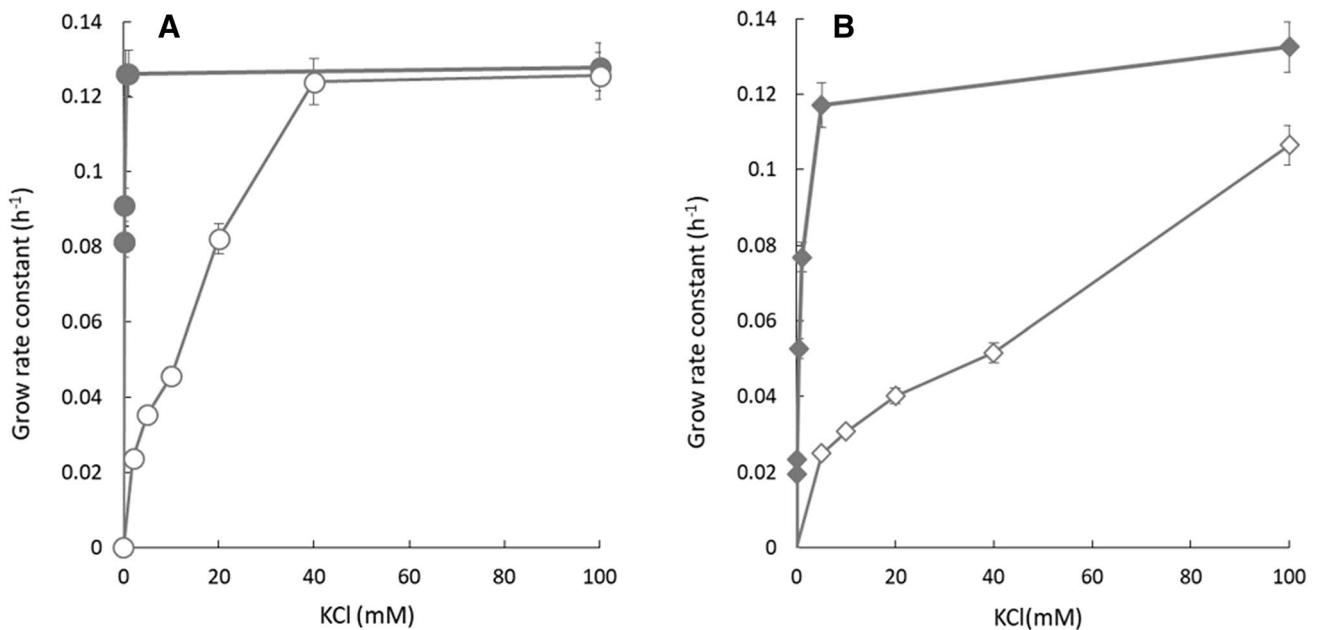


Fig. 1 K^+ dependence of the growth of *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *C. glabrata* (a) or *S. cerevisiae* BYT12 (b), lacking (open circle, open diamond) or expressing (filled circle, filled diamond) the *CgTRK1* gene were inoculated into liquid YNB-F

medium supplemented with the indicated amounts of KCl, and the Absorbance at 600 nm (A_{600}) of cultures was followed. Mean values \pm standard deviation obtained in three independent experiments are plotted

Table 2 Effect of *CgTrk1* on the kinetic parameters for rubidium transport in yeast with a normal K^+ content and in K^+ -starved cells

Strains	Normal k^+ cells		K^+ -starved cells	
	V_{max} (nmol mg^{-1} min^{-1})	K_m (mM)	V_{max} (nmol mg^{-1} min^{-1})	K_m (mM)
<i>C. glabrata</i> wild type	2.7 ± 0.1	0.39 ± 0.06	28.9 ± 1	0.09 ± 0.03
<i>C. glabrata trk1</i>	0.5 ± 0.2	5.47 ± 5.02	3.5 ± 0.1	25.37 ± 0.4
<i>S. cerevisiae</i> BYT12 [YEp-CgTRK1]	11.4 ± 0.2	0.24±0.12	72.42±2.9	0.14 ± 0.012
<i>S. cerevisiae</i> BYT12 [YEp352]	9.2 ± 0.1	24.82 ± 0.01	8.4 ± 3.4	21.51 ± 0.54

more than two orders of magnitude, than yeasts lacking the transporter. Moreover, the presence of *CgTrk1* also greatly increased the V_{max} of transport in both yeast species. Once again, the K_m values measured in *C. glabrata* wild type and in *S. cerevisiae* expressing *CgTRK1* were comparable (0.09 and 0.14 mM, respectively).

CgTRK1 is not regulated at transcriptional level

To study the possible transcriptional regulation of *CgTRK1*, we performed quantitative RT-PCR experiments. RNA was extracted from *C. glabrata* wild-type cells grown without potassium limitation (Normal K^+ cells) or potassium starved (K^+ -starved cells), retrotranscribed and amplified with specific *TRK1* primers. Additionally, to cover other environmental conditions that can affect the K^+ transport process or to modulate expression of yeast plasma membrane transporters, *TRK1* transcripts were also determined from cells grown in high NaCl (1 M) or at acidic (4.5) and alkaline (7.5) pHs. No

significant changes in *TRK1* transcript levels were observed under any of the tested condition (not shown), suggesting that *TRK1* gene is not regulated at the transcriptional level.

Potassium uptake mediated by *CgTrk1* influences cell size

To investigate if *CgTrk1* was able to modulate cell size, we determined this parameter in *C. glabrata* wild-type and *trk1* mutant cells in the presence of different potassium levels. Non-significant changes in the cell size could be determined for any of the conditions tested. However, when the same experiments were performed in *S. cerevisiae* expressing the *Candida* transporter we could see a clear phenotypic effect associated to the protein. When high potassium (100 mM KCl) was added to K^+ -starved cells of strains expressing or not *CgTRK1*, both strains were able to accumulate the cation and increase their size (Fig. 2a, b, compare black and white columns) but when low potassium (0.5 mM KCl)

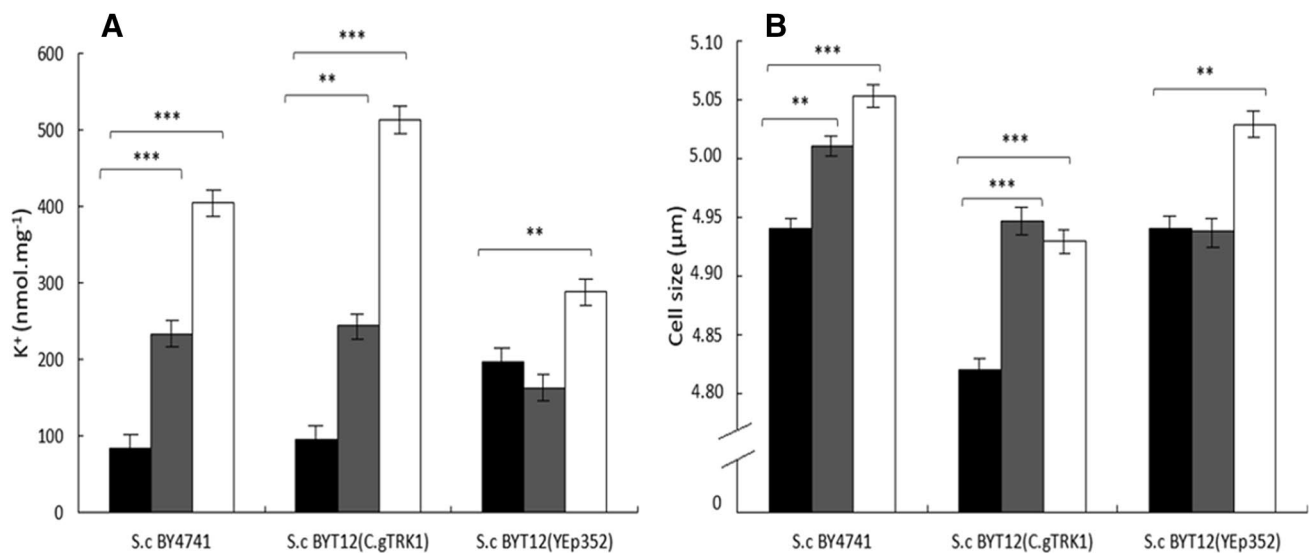


Fig. 2 Potassium content (a) and cellular size (b) in *S. cerevisiae* BY4741, BYT12[YEp-CgTrk1] and BYT12[YEp352] strains. Cells were pregrown overnight in YNB without amino acids plus 100 mM KCl. Then, cells were K^+ starved during three hours in YNB-F medium and K^+ content and cell size were determined (black). Finally, 0.5 mM (grey) or 100 mM (white) KCl were added

to the medium. And after one hour of additional incubation samples were taken and K^+ content and cell size were measured. Mean values ± standard deviation obtained in three independent experiments are plotted. Significant differences are indicated with asterisks (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)

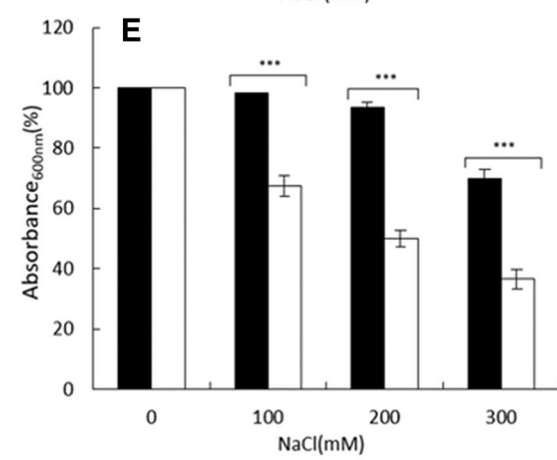
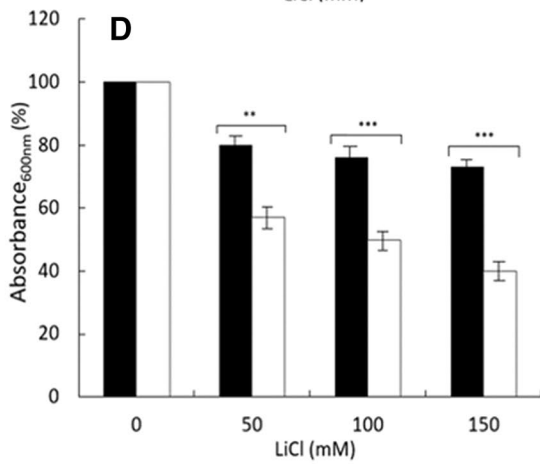
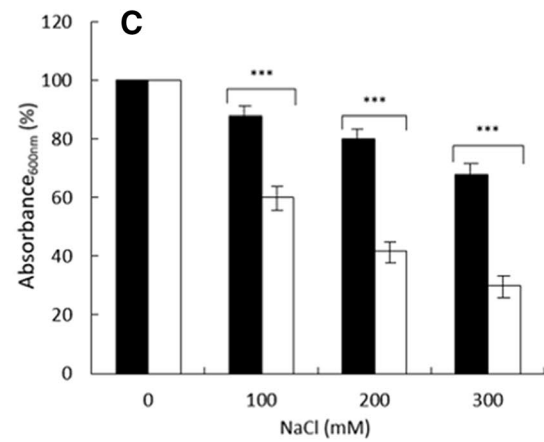
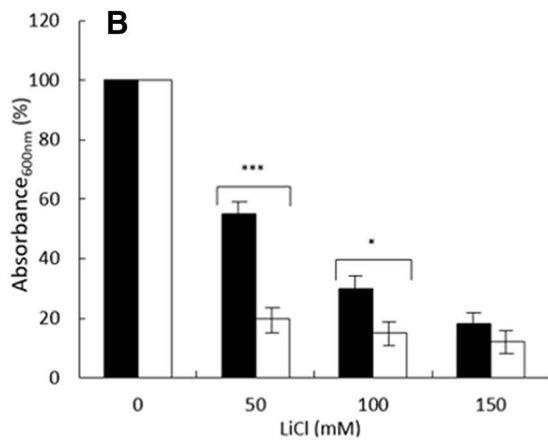
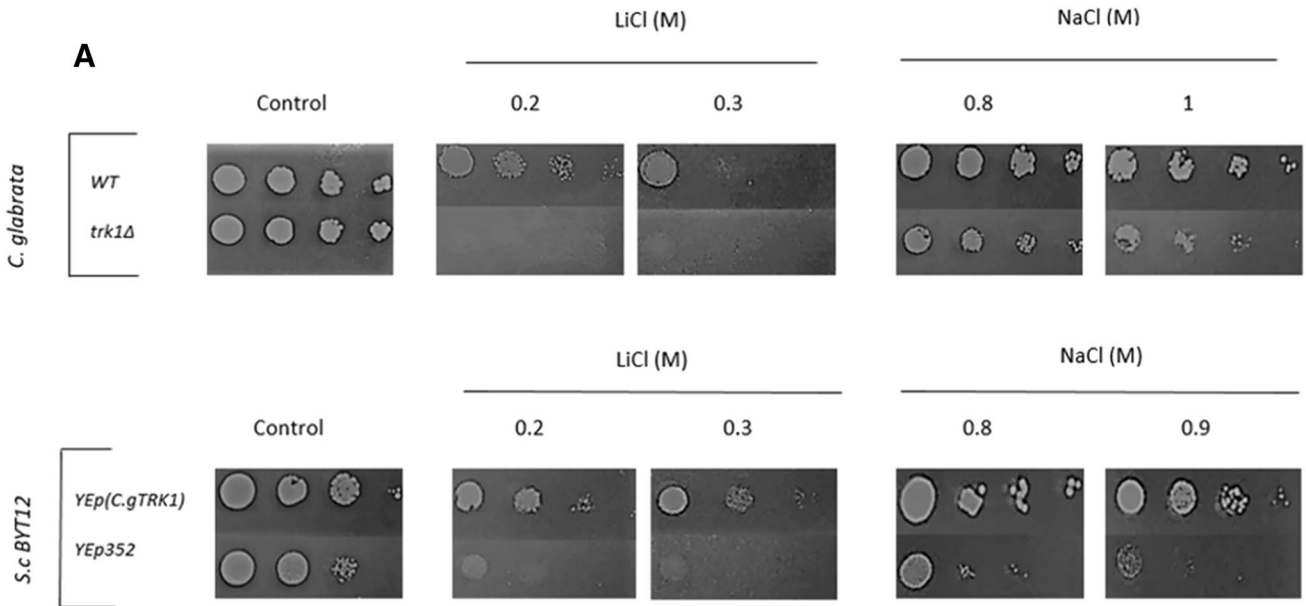


Fig. 3 Growth of *C. glabrata* or *S. cerevisiae* BYT12, lacking or expressing the *CgTRK1* gene, in the presence of different concentrations of LiCl or NaCl. Experiments in **a** were performed in YNB plus 100 mM KCl plates inoculated with serial dilutions of yeast suspensions and containing the indicated concentrations of toxic salts. The pictures were taken after 48 h incubation at 28 °C. The experiment was repeated twice, and a representative result is shown. **b–e** The growth of *C. glabrata* (**b, c**) and *S. cerevisiae* (**d, e**) in liquid YNB plus 100 mM KCl was determined by monitoring Absorbance at 600 nm after incubation overnight in the presence of the indicated amount of LiCl (**b, d**) or NaCl (**c, e**). (filled square) Strains expressing *CgTRK1* gene; (open square) Strains lacking *CgTRK1* gene. Results are expressed as %. Mean values \pm standard deviation obtained in three independent experiments are plotted. Significant differences are indicated with asterisks (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)

concentrations were added to the medium, only the strain carrying the transporter was able to transport potassium inside the cells and the subsequent increase in cell size was observed (Fig. 2a, b, compare black and grey columns). A similar behavior was observed in a control wild type *S. cerevisiae* strain (BY4741) endowed with its endogenous potassium transporters.

Two additional questions derive from experiments in Fig. 2. Why BYT12 K^+ -starved cells expressing *CgTrk1* contained less K^+ and were smaller than the control BYT12[YEp352]? (Fig. 2a, b, black columns). One possible explanation maybe that cells expressing *CgTrk1* are actively dividing during the three hours starvation period while the ones lacking the transporter may not. Second question would be why there is no a direct/proportional relationship between intracellular K^+ levels and cell size after addition of 100 mM KCl? In other words, why cells carrying *CgTrk1* accumulate more potassium but have a lower volume than the control cells carrying empty plasmid? (Fig. 2a, b, black columns). We do not have a definitive answer to this question. The topic may require a polygenic analysis and cell volume could be regulated by many factors that may be indirectly biased by *Trk1* transporter.

***CgTrk1* efficiently discriminates between potassium and sodium or lithium**

In order to study the possible functions of *CgTrk1* in tolerance to salt stress in yeast, cell growth in solid and liquid media supplemented with other salts as LiCl or NaCl was investigated. Figure 3 shows that under the different conditions studied, the presence of *CgTrk1* improved growth when cells were exposed to high amounts of lithium or sodium both in plates (A) or in liquid media (B–E). These results are in accordance to those published by Llopis-Torregrosa et al. (2016) who showed reduced growth of *C. glabrata trk1* cells compared to the wild type, on YPD plates containing NaCl or LiCl.

To further investigate the underneath mechanisms for this behaviour, intracellular cation content was determined in the studied conditions. The growth improvement due to the activity of the transporter was accompanied by a higher capacity to accumulate potassium instead of the toxic sodium cation. As an example, the potassium and sodium contents (nmol/mg) in NaCl (0.2 M) grown cells were 260/150 in *C. glabrata* wild type versus 163/220 in the *trk1* mutant. Similarly, in the case of the *S. cerevisiae* BYT12 strain transformed with empty plasmid or carrying *CgTRK1*, the intracellular potassium and sodium values measured in NaCl (0.2 M) grown cells were 172/261 versus 225/201 (nmol/mg) respectively.

These results point to a higher capacity to discriminate between potassium and sodium in strains expressing *CgTRK1*, as was previously shown for *S. cerevisiae* (Gómez et al. 1996). To confirm this possibility, we studied the effect of potassium on the time course of lithium influx, both in *C. albicans* wild type and *trk1* mutant and in *S. cerevisiae* expressing or not *CgTRK1*. As shown in Fig. 4, the presence of 0.5 or 5 mM KCl in the uptake buffer hardly affected lithium influx (LiCl 100 mM) in cells lacking *Trk1* (B and D) but, in the presence of the *C. glabrata* potassium transporter the uptake of the toxic cation was decreased very efficiently (A and C). All together our results suggest that *Trk1* is improving tolerance to high salt concentrations by efficiently discriminating the uptake of potassium against toxic cations during the influx process.

***CgTrk1* contributes to the proper intracellular pH and membrane-potential homeostasis**

The absence of active high-affinity potassium influx results in an increase of the plasma-membrane potential and a decrease in intracellular pH, both in *S. cerevisiae* and in *C. glabrata* (Navarrete et al. 2010; Llopis-Torregrosa et al. 2016). To verify whether the activity of heterologous *CgTrk1* is able, besides providing the necessary amount of potassium, to restore the wild-type level of the two physiological parameters in *S. cerevisiae* cells, we compared the relative membrane potential and intracellular pH of three strains under the same conditions. The strains were *S. cerevisiae* wild type BY4741 harbouring an empty plasmid (positive control, cells with their own *Trk1* and *Trk2* transporters) and the BYT12 cells transformed either with an empty vector (negative control) or YEp-*CgTrk1*. For intracellular pH measurements, the strains with chromosomally integrated pHluorin sequence were used (Table 1; Zimmermann et al. 2015).

The estimation of intracellular pH in cells grown either in YNB^{ph} without added KCl or in cells grown in YNB^{ph} supplemented with 100 mM KCl, revealed that the presence of *CgTrk1* increased the intracellular pH of BYT12 cells to

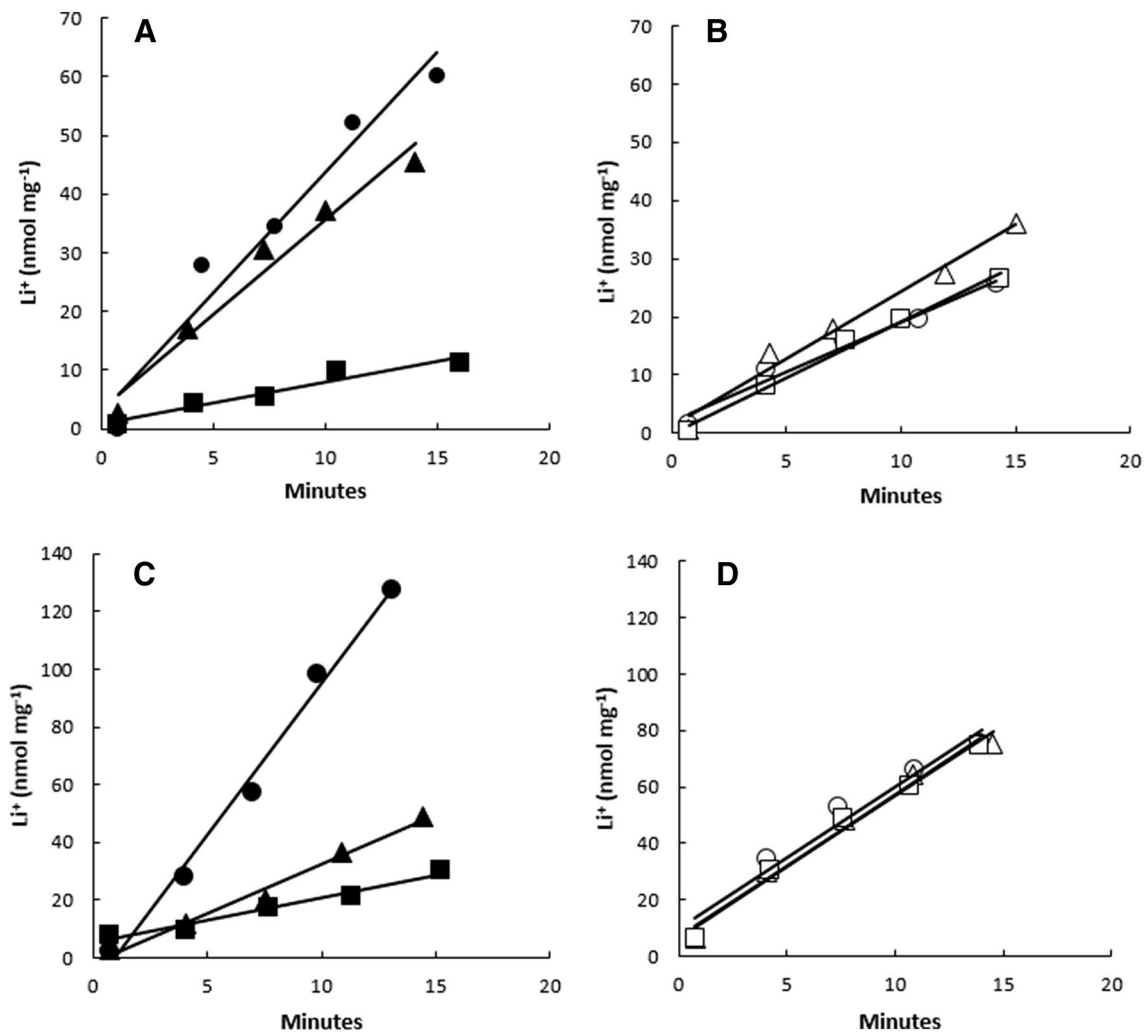


Fig. 4 Time course of lithium influx into *C. glabrata* (a, b) or *S. cerevisiae* BYT12 (c, d), lacking (b, d) or expressing (a, c) the *CgTRK1* gene. Cells were pregrown overnight in YNB plus 100 mM KCl. Then, cells were K^+ starved during 3 h in YNB-F medium, suspended in uptake buffer and LiCl (100 mM) and KCl (0, 0.5 or

5 mM) (circles, triangles or squares) were added at time zero. Samples were taken during 15 min and intracellular lithium was measured as described in “Materials and methods” section. Experiments were repeated three times and representative results are shown

the level observed for the *S. cerevisiae* wild type (Fig. 5). In the absence of 100 mM KCl, the BYT12^{pHl} [YEp352] strain was not growing, so its intracellular pH could not be estimated. Similar complementation was found if the three strains were grown in YNB-F^{pHl} supplemented with 100 mM KCl (not shown). It is worth noting, that the intracellular pH of all three strains was about 0.1 unit higher in YNB-F^{pHl}-grown cells compared to YNB^{pHl}-grown cells (7.12 and 7.20, respectively, for BY4741[YEp352] and BYT12[YEp-CgTrk1]; 6.99 and 7.05 for BYT12[YEp352]).

Figure 6a shows that expression of *CgTrk1* in BYT12 cells also diminished their hyperpolarization and the relative membrane potential of cells with functional *CgTrk1* was close to that of the *S. cerevisiae* wild type. A decrease in membrane potential should be accompanied with an

increase in tolerance to toxic cationic drugs and cations whose non-specific uptake is driven by the negative-inside membrane potential (Ariño et al. 2010). To verify that the observed decrease in membrane potential is accompanied with corresponding changes in drug tolerance, we compared the growth of the three strains in the presence of toxic compounds as Hygromycin B or tetramethylammonium (TMA). As shown in Fig. 6b the presence of *CgTrk1* clearly improved the drug tolerance of BYT12 cells, though the level of wild-type tolerance was not fully reached. Results of the drop tests are in agreement with the results of relative membrane potential measurement, where the staining curve of BYT12[YEp-CgTrk1] cells suggests that these cells are still slightly hyperpolarized compared to the BYT4741 wild type (Fig. 6a).

Fig. 5 Intracellular pH of *S. cerevisiae* cells (with chromosomally integrated sequence encoding pHluorin) growing in YNB^{pH} in the absence or presence of 100 mM KCl. BY4741^{pHl}, wild type transformed with an empty vector; BYT12^{pHl} expressing *CgTRK1* or transformed with an empty vector. Mean values ± standard deviation obtained in three independent experiments are plotted. Significant differences are indicated with asterisks (**P<0.01)

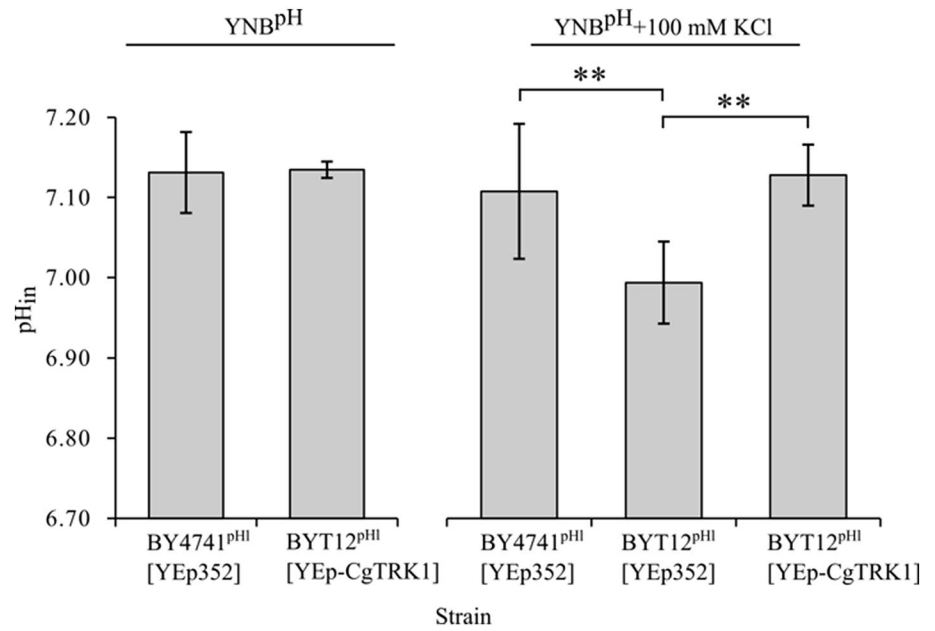
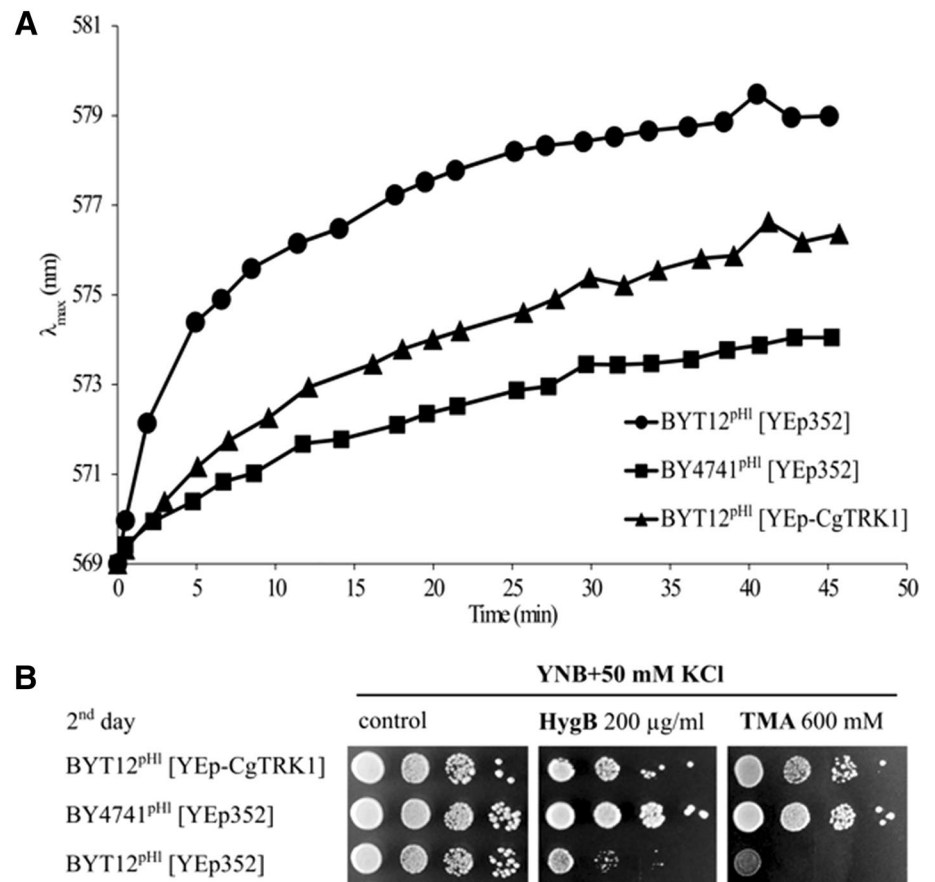


Fig. 6 Relative membrane potential (a) and sensitivity to cationic drugs (b) of *S. cerevisiae* cells (with chromosomally integrated sequence encoding pHluorin). BY4741^{pHl}, wild type transformed with an empty vector; BYT12^{pHl} expressing *CgTRK1* or transformed with an empty vector. The staining curves of cells pregrown in YNB supplemented with 50 mM KCl with the potentiometric probe were obtained as described in “Materials and methods” section. The experiments were repeated three times, representative results are shown in (a) and (b)



Discussion

The prevalence of disease caused by non-albicans *Candida* species is on the rise, along with an increase in antifungal drug resistance. *C. glabrata* accounts for approximately 15% to 20% of all *Candida* infections in the United States and is the most common non-albicans *Candida* specie (Xin 2018).

The information on potassium homeostasis in *C. glabrata* is scarce. It has been reported that the ability to grow at limiting potassium differs in several *Candida* species and that Trk1 is the only specific plasma membrane potassium transporter in *C. glabrata* (Hušeková et al. 2016; Llopis-Torregrosa et al. 2016). *Zygosaccharomyces rouxii* is, so far, the only yeast carrying a sole potassium transporter in which the characteristics of potassium transport were studied (Zimmermannova et al. 2015). Our previous work on *C. glabrata* Trk1 consisted mainly in the description of phenotypes of *C. glabrata* mutants lacking *TRK1* (cation sensitivity, increased relative membrane potential, decreased intracellular pH) (Llopis-Torregrosa et al. 2016).

In this work we show that *CgTrk1* mediates transport processes and we used the *C. glabrata TRK1* gene to study whether its presence can complement not only the absence of the two potassium uptake systems in *S. cerevisiae* in providing its cells with necessary potassium but also in restoring the wild-type levels of physiological parameters which are changed in *S. cerevisiae* cells lacking potassium uptake systems. As far as we know, it is for the first time that the effect of the *CgTRK1* expression on *S. cerevisiae* physiological parameters related to the potassium homeostasis has been tested.

We now report insights of the kinetics of transport and other basic physiological processes depending on *CgTrk1*, in a pathogenic yeast with only that plasma membrane potassium influx system.

One important characteristic of *CgTrk1* was its adaptability to work under extremely different external conditions. Very significant changes in V_{\max} and K_m for Rb^+ transport were detected when cells grown under normal potassium conditions were K^+ -starved for 3 h. These adaptations, with increased affinity and velocity of cation transport, were observed only in the presence of *CgTRK1* and most probably took place at protein level since no transcriptional regulation was observed under any of the conditions studied. Posttranslational modification are key events for controlling many physiological functions of eukaryotic cells. Ion channels and ion transporters share a common ancestor (Zayats et al. 2015) and it has been previously described that ion channels can be modified by posttranslational modifications that alter their structure,

adding phosphate, acetyl or ubiquitin, among other groups. These changes can contribute to the regulation of their number, their location or their kinetics. It has been proposed S-acylation as a major contributor for the channel kinetics (Shipston 2014). Also, the members of the TRK family have several conserved glycines that are key residues for *S. cerevisiae* Trk1. For that reason, they have been proposed to participate in the selectivity filter for the ion (Zayats et al. 2015). Other key residues have also been identified that contribute to the folding of the protein (Zayats et al. 2015) but further studies are necessary to predict which residues participate in the active site of the transporter and which modifications can alter their function and kinetic parameters.

The *CgTRK1* was expressed in BYT12 from a weak constitutive promoter (*ScNHA1*) and multicopy plasmid, so its expression is not influenced by potassium starvation. The fact that the V_{\max} of transport via *CgTrk1* in K^+ -starved cells is significantly higher may imply that during the starvation process there are no changes in the number of transporters but in their activity. In fact, we have shown previously (Ramos and Rodríguez-Navarro 1986; Ramos et al. 1994) that those treatments, for example with sodium azide, that rapidly decreases internal potassium, increases V_{\max} of transport in few minutes. This suggests that actors such as potassium content, directly or indirectly, could down regulate the activity of the transporters and influence the V_{\max} .

Llopis-Torregrosa et al. (2016) have shown, and we have confirmed here, that the mutant *Cgtrk1* still grows at high potassium suggesting the existence of nonspecific potassium transporters that would mediate the influx of potassium in the absence of Trk1 as previously reported in *S. cerevisiae* (Madrid et al. 1998). In fact, it is interesting to mention that the *trk1* deletion mutant shows a higher affinity for potassium in normal potassium cells than in starved cells, something that was not reported previously for other yeast species.

In addition to the potassium transport phenotypes we observed a diversity of pleiotropic effects on other basic processes such as cellular size, salt tolerance, membrane potential or intracellular pH that are affected by the absence of *CgTrk1*. In relation to cellular size, and although no significant results could be obtained in *C. glabrata*, we could observe a direct relationship between the capacity to take potassium and cell volume increase in *S. cerevisiae* expressing or not *CgTrk1*. Even though, both *ScTrk1* and *CgTrk1* decreased the amount of external potassium needed to trigger this effect.

In BYT12, *CgTrk1* brings back the values of two basic physiological parameters to almost the wild-type level. Our results prove that not only the amount of intracellular K^+ but

the rate of its influx is important to regulate the activity of Pma1 and thus the membrane potential and intracellular pH.

The higher tolerance to sodium observed in *S. cerevisiae* wild-type cells has been related to the capacity to discriminate between potassium and the toxic sodium cations by the Trk transporters (Gómez et al. 1996). Two results here support that proposal. On the one hand, *C. glabrata* or *S. cerevisiae* expressing *CgTRK1* accumulated more K⁺ and less Na⁺ than the corresponding strains lacking the transporter, when grown in high NaCl (0.2 M). On the other hand, we show that while in the absence of *CgTrk1*, external potassium (0.5–5 mM KCl) barely affected the time course of lithium uptake (100 mM LiCl) in *C. glabrata* and ScBYT12, in the presence of the transporter, potassium addition efficiently inhibited lithium influx in both yeast species. In conclusion, our results show that the maintenance of membrane potential, intracellular pH and efficiency of the cation transport process are factors that depend on *CgTrk1* and that interact and are linked to salt tolerance.

Our findings show that *CgTRK1* exerts a diversity of pleiotropic physiological roles. Moreover, taking into consideration that the corresponding protein is the only specific plasma membrane potassium transporter in *C. glabrata*, it is conceivable to imagine *CgTrk1* as an attractive pharmacological target for the development of new antifungal drugs.

Acknowledgements This work was supported by Grant Nos. XX and XXII Plan Propio Investigación, University of Córdoba (JR) and by Grant No. 16-03398S from the Czech Science Foundation (HS).

Compliance with ethical standards

Conflict interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Ariño J, Ramos J, Sychrová H (2010) Alkali metal cation transport and homeostasis in Yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:95–120

Ariño J, Ramos J, Sychrová H (2018) Monovalent cation transporters at the plasma membrane in yeasts. *Yeast*. <https://doi.org/10.1002/yea.3355>

Benito B, Garciadeblás B, Schreier P, Rodríguez-Navarro A (2004) Novel p-type ATPases mediate high-affinity potassium or sodium uptake in fungi. *Eukaryot Cell* 3:359–368

Bolotin-Fukuhara M, Fairhead C (2014) *Candida glabrata*: a deadly companion? *Yeast* 31:279–288

Dujon B, Sherman D, Fischer G et al (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* 430:34–35

Elicharová H, Hušeková B, Sychrová H (2016) Three *Candida albicans* potassium uptake systems differ in their ability to provide *Saccharomyces cerevisiae* *trk1trk2* mutants with necessary potassium. *FEMS Yeast Res* 16:1–10

Felcmanova K, Neveceralova P, Sychrova H, O (2017) Yeast Kch1 and Kch2 membrane proteins play a pleiotropic role in membrane potential establishment and monovalent cation homeostasis regulation. *FEMS Yeast Res* 17:fox053

Fitzpatrick DA, Logue ME, Stajich JE, Butler G (2006) A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol Biol* 6:99

Gabaldón T, Martín T, Marcet-Houben M et al (2013) Comparative genomics of emerging pathogens in the *Candida glabrata* clade. *BMC Genomics* 14:623

Gášková D, Brodská B, Heřman P, Vecer J, Malínský J, Sigler K, Benada O, Plásek J (1998) Fluorescent probing of membrane potential in walled cells: diS-C(3)3 assay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14:1189–1197

Gómez M, Luyten K, Ramos J (1996) The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 135:157–160

Hazen KC (1995) New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 8:462–478

Hušeková B, Elicharová H, Sychrová H (2016) Pathogenic *Candida* species differ in the ability to grow at limiting potassium concentrations. *Can J Microbiol* 62:394–401

Kodedová M, Sychrová H (2015) Changes in the sterol composition of the plasma membrane affect membrane potential, salt tolerance and the activity of multidrug resistance pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* 10:e0139306

Llopis-Torregrosa V, Hušeková B, Sychrová H (2016) Potassium uptake mediated by Trk1 is crucial for *Candida glabrata* growth and fitness. *PLoS ONE* 11:e0153374

Madrid R, Gómez MJ, Ramos J, Rodríguez-Navarro A (1998) Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J Biol Chem* 273:14838–14844

Marešová L, Hošková BJ, Urbánková E, Chaloupka R, Sychrová H (2010) New applications of pHluorin—measuring intracellular pH of prototrophic yeasts and determining changes in the buffering capacity of strains with affected potassium homeostasis. *Yeast* 27:317–325

Martínez J, Sychrova H, Ramos J (2011) Monovalent cations regulate expression and activity of the Hak1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Genet Biol* 48:177–184

Navarrete C, Petreszélyová S, Barreto L, Martínez JL, Zahradka J, Ariño J, Sychrová H, Ramos J (2010) Lack of main K⁺ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res* 10:508

Perlroth J, Choi B, Spellberg B (2007) Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol* 45:321–346

Prista C, Almagro A, Loureiro-Dias MC, Ramos J (1997) Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol* 63:4005–4009

Pueyo C, Jurado J, Prieto-Alamo MJ, Monje-Casas F, López-Barea J (2002) Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for determining transcriptional regulation of thioredoxin and glutaredoxin pathways. *Methods Enzymol* 347:441–451

Ramos J, Rodríguez-Navarro A (1986) Regulation and interconversion of the potassium transport systems of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium transport. *Eur J Biochem* 154:307–311


Ramos J, Haro R, Rodríguez-Navarro A (1990) Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *BBA Biomembranes* 1029:211–217

Ramos J, Alijo R, Haro R, Rodríguez-Navarro A (1994) TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 176:249–252

- Ramos J, Ariño J, Sychrová H (2011) Alkali–metal–cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species. *FEMS Microbiol Lett* 317:1–8
- Ribeiro de Carvalho R, Chaves Silva N, Cusinato M, Tranches Dias KS, Dos Santos MH, Viegas Junior C, Gonçalves Silva É, Tranches Dias AL (2018) Promising synergistic activity of fluconazole with bioactive Guttiferone-A and derivatives against non-albicans *Candida* species. *J Mycol Méd* 28:645–650
- Rodriguez-Navarro A, Ramos J (1984) Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 159:940–945
- Shipston MJ (2014) Ion channel regulation by protein S-acylation. *J Gen Physiol* 143:659–678
- Xin H (2018) Effects of immune suppression in murine models of disseminated *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* infection and utility of a synthetic peptide vaccine. *Med Mycol* 1:1. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy122>
- Zayats V, Stockner T, Pandey SK, Wörz K, Ettrich R, Ludwig J (2015) A refined atomic scale model of the *Saccharomyces cerevisiae* K⁺-translocation protein Trk1p combined with experimental evidence confirms the role of selectivity filter glycines and other key residues. *BBA Biomembranes* 1848:1183–1195
- Zimmermannova O, Salzar A, Sychrova H, Ramos J (2015) The *Zygosaccharomyces rouxii* Trk1 is an efficient potassium transporter providing yeast cells with high lithium tolerance. *FEMS Yeast Res* 15:fov029

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Affiliations

Gabriel Caro¹ · Jan Bieber² · Francisco J. Ruiz-Castilla¹ · Carmen Michán³ · Hana Sychrova² · José Ramos¹ 

¹ Department of Microbiology, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain

² Department of Membrane Transport, Institute of Physiology, Czech Academy of Sciences, 142 20 Prague 4, Czech Republic

³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain



Inoculation with a terroir selected *Debaryomyces hansenii* strain changes physico-chemical characteristics of Iberian cured pork loin



Laura Ramos-Moreno^a, Francisco J. Ruiz-Castilla^a, Cristina Bravo^a, Ester Martínez^a, Macarena Menéndez^b, Rafaela Dios-Palomares^c, José Ramos^{a,*}

^a Department of Microbiology, University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain

^b Department of Organic Chemistry, University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain

^c Department of Statistics and Operational Research, University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Iberian pork loin
Debaryomyces hansenii
Physico-chemical parameters
Sensory

ABSTRACT

Debaryomyces hansenii Lr1, previously isolated from naturally fermented cured pork loin (“lomo embuchado”), was used to inoculate Iberian pork loin under four different conditions. In all cases, specifically inoculated *D. hansenii* yeasts grew on the surface of the product and affected its physico-chemical and sensory characteristics. Inoculated pork loin kept higher water activity and pH and possessed lower sodium content than control samples at the end of the 90 days ripening period. Moreover, inoculation with Lr1 yeast did not change the general profile of fatty acids but modified the levels of volatile and aroma compounds by decreasing aldehydes and increasing esters and alcohol compounds. Principal Component Analysis (PCA) of the different physico-chemical parameters that were determined showed a clear separation between the samples indicating that they were different. A tendency in consumers acceptance to prefer cured pork loin specifically inoculated with the higher amounts of yeasts used in this study was observed.

1. Introduction

Debaryomyces hansenii is a hemiascomycetous non-conventional yeast of importance in basic and applied research (Breuer & Harms, 2006; Gunde-Cimerman, Ramos, & Plemenitas, 2009; Prista, Loureiro-Dias, Montiel, García, & Ramos, 2005). Although its genome was fully sequenced by the Genolevures consortium in 2004 (Dujon et al., 2004), knowledge of this yeast is very limited. One of the most fascinating and intriguing properties of *D. hansenii* is its halotolerant behavior, which has been studied during a long time, and its relationship with responses to additional stress factors (Almagro et al., 2000). Potential biotechnological applications and peculiarities conditioning research in *D. hansenii* have been reviewed in Breuer and Harms (2006) or Prista, Michán, Miranda, and Ramos (2016).

D. hansenii is the most abundant yeast in several common foods, such as cheese (Fadda, Mossa, Pisano, Deplano, & Cosentino, 2004; Mounier et al., 2006) and sausages (Dalton, Board, & Davenport, 1984). They are crucial in cheese ripening (Bonaïti, Leclercq-Perlat, Latrille, & Corrieu, 2004; Cholet, Hénaut, Casaregola, & Bonnarme, 2007; Kumura et al., 2002; López Del Castillo-Lozano, Delile, Spinnler, Bonnarme, & Landaud, 2007) and, furthermore, in limiting the presence of undesirable spoilage bacteria (Fatichenti, Bergere, Deiana, & Farris, 1983). In

addition, *D. hansenii* is involved in the ripening process of sausages such as salami, and several papers have reported its possible utilization as a starter to develop their characteristic flavours under many different conditions (Cano-García, Belloch, & Flores, 2014; Cano-García, Rivera-Jiménez, Belloch, & Flores, 2014; Corral, Belloch, López-Díez, & Flores, 2018; Corral, Belloch, López-Díez, Salvador, & Flores, 2017).

Food industry interest in *D. hansenii* is directly linked to the salt tolerance characteristics of this yeast (Butinar, Santos, Spencer-Martins, Oren, & Gunde-Cimerman, 2005; Prista et al., 2005; Seiler & Busse, 1990) although *D. hansenii* strains are very heterogeneous both genetically and biochemically. From a biotechnological point of view, they contribute directly and indirectly to the flavour of the food they grow on. Different strains characteristically contribute to the final aroma and taste of the foods, adding a whole range of distinct volatile compounds or altering their composition with their lipolytic and proteolytic enzymes (Gori, Sørensen, Petersen, Jespersen, & Arneborg, 2012; López Del Castillo-Lozano et al., 2007).

In a previous study our group has isolated, for the first time, the yeast microbiota present in several Iberian dry meat products from Valle de los Pedroches (Córdoba, Spain). The dehesa is the prominent ecosystem of the Valle de los Pedroches. It is formed basically by oaks, cork oaks, and gall oaks. The fruit of these trees is the support of its

* Corresponding author.

E-mail address: milraruj@uco.es (J. Ramos).

livestock and the basis of the quality of its meat products. Rural Quality-Los Pedroches is the brand linked to the Association of the European Territorial Quality Mark that recognizes the quality of these products. In addition, Spanish legislation regulates the quality standard for meat, ham, shoulder and loin of Iberian loin (BOE, 2014).

One of these products, cured pork loin (“lomo embuchado”), is prepared removing most of the fat from pork followed by seasoning during six hours with a mixture of garlic, oregano, salt, pepper nitrate and/or nitrite. The pork loins are then stuffed into casings and they are cured for three months at 12 °C approximately. *D. hansenii* was the most abundant yeast species in the cured dry meat product studied and some isolates were proposed as valuable candidate starter cultures based on their resistance to some abiotic stresses and their catabolic characteristics (Ramos, Melero, Ramos-Moreno, Michán, & Cabezas, 2017).

The aim of this study was to evaluate a selected strain previously isolated from Iberian cured pork loin casing determining its effect on the general characteristics of the cured pork loin from Valle de los Pedroches region. The general proposal is that inoculation with a selected indigenous strain will help conserve local characteristics and increase quality of Iberian cured pork loin.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of *Debaryomyces hansenii* inoculum

Debaryomyces hansenii Lr1 strain, previously isolated from naturally fermented cured pork loin (“lomo embuchado”) from Valle de los Pedroches, was used throughout this work (Ramos et al., 2017). Yeasts were grown at 26 °C in complex YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose). Cells were grown under aeration and collected during exponential growth phase, they were centrifuged, washed with ice cold sterile water, concentrated and kept refrigerated in ice-cold water until inoculation two hours later. Cell viability tests were performed by inoculating samples of cells on YPD plates just when they were concentrated and before inoculation.

2.2. Sampling

Selected *D. hansenii* Lr1 yeast cells were inoculated either directly on the meat surface (M treatments) or on the collagen casing (C treatments) in which each loin piece (1.25 Kg approximately) was stuffed to make the product (Viscofam company). One or two ml of yeast suspension was inoculated on each piece of loin and spread by rubbing with the aid of a sterile laboratory brush. Therefore, two different amounts of yeasts were used to inoculate each loin, 0.52 g (approximately 5×10^9 cells) (treatments M1 and C1) or 1.04 g of cells (approximately 10^{10} cells) (treatments M2 and C2). In addition, uninoculated control samples were maintained in parallel with the treated samples.

In summary, we ended up with four different conditions plus the uninoculated control loins. Each condition was applied to twelve individual pork loins that were analysed independently at the end of the treatments. The pork loins were cured during 90 days at 12 °C approximately and 70–90% relative humidity. At the end of the curing process, loin samples were taken and analysed. For pH, Aw, sodium content, and sensory analysis the twelve cured pork loins of each treatment were used. In the case of fatty acids and volatile compounds determinations, we used only three loins for each treatment due to economic reasons and since it was statistically enough.

2.3. Microbial analysis

Four cured pork loins (one per treatment) were used to identify yeast present at the end of the ripening period. Samples were inoculated in Sabouraud Chloramphenicol Agar (Scharlau Chemie, Spain) and one isolate per treatment was identified by analysing mitochondrial DNA.

2.4. Chemical analysis

Samples of cured pork loins were minced in sterile distilled water (1:1) to measure pH, and sodium content. pH was determined by using a pHmeter Hach sensION PH3. Water activity was measured using a Dew Point hygrometer (Decagon Devices CX-2). The content of sodium was analysed by atomic emission spectrophotometry (Ramos, Haro, & Rodríguez-Navarro, 1990).

2.5. Fatty acid profile

Total lipids were extracted from 25 g cured pork loins. Extraction was carried with pre-crushed loin, in a Stomacher bag, using 40 mL diethyl ether extraction solvent, for 4 min.

The extracts were dried in a rotating vacuum evaporator. Lipid profile was determined by means of total fatty acids which were methylated (Berry, Bovis, & Logothetis, 1965). Methyl esters are formed by trans-esterification with potassium hydroxide solution in methanol as the methylating reagent. Fatty acids methyl esters were analysed in a Perkin Elmer Clarus 500 gas chromatograph (GC) equipped with a flame ionization detector (FID). The column used was a BTEX70 (60 m × 0.25 mm × 0.25 µm), with a column flow rate of 1 mL/min. Injector temperature was 235 °C, a temperature program of 170 °C for 10 min and 5 °C/min to 235 °C and a final hold for 3 min was used to achieve separation of the fatty acid methyl esters. The inlet was set to Split mode with a split ratio of 100:1 and detector temperature was 250 °C. Fatty acid methyl esters were identified by comparing their retention times with those of standard fatty acid methyl esters. The results were expressed as percentage of total fatty acids identified (Corral et al., 2018).

2.6. Analysis of volatile compounds

The analysis of volatile compounds was performed on a HS-GC-MS (Perkin-Elmer, Turbo Matrix 40 HS-Trap and Clarus 600 T GC-MS), working with electron impact ionization and Full Scan mode for ion detecting. Extraction of volatile and semi-volatile components from cured pork loin was conducted by the technique of static headspace. Each sample (2.8 g of minced loin) was weighed into a 20 mL HS vial (headspace), 0.01 mL of an internal standard solution of 1-Fluorobenzene was added and used for the relative quantification of analytes. The vial was left for 30 min at 37 °C for equilibration to facilitate the analytes extraction. Chromatographic separation was carried out on a 5% phenyl silicone GC column (60 m length, 0.32 mm i.d. and 1 µm film thickness), with a column pressure of 30 psi. Injector temperature was 220 °C, a temperature program of 35 °C for 0.5 min and 7 °C/min to 110 °C, and 25 °C/min to 275 °C and a final hold for 5 min was used to achieve separation of the volatiles and semi-volatiles. The MS source temperature was 250 °C and full scan mode 35–325 *m/z* with 0.5 s/scan. Under these conditions, a series of compounds were selected that were identified by comparison with mass spectra from a library database (SCAI, University of Córdoba) and calculating Kovats retention index (Kovats, 1965).

The results were expressed as relative units based on total extracted area.

2.7. Sensory analysis

A panel of 15 women and 15 men with ages ranging from 23 to 60 years old tested the Iberian cured pork loins at the end of the ripening process (90 days). All members of the panel, belonging to the university or the Navalpedroche company staff, had previous experience in sensory analysis. The analysis was performed in the sensory laboratory of the food department of the University of Córdoba as previously described (Olivares, Navarro, & Flores, 2011) with minor modifications. The casing of the loins was removed, and samples were

cut in slices 3–4 mm thick and served at room temperature. All the samples were tasted in duplicate in two different sessions. Water and unsalted toasts were provided to clean the palate between samples. The order of evaluation of the attributes was as follows: visual appearance, aroma, flavour, texture, salty taste and overall evaluation. The acceptability test was carried out using a 9-box hedonic scale (1 extremely dislike – 9 extremely like).

2.8. Statistical analysis

Data were analysed using SPSS software to evaluate the differences between treatments.

A mixed nested design ANOVA and factorial (2×2) ANOVA was applied. The three included factors were: F1: Yeast (0 = no inoculation; 1 = any inoculation), F2: Doses (0.52 g and 1.04 g), F3: Application (M = Inoculation in meat; C: Inoculation in casing). The factorial ANOVA (2×2) (F2 and F3) were nested of Yeast. The applied model was $Y = \mu + \text{yeast} + \text{doses (yeast)} + \text{application (yeast)} + \text{doses} \times \text{application (yeast)}$. Principal Component Analysis (PCA) was used to evaluate the five samples and to find the relationships among treatments in cured pork loins and the different physico-chemical determinations (Unscrambler v.9.2 software).

3. Results and discussion

3.1. Implantation of inoculated yeast in pork loins

Cell viability tests indicated that 100% of cells were viable at the moment of inoculation. The yeast cells were able to implant, colonize and proliferate on the surface of the pork loin (“lomo embuchado”) regardless of whether they were inoculated directly on the surface of the meat (M treatments) or on the casing (C treatments). After the ripening period most of the surface of the inoculated loins was covered by a layer of yeasts. However, in the uninoculated control samples only some yeasts from the environment were able to proliferate and form some spots on the surface of the loins. No visual differences were observed between the several treatments (M1, M2, C1, and C2). **Picture 1** shows an example of the appearance of control (left) and inoculated cured pork loins (right) at the end of the 90 days ripening period. Then, four isolates (one per treatment) were randomly taken from the pork loin surface inoculated with yeasts. They were biochemically and molecularly identified (including mitochondrial DNA analysis). Results of the tests confirmed the implantation of the Lr1 strain (not shown) although we cannot rule out the possibility that some environmental yeasts also could reach and grow on the experimental groups of loins.



Picture 1. Example of the appearance of control (left) and inoculated (M2 treatment, right) pork loins at the end of the ripening period. No visual differences were observed between the several treatments in which a selected strain was used to inoculate the loins (M1, M2, C1, C2 treatments as described in Materials and methods).

3.2. Physicochemical parameters: pH, aw and Na⁺ content

pH, water activity and sodium content, determined after the 90 days of ripening, were clearly affected by the inoculation of Lr1 *D. hansenii* strain (**Table 1**).

Slightly higher water activity than in the control was observed in all the four different treatments. In addition, the final water activity was dependent on the amount of yeast inoculated being higher in M2 and C2 treatments inoculated with double amount of yeasts. This phenomenon has been previously reported in other products and it has been interpreted because of the yeast growth on the surface of the loin thus regulating the drying process (Cano-García, Belloch, & Flores, 2014; Corral et al., 2017).

Moreover, yeast inoculation also produced lower decrease in pH in all treatments. In this case the changes in pH were dependent on the yeast amount in the case of M treatments but not for C treatments. This higher final pH may be due to the consumption of organic acids by yeast as proposed previously for fermented sausages (Cano-García, Belloch, & Flores, 2014; Corral et al., 2017).

Interestingly, yeast inoculation produced a significant decrease in the sodium content of the cured pork loins which was especially noticeable in the case of C2 treatment. It is known that *D. hansenii* can accumulate high amounts of sodium from the environment without becoming intoxicated and for this reason it has been defined as a sodium includer yeast (Herrera, Salazar, Ramos-Moreno, Ruiz-Roldan, & Ramos, 2017; Martínez, Sychrova, & Ramos, 2011; Prista, Almagro, Loureiro-Dias, & Ramos, 1997). This behaviour could explain why inoculated loins contained lower sodium amounts a characteristic that was never reported before.

3.3. Lipid profile

Details of the total fatty acid profile in cured pork loins at the end of the ripening process, and under the different conditions used in this research, are shown in **Table 2**. It is worth to mention that in all cases, including control samples, loins contained a very low percentage of polyunsaturated fatty acids (PUFA) and that the most abundant were the monounsaturated fatty acids (MUFA). On the other hand, inoculation with Lr1 strain did not importantly change the fatty acids profile of none of the treatments applied. Oleic acid (C18:1) around 50%, palmitic acid (C16:0) around 26% and stearic acid (C18:0) around 10–12% of total fatty acids were the most abundant in all samples. Clear differences could not be found related to the different treatments although slight but consistent effects on the percentage of some fatty acids were observed and, for example, a significant increase in myristic acid (C14:0) and decrease in arachidic acid (C20:0) and gadolenic acid (C20:1 n11) were measured in the M treatments. Moreover, all the treatments produced a decrease in the percentage of t-oleic acid (elaidic

Table 1Changes in pH, Aw and sodium (ppm) content at the end of the ripening process of pork loins inoculated with Lr1 *D. hansenii* strain.

	Control	Dose 1		Dose 2		SEM	P_Y	P_D	P_A	$P_{D \times A}$
		M1	C1	M2	C2					
pH	6.492	6.900	6.867	7.308	6.900*	0.268**	***	***	***	***
A _w	0.905	0.914	0.915	0.920	0.919	0.005	***	***	***	***
Sodium	5589.330	5064.750	4894.080	5033.920	4487.080	365.181	***	***	***	***

Control: Non-inoculated with a specific yeast strain.

M1, C1, M2 and C2: Different treatments used in this study (see Materials and methods).

Standard error of the mean is shown.

 P_Y : Pvalue of the yeast effect. P_D : Pvalue of the dose effect. P_A : Pvalue of the application effect. $P_{D \times A}$: Pvalue of interaction between dose and application effects.ns = non-significant $P > .05$.* $P < .05$.** $P < .01$.*** $P < .001$.

acid, C18:1 n9t) when compared to the control samples.

In summary, our results show that the inoculation with Lr1 strain did not significantly change the lipid profile of the loins. Only the amount of some fatty acids was affected but changes in the total amounts of SFA, MUFA and PUFA were not significant.

3.4. Production of volatile and aroma compounds

Table 3 shows the predominant representative volatile compounds that were identified both in the control samples and in the inoculated loins at the end of the ripening process. Fig. 1 represents the abundance of the identified compounds grouped by chemical families. For all

samples, the most abundant compounds identified were, in all cases, alcohols (64.7–73.2%) and aldehydes (14.2–27.4%). In addition, significant amounts of esters (2.6–7.5%), sulfur compounds (3.1–4.7%) and ketones (0.8–2.1%) were found. Three important effects due to the inoculation with specific yeasts were very clearly observed. First a decrease in aldehyde compounds, second, an increase in ester compounds and third an increase in alcohols. The decrease in aldehydes was observed in all samples inoculated with Lr1 strain. Pentanal and hexanal, derived from the lipid oxidation process, were almost undetectable in the inoculated loins and an important reduction in acetaldehyde was measured in C samples. Under all conditions studied, yeast inoculation produced an increase in esters which was more relevant in the case of

Table 2Total fatty acid profile (%) in pork loins inoculated with Lr1 *D. hansenii* selected strain at the end of the ripening process.

Fatty acid	Control	Dose 1		Dose 2		SEM	P_Y	P_D	P_A	$P_{D \times A}$
		M1	C1	M2	C2					
C12:0	0.080	0.090	0.080	0.095	0.080	0.007	ns	ns	***	ns
C14:0	1.450	1.627	1.373	1.710	1.397	0.139	***	**	***	ns
C16:0	26.550	26.200	26.017	26.353	26.000	0.301	*	ns	ns	ns
C17:0	0.183	0.197	0.173	0.163	0.193	0.017	ns	ns	ns	**
C18:0	11.750	11.380	12.817	12.127	11.663	0.574	ns	*	***	**
C20:0	0.197	0.170	0.253	0.172	0.190	0.032	ns	***	***	***
C24:0	0.043	0.042	0.020	0.040	0.043	0.011	ns	**	*	**
SFA	40.253	39.706	40.733	40.660	39.566	0.603	ns	ns	ns	***
C16:1 n7	4.133	4.860	3.063	4.393	4.047	0.636	ns	ns	***	***
C17:1	0.230	0.270	0.173	0.177	0.223	0.038	**	**	***	***
C18:1 n9t	0.233	0.173	0.200	0.183	0.217	0.023	***	***	***	ns
C18:1	51.130	52.050	51.600	50.687	52.007	0.794	ns	ns	ns	*
C20:1 n11	1.000	0.798	1.173	0.793	0.990	0.153	ns	**	***	**
MUFA	56.726	58.151	56.209	56.233	57.484	1.016	ns	ns	ns	**
C18:2 n6c	3.020	2.723	3.160	3.123	3.127	0.250	ns	ns	ns	ns
C18:3 n3	0.177	0.173	0.210	0.197	0.207	0.025	ns	ns	ns	ns
PUFA	3.197	2.896	3.37	3.320	3.334	0.271	ns	ns	ns	ns
Total	100.176	100.753	100.312	100.213	100.384					

Control: Non-inoculated with a specific yeast strain.

M1, C1, M2 and C2: Different treatments used in this study (see Materials and methods).

Standard error of the mean is shown.

 P_Y : Pvalue of the yeast effect. P_D : Pvalue of the dose effect. P_A : Pvalue of the application effect. $P_{D \times A}$: Pvalue of interaction between dose and application effects.ns = non-significant $P > .05$.* $P < .05$.** $P < .01$.*** $P < .001$.

Table 3Most abundant volatile compounds (expressed as relative units) in pork loins inoculated with Lr1 *D. hansenii* selected strain at the end of the ripening process.

Volatile	Control	Dose 1		Dose 2		SEM	P_Y	P_D	P_A	$P_{D \times A}$
		M1	C1	M2	C2					
Aldehydes										
Acetaldehyde	0.206	0.240	0.137	0.205	0.183	0.038	ns	ns	***	**
2-Methylpropanal	0.030	0.025	0.019	0.019	0.022	0.006	*	ns	ns	ns
2-Methylbutanal	0.019	0.014	0.012	0.009	0.012	0.004	**	ns	ns	ns
3-Methylbutanal	0.087	0.033	0.031	0.021	0.032	0.025	***	ns	ns	ns
Pentanal	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	**	ns	ns	ns
Hexanal	0.009	0.000	0.004	0.000	0.002	0.004	***	ns	*	ns
Ketones										
2,3-Butanedione	0.015	0.015	0.029	0.019	0.010	0.010	ns	ns	ns	ns
Sulfur compounds										
Methional	0.008	0.009	0.007	0.005	0.006	0.002	ns	*	ns	ns
Ethyl methyl sulfide	0.015	0.032	0.033	0.009	0.023	0.011	*	***	*	ns
Methanethiol	0.030	0.036	0.024	0.023	0.032	0.007	ns	ns	ns	*
Alcohols										
Ethanol	0.776	1.218	0.788	0.923	0.827	0.225	ns	ns	*	ns
1-Pentanol	0.005	0.000	0.008	0.000	0.002	0.004	ns	ns	**	ns
2-Methylbutanol	0.053	0.080	0.080	0.080	0.071	0.012	***	ns	ns	ns
Esters										
Methyl isobutyrate	0.000	0.008	0.007	0.006	0.005	0.003	***	ns	ns	ns
Methyl butyrate	0.004	0.001	0.002	0.003	0.002	0.001	*	ns	ns	ns
Methyl isovalerate	0.004	0.021	0.022	0.016	0.018	0.007	***	**	ns	ns
Methyl acetate	0.026	0.041	0.073	0.051	0.051	0.021	*	ns	ns	ns

Control: Non-inoculated with a specific yeast strain.

M1, C1, M2 and C2: Different treatments used in this study (see Materials and methods).

Standard error of the mean is shown.

 P_Y : Pvalue of the yeast effect. P_D : Pvalue of the dose effect. P_A : Pvalue of the application effect. $P_{D \times A}$: Pvalue of interaction between dose and application effects.ns = non-significant $P > .05$.* $P < .05$.** $P < .01$.*** $P < .001$.

C1 samples. Importantly, the amounts of methyl isovalerate, related to fruity odour and flavour, increased more than one order of magnitude in all the experimental conditions when compared to the control samples. That increase was especially significant in treatments (M1 and

C1). Similarly, levels of methyl isobutyrate were detected only when yeast was inoculated. Yeast inoculation in meat or casing induced an increase in the production of alcohols with ethanol being the most abundant. It is known that this compound is not an important

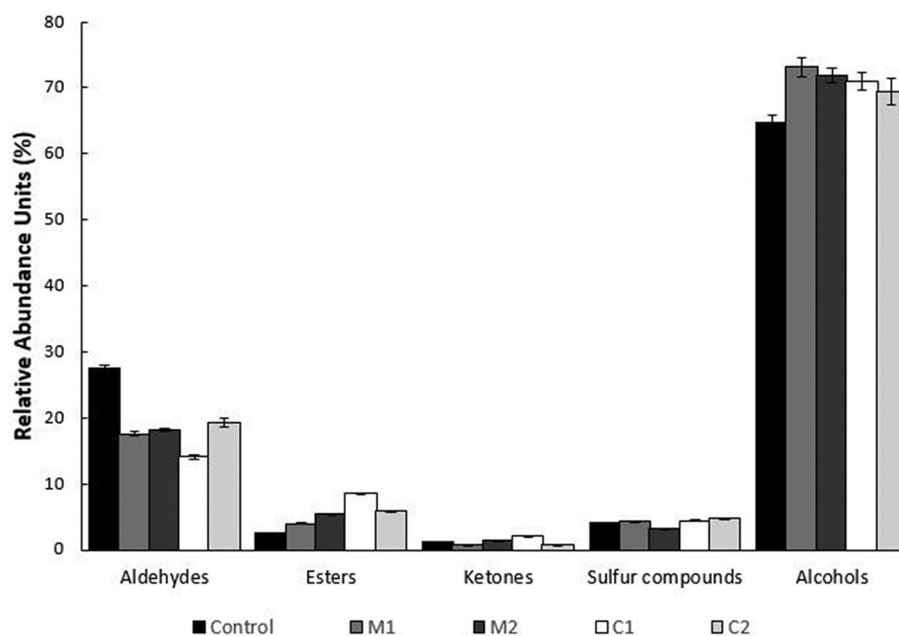


Fig. 1. Families of volatile compounds at the end of the ripening process in pork loins inoculated with Lr1 *D. hansenii* strain. Total compounds abundance is expressed in percent of the total as Relative Abundance Units (%). Control, M1, M2, C1 and C2 treatments as described in Materials and methods.

Table 4
Sensory acceptability of cured pork loins inoculated with Lr1 *D. hansenii* selected strain under the different conditions of this study (see Materials and methods).

Aspect	Control	Dose 1		Dose 2		SEM	P_Y	P_D	P_A	P_{DxA}
		M1	C1	M2	C2					
Aspect	5.73	6.10	6.20	6.10	6.30	0.38	***	ns	*	ns
Aroma	6.10	6.62	6.80	7.10	7.20	0.52	***	***	*	ns
Flavour	6.12	6.60	6.50	7.13	7.18	0.56	***	***	ns	ns
Texture	6.02	6.20	6.08	6.10	6.23	0.39	ns	ns	ns	ns
Salty taste	5.93	7.12	7.13	7.18	7.30	0.65	***	ns	ns	ns
Overall quality	6.52	6.81	6.93	7.00	7.22	0.39	***	***	**	ns

Values represent average of 30 consumers. Scale (1 extremely dislike – 9 extremely like).

Control: Non-inoculated with a specific yeast strain.

M1, C1, M2 and C2: Different treatments used in this study (see Materials and methods).

Standard error of the mean is shown.

P_Y : Pvalue of the yeast effect.

P_D : Pvalue of the dose effect.

P_A : Pvalue of the application effect.

P_{DxA} : Pvalue of interaction between dose and application effects.

ns = non-significant $P > .05$.

* $P < .05$.

** $P < .01$.

*** $P < .001$.

contributor to the final aroma of fermented sausages, rather it is a precursor of ester compounds (Molimard & Spinnler, 1996), which increased in our treatments and which are responsible for fruity odours. Finally, inoculation produced an increase in 2-methylbutanol in all cases.

It has been previously shown that the abundance of volatile compounds in some fermented sausages depends on the yeast strain used to inoculate the sausages (Cano-García, Belloch, & Flores, 2014). In our

case, Lr1 *D. hansenii* strain, produced a reduction in aldehydes and an increase in alcohols and esters in pork loins under the different conditions used, which is in good agreement with results published previously (Corral et al., 2018) in sausages fermented with specific *D. hansenii* strain P2. Finally, the amounts of ketones and sulfur compounds were kept at levels relatively low independently of the presence of the inoculated yeasts. The low amount sulfur compounds in sausages fermented with *Debaryomyces* yeasts has been previously reported (Andrade, Córdoba, Casado, Córdoba, & Rodríguez, 2010; Olesen & Stahnke, 2000).

It is important to mention that in all the experiments mentioned above we did not look for differences between the outer and the inner part of each product since each piece was considered as a whole. However, this is a matter that deserves more research in the next future.

3.5. Sensory analysis

The possible effect of inoculation of fermented sausages with *Debaryomyces* on their sensory characteristics has been controversial. While some studies reported a significant effect (Flores, Durá, Marco, & Toldrá, 2004; Iucci et al., 2004) other papers reported absence of sensory effects (Olesen & Stahnke, 2000; Selgas, Ros, & García, 2003). Results can be affected by the selected strain, the inoculated quantity of yeast, the type of sausage and even the possible presence of other starters. In our case, the results obtained after a sensory analysis of the cured pork loins are summarized in Table 4. The consumer sensory panel did not detect significant differences in texture among treatments. However, significant differences were found in all the other attributes evaluated when compared to the control samples. In general, all treatments improved in a similar way the acceptability of the product in comparison to the control, including the aspect of the samples. Moreover, a tendency to higher global consumer acceptability for samples inoculated with twice yeast amounts (M2 and C2 treatments) was observed. Furthermore, a positive effect of the higher dose of yeast inoculated was found with respect to Aroma and Flavour. Also relevant

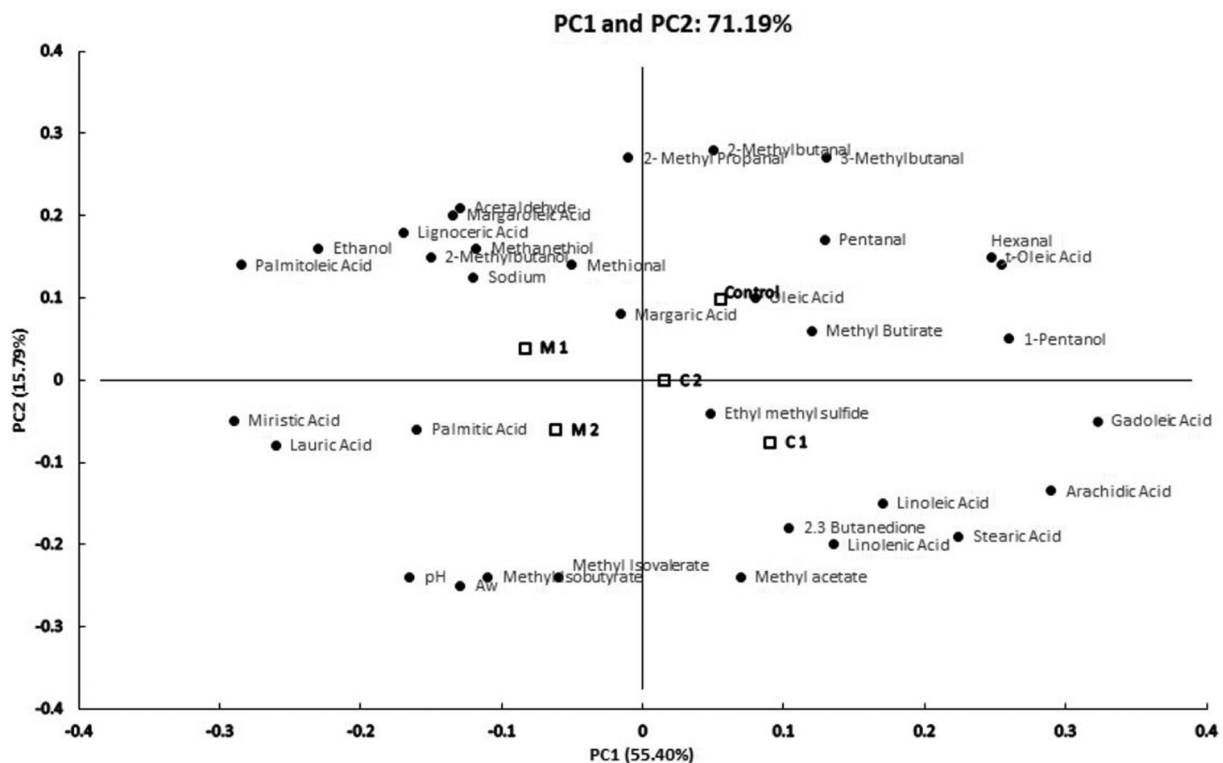


Fig. 2. Principal Component Analysis (PCA) of the different physico-chemical determinations from the five treatments (control, M1, M2, C1 and C2) used in this study. The “x” and “y” axes are the PC1 and PC2 components respectively.

is the improvement in the salty taste that inoculated yeast produced and that most probably was due to the sodium includer characteristics of *D. hansenii*. However, no significant differences due to the dose or to the application (M or C treatments) were found.

In summary this study and many others previously reported highlight the difficulty of obtaining generalized and definitive conclusions on the effect of yeast inoculation on the sensory characteristics of fermented products. However, we can conclude a better consumer acceptance in pork loin samples inoculated with Lr1 strain.

3.6. Correlation analysis of samples and physicochemical characteristics

To establish the relationships among the five treatments (control, M1, M2, C1 and C2) used in this study and the different physico-chemical determinations we used Principal Component Analysis (PCA) (Fig. 2). The Principal Component Analysis showed that 71.19% of the variability was explained. The most important variable was PC1 which explained 55.40% while PC2 accounted for 15.79% of the variability. The five samples/treatments were clearly separated in the representation indicating that they were different. M treatments (M1 and M2) were located on the negative side of PC1 component while control and C treatments (C1 and C2) appeared on the positive side. Moreover, lauric, myristic and palmitic acids were closely related to treatment M2 and ethanol correlated to M1. The representation also shows a big distance between acetaldehyde and C1 but close correlation between this treatment and stearic acid or methyl acetate.

4. Conclusions

This is the first study reporting the effects of the inoculation of Iberian cured pork loins with a selected terroir yeast strain (Lr1). Our research provides valuable information in relation to changes in physico-chemical characteristics of the final product and consumers acceptance dependent on yeast inoculation. In summary, inoculation with a selected yeast strain produced a general decrease in aldehydes and increase in esters and alcohols. Finally, this study opens possibilities for improved industrial productions since a tendency to a better consumer acceptability was observed when twice yeast amounts were used to inoculate the loins which may be linked to a higher Aw and pH and lower amount of Na⁺ in those treatments (M2 and C2) at the end of the ripening process.

Declaration of interest

The authors guarantee that no competing interest exists.

Acknowledgements

Research was supported by XX and XXI Plan Propio de Investigación to José Ramos (Universidad de Córdoba). We thank Bibiano López (Navalpedroche S.L.) for supplying the meat samples and Dr. Hortensia Galán for useful and critical comments. The fatty acids and aroma compounds analyses were carried out in the UCO-SCAI (Universidad de Córdoba).

References

- Almagro, A., Prista, C., Castro, S., Quintas, C., Madeira-Lopes, A., Ramos, J., & Loureiro-Dias, M. C. (2000). Effects of salt on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *56*, 191–197.
- Andrade, M. A., Córdoba, J. J., Casado, E. M., Córdoba, M. G., & Rodríguez, M. (2010). Effect of selected strains of *Debaryomyces hansenii* on the volatile compound production of dry fermented sausage "salchichón". *Meat Science*, *85*, 256–264.
- Berry, J. F., Bovis, M., & Logothetis, J. (1965). Determination of the fatty acid composition of cerebrospinal fluid by gas-liquid chromatography. *Neurology*, *15*, 1089–1094.
- BOE (2014). *Boletín Oficial del Estado. Norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico*. (N° 10, January 11).
- Bonaiti, C., Leclercq-Perlat, M. N., Latrille, E., & Corrieu, G. (2004). Deacidification by *Debaryomyces hansenii* of smear soft cheeses ripened under controlled conditions: Relative humidity and temperature influences. *Journal of Dairy Science*, *87*, 3976–3988.
- Breuer, U., & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii*—an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, *23*, 415–437.
- Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren, A., & Gunde-Cimerman, N. (2005). Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*, *244*, 229–234.
- Cano-García, L., Belloch, C., & Flores, M. (2014). Impact of *Debaryomyces hansenii* strains inoculation on the quality of slow dry-cured fermented sausages. *Meat Science*, *96*, 1469–1477.
- Cano-García, L., Rivera-Jiménez, S., Belloch, C., & Flores, M. (2014). Generation of aroma compounds in a fermented sausage meat model system by *Debaryomyces hansenii* strains. *Food Chemistry*, *151*, 364–373.
- Cholet, O., Hénaut, A., Casaregola, S., & Bonnarme, P. (2007). Gene expression and biochemical analysis of cheese-ripening yeasts: Focus on catabolism of L-methionine, lactate, and lactose. *Applied Environmental Microbiology*, *73*, 2561–2570.
- Corral, S., Belloch, C., López-Díez, J. J., & Flores, M. (2018). Lipolysis and aroma generation as mechanisms involved in masking boar taint in sodium reduced fermented sausages inoculated with *Debaryomyces hansenii* yeast. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *98*, 2121–2130.
- Corral, S., Belloch, C., López-Díez, J. J., Salvador, A., & Flores, M. (2017). Yeast inoculation as a strategy to improve the physico-chemical and sensory properties of reduced salt fermented sausages produced with entire male fat. *Meat Science*, *123*, 1–7.
- Dalton, H. K., Board, R. G., & Davenport, R. R. (1984). The yeasts of British fresh sausage and minced beef. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *50*, 227–248.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., ... Souciet, J. L. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*, *430*, 35–44.
- Fadda, M. E., Mossa, V., Pisano, M. B., Deplano, M., & Cosentino, S. (2004). Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *95*, 51–59.
- Faticenti, F., Bergere, J. L., Deiana, P., & Farris, G. A. (1983). Antagonistic activity of *Debaryomyces hansenii* towards *Clostridium tyrobutyricum* and *Cl. butyricum*. *Journal of Dairy Research*, *50*, 449–457.
- Flores, M., Durá, M. A., Marco, A., & Toldrá, F. (2004). Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages. *Meat Science*, *68*, 439–446.
- Gori, K., Sørensen, L. M., Petersen, M. A., Jespersen, L., & Arneborg, N. (2012). *Debaryomyces hansenii* strains differ in their production of flavor compounds in a cheese-surface model. *MicrobiologyOpen*, *1*, 61–68.
- Gunde-Cimerman, N., Ramos, J., & Plemenitas, A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research*, *113*, 1231–1241.
- Herrera, R., Salazar, A., Ramos-Moreno, L., Ruiz-Roldán, C., & Ramos, J. (2017). Vacuolar control of subcellular cation distribution is a key parameter in the adaptation of *Debaryomyces hansenii* to high salt concentrations. *Fungal Genetics and Biology*, *100*, 52–60.
- Iucci, G., Infante, G., Rossi, L., Polzonetti, G., Rosato, N., Avigliano, L., ... Palacios, A. C. (2004). Albumin-containing sol-gel glasses: Chemical and biological study. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, *15*, 601–606.
- Kovats, E. S. (1965). Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. In J. C. Giddings, & R. A. Keller (Eds.). *Advances in chromatography* (pp. 229–247). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Kumura, H., Takagaki, K., Sone, T., Tsukahara, M., Tanaka, T., & Shimazaki, K. (2002). Casein digestion by *Debaryomyces hansenii* isolated from cheese. *Biochemistry, Biotechnology and Biochemistry*, *66*, 1370–1373.
- López Del Castillo-Lozano, M., Delile, A., Spinnler, H. E., Bonnarme, P., & Landaud, S. (2007). Comparison of volatile Sulphur compound production by cheese-ripening yeasts from methionine and methionine-cysteine mixtures. *Applied Microbiology Biotechnology*, *75*, 1447–1454.
- Martínez, J. L., Sychrova, H., & Ramos, J. (2011). Monovalent cations regulate expression and activity of the Hsk1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Genetics and Biology*, *48*, 177–184.
- Molimard, P., & Spinnler, H. E. (1996). Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties. *Journal of Dairy Science*, *79*, 169–184.
- Mounier, J., Goerges, S., Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., ... Cogan, T. M. (2006). Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology*, *101*, 668–681.
- Olesen, P. T., & Stahnke, L. H. (2000). The influence of *Debaryomyces hansenii* and *Candida utilis* on the aroma formation in garlic spiced fermented sausages and model minces. *Meat Science*, *56*, 357–368.
- Olivares, A., Navarro, J. L., & Flores, M. (2011). Effect of fat content on aroma generation during processing of dry fermented sausages. *Meat Science*, *87*, 264–273.
- Prista, C., Almagro, A., Loureiro-Dias, M. C., & Ramos, J. (1997). Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*, 4005–4009.
- Prista, C., Loureiro-Dias, M. C., Montiel, V., García, R., & Ramos, J. (2005). Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, *5*, 693–701.
- Prista, C., Michán, C., Miranda, I. M., & Ramos, J. (2016). The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast*, *33*, 523–533.
- Ramos, J., Haro, R., & Rodríguez-Navarro, A. (1990). Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1029*, 211–217.
- Ramos, J., Melerio, Y., Ramos-Moreno, L., Michán, C., & Cabezas, L. (2017). *Debaryomyces hansenii* strains from Valle de los Pedroches Iberian dry meat products: Isolation, identification, characterization, and selection for starter cultures. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*, 1576–1585.
- Seiler, H., & Busse, M. (1990). The yeasts of cheese brines. *International Journal of Food Microbiology*, *11*, 289–303.
- Selgas, M. D., Ros, J., & García, M. L. (2003). Effect of selected yeast strains on the sensory properties of dry fermented sausages. *European Food Research and Technology*, *217*, 475–480.

