



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**“El gen *ENO1* de *C. albicans* codifica una transglutaminasa implicada en el
crecimiento, división celular, morfogénesis y protección osmótica”**

Tesis que presenta

M. en C. Elizabeth Reyna Beltrán

Para obtener el Grado de Doctor en Ciencias

En la Especialidad de

Biología Celular

Director de la Tesis: Dr. Juan Pedro Luna Arias

Ciudad de México

AGOSTO 2018

Agradecimientos

Al Dr. Juan Pedro Luna Arias, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo durante el desarrollo de proyecto de doctorado, por darme la libertad de crecer profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (Conacyt) por la beca de doctorado otorgada.

A los integrantes del comité de evaluación del presente trabajo, por todas las aportaciones realizadas.

Al Dr. Salvador Mormeneo Bernat y la Dra. María Iranzo Rodenas por permitirme ser parte de su grupo de trabajo durante mi estancia en la Universidad de Valencia, por todas las aportaciones realizadas a mi trabajo de doctorado, por que sin duda fueron pieza clave en el desarrollo de este proyecto.

A la Bióloga María Luisa Labra Barrios por su apoyo en el desarrollo experimental de este proyecto de investigación, porque sin su ayuda no habría sido posible obtener tan magnífico trabajo de doctorado.

A la QFB. Sirenia González Pozos por su invaluable participación en la obtención de los resultados por microscopía electrónica y de barrido.

Al M. en C. Víctor Hugo Rosales García por su asesoría en el manejo del citómetro de flujo.

A la QFB. Mónica Edith Mondragón Castelán por su colaboración en la realización de la inmunoelectron microscopía.

Al M. en C. Emmanuel Ríos Castro por su colaboración en los análisis por espectrometría de masas en el Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE) en Cinvestav-IPN.

A mis padres Maria Elena Beltrán y Alejandro Reyna, y a mi hermana Patricia Reyna, por estar conmigo siempre, por ser mi apoyo incondicional.

A mis grandes amigos, Fernando Pereyra, Alejandra Tavera, Refugio Contreras, Erika Angeles, Ravi Kumar, César Bazán, Jenny, Erick Daniel, German y Roberto Cardenas. Y muy especialmente a mi gran amiga Karla Calderón por estar conmigo en las buenas y en las malas, por su ayuda en el laboratorio y por todos los momentos divertido que pasamos.

A mi novio Irandi Gutierrez, por todo su cariño y apoyo, por todos los consejos profesionales, y por estar conmigo siempre.

Y a mis compañeros de trabajo.

	Página
Índice general	1 y 2
Resumen	6
Abstract	7
Abreviaturas	8
Índice de figuras y tablas	3-5
1. Introducción	9-23
1.1 Composición y propiedades de la pared celular	10
1.1.1 Quitina	11
1.1.2 β -1, 3- glucano	11
1.1.3 β -1,6- glucano	12
1.1.4 Proteínas de la pared celular	12-14
1.1.5 Otras proteínas en pared celular	14-17
1.1.6 Transglutaminasas	17-21
1.1.7 Importancia fisiológica de la autofagia	21-23
2. Justificación	24
3. Hipótesis	24
4. Objetivo general	25
5. Objetivos específicos	25
6. Materiales y métodos	26-39
6.1 Cepas de <i>Candida albicans</i> y condiciones cultivo	26
6.2 Vectores de clonación	26
6.3 Inducción de miceliación en <i>C. albicans</i>	29
6.4 Fraccionamiento de células de levadura	29
6.5 Determinación de la actividad enzimática de transglutaminasa	30
6.6 Determinación de la actividad enzimática de enolasa	30

6.7 Solubilización de la actividad de TGasa de paredes celulares de <i>C. albicans</i>	31
6.8 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	31-32
6.9 Tinción de quitina en células de <i>C. albicans</i> , y análisis por microscopía confocal	32
6.10 Cuantificación de quitina, manoproteínas y glucano por citometría de flujo	32-33
6.11 Determinación del contenido de glucano	33-34
6.12 Western blot	34-35
6.13 Identificación de la TGasa usando el inhibidor fluorescente monodansilcadaverina (MDC) de las TGasas	35
6.14 Expresión de la proteína recombinante Eno1, generación de anticuerpos policlonales anti-rCaEno1	35-37
6.15 Análisis bioinformático	37-38
6.16 Inmunolocalización de Eno1 en <i>C. albicans</i> por inmunoelectrón microscopía electrónica de transmisión (IEM)	38-39
7. Resultados	40-80
7.1 Efecto de la inhibición de la TGasa en el crecimiento y superficie celular de levaduras de <i>C. albicans</i> CAI4	40
7.2 La inhibición de la actividad de TGasa con cistamina no afecta la concentración de quitina, glucano y manoproteínas en la pared celular de levaduras de <i>C. albicans</i>	50
7.3 La actividad de TGasa es esencial en el proceso de transición de levadura a micelio en <i>C. albicans</i>	54
7.4 Identificación de la proteína con actividad de TGasa en las paredes celulares de <i>Candida albicans</i>	56
7.5 La enolasa de <i>C. albicans</i> tiene actividad de TGasa	64
7.6 Los inhibidores de la TGasa, cistamina y MDC afectan el proceso de miceliación de la cepa de <i>C. albicans</i> 26555	66
7.7 Caracterización de aceptores de la TGasa en la pared celular de <i>C. albicans</i>	68
7.8 Determinación del sitio catalítico putativo de TGasa en la Eno1 de <i>C. albicans</i>	72

7.9 Alineamiento de la CaEno1 con otras transglutaminasas	76
8. Discusión	81-88
9. Conclusiones	89
10. Perspectivas	90
11. Bibliografía	91-101

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de la pared celular de <i>Candida albicans</i>	10
Figura 2. Las Transglutaminasas catalizan la formación de enlaces covalentes entre proteínas	18
Figura 3. Macroautofagia	22
Figura 4. Secuencias completas de los vectores pJET 1.2/blunt y pCold II	28
Figura 5. Efecto de la inhibición de la actividad de TGasa en curvas de crecimiento de levaduras de <i>C. albicans</i>	41
Figura 6. Efecto en la inhibición de la actividad de TGasa en la superficie de <i>C. albicans</i>	43
Figura 7. Cambios en la ultraestructura de <i>C. albicans</i> por la inhibición de la actividad de TGasa	44
Figura 7 (continuación). Inhibición de la actividad de TGasa indujo cambios en el patrón de división en levaduras de <i>C. albicans</i>	45
Figura 8. Efectos en la ultraestructura de la pared celular en levaduras de <i>C. albicans</i> tratadas con cistamina (0, 50, 100 y 200 mM)	46
Figura 9. La inhibición de la actividad de TGasa por la cistamina incrementa la autofagia en levaduras de <i>C. albicans</i>	48

Figura 10. Aumento de la autofagia en respuesta a la inhibición de la actividad de TGasa en levaduras de <i>C. albicans</i>	49
Figura 11. Inhibición de la actividad de TGasa no afecta la concentración de los componentes de la pared celular (quitina, glucano y manoproteínas)	51
Figura 12. La inhibición de la actividad de la TGasa generó el aumento de la quitina en levaduras de mayor tamaño que las células control	52
Figura 13. La inhibición de la actividad de TGasa por la cistamina, no afecta los niveles de los componentes de la pared celular	53
Figura 14. La inhibición de la actividad de TGasa por la cistamina afecta la formación de la hifa	55
Figura 15. Determinación de la actividad de TGasa en fracciones celulares de <i>C. albicans</i>	56
Figura 16. Determinación de la actividad de TGasa en paredes celulares de <i>C. albicans</i> tratadas con zimoliasa y quitinasa, sujetas a solubilización con urea 8 M	57
Figura 17. Identificación de la proteína con actividad de TGasa	58
Figura 18. Clonación secuencial del gen <i>CaENO1</i> en los vectores pJET 1.2 y pCold II	60
Figura 19. Expresión e inmunodetección de la proteína rCaEno1	61
Figura 20. Identificación de la proteína recombinante enolasa 1 e de <i>C. albicans</i> (rCaEno1) por espectrometría de masas en tándem	62
Figura 21. Inmunolocalización de la proteína Eno1 en <i>C. albicans</i>	63
Figura 22. Determinación de las actividades de enolasa y transglutaminasa de la enzima rCaEno1	65
Figura 23. Efecto de la cistamina y MDC en la transición levadura a micelio de la cepa de <i>C. albicans</i> ATCC 26555	66-67

Figura 24. Clasificación de proteínas extraídas con SDS 2 % en el sistema de clasificación “Gene Ontology Panther”	69
Figura 25. Clasificación de proteínas extraídas con zimoliasa en el sistema de clasificación “Gene Ontology Panther”	70
Figura 26. Clasificación de proteínas extraídas con quitinasa en el sistema de clasificación “Gene Ontology Panther”	71
Figura 27. Alineamiento Clustal Omega de las secuencias de aminoácidos de la enolasa 1 de <i>C. albicans</i> y <i>S. cerevisiae</i> .	72
Figura 28. Comparación estructural de los modelos moleculares de las proteínas CaEno1 y ScEno1	74
Figura 29. Comparación del sitio catalítico de las proteínas CaEno1 y ScEno1 con el fosfoenolpiruvato/2-fosfoglicerato	75
Figura 30. Alineamiento en Clustal Omega de la secuencia de la Enol de <i>C. albicans</i> con las TGAsas de <i>Anopheles gambiae</i> (Ag), <i>Mus musculus</i> (Mm), <i>Gallus gallus</i> (Gg), <i>Apis mellifera</i> (Am) y <i>Homo sapiens</i> (Hs)	77-79
Figura 31. Identificación del sitio activo putativo de TGasa (verde) en la estructura de la CaEno1	80

Índice de tablas

Tabla 1. Vectores de clonación	27
Tabla 2. Proteínas identificadas en las bandas fluorescentes provenientes del gel mostrado en la Fig. 17A	59

Resumen

Candida albicans es un hongo oportunista que forma parte de la microbiota normal de tracto digestivo, membrana mucosa o piel en personas sanas. Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos, se convierte en un problema de salud grave, clasificándose como la principal infección fúngica en el mundo. Ya que los tratamientos existentes para esta infección son inespecíficos o están en riesgo de desarrollar resistencia, es necesario encontrar nuevos blancos terapéuticos. Algunos autores informaron la presencia de la actividad transglutaminasa en *Candida* y *Saccharomyces*, pero su identidad sigue siendo desconocida. En este trabajo presentamos los efectos fenotípicos producidos por la inhibición de la transglutaminasa usando cistamina, los cuales incluyen la inhibición del crecimiento de células de levadura, inducción de autofagia en respuesta al daño causado por la cistamina, alteración del patrón de división celular, cambios en la pared celular e inhibición de la transición levadura a micelio. Este último fenómeno también se observó en la cepa ATCC 26555 de *C. albicans*. La inhibición del crecimiento por cistamina se determinó en otras cepas de *Candida*, lo que demuestra la importancia de la transglutaminasa en estas especies. Finalmente, identificamos la enolasa 1 como la proteína de la pared celular responsable de la actividad de la TGasa. Después de estudiar la inhibición de las actividades enzimáticas con anticuerpos anti-CaEno1 y mediante estudios bioinformáticos, sugerimos que los sitios catalíticos de enolasa y transglutaminasa están localizados en diferentes dominios de la proteína. Los datos mencionados anteriormente indican que TGase / Eno1 es un objetivo putativo para diseñar nuevos fármacos para controlar la infección por *C. albicans*.

Abstract

Candida albicans is an opportunistic fungus, that is part of the normal microbiota of the digestive tract, mucous membrane or skin in healthy people. However, in immunocompromised patients, it becomes a serious health problem, classifying itself as the main fungal infection in the world. Since the existing treatments for this infection are nonspecific or at risk of developing resistance, it is necessary to find new therapeutic targets. Some authors reported the presence of transglutaminase activity in *Candida* and *Saccharomyces*, but their identity remains unknown. In this work we present the phenotypic effects produced by the inhibition of transglutaminase using cystamine, which include the inhibition of the growth of yeast cells, induction of autophagy in response to the damage caused by cystamine, alteration of the cell division pattern, changes in the cell wall and inhibition of the yeast to mycelium transition. This latter phenomenon was also observed in strain ATCC 26555 of *C. albicans*. The inhibition of growth by cystamine was also determined in other strains of *Candida*, which demonstrates the importance of transglutaminase in these species. Finally, we identified enolase 1 as the cell wall protein responsible for TGase activity. After studying the inhibition of enzymatic activities with anti-CaEno1 antibodies and by bioinformatic studies, we suggest that the catalytic sites of enolase and transglutaminase are located in different domains of the protein. The data mentioned above indicate that TGase / Eno1 is a putative target to design new drugs to control *C. albicans* infection.

Abreviaturas

Eno1	Enolasa 1
rCaEno1	Enolasa recombinante de <i>C. albicans</i>
MDC	Monodansilcadaverina
Cist	Cistamina
DO	Densidad óptica
AutoFL	Autofluorescencia
CW	Pared celular
FMM	Fracción mixta de membrana
S-35K	Fracción soluble
SN	Sobrenadante
H	horas
kDa	Kilo Dalton
M	Molar
IEM	Inmunoelectrón microscopía electrónica
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
Min	Minutos
ml	Mililitros
mM	milimolar
Nm	nanogramos
IMAC	cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizada
ET	Extracto total
SDS	Dodecil sulfato de Sodio
MPM	Marcador de peso molecular
U	Unidades
Volts	voltios
µl	Microlitros
µg	microgramos
YPD	Extracto de levadura-peptona- glucosa

1.INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas causan más de 1.3 millones de muertes en el mundo, principalmente en individuos inmunocomprometidos con dos o más condiciones patológicas (Brown et al., 2012; Calderone et al., 2014). Aunque existen más de 150 especies de *Candida*, aproximadamente 20 son conocidas por causar infecciones en seres humanos; *Candida albicans* es el agente más frecuente causante de candidiasis o candidosis, la cual es la principal infección por hongos ((CDC), 2013; Sardi, Scorzoni, Bernardi, Fusco-Almeida, & Mendes Giannini, 2013). Este organismo oportunista es un hongo comensal que puede ser aislado de mucosa normal o microflora cutánea de individuos sanos (Calderone et al., 2014). Sin embargo, cuando los pacientes reciben tratamientos prolongados con antibióticos, quimioterapia, fármacos inmunosupresores o están en unidades quirúrgicas de cuidados intensivos, cambia de levadura comensal a patógeno causante de candidiasis invasiva ((CDC), 2013; Morgan et al., 2005; Poulain, 2015; Sardi et al., 2013).

C. albicans es caracterizada por una compleja interacción con el hospedero, mediada por la expresión de factores de virulencia fúngicos que resulta en adherencia, invasión, y daño celular (Hofs, Mogavero, & Hube, 2016). La pared celular fúngica es la principal estructura que tiene contacto con el hospedero y es esencial para la integridad celular. Ésta protege a las células en condiciones de estrés ambiental, incluyendo deshidratación, cambios osmóticos, respuesta inmune o el ataque por otros organismos (Chaffin, 2008; Free, 2013; Munro, 2013; Ruiz-Herrera, Elorza, Valentin, & Sentandreu, 2006). Además, tiene un papel en adhesión a células del hospedero a través de adhesinas, así como una comunicación, la cual se conoce como el “código glucano”. De esta interacción resultará el desarrollo de un estado patogénico o la producción de una reacción de resistencia por el hospedero (Poulain & Jouault, 2004). La pared celular de *C. albicans* es una estructura hecha por disposiciones ordenadas de sus diferentes componentes. Algunos están unidos por enlaces covalentes y otros son retenidos por puentes de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas (Horisberger & Clerc, 1988).

1.1 Composición y propiedades de la pared celular

La pared celular de hongos está organizada en dos secciones fundamentales: una pared interna y una externa, las cuales varían con el morfotipo, el estado de crecimiento y especie del hongo. Adicionalmente y dependiendo del método de análisis, la pared celular de *C. albicans* puede contener de cuatro a ocho capas (Poulain, Tronchin, Dubremetz, & Biguet, 1978). Esta estructura está compuesta principalmente de glucano (60%), manoproteínas (40%) y una pequeña cantidad de quitina (1-2%) (Orlean, 1997) (Fig. 1). Sin embargo, la quitina en levaduras puede incrementar de tres a cuatro veces en condiciones que afecten a la pared celular, como en la inhibición de la síntesis del β -1,3-glucano mediado por caspofungina (Walker et al., 2008).

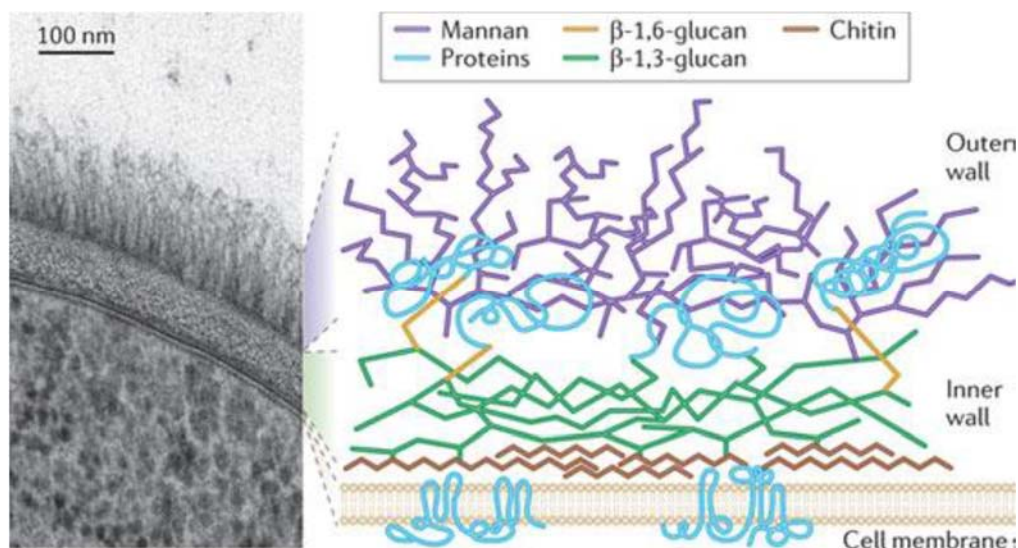


Figura 1. Estructura de la pared celular de *Candida albicans*. La pared externa es enriquecida con polímeros de *O*- y *N*-manosa, unidos covalentemente a proteínas para formar glicoproteínas; la pared interna contiene un esqueleto de polisacáridos, el β -1,3-glucano y la quitina, el cual le confieren forma y rigidez a la célula. Las proteínas de la pared externa están unidas a la estructura de la pared interna por un remanente GPI que a su vez se une al β -1,6-glucano (Gow, van de Veerdonk, Brown, & Netea, 2011).

1.1.1 Quitina

La quitina es un polímero lineal de moléculas de N-acetilglucosamina con enlaces β -1,4 que forma microfibrillas estabilizadas a través de puentes de hidrógeno. Representa del 1 al 2% del peso seco de la pared celular (Klis, 1994; Klis, Mol, Hellingwerf, & Brul, 2002); alrededor de un 50% de las cadenas de quitina se encuentran unidas a los extremos no reductores del β -1,3- y β -1,6-glucano a través de enlaces β -1,4 (Kollar, Petrakova, Ashwell, Robbins, & Cabib, 1995). En la síntesis de la quitina participan varias quitina sintasas, codificadas por los genes *CHS* (Cabib, Roh, Schmidt, Crotti, & Varma, 2001; Latge, 2007; Lesage & Bussey, 2006; Lesage et al., 2005). Las quitina sintasas más estudiadas (Chs1p, Chs2p y Chs3p), presentan la misma actividad polimerizante, aunque depositan la quitina en diferentes localizaciones celulares y en distintos momentos del ciclo celular (Bulik et al., 2003).

1.1.2 β -1, 3-glucano

El β -1,3-glucano es el principal componente estructural de la pared celular y está formado por monómeros de glucosa unidos por enlaces β -1,3. Junto con la quitina, el glucano es responsable de la rigidez que presenta esta estructura (Kapteyn et al., 1999; Kollar et al., 1995; Kollar et al., 1997). En la síntesis del β -1,3-glucano participa la β -1,3-glucano sintasa, un complejo enzimático que comprende dos subunidades: una proteína transmembranal, correspondiente al dominio catalítico, y una proteína citosólica encargada de regular el complejo sintasa (Adams, 2004; Lesage & Bussey, 2006). Los genes que codifican la glucano sintasa en *C. albicans*, homólogos de los genes de la glucano sintasa *FKS1* de *S. cerevisiae*, son *CaGSC1*, *CaGSL1* y *CaGSL2* (Mio et al., 1997). Los autores describen que, durante el crecimiento, sólo *CaGSC1* y *CaGSL2* se expresan, pero la actividad *in vivo* es principalmente debida a Gsc1p, identificado como el blanco de los inhibidores de la glucano sintasa (Douglas et al., 1997).

1.1.3 β -1,6-glucano

El β -1,6- glucano es un polímero altamente ramificado que contiene aproximadamente 140 residuos de glucosa (Manners, Masson, & Patterson, 1973). Es un componente esencial en la pared celular puesto que sirve de receptor para la quitina y, además, es el encargado de actuar como conector entre las proteínas de la pared celular que se unen a través de un residuo GPI y el β -1,3-glucano (Fujii, Shimoi, & Iimura, 1999; Klis et al., 2002). La síntesis del β -1,6-glucano puede ocurrir en la superficie celular. Los 10 genes identificados por estar involucrados en la síntesis de este polisacárido son *KRE1*, *KRE5*, *KRE6*, *KRE9*, *KRE11*, *CNE1*, *CWH41/GLS1*, *KNH1*, *ROT2/GLS2* y *SKN1* (Shahinian & Bussey, 2000). La localización de las proteínas codificadas por estos genes y su putativa función son parcialmente conocidas. Solo Kre1p, una proteína GPI, es localizada en la membrana plasmática, en donde Kre9p y Knh1p son proteínas extracelulares solubles. Por otro lado, algunas de las proteínas que han sido localizadas intracelularmente, como la proteína Kre11p que está localizada en el citoplasma; Kre5p, Cwh4p1, Cne1p, y Rot2p están localizadas en el retículo endoplásmico, mientras que Kre6p y Skn1p lo están en el aparato de Golgi. Las mutaciones en alguno de estos genes llevan a la reducción en los niveles de β -1, 6-glucano, siendo algunas de ellas letales. Interesantemente, la mutación en *KRE9* de *C. albicans* fue letal en un medio con glucosa, en donde las mutantes fueron capaces de formar micelio en un medio con suero, el cual es un método común para la inducción de formación de filamentos en *C. albicans* (Lussier, Sdicu, Shahinian, & Bussey, 1998).

1.1.4 Proteínas de la pared celular

Concentradas en la capa más externa de la pared celular aparecen una serie de proteínas altamente glicosiladas que reciben el nombre genérico de manoproteínas. Generalmente, los residuos de serina y treonina, que pueden llevar unidas cadenas cortas de manosa, suelen encontrarse agrupados, por lo que estas proteínas adoptan una conformación alargada similar a la de una varilla rígida (Jentoft, 1990). La presencia de largas cadenas laterales de carbohidratos unidas a residuos de asparagina en las manoproteínas (Orlean, 1997), así como

la presencia de numerosos enlaces disulfuro, determinan dos principales propiedades de la superficie celular: permeabilidad de la pared celular y carga de la superficie celular (Cutler, 2001; Fradin et al., 2008; Horisberger & Clerc, 1988).

Las proteínas de la pared celular cumplen diversas funciones: intervienen en la síntesis de la pared celular (Cabib, Blanco, Grau, Rodriguez-Pena, & Arroyo, 2007), median fenómenos de adhesión, como la aglutinación sexual y la floculación (Dranginis, Rauceo, Coronado, & Lipke, 2007; Lipke & Kurjan, 1992), participan en la invasividad (Verstrepen, Derdelinckx, Verachtert, & Delvaux, 2003) y facilitan la captación de hierro (Protchenko et al., 2001). Un considerable número de proteínas de la pared celular tiene actividad de glicosilasas y transglicosilasas (Cantarel et al., 2009; de Groot et al., 2004). Esto plantea la cuestión de si estas proteínas son parte de la cubierta externa estando lejos de su sustrato, o podrían ser localizadas en otra parte de la pared (Hiller, Heine, Brunner, & Rupp, 2007; Norice, Smith, Solis, Filler, & Mitchell, 2007).

Las proteínas de la pared celular pueden unirse al entramado del β -1,3-glucano de diferentes maneras (Klis, Boorsma, & De Groot, 2006; Klis et al., 2002). En células cultivadas en medio rico, el complejo proteína GPI- β -1,6-glucano- β -1,3-glucano es el más abundante. Este complejo consiste de proteínas GPI unidas covalentemente, a través del remanente GPI, al extremo no reductor del β -1,6-glucano que a su vez está unido al extremo no reductor de una cadena de β -1,3-glucano (Fujii et al., 1999; Kapteyn et al., 1999; Kollar et al., 1997). Otro tipo de unión entre proteínas y polisacáridos relativamente abundante, implica la unión directa entre una proteína de la familia Pir y el β -1,3-glucano, a través de un enlace sensible a álcali (Ecker, Deutzmann, Lehle, Mrsa, & Tanner, 2006; Mrsa & Tanner, 1999). Algunas proteínas GPI pueden estar unidas directamente al β -1,3-glucano a través de un enlace sensible a álcali, presumiblemente de una forma similar a las proteínas Pir (Kapteyn et al., 2001), por lo que ciertas proteínas GPI podrían estar unidas simultáneamente al β -1,6-glucano, a su vez unido al β -1,3-glucano, a través del remanente GPI, y directamente al β -1,3-glucano. Finalmente, se ha identificado un último tipo de complejo formado por una proteína GPI unida a una molécula del β -1,6-glucano, a su vez unida directamente a la quitina

(Kapteyn et al., 2000; Kapteyn, Montijn, Dijkgraaf, & Klis, 1994; Kapteyn, Montijn, Dijkgraaf, Van den Ende, & Klis, 1995; Surarit, Gopal, & Shepherd, 1988).

Existen dos clases de proteínas en pared celular (CWP) unidas covalentemente, CWP dependientes de GPI y CWP-Pir (Chaffin, 2008; Free, 2013; Ruiz-Herrera et al., 2006), las cuales pueden ser extraídas al incubar las paredes celulares en álcali (enlaces sensibles a álcali, “ASL, por sus siglas en inglés”). La proteína ScCwp2 de *S. cerevisiae* (ScCwp2) es una pequeña proteína GPI de pared, la cual contiene un repetido Pir involucrado en el enlace de ScCwp2 al β -1,3-glucano, con lo cual aumenta la integridad de la pared celular (Chaffin, 2008; Ecker et al., 2006). Hay otras proteínas que pierden homología con las proteínas Pir, designadas proteínas de pared celular de enlace álcali-sensible (ASL-CWPs), que son covalentemente unidas por enlaces químicos sensibles a medio álcali a las paredes celulares de *C. albicans* y *S. cerevisiae* (Chaffin, 2008; Ecker et al., 2006; Ruiz-Herrera et al., 2006). Adicionalmente, otras proteínas son unidas a las CWPs a través de enlaces disulfuro (Lesage & Bussey, 2006).

La interconexión de los diferentes componentes de la pared celular, debe producirse necesariamente en el exterior de la membrana plasmática, puesto que la síntesis de β -1,3-glucano y quitina ocurre en la membrana plasmática (Cabib, Roberts, & Bowers, 1982; Shematek, Braatz, & Cabib, 1980).

1.1.5 Otras proteínas en pared celular

Se han identificado proteínas de *C. albicans* en la pared celular y en el medio extracelular que pierden el péptido señal, para las cuales se ha propuesto una vía secretoria no convencional (Angiolella et al., 1996; Gil-Navarro et al., 1997; Nombela, Gil, & Chaffin, 2006; Sorgo et al., 2010; Urban, Sohn, Lottspeich, Brunner, & Rupp, 2003). Algunas de estas proteínas son enzimas glucolíticas, que desempeñan diferentes funciones dentro y fuera de la célula (Tristan, Shahani, Sedlak, & Sawa, 2011). Por ejemplo, la enolasa extracelular, es un factor de virulencia en *Candida albicans* y algunos parásitos (Avilan et al., 2011; Jong et al., 2003). Dicha proteína ha sido encontrada en la pared celular (Edwards, Braley, & Chaffin,

1999) y en pequeñas vesículas fuera de la célula (Oliveira, Freire-de-Lima, et al., 2010; Oliveira, Nakayasu, et al., 2010). En la pared celular no presenta actividad enzimática de enolasa y se une al plasminógeno, con lo cual promueve la invasión por el patógeno (Swenerton et al., 2011). La enolasa también ha sido encontrada en partículas virales (Bechtel, Winant, & Ganem, 2005; Chertova et al., 2006; Shaw, Stone, Colangelo, Gulcicek, & Palese, 2008) y es requerida para la transcripción del virus Sendai (Ogino, Yamadera, Nonaka, Imajoh-Ohmi, & Mizumoto, 2001). Por lo tanto, la enolasa es un blanco terapéutico en muchas enfermedades, incluyendo candidiasis (Ogino et al., 2001; van Deventer, Goessens, van Vliet, & Verbrugh, 1996). Otra enzima glucolítica extracelular es la fosfoglucosa isomerasa, la cual favorece la movilidad de células tumorales, se comporta como una citocina (Torimura et al., 2001) y no posee actividad enzimática fuera de la célula (Tsumumi et al., 2003). La vía secretoria de las enzimas glucolíticas, tales como la enolasa y la fosfoglucosa isomerasa, falta por ser caracterizada. Esta vía parece ser no convencional, ya que las enzimas glucolíticas no tienen señal de secreción. Recientemente, Duran y colaboradores identificaron una nueva vía secretora no convencional de la proteína Acb1 (Duran, Anjard, Stefan, Loomis, & Malhotra, 2010). Miura y col., mostraron que la proteína Eno2 de *S. cerevisiae* no posee una secuencia señal de secreción, puesto que las proteínas Eno2p y Pgi1p (proteína control) fueron secretadas en una mutante *sec23-1* a 37 °C. Estos datos proporcionan evidencia de que la secreción de enzimas glucolíticas, al menos Eno2p y Pgi1p, es independiente de la vía secretora convencional. Análisis de mutantes por delección muestran que el *knock-in* del gen *TLG2* (gen que codifica SNARE) inhibe la secreción de la enolasa. Sin embargo, otras proteínas podrían estar involucradas, ya que la inhibición no es completa.

Resultados obtenidos por espectrometría de masas de las paredes celulares de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* expuestas a diferentes concentraciones de H₂O₂, permitió la identificación de proteínas de la pared conocidas como multifuncionales o “moonlighting”, las cuales son: (i) enzimas glucolíticas, (ii) de choque térmico, (iii) proteínas de respuesta al estrés oxidativo, (iv) enzimas metabólicas generales, y proteínas altamente conservadas, siendo sobre o subexpresadas en presencia o ausencia de especies reactivas de oxígeno (ROS). Algunas de las enzimas glucolíticas identificadas fueron la trifosfato

isomerasa (Tpi1), gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (Gapdh), fructosa bifosfato aldolasa (Fba1), fosfoglicerato cinasa (Pgk), fosfoglicerato mutasa (Gpm1), piruvato cinasa (Pk) y la enolasa 1 (Eno1) (Serrano-Fujarte, Lopez-Romero, & Cuellar-Cruz, 2016).

En *Candida albicans*, la enolasa comprende aproximadamente el 0.7% del total de las proteínas en la levadura y el 2% de las proteínas en la hifa (Sundstrom & Aliaga, 1994). La enolasa es la enzima responsable de la conversión del D-2-fosfoglicerato (2-PGA) y el fosfoenolpiruvato (PEP) en glucólisis y gluconeogénesis, respectivamente (Pancholi, 2001). La enolasa es una proteína altamente conservada en los dominios Archaea, Bacteria y Eucarya, con propiedades catalíticas similares en organismos divergentes.

La enolasa es una de las proteínas citosólicas más abundantes en diferentes microorganismos (Holland & Holland, 1978) y está considerada una proteína multifuncional. Por ejemplo, en *Saccharomyces cerevisiae* la enolasa se comportó como una proteína de choque térmico involucrada en termotolerancia y control de crecimiento (Iida & Yahara, 1985), componente estructural del cristalino en aves, lampreas, peces y reptiles (Piatigorsky, 2003). Otros estudios demuestran que la enolasa puede mediar la adhesión por medio de la unión a proteínas de matriz extracelular, como la fibronectina y laminina, aunque los mecanismos aún no están bien caracterizados (Carneiro, Postol, Nomizo, Reis, & Brentani, 2004; Castaldo et al., 2009; Donofrio et al., 2009; Esgleas et al., 2008). La enolasa de *C. albicans* promueve una abundante respuesta inmune humoral en pacientes con candidiasis invasiva (Strockbine, Largen, Zweibel, & Buckley, 1984). También se encuentra en la superficie celular (Eroles, Sentandreu, Elorza, & Sentandreu, 1997), en asociación con el glucano de la pared celular (Angiolella et al., 1996). Aunque estudios previos indican que la enolasa de *C. albicans* es un antígeno inmunodominante, su función precisa en la patogénesis de *C. albicans* es desconocida (Angiolella et al., 1996).

La formación de enlaces covalentes en la pared celular fúngica permite la organización de este organelo (Sentandreu, Mormeneo, & Ruiz-Herrera, 1994; Wessels, 1986). Las evidencias muestran que una población definida de proteínas de alto peso molecular está covalentemente unida a la red de polisacáridos estructurales de la pared celular en diversos

hongos (Elorza, Murgui, & Sentandreu, 1985; Herrero, Valentín, & Sentandreu, 1985; Van Rinsum, Klis, & van den Ende, 1991). En sistemas animales, existe una actividad enzimática que cataliza la formación de enlaces covalentes entre proteínas a través de la interacción de los residuos glutamina y lisina. Esta enzima, **la glutaminil-péptido- γ -glutamilil transferasa, o glutamilil transferasa, o transglutaminasa (TGasa)**, cataliza una reacción que involucra un grupo γ carboxamida de una glutamina de un péptido y el grupo ϵ en el amino de la lisina de otro péptido. La formación de estas uniones interproteínas ha sido descrita en múltiples células animales, *Paramecium aurelia* y *Physarum polycephalum* y en procariontes como *Escherichia coli* (Folk, 1980; Loewy, 1984).

En 1995, Ruiz-Herrera y colaboradores demostraron la actividad enzimática de TGasa en *C. albicans* mediante la incorporación de putrescina marcada con [^{14}C] en fracciones celulares, encontrando una mayor actividad en la pared celular y una mínima actividad en citosol. La incorporación de putrescina fue inhibida por la cistamina, un inhibidor de las TGasas (Barsigian, Fellin, Jain, & Martinez, 1988; Lorand & Conrad, 1984). Un trabajo similar fue realizado en *S. cerevisiae* usando lisina [^{14}C] como precursor, donde un alto porcentaje de la radioactividad fue incorporado en la pared celular de este organismo, una mínima cantidad en el citosol, y en ambas fracciones la actividad fue inhibida por la cistamina, indicando que el proceso es mediado por la TGasa (Iranzo, Aguado, Pallotti, Canizares, & Mormeneo, 2002). En células animales las TGasas son dependientes de Ca^{2+} , el cual no es esencial para la actividad de TGasa en plantas y microorganismos (Aeschlimann & Paulsson, 1994). En ambos trabajos realizados en hongos, se demostró que el Ca^{2+} es esencial en la actividad de la TGasa (Iranzo et al., 2002; Ruiz-Herrera, Iranzo, Elorza, Sentandreu, and Mormeneo (1995)).

1.1.6 Transglutaminasas

Las transglutaminasas catalizan una reacción de transferencia de un grupo acilo dependiente de Ca^{2+} entre un grupo γ -carboxamida de la glutamina y el grupo ϵ -amino de la lisina, otra amina primaria, lo cual resulta en la formación de un enlace isopeptídico γ -glutamil- ϵ -lisina (Lorand & Conrad, 1984) (Fig. 2).

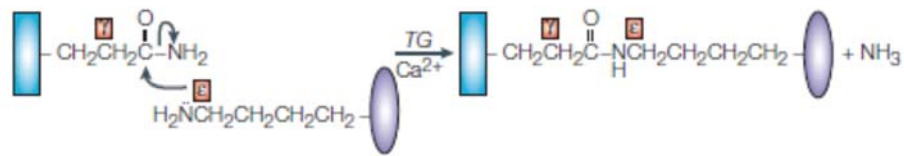


Figura 2. Las Transglutaminasas catalizan la formación de enlaces covalentes entre proteínas. La reacción de transamidación causa el entrecruzamiento proteico con la formación de un enlace isopeptídico Nε(γ-glutamilo) lisina entre un residuo donador lisina (Lys) de una proteína (elipse) y un residuo aceptor glutamina (Gln) de otra proteína (rectángulo) (Lorand & Graham, 2003).

Así, estas enzimas establecen entrecruzamiento inter o intramolecular en las proteínas. Las transglutaminasas animales poseen una tríada catalítica de aminoácidos: cisteína, histidina y ácido aspártico; la reacción transcurre con la formación de un intermediario unido a la cisteína nucleofílica en la enzima (Hettasch & Greenberg, 1994; Micanovic, Procyk, Lin, & Matsueda, 1994). Esta reacción es contraria a la reacción proteolítica catalizada por las tiolproteasas que poseen la misma tríada catalítica. La unión de los iones calcio en las TGAsas y la exposición de la cisteína del sitio activo son esenciales para la actividad enzimática. La cisteína del sitio activo reacciona con el grupo γ-carboxamida de la glutamina, formando un γ-glutamilo tioéster, con la liberación de amoníaco. El intermediario acil-enzima reacciona con alguna amina nucleofílica primaria, generando un enlace isopeptídico o un enlace (γ-glutamilo) poliamina. Cuando una amina no está disponible reacciona con el agua, formando un residuo de ácido glutámico (Folk, 1980; Folk & Finlayson, 1977).

Las transglutaminasas tienen una amplia especificidad por aminas primarias como aceptores (lisinas de un péptido o poliaminas) (Beninati & Folk, 1988; Folk & Finlayson, 1977). En contraste, pocas proteínas contienen residuos de glutamina que forma intermediarios acil-enzima. Esta capacidad es influenciada por la secuencia de aminoácidos (incluyendo carga) adyacentes a los residuos de glutamina susceptibles a estructura secundaria local que no está bien definida (Folk, 1980).

La desnaturalización o proteólisis de una proteína no reactiva, puede convertirla en un sustrato para la transglutaminasa (Folk & Finlayson, 1977). La estrecha alineación de la glutamina y una amina primaria sustrato puede promover la reacción de entrecruzamiento. Esta reacción es ilustrada por el acercamiento espontáneo de las moléculas de fibrina después de que la trombina corta el fibrinógeno, promoviendo la formación de enlaces isopeptídicos entre las cadenas γ , seguida de la formación de multímeros de cadenas α , la cual es mediada por el factor XIIIa. A pesar de la homología en las secuencias cercanas a la cisteína del sitio activo, las transglutaminasas exhiben distintos patrones de entrecruzamiento de los del fibrinógeno (Chung, 1972).

La resolución de la estructura cristalográfica de un precursor de la transglutaminasa, el factor de coagulación humana XIII (Yee et al., 1994), mostró que las transglutaminasas tienen un núcleo estructural como el de las tiolproteasas parecidas a la papaína. De acuerdo con esto, las transglutaminasas y las proteasas parecidas a la papaína han sido clasificadas en la misma superfamilia en la base de datos “Structural Classification of Proteins” (SCOP) (Hubbard, Ailey, Brenner, Murzin, & Chothia, 1999). Hasta la fecha, ocho tipos funcionales de transglutaminasas que difieren en términos de especificidad por sus proteínas blanco han sido caracterizadas en el ser humano (Lorand & Graham, 2003), las cuales están involucradas en una variedad de modificaciones proteicas y patologías (Muszbek, Adany, & Mikkola, 1996). Un homólogo inactivo de las transglutaminasas en humano, la proteína banda 4.2, no presenta actividad enzimática y tiene un papel estructural como componente del citoesqueleto en el eritrocito (Cohen, Dotimas, & Korsgren, 1993).

Durante los estudios de maestría determinamos la actividad enzimática de la TGasa en *C. albicans* CAI4, por incorporación de lisina [^{14}C] como un precursor, obteniendo que alrededor del 74% de la actividad se encuentra en pared celular, el 12% en la fracción mixta de membranas y muy interesantemente encontramos una actividad no antes reportada en la fracción soluble (fracción citosólica) correspondiente al 14% de la actividad total, la cual no

fue inhibida por la cistamina, sino que por el contrario aumentó un 36% , contrario a los hallazgos previos en *S. cerevisiae* y *C. albicans* (Iranzo et al., 2002; Ruiz-Herrera et al., 1995). Estos autores reportaron una actividad del 4% en citosol, la cual fue inhibida por la cistamina. Nosotros consideramos que la actividad de TGasa en la fracción soluble reportada en este trabajo podría tener propiedades diferentes a la que se encuentran en la pared celular y en la fracción mixta de membranas, o que la cistamina se inactiva por efecto de los sistemas REDOX propios de las levaduras, por ejemplo, que el puente disulfuro de la cistamina sea reducido por el glutatión (GSH), produciendo la molécula de cisteamina que pierde la capacidad inhibitoria sobre las TGasas (Jeon et al., 2004). Esto nos abre un nuevo panorama de investigación en el futuro, puesto que en sistemas animales se ha caracterizado ampliamente la TGasa 2, siendo predominantemente una proteína citoplasmática y multifuncional en diversos organelos. La actividad de TGasa es usualmente inhibida en el citoplasma debido a bajas concentraciones de calcio intracelulares y a altas concentraciones de GTP (Hatakeyama & Yoneyama, 1998; Horie & Irisawa, 1989). La TGasa 2 citoplásmica de mamífero tienen un dominio de unión a GTP; si este nucleótido trifosfato está unido a la enzima, entonces se comportan como proteínas G (Hatakeyama & Yoneyama, 1998; Horie & Irisawa, 1989).

El análisis de la cinética de crecimiento de *C. albicans* en diferentes concentraciones de cistamina (50, 100 y 200 mM) mostró que la formación de enlaces covalentes generados por la TGasa es esencial en la viabilidad de este hongo. Cuando comparamos nuestros resultados con los reportados por Iranzo et al. (2002) en *S. cerevisiae*, encontramos que *C. albicans* mostró mayor resistencia al tratamiento con altas concentraciones de cistamina (100 mM y 200 mM), porque en el caso de *Saccharomyces*, el crecimiento fue nulo en un tiempo de cultivo similar al nuestro. Esto podría deberse a diferencias en la composición de la pared celular de dichos hongos como ya ha sido reportado (Lommel & Strahl, 2009). Otra posibilidad es que la TGasa de *Saccharomyces* tenga mayor afinidad por la cistamina y que se inhiba a concentraciones más bajas de este inhibidor causando los daños ya reportados (Iranzo et al., 2002).

Los efectos causados en células levaduriformes de *Candida* que fueron cultivadas en presencia de concentraciones variables de cistamina, se analizaron por microscopía óptica. Encontramos que a mayor concentración de cistamina las células son esféricas y de mayor tamaño, perdiendo la protección osmótica proporcionada por la pared celular, cuando estas células fueron puestas en contacto directo con agua, esto indicó que la inhibición del crecimiento por la cistamina es debida en parte a la inhibición de la actividad de la TGasa en la pared celular, lo que disminuye la formación de enlaces covalentes entre las proteínas que proporcionan estabilidad y carga a la pared celular, lo cual podría afectar la capacidad de conferir protección osmótica a la célula. Sin embargo, estos resultados aún requieren de cuantificación.

El estrés generado en células levaduriformes por la inhibición de la actividad de TGasa a mayores concentraciones de cistamina, puede inducir el aumento de ciertos procesos celulares como la autofagia, el cual promueve la degradación y reciclamiento de componentes dañados permitiendo sobrellevar los daños generados en estas células.

1.1.7 Importancia fisiológica de la autofagia

La autofagia es considerada típicamente como un proceso degradativo que participa en el recambio de componentes citoplasmáticos (Mizushima & Klionsky, 2007). Una de las principales funciones de la autofagia es el reciclamiento durante inanición. Este parece ser especialmente importante en organismos inferiores, incluyendo hongos (Tsukada & Ohsumi, 1993). Por lo tanto, no es sorprendente que un sistema complejo como la autofagia permita a la célula mantenerse viable durante una baja en la cantidad de nutrientes. Los organelos pueden ser eliminados por autofagia no selectiva, pero también pueden ser dirigidos específicamente para degradación. Este tipo de autofagia organelo-selectiva puede ocurrir en respuesta a disfunción o daño del organelo, pero también puede ser el resultado de la adaptación celular a cambios en las condiciones nutricionales (Titorenko, Keizer, Harder, & Veenhuis, 1995; Tuttle, Lewin, & Dunn, 1993). Por otro lado, la autofagia puede implicar procesos biosintéticos. La vía citoplasma hacia vacuola (Cvt “cytoplasm to vacuole targeting”, por sus siglas en inglés) es usada para el transporte de hidrolasas residentes en la

vacuola (Lynch-Day & Klionsky, 2010). La maquinaria proteica usada en la vía Cvt y la morfología del proceso coincide con la macroautofagia selectiva (Baba, Osumi, Scott, Klionsky, & Ohsumi, 1997; Harding, Hefner-Gravink, Thumm, & Klionsky, 1996; Scott et al., 1996). La ejecución de la autofagia involucra un grupo de productos génicos conservados evolutivamente, conocidos como proteínas Atg, que son requeridas para la formación de la membrana aislante y el autofagosoma (referido aquí como “maquinaria autofágica”). El proceso de formación del autofagosoma involucra dos pasos principales: nucleación y elongación de la membrana aislante. El complejo cinasa ULK/Atg1, el complejo PI3-cinasa específico de autofagia, los efectores PI(3)P y proteínas relacionadas son importantes en el proceso de nucleación, donde los sistemas de conjugación Atg12 y LC3/Atg8 son importantes en el paso de elongación. Además, otras proteínas son requeridas para la fusión autofagosoma-lisosoma, acidificación, digestión lisosomal y señales regulatorias del medio ambiente involucradas en autofagia (He & Klionsky, 2009; Longatti & Tooze, 2009). En células de mamífero, muchas de las proteínas Atg se localizan en las membranas aislantes (por ejemplo, ULK1/2, Atg13, FIP200, Atg12, Atg16L1) pero no en autofagosomas completos (Longatti & Tooze, 2009) (Figure. 3).

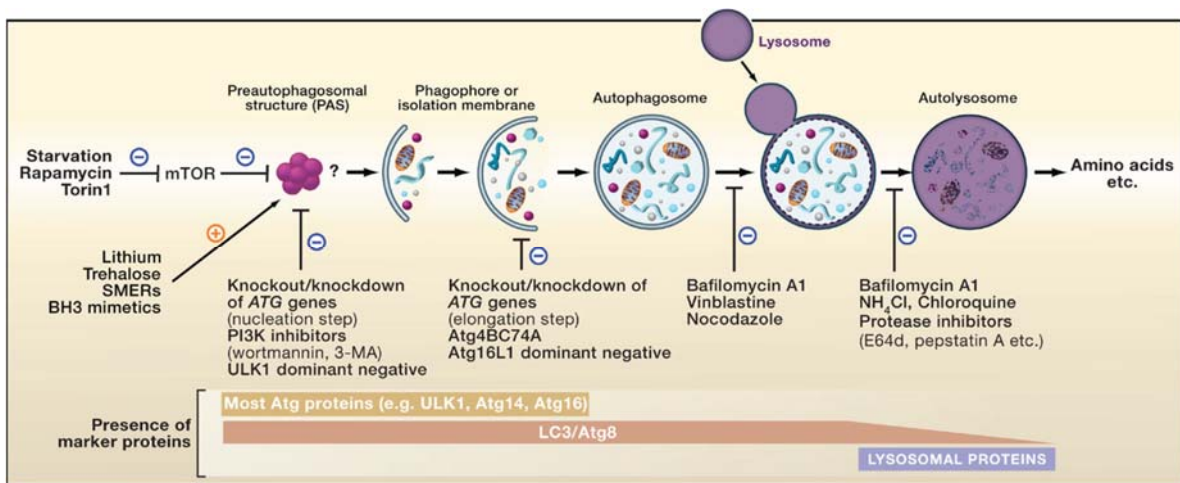


Figura 3. Macroautofagia. Una porción del citoplasma, incluyendo organelos, son envueltos por una membrana aislante o fagoforo. La membrana externa del autofagosoma gradualmente se fusiona con el lisosoma y el material interno es degradado en el autolisosoma. En levaduras, los autofagosomas son generados de la estructura preautofagosomal (PAS) el cual no ha sido identificado en células de mamífero. Las proteínas Atg que han sido identificadas en la membrana aislante incluyen: ULK1/2, Atg5, Beclina 1, LC3, Atg12, Atg13, Atg14, Atg16L1, FIP200 y Atg101 (Longatti & Tooze, 2009).

Hasta la fecha, sólo la cadena ligera 3 asociada a microtúbulos (LC3), un homólogo de mamífero de la proteína Atg8 en levadura, es conocido por existir en los autofagosomas; por lo tanto, esta proteína sirve como un marcador para autofagosomas (Fig. 3) (Kabeya et al., 2000; Mizushima, Yamamoto, Matsui, Yoshimori, & Ohsumi, 2004). La identificación de la maquinaria autofágica ha sido facilitada a través de pruebas bioquímicas y microscópicas basadas en LC3. La vía autofágica es también manipulada con agentes que regulan la formación del autofagosoma y los pasos de degradación subsecuentes (Fig. 3).

2. JUSTIFICACIÓN

Dado el aumento de infecciones causadas por *C. albicans* es necesario identificar nuevos blancos terapéuticos implicados en la síntesis de la pared celular como el principal organelo que tiene contacto con el hospedero y que protege a la célula en condiciones adversas, por lo cual es de nuestro interés determinar si la TGasa está participando en la organización y síntesis de dicho organelo.

3. HIPÓTESIS

La transglutaminasa participa en la organización y síntesis de la pared celular en *Candida albicans* y por tanto es esencial en diferentes procesos biológicos de la levadura.

4. OBJETIVO GENERAL

Identificar y evaluar el papel biológico de la proteína con actividad de TGasa en la pared celular de *C. albicans*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los efectos producidos por la inhibición de la TGasa en *C. albicans*.
2. Identificar a la proteína con actividad de TGasa de la pared celular de *C. albicans*.
3. Demostrar que la proteína identificada tiene actividad de TGasa.
4. Inmunolocalizar a la TGasa de *C. albicans*.
5. Identificar los sustratos endógenos de la TGasa de pared celular de *C. albicans*.
6. Identificar el posible dominio catalítico de la TGasa de *C. albicans*

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas de *Candida albicans* y condiciones de cultivo

Las cepas usadas en este proyecto fueron: *C. albicans* CAI4 (ura3/ura3 Δ) (Jong et al., 2003) y *C. albicans* ATCC 26555, las cuales fueron cultivadas en medio YPD líquido y sólido (1% extracto de levadura, 2% de bacto peptona, 2% de glucosa y 2% de agar en el caso de medio de cultivo sólido). Para el caso de la cepa de *C. albicans* CAI4, el medio de cultivo YPD fue suplementado con 25 μ g/mL de uridina.

Para estudiar los efectos de la cistamina en el crecimiento de *C. albicans* CAI4, las células fueron crecidas en medio YPD a 30 °C a 200 rpm en agitación durante 16 horas (h); a partir de este cultivo se tomaron muestras, las cuales fueron inoculadas en matraces Erlenmeyer de 250 mL para tener un volumen final de 100 mL de medio YPD conteniendo diferentes concentraciones de cistamina (0 mM, 50 mM, 100 mM y 200 mM), a una densidad óptica (DO) inicial de 0.1 a 600 nm. Cada hora (h) y hasta las 24 h se determinó la DO a 600 nm.

6.2 Vectores de clonación

Los vectores de clonación usados en este trabajo se indican en la Tabla 1 y los sitios de corte para endonucleasas en la figura 4.

Tabla 1. Vectores de clonación

Plásmido	Características	Referencia
pCold II	Basado en la expresión del gen a bajas temperaturas (gen de choque frío) de <i>E. coli</i> . Utiliza el promotor del gen <i>cspA</i> , el cual es un gen de choque frío, en la expresión de proteínas de interés.	Cold Shock Expression System pCold™ DNA Cat. #3360_3364 v1304Da TAKARA
pJET1.2 /blunt	Contiene un gen letal, el cual es bloqueado por ligación de un ADN inserto en el sitio de clonación. Promotor T7 para transcripción <i>in vitro</i> .	Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning

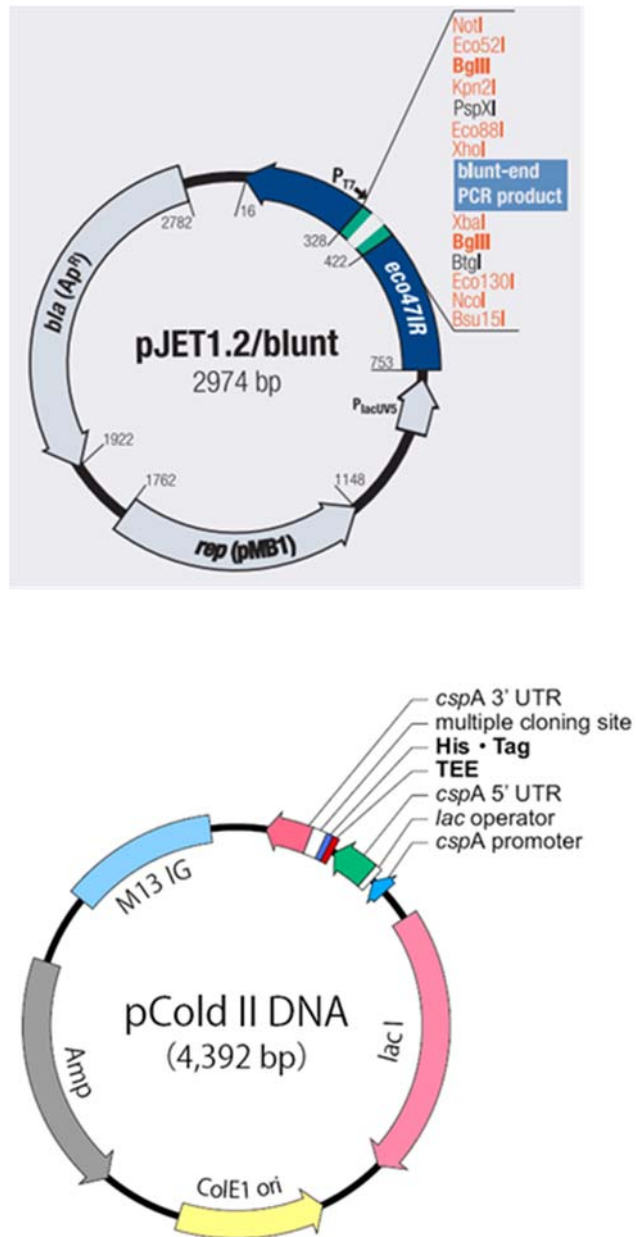


Figura 4. Secuencias completas de los vectores pJET 1.2/blunt y pCold II.

6.3 Inducción de miceliación en *C. albicans*

Células levaduriformes de *C. albicans*, fueron cultivadas en medio Lee (Iranzo et al., 2002; Ruiz-Herrera et al., 1995), suplementado con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de uridina (en el caso de la cepa CAI4), a 30 °C por 16 h en agitación a 200 rpm. Las células fueron cosechadas por centrifugación, lavadas dos veces con agua destilada y resuspendidas en una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (peso húmedo) en agua desionizada estéril y almacenadas por 48 h a 4 °C. Estas células fueron usadas para inocular medio Lee fresco a una $\text{DO}_{600\text{ nm}} = 0.2$ e incubadas con diferentes concentraciones de cistamina (0 mM, 50 mM, 100 mM y 200 mM) a 37 °C, 200 rpm por 4 h para inhibir el proceso de miceliación.

Otro inhibidor de la actividad de las transglutaminasas es la monodansilcadaverina (MDC), la cual fue usada en las condiciones antes mencionadas, a concentraciones de 0 mM, 1 mM y 2 mM a 37 °C, 200 rpm por 4 h. Finalmente las células fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido en los Laboratorios Nacionales de Servicios Experimentales (LaNSE) del Cinvestav-IPN.

6.4 Fraccionamiento de células de levadura

Los extractos celulares fueron obtenidos por rompimiento mecánico usando 4 g de perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro, BioSpec Products) por gramo de paquete celular en buffer A (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y pepstatina A 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por periodos de 30 s en un agitador de vortex, alternando con periodos de enfriamiento por 1 min en hielo, hasta que las células estuvieron completamente rotas por observación al microscopio óptico. Los extractos celulares fueron centrifugados a $1,200 \times g$ a 4 °C en una centrifuga Eppendorf, y las paredes sedimentadas fueron lavadas dos veces en un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4, dos veces en NaCl 2 M y dos veces con agua desionizada y se conservaron en hielo hasta su uso. Por otra parte, el sobrenadante libre de paredes se centrifugó a $105,000 \times g$ ($35,000 \times \text{rpm}$) en un rotor 90Ti por 1 h a 4 °C en una

ultracentrífuga Beckman-Coulter Optima L-100XP para la obtención de la fracción soluble (S-35K) y la fracción mixta de membrana (FMM). Una vez obtenidas todas las fracciones, se procedió inmediatamente a determinar la actividad enzimática de TGasa.

6.5 Determinación de la actividad enzimática de transglutaminasa

Para la determinación de la actividad enzimática de transglutaminasa se incubaron 0.25 μ Ci de lisina [C^{14}] (Perkin-Elmer, actividad específica 320 mCi/mmol, 0.1 mCi/mL), 1% (w/v) de N,N'-dimetil caseína (Sigma Aldrich), $CaCl_2$ 2 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.4 y la fuente enzimática en un volumen final de 500 μ L. Después de 4-6 h de incubación a 30 °C en agitación, las reacciones fueron detenidas mediante la adición de 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % (w/v); las mezclas se mantuvieron a 4 °C por 2 h, se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio de 2.5 cm de diámetro (Whatman) en un Manifold (Millipore) conectado al vacío; se lavaron los filtros dos veces con 2 mL de TCA al 5%, 2 veces con 2 mL de etanol al 70% frío y secados a temperatura ambiente. Finalmente, la radioactividad incorporada fue determinada en viales de vidrio conteniendo 5 mL de líquido de centelleo Ready Protein (Beckman) en un contador de líquido de centelleo LS6000 (Beckman).

6.6 Determinación de la actividad enzimática de enolasa

La actividad de enolasa fue determinada espectrofotométricamente midiendo la reducción en la absorbencia a 240 nm del sustrato fosfoenolpiruvato (PEP). La mezcla de reacción contenía imidazol 50 mM en buffer de fosfatos 15 mM pH 6.8, KCl 400 mM, PEP (Sigma Aldrich) 1 mM, $MgSO_4$ 3 mM en un volumen final de 200 μ L. La actividad fue evaluada midiendo los cambios en la absorbencia de 0.2 correspondiente a la conversión de 0.226 μ mol del sustrato (Kustrzeba-Wojcicka & Golczak, 2000). Para estudios de inhibición de la actividad de la enolasa, usamos el anticuerpo policlonal de conejo anti-Eno1

recombinante de *C. albicans* (rCaEno1) y el anticuerpo policlonal de conejo contra el anti-antígeno nuclear de proliferación celular de *Entamoeba histolytica* (rEhPCNA) como control negativo.

6.7 Solubilización de la actividad de TGasa de paredes celulares de *C. albicans*

Las paredes celulares de *C. albicans* fueron digeridas simultáneamente con 0.26 unidades de zimoliasa E1004 (Zimo Research) por μg de proteína en pared (cuantificada por Bradford) y 0.05 mg de quitinasa (Sigma Aldrich) por cada mL de pared durante 4 h a temperatura ambiente; posteriormente, se extrajeron las proteínas con urea 8 M en Tris HCl 50 mM pH 7.4 (a una relación de 10 mg de paredes por mL de urea 8 M) en agitación suave durante 18 h a 28°C, subsecuente renaturalización mediante diálisis secuencial con urea 5 M en Tris-HCl 50 mM pH 7.4 (4 L), urea 2 M en el buffer antes descrito (4 L) y Tris-HCl 50 mM pH 7.4 (4 L) cada 12 h a 4°C. Las muestras fueron centrifugadas a $1,200 \times g$ por 10 min a 4°C en una centrifuga Eppendorf modelo 5810R, el sedimento se desechó y el sobrenadante (SN $1,200 \times g$) fue sometido a una centrifugación a $12,000 \times g$ por 30 min a 4°C en una centrífuga Eppendorf; la pastilla se resuspendió en Tris-HCl 50 mM pH 7.4 y se denominó pastilla $12,000 \times g$, mientras que el sobrenadante (SN $12,000 \times g$) se conservó en hielo. La actividad de TGasa se determinó en las fracciones de paredes celulares (CW), en el SN $12,000 \times g$ y en el sedimento final (pastilla $12,000 \times g$).

6.8 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Una muestra de un cultivo celular de levaduras crecidas en fase exponencial, se lavó con agua y la pastilla resultante se fijó por 1 h en gliceraldehído al 3 % en PBS 1X a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS 1X cada 10 min, después se colocaron en una solución de tetróxido de osmio al 1 % en PBS 1X durante 2 h a temperatura

ambiente (TA); posteriormente, las células se lavaron con abundante agua y se tiñeron con acetato de uranilo al 0.1% toda la noche a TA. Los pasos subsiguientes fueron de deshidratación con diferentes concentraciones de etanol (50, 60 y 70%) cada 10 min, y 80, 90 y 100% de etanol por 15 min cada una. El óxido de propileno fue usado como solvente transicional, el cual se cambió dos veces, cada 10 minutos. Las muestras fueron colocadas en una mezcla 1:1 de resina DER 736 epoxy y etanol absoluto por 3 h a TA, y en una relación 3:1 de la mezcla resina epoxy: etanol durante toda la noche a TA. Al siguiente día, las muestras fueron transferidas a resina epoxy al 100% e incubadas por 2 h a TA, embebidas en moldes y polimerizadas por 24 h a 60°C. Para obtener cortes delgados se utilizaron cuchillas de vidrio en el ultramicrotomo Leica EM UC7. Los cortes (60-80 nm) se colocaron en rejillas de cobre y se tiñeron con acetato de uranilo al 1% y citrato de plomo de Reynolds. Por último, las muestras se analizaron con el microscopio electrónico de transmisión JOEL 1400 en LaNSE del Cinvestav-IPN.

6.9 Tinción de quitina en células de *C. albicans* y análisis por microscopia confocal

Un millón de células de *C. albicans* se obtuvieron a las 6 h de la curva de crecimiento con diferentes concentraciones de cistamina (0 mM, 50 mM, 100 mM y 200 mM), se fijaron en etanol al 70 % por 15 min, se lavaron dos veces con PBS 1X por 30 s, se incubaron con 100 µg/mL de calcoflúor blanco (CFW, Sigma) por 5 minutos, se lavaron dos veces con agua destilada y las células teñidas se observaron con un filtro compatible con DAPI en un microscopio confocal Leica TCS SP8 (Leica Microsistemas, Ciudad de México, México).

6.10 Cuantificación de quitina, manoproteínas y glucano por citometría de flujo

Se realizó una curva de crecimiento de células de *C. albicans* en medio YPD con diferentes concentraciones de cistamina (0 mM, 50 mM, 100 mM y 200 mM) usando una

DO_{600 nm} inicial de 0.2. Cada hora se tomó una alícuota de 1.5 mL del cultivo (aproximadamente un millón de células), se centrifugaron a $500 \times g$ en una microcentrifuga Eppendorf a 4 °C, las pastillas celulares fueron lavadas dos veces con agua destilada (dH₂O), se permeabilizaron con etanol al 70%, se lavaron dos veces con dH₂O y incubaron sin y con calcoflúor (CFW) 50 µg/mL (Amberg, 2005) por 15 min a TA; posteriormente, se lavaron las células para eliminar el exceso de colorante como se mencionó anteriormente y se analizaron en un citómetro de flujo BD LSR Fortessa del LaNSE en Cinvestav-IPN para cuantificar la fluorescencia del CFW (usando un filtro compatible con DAPI). En cada experimento, se determinó la fluorescencia emitida por 20, 000 células usando el detector de dispersión frontal (FSC) y los detectores de dispersión lateral (SSC). La intensidad media de fluorescencia emitida por la población teñida (población positiva) y no teñida (autofluorescencia o población negativa) se analizó y procesó con el software FlowJo 10.0.6 (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

Para la cuantificación de manoproteínas, las células se tiñeron con concanavalina A acoplada a fluoresceína (FITC-ConA, laboratorios Vector) en los mismos puntos de la curva de crecimiento antes mencionados. Las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X, permeabilizadas con etanol al 70% e incubadas con 2 µg/mL de FITC-ConA en PBS 1X durante 30 min a TA, las células se lavaron nuevamente con PBS 1X y fueron analizadas en el citómetro de flujo. La longitud de onda de excitación fue 495 nm y la longitud de onda de emisión fue 515 nm.

6.11 Determinación del contenido de glucano

Las células contenidas en las alícuotas obtenidas de las curvas de crecimiento en los tiempos antes señalados se lavaron dos veces con PBS 1X, se permeabilizaron con etanol al 70%, se lavaron dos veces con PBS 1X y se incubaron en azul de metilo (Sigma) al 0.5 mg/mL durante 5 min a TA. Después, las células fueron analizadas por citometría de flujo usando una longitud de onda de excitación de 410 nm y una longitud de onda de emisión de 455 nm. En cada experimento, el índice de tinción (SI) fue calculado de la siguiente forma:

$$SI = \frac{(M_1 - M_2)}{2} \cdot S$$

donde M_1 es la intensidad media de fluorescencia de la población positiva, M_2 es la intensidad media de fluorescencia de la población negativa y S es la desviación estándar de la intensidad media de fluorescencia de la población negativa.

6.12 Western blot

Para la inmunodetección de la proteína Atg8 de *C. albicans*, usamos el anticuerpo policlonal de conejo LC3A/B (Cell Signaling Technology), el cual reconoce la proteína LC3-I y LC-II (16 y 14 kDa, respectivamente). Células levaduriformes se crecieron en 100 mL de medio YPD en diferentes concentraciones de cistamina (0, 50, 100 y 200 mM) durante 6 h de incubación a una densidad óptica ($DO_{600\text{ nm}}$) inicial de 0.1-0.2, se cosecharon las células por centrifugación, se lavaron con agua destilada y se rompieron con perlas de vidrio como se describió anteriormente. Las paredes celulares se aislaron por centrifugación, se desecharon y el sobrenadante fue utilizado para realizar SDS-PAGE al 12% y transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare Life Science, Ciudad de México, México). Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada (Difco) al 5% en PBS 1X conteniendo Tween 20 al 0.05% (PBS-T) por 4 h a TA. El anticuerpo primario anti LC3 A/B se incubó en una dilución 1:250 en PBS-T conteniendo leche descremada al 5 % durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las membranas se lavaron 10 veces con PBS-T por 10 minutos a TA, se incubaron con el anticuerpo secundario de carnero anti-IgG de conejo (Zymed) a una dilución de 1: 20,000 en leche al 5% en PBS-T por 2 h a TA. Las membranas se lavaron como anteriormente se mencionó y la inmunorreactividad fue detectada por quimioluminiscencia usando el reactivo del kit Super signal Femto Maximum Sensitivity Substrate kit (Pierce, Ciudad de México, México) a una dilución de 1:8 (v/v) y películas para quimioluminiscencia de alto rendimiento (GE Healthcare Life Sciences, Ciudad de México, México). Las imágenes digitales de los Western blots se obtuvieron con un sistema Gel Doc EZ y se procesaron con el software Image Lab (ambos de Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Como marcadores de peso molecular, se usaron los estándares Streptagged Precision Plus

Protein All Blue (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), los cuales son usados para quimioluminiscencia con el conjugado Precision Protein StrepTactin-HRP (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Para la identificación de la proteína rCaEno1, se usaron los anticuerpos monoclonales anti His de ratón (dilución 1: 5,000 de Roche) o el anticuerpo policlonal de conejo anti-rCaEno1 (dilución 1: 20,000), siguiendo la metodología antes descrita.

6.13 Identificación de la TGasa usando el inhibidor fluorescente de las TGasas monodansilcadaverina (MDC)

Las paredes celulares de *Candida albicans* fueron digeridas simultáneamente con 60 U de quitinasa (Sigma) y 100 U de zimoliasa E1004 (Zymo Research) durante toda la noche a TA. Esta fracción fue usada como fuente enzimática del ensayo de la actividad de TGasa. Doscientos microlitros de las paredes digeridas se mezclaron con MDC 0.2 μ M, PMSF 1 μ M, pepstatina A 1 μ g/mL, con y sin CaCl₂ o EDTA 2 mM, y se incubaron por 1 h a 4 °C sujetas a un agitador de vortex a una velocidad de 4. Las proteínas fueron separadas por PAGE no desnaturizante al 7.5 % y la fluorescencia visualizada a 350 nm con el sistema de imágenes Gel Doc EZ (Bio-Rad). Finalmente, las bandas fluorescentes fueron cortadas, extraídas y procesadas para la identificación proteica por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en la División de Proteómica del Centro Interdisciplinario de Biotecnología de la Universidad de Florida., USA.

6.14 Expresión de la proteína recombinante Eno1 y generación de anticuerpos policlonales de conejo anti-rCaEno1

El marco de lectura completo del gen *CaENO1* (1,323 pb) flanqueado por los sitios para endonucleasas *Kpn I* y *Bam HI* fue amplificado con la Phusion DNA polymerasa por PCR usando ADN genómico con los siguientes cebadores: *CaENO1*pColdII_Fw (5'-CGGGGTACCATGTCTTACGCCACTAAAATCCA-3') y el *CaENO1*pColdII_Rv (5'-CGCGGATCCTTACAATTGAGAAGCCTTTTGGAA-3'), y clonado en el vector PJET

1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, el inserto fue subclonado en el plásmido pCold II (Takara) en los sitios para las endonucleasas antes mencionadas para generar la construcción *CaENO1pCold II*, el cual fue transformado en células competentes (por el método de CaCl_2 y RbCl_2) *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen). La inducción de la proteína recombinante CaEno1 (rCaEno1) fue realizada con isopropil beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.5 mM por 24 h a 23°C en medio Luria-Bertani (con ampicilina 100 µg/mL) a 200 rpm. Las células fueron cosechadas por centrifugación a $4,000 \times g$ por 20 min y resuspendidas en 12 mL del buffer A (Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7.4) que contenía fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM, pepstatina A 1 µg/mL, imidazol 10 mM y lisozima 1 mg/mL. Las células fueron incubadas por 1 h a 4 °C, sonicadas 3 veces en hielo por 10 segundos a 60% de amplitud en un equipo Ultrasonic Processor CPX 130PB (Cole-Parmer, Verno Hills, IL USA), incubando en hielo durante un minuto entre cada ciclo de sonicación. Finalmente, los extractos celulares fueron obtenidos por centrifugación a $10,000 \times g$ por 30 min a 4 °C.

La purificación de la proteína rCaEno1 fue realizada por cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado (IMAC, por sus siglas en inglés) usando una columna de NTA- Ni^{2+} (ácido nitrilotriacético acoplado a ión níquel) agarosa (7.0 cm \times 0.9 cm, gel 1 mL, Sigma). La columna fue lavada con 4 volúmenes del buffer A y la proteína rCaEno1 unida a la columna fue eluida con 4 volúmenes del buffer E (Tris-HCl 50 mM, imidazol 250 mM, pH 7.4) a 4 °C, colectando fracciones de 1 mL. La identidad del polipéptido purificado fue verificada por Wertern Blot y por espectrometría de masas en tándem con un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4800 (Applied Biosystems) del LaNSE (Cinvestav-IPN). Los espectros MS/MS obtenidos fueron comparados contra la base de datos de *Candida albicans* SC5314 (ATCC MYA-2876) cargada de la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot, usando el software Protein Pilot versión 4.0 (SCIEX, Ciudad de México, México), utilizando el algoritmo Paragon como motor de búsqueda.

Para determinar las actividades de TGasa y enolasa, la proteína rEno1 purificada fue pasada a través de una columna de Sephadex G-25 (5.7 cm \times 0.7 cm, volumen de cama de 1

mL) y colectada en la fracción V_0 ya sea con buffer de fosfatos 15 mM pH 6.8 o con Tris-HCl 50 mM pH 7.4.

Los anticuerpos policlonales de conejo contra la proteína rCaEno1 fueron producidos como se describió anteriormente (Herrera-Aguirre, Luna-Arias, Labra-Barrios, & Orozco, 2010), usando 50 μ g de proteína purificada en cada inmunización y como adyuvante el TiterMax Gold como se recomienda por el fabricante. Utilizamos conejos de la Unidad de Experimentación y Producción de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Cinvestav-IPN. Los anticuerpos policlonales hechos en conejo anti-rEnPCNA fueron obtenidos a partir de la proteína rEnPCNA purificada como se describió antes, usando el plásmido pRSET A-*Ehpcna* el cual codifica el marco de lectura completo del gen *Ehpcna* (GenBank: XM_646418.1). Ambos anticuerpos fueron purificados por inmunoadsorción con sus correspondientes proteínas recombinantes inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa, previamente bloqueadas con albúmina de suero bovino (“BSA” por sus siglas en inglés), y eluidas con glicina 100 mM pH 2.3 e inmediatamente neutralizados con Tris-HCl 1M pH 8.0.

6.15 Análisis bioinformático

Se realizó el alineamiento de las secuencias primarias de la CaEno1 (con el número de acceso AAB46358.1 en GenBank) y ScEno1 (con el número de acceso AAA88712.1 en GenBank) usando el programa Clustal Omega (versión 1.2.4) del Instituto Europeo de Bioinformática (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). La estructura de la CaEno1p fue obtenida mediante modelado por homología usando el programa Modeller en el servidor ModWeb para Modelado de Estructuras Proteicas (versión r189, <https://modbase.compbio.ucsf.edu/modweb>), seleccionando el mejor modelo y de score más alto, con métodos de asignación de plegado lento. La proteína en cuestión (residuos del 4-40) fue modelada usando como templado la región correspondiente de la ScEno1p (residuos 2-436), el cual fue diseñado para obtener un heterodímero compuesto de un sitio activo y una subunidad inactiva (RCSB Protein Data Bank code 2a11). Las estructuras proteicas fueron visualizadas con el programa UCSF Quimera (versión 1.10.2, estructura 40686, <https://www.cglucsf.edu/chimera/>). Estas estructuras fueron comparadas con el programa

Match Maker del Quimera, utilizando el algoritmo Needleman-Wunsh y la matriz BLOSUM62 para el mejor par de cadenas alineadas. La evaluación de la calidad del modelo fue determinada con los programas VERIFY_3D y ERRAT en el servidor de verificación y análisis de estructura versión 4 (SAVES) del Instituto de Biología Molecular de la UCLA (<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>). Los gráficos de Ramachandran fueron obtenidos con el programa RAMPAGE de la Universidad de Cambridge (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>). El modelo por homología de la CaEno1 fue depositado en el “Protein Model Database” de CASPUR y el Biocumputing Group del Departamento de Ciencias Bioquímicas de la Universidad de Roma “La Sapienza” (<https://bioinformatics.cineca.it/PMDB>), con el identificador PM0081054. Para determinar el potencial electrostático de superficie (PE) de CaEno1p y ScEno1p, los archivos PDB fueron convertidos a un formato PQR usando el servidor PDB2PQR (versión 2.1.1) del sitio web National Biomedical Computation Resource (<http://nbc.ucs.d.edu/>) empleando los parámetros predeterminados en el programa (force field, PARSE; optimización de la prueba). El PE de los modelos moleculares fue determinado con la conexión web mencionada antes. Finalmente, el PE en la superficie de la proteína fue visualizada con Quimera (valores establecidos entre -5 (rojo) a +5 (azul) kcal/mol). El BioGRID (the Biological General Repository for Interaction Datasets, <https://thebiogrid.org/>) y redes funcionales de asociaciones de proteínas con el programas STRING (<https://string-db.org/>) fueron usadas para determinar mapas de interacciones e interactores de la enolasa. La clasificación estructural de la enolasa fue realizada en el sitio web CATH/Gene3D (versión 4.1) (<http://www.cathdb.info/>) (Sillitoe et al., 2015). La búsqueda de dominios fue realizada en la base de datos Protein Sequence Analysis and Classification del Instituto de Bioinformática Europeo (SIB, InterPro, <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

6.16 Inmunolocalización de Eno1 en *C. albicans* por inmunoelectrón microscopía electrónica de transmisión (IEM)

Se realizó la detección de la proteína Eno1 de *C. albicans* por microscopía electrónica, siguiendo una metodología previamente reportada (Escalona-Montano et al., 2016). Las levaduras fueron lavadas con PBS 1× y fijadas con una mezcla de paraformaldehído al 4% y

glutaraldehído al 0.05 % en PIPES 0.2 M, pH 7.0, por 1 h a TA. Después de abundantes lavados con PBS 1×, las levaduras fueron bloqueadas con suero fetal de ternera al 10%, lavados con PBS 1×, deshidratadas y posteriormente embebidas en concentraciones crecientes de etanol y resina LR White (London Resin, Polysciences, Inc.). Las levaduras embebidas en resina fueron polimerizadas en cápsulas de gelatina toda la noche, bajo luz UV a 4 °C. El inmunomarcaje con oro coloidal fue realizado en secciones obtenidas con un ultramicrotomo (Reichert Jung, Austria) y montadas en rejillas de níquel cubiertas con Formvar. Las rejillas con las secciones fueron puestas en flotación en gotas de la siguiente solución: (a) leche desgrasada al 0.1% y PBS-T por 30 min para disminuir el marcaje no específico; (b) el anticuerpo policlonal anti rCaEno1 en una dilución 1:20 en PBS-T por una h a TA y toda la noche a 4 °C, y (C) el anticuerpo policlonal de carnero anti-conejo acoplado a una partícula de oro coloidal de 10 nm por 2 h a TA (Zymed Laboratories Inc y Thermo Fisher Scientific) (dilución 1:40 en PBS-T). Las rejillas fueron lavadas en cada paso con PBS-T y en el último paso con PBS 1× y agua destilada. Las secciones fueron contrastadas con acetato de uranilo al 3% y después examinadas en un microscopio electrónico de transmisión (TEM, JEOL 1400x, JEOL Ltd., Japón). Como control negativo, las secciones fueron incubadas con suero de conejo normal, diluidas en PBS-T y después con un anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro coloidal. La identificación de las estructuras subcelulares positivas a Eno1 fueron realizadas usando secciones delgadas que fueron procesadas para preservar la ultra estructura. Brevemente, las células fueron fijadas por 1 h en glutaraldehído al 2.5%. Después se lavaron en PBS 1×, gradualmente se deshidrataron en etanol y finalmente se embebieron en resina Spurr. Secciones delgadas fueron obtenidas utilizando un ultramicrotomo, las cuales fueron teñidas con acetato de uranilo saturado disuelto en etanol y citrato de plomo acuoso saturado. Las rejillas de cobre con las secciones fueron examinadas en el microscopio electrónico. Las imágenes digitales fueron obtenidas y procesadas con Adobe Photoshop Software.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto de la inhibición de la TGasa en el crecimiento y superficie celular de levaduras de *C. albicans* CAI4

Estudios previos demostraron que la actividad de TGasa es esencial para *S. cerevisiae* (Iranzo et al., 2002) y *C. albicans* (Reyna-Beltrán, 2012, tesis de maestría) hasta las 6 h de crecimiento en medio rico con diferentes concentraciones de cistamina (50, 100 y 200 mM). Con la finalidad de evaluar los cambios en la densidad óptica a mayores tiempos, decidimos realizar curvas de crecimiento hasta las 24 horas. Encontramos una inhibición del crecimiento (disminución de la densidad óptica) en función de la concentración de la cistamina utilizada, observándose un mayor efecto en las concentraciones de 100 y 200 mM a las 6 h. Sin embargo, la densidad óptica de los cultivos crecidos en altas concentraciones de cistamina fue similar al control a las 24 h, lo que sugiere que el efecto de la cistamina es reversible (Fig. 5A). Para corroborar esta hipótesis, se adicionó una segunda dosis de cistamina (0, 50, 100 y 200 mM) a las 6 h (Fig. 5B). Se observó una clara disminución en el crecimiento a las 12 h, el cual fue evidente aún a las 24 h de incubación. En este tiempo, la densidad óptica de los cultivos obtenidos en presencia de 50, 100 y 200 mM de cistamina, no mostró una diferencia significativa entre sí, la cual fue de aproximadamente $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ de la $DO_{600\text{ nm}}$ del cultivo crecido sin cistamina (Fig. 5B). Esto demuestra un efecto de inhibición transitoria de la cistamina.

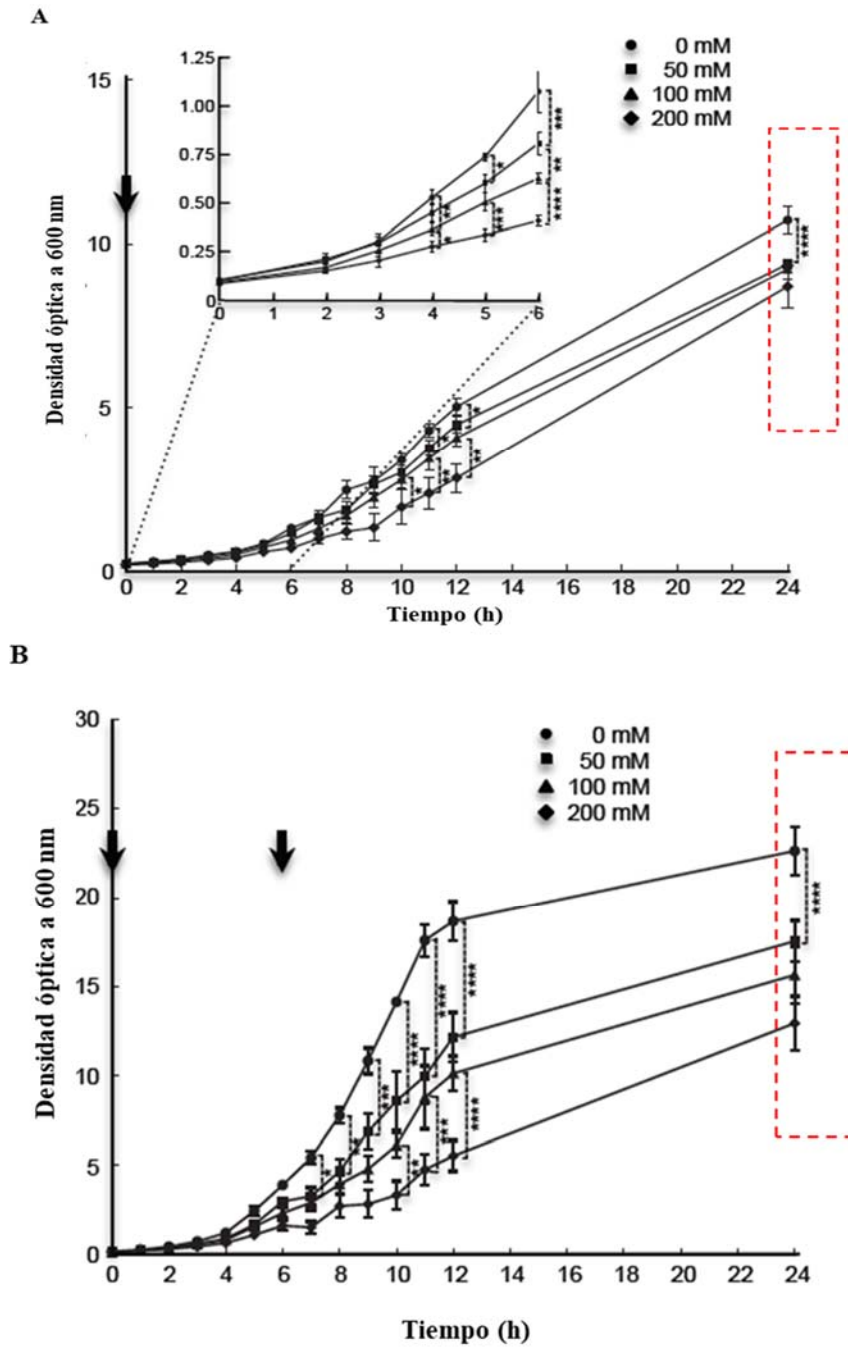


Figura 5. Efecto de la inhibición de la actividad de TGasa en curvas de crecimiento de levaduras de *C. albicans*. A, las levaduras se crecieron en diferentes concentraciones de cistamina (0, 50, 100 y 200 mM) por un máximo de 24 h en medio rico. B, se adicionaron cantidades adicionales de cistamina a las 6 h, similares a las concentraciones usadas al inicio del experimento (B). Las flechas indican la adición de cistamina fresca.

Dado que el mayor efecto observado de la cistamina fue a las 6 h (Fig. 5A), decidimos analizar la morfología de las células por microscopía electrónica de barrido (SEM) en este tiempo como se describió en Materiales y Métodos (Fig. 6). Encontramos una población que presentó cambios en el patrón de división celular correspondiente al 4.3, 3.2 y 4.3 % para 50, 100 y 200 mM de cistamina, respectivamente. Además, observamos material fibrilar en la superficie, el cual apareció sólo en células grandes y redondas, y corresponden del 1-2 % de las células tratadas con 50 o 100 mM, en donde el porcentaje de células con estas características aumentó al 8.4 % en una concentración de cistamina de 200 mM (Fig. 6M-Ñ). Notablemente, se visualizaron protusiones de aproximadamente 100 nm de diámetro en la superficie de células tratadas con 200 mM de cistamina (Fig. 6O). Estas protusiones podrían ser vesículas, restos celulares, o pequeñas exposiciones de pared celular debidas al choque osmótico.

Con el objetivo de obtener más información del efecto causado por la inhibición de la TGasa, realizamos microscopía electrónica de transmisión (TEM), con la cual evaluamos los cambios en la ultraestructura de células tratadas con 0, 50, 100 y 200 mM de cistamina por 6 h. Encontramos una abundante acumulación de material electrón denso en las vacuolas de aquellas células que habían sido tratadas con cistamina, el cual se incrementó en relación con la concentración del inhibidor (Fig. 7B-D); en algunas vacuolas se observan estructuras de doble membrana, cuerpos lipídicos, restos de membrana, así como el aparente momento en el cual están entrando organelos (Fig. 7H-Ñ). Estos datos sugieren un incremento en la ruta de degradación de material intracelular característico del proceso de autofagia en levaduras (Kirisako et al., 1999). La microscopía electrónica de transmisión de cortes ultrafinos de células crecidas sin el inhibidor de la TGasa mostró una característica morfología de levaduras. Cuando las células fueron cultivadas en medio con cistamina, observamos alteraciones en el patrón de división celular; algunas células presentaron dos sitios de gemación en polos opuestos (Fig. 7B y N), y otras células iniciaron una ronda de gemación, sin previamente haberse separado de la célula madre (Fig. 7C, K y N). Un análisis a mayores aumentos ($\times 200,000$) reveló pérdida de material electrón denso en la pared interna cuando las células fueron tratadas con cistamina (Fig. 8B-D), con una evidente acumulación de material electrón denso en la pared externa (Fig. 8C y D), en la región de las manoproteínas,

esto en comparación con las células control. Además, encontramos un incremento en el número de pequeñas vesículas cerca de la membrana plasmática (Fig. 7I). Estos datos sugieren que la inhibición de la actividad de TGasa afectó la organización de los componentes de la pared celular e indujo el incremento de la autofagia en respuesta al estrés causado por la cistamina.

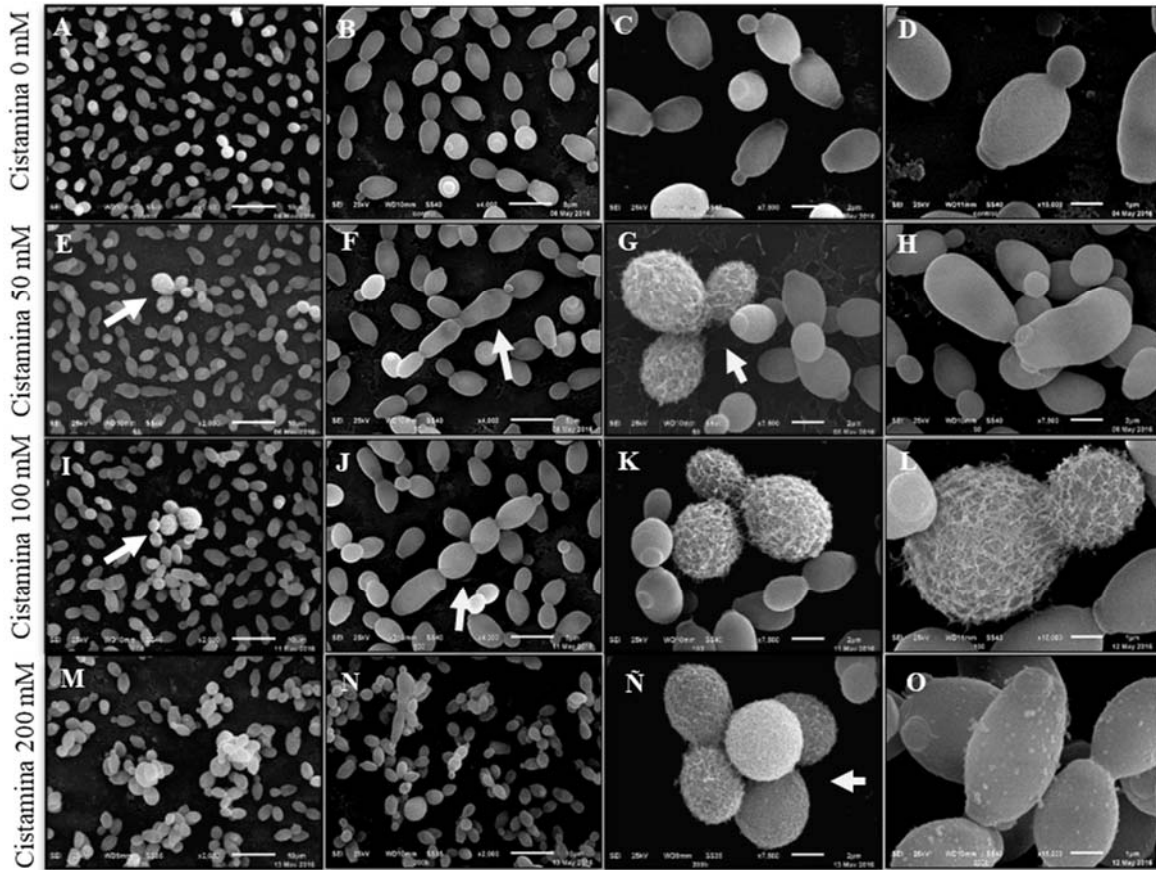


Figura 6. Efecto en la inhibición de la actividad de TGasa en la superficie de *C. albicans*. En presencia de cistamina, algunas células muestran estructuras fibrilares visibles en la superficie como se visualiza por SEM. Además, encontramos alteraciones en el patrón de división celular con baja frecuencia (cerca del 2.0 % en 50 y 100 mM de cistamina; 8.4 % a 200 mM). Interesantemente, un gran número de células crecidas con cistamina 200 mM mostraron protusiones de diferentes tamaños, con un promedio de aproximado de 100 nm. Las flechas indican alteraciones en el patrón de división celular. El análisis estadístico, prueba *t* Student no pareado. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****.

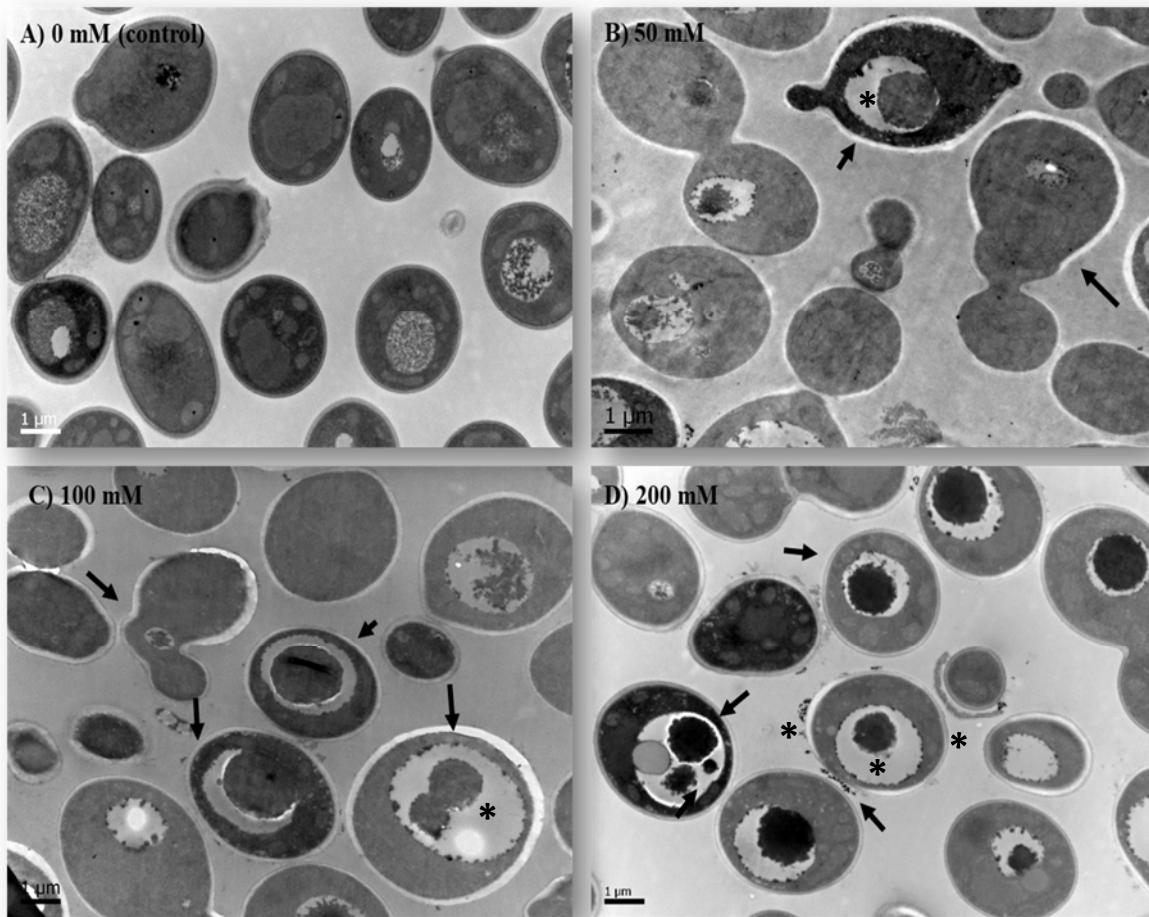


Figura 7. Cambios en la ultraestructura de *C. albicans* por la inhibición de la actividad de TGasa. A-D, levaduras cultivadas por 6 h en 0, 50, 100, y 200 mM de cistamina y analizadas por TEM. Se observó un incremento de material electrón denso en las vacuolas (asteriscos) el cual correlacionó directamente con el incremento de la cistamina. Algunas células mostraron acumulación de material electrón denso (asteriscos) en la superficie de la pared celular sólo en presencia de cistamina. Se encontraron alteraciones en el patrón de división celular (flechas).

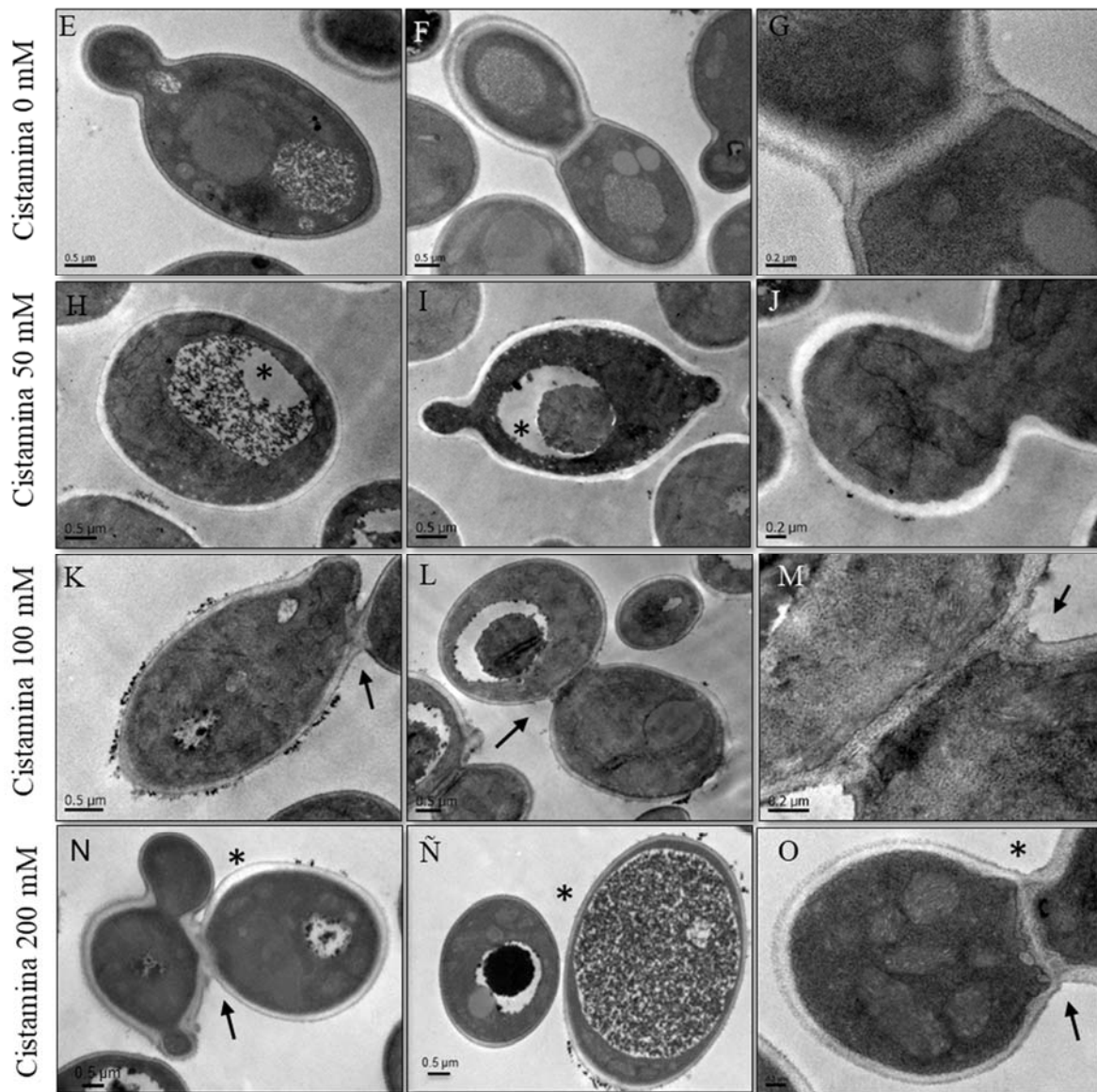


Figura 7 (continuación). Inhibición de la actividad de TGasa indujo cambios en el patrón de división en levaduras de *C. albicans*. Células de *C. albicans* cultivadas por 6 h con diferentes concentraciones de cistamina (0, 50, 100 y 200 mM) fueron analizadas por TEM, mostrando gemación en ambos polos de la célula, septos gruesos, células que no terminaron el proceso de división celular (flechas) y levaduras con abundante material electrón denso dentro de la vacuola (asteriscos).

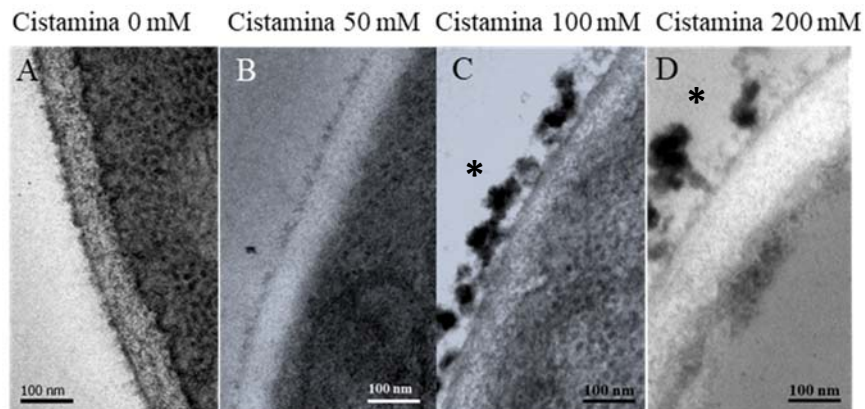


Figura 8. Efectos en la ultraestructura de la pared celular en levaduras de *C. albicans* tratadas con cistamina (0, 50, 100 y 200 mM). Secciones de la pared celular de levaduras de *C. albicans* obtenidas de curvas de crecimiento incubadas sin y con cistamina (50, 100 y 200 mM). Los asteriscos muestran la acumulación de material electrón denso en la superficie de la pared celular en relación con el aumento de la concentración de la cistamina.

Para demostrar si hubo un incremento de la autofagia, evaluamos un marcador de ésta, la proteína LC3/Atg8 (Kirisako et al., 1999). Inicialmente realizamos un alineamiento de la proteína LC3 de humano y las proteínas ortólogas Atg8 de *S. cerevisiae* y *C. albicans* para identificar las secuencias adyacentes a la lisina 40, reconocida por el anticuerpo policlonal anti-LC3/Atg8 de humano (Fig. 9A). Este dominio en la proteína Atg8 de *Candida* mostró una identidad del 36.4 % y una similitud del 59% con la proteína LC3 de humano. El análisis de extractos totales de células crecidas en 0, 50, 100 y 200 mM de cistamina por 6 h, reveló un aumento significativo de la proteína Atg8/LC3 unida a las membranas de los autofagosomas (LC3-II, forma unida al lípido fosfatidiletanolamina, PE, con una masa molecular de la proteína de 14 kDa) en relación con el incremento de la cistamina (Fig. 9B y C). Sin embargo, la banda de 16 kDa correspondiente a la proteína Atg8 no modificada no fue detectada. También observamos una disminución de una banda de 125 kDa con el incremento de la concentración de la cistamina (Fig. 9C). Las células que crecieron sin cistamina también mostraron las bandas de 14 y 125 kDa cuando la membrana de nitrocelulosa fue sobreexpuesta a la placa quimioluminiscente (Fig. 9D). Para mejorar la

resolución de las bandas de 14 y 16 kDa, realizamos un análisis de Western blot de las muestras en un SDS-PAGE al 12% con urea al 6 M (Fig. 9F). Aquí observamos la desaparición casi completa de la banda de 125 kDa, así como la presencia de una banda 14 y 16 kDa. Como no obtuvimos una adecuada resolución entre las proteínas de 14 y 16 kDa, llevamos a cabo un WB de muestras que fueron sometidas a SDS-PAGE en gradiente del 4-20 % (gel de 15 x17 cm) con urea 6 M. En este caso, todas las proteínas identificadas por el anticuerpo anti-LC3A/B estuvieron en el intervalo de 14-16 kDa. En estas condiciones detectamos una pequeña cantidad de la banda correspondiente a la proteína Atg 8 procesada, lo cual se encontró como un barrido, que podría indicar que la banda de 16 kDa contiene a la proteína procesada. Otra importante observación es que este barrido no fue observado en las muestras obtenidas de células que crecieron sin cistamina, indicando la escasa o nula autofagia. Esta información fue confirmada por inmunofluorescencia y microscopía confocal utilizando el anticuerpo anti-LC3A/B, la cual no mostró autofagia o mostró autofagia en niveles bajos en células control (Fig. 10A). La inmunodetección en células tratadas con cistamina fue similar a la observada en células tratadas con rapamicina 200 nM, un conocido inductor de la autofagia (Zinzalla, 2007). Estos resultados confirman el incremento de la autofagia durante la inhibición de la actividad de TGasa por la cistamina in *C. albicans*.

revelado con un anticuerpo anti-LC3A/B. *, $p < 0.05$ (prueba t de Student no pareada). Las barras se muestran con error estándar de la media.

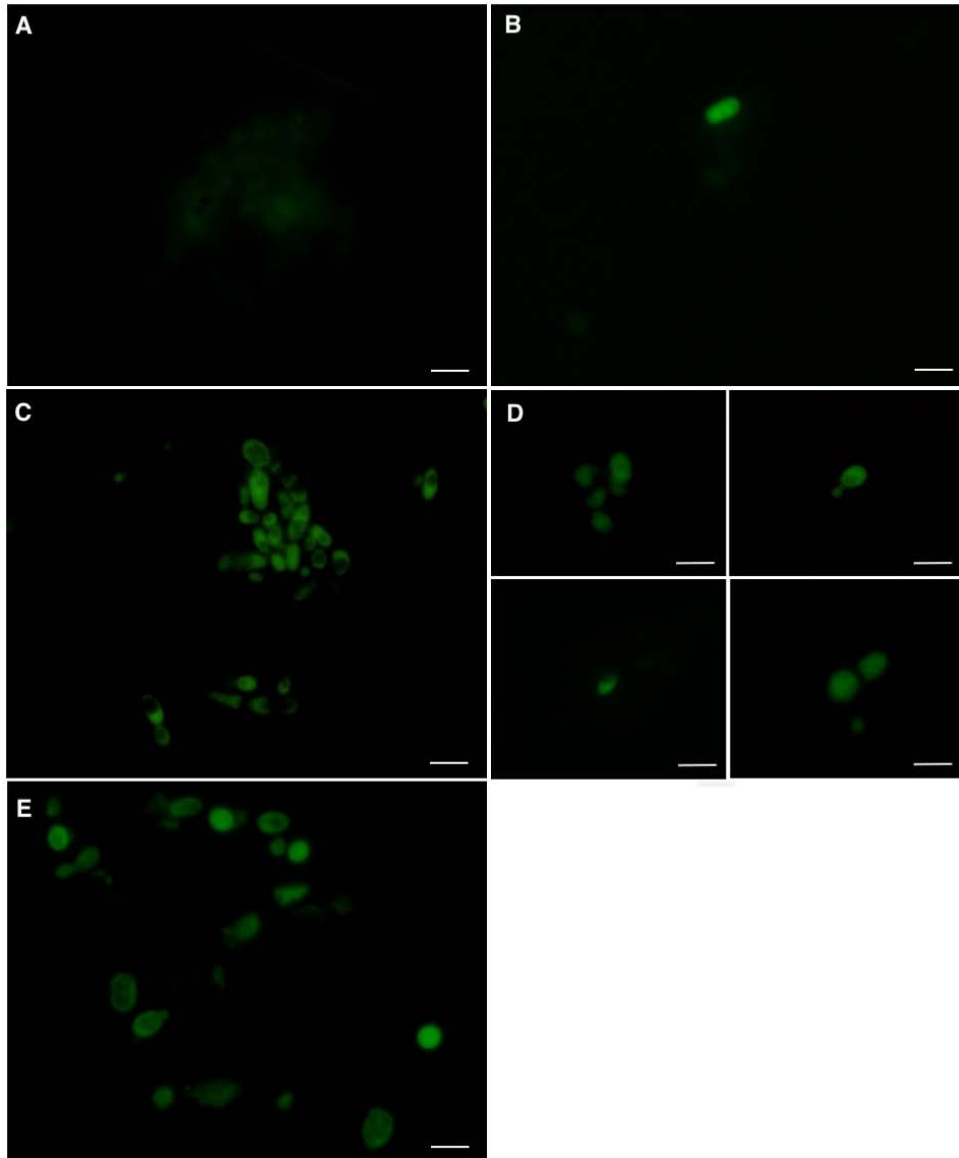


Figura 10. Aumento de la autofagia en respuesta a la inhibición de la actividad de TGasa en levaduras de *C. albicans*. A, en condiciones normales de crecimiento, células de *C. albicans* muestran una escasa tinción con el anti-LC3A/B. De B-D, la inhibición de la actividad de la TGasa con 50, 100, y 200 mM de cistamina, respectivamente, indujo el aumento de autofagia. Debido a la escasa unión de células tratadas con cistamina al cubreobjetos, se evaluaron varios campos de las células tratadas con cistamina 200 mM. En D, la tinción fue similar a la que se observó en células incubadas con 200 nM de rapamicina por 3 h (E), conocido inductor de la autofagia. La barra de escala corresponde a 5 μm .

7.2 La inhibición de la actividad de TGasa con cistamina no afecta las cantidades de quitina, glucano y manoproteínas en la pared celular de levaduras de *C. albicans*

Previamente mostramos por microscopia electrónica de transmisión, cambios en la ultraestructura de la pared celular de células tratadas con cistamina. Estos resultados sugirieron modificaciones en la concentración de los componentes de la pared celular. Para evaluar esta hipótesis, cuantificamos la cantidad de quitina, glucano y manoproteínas en levaduras crecidas con diferentes concentraciones de cistamina de 1 a 6 h por citometría de flujo. Observamos una variación aparente de la cantidad de los componentes de la pared celular (quitina, glucano y manoproteínas), tanto en células control como en aquellas que fueron incubadas en diferentes concentraciones de cistamina, las cuales no presentaron diferencias significativas (Fig. 11). A las 6 horas de las curvas de crecimiento, el tiempo en el cual se determinó el mayor efecto en la disminución del crecimiento, las levaduras tratadas con cistamina 200 mM se encontraron redondeadas y de mayor tamaño (5 μm) y mostraron una mayor tinción con calcoflúor al ser observadas por microscopía confocal (Fig. 12B-D). Sin embargo, no encontramos cambios significativos en las células obtenidas a las 6 h, para el contenido de quitina (Fig. 13A y B), glucano (Fig. 13C y D) y manoproteínas (Fig. 13E y F), los cuales son contrarios a los resultados obtenidos en células de *Alternaria infectoria* tratadas con drogas antifúngicas, donde los cambios en la cantidad de quitina o glucano fueron evidentes usando equinocandinas o nikomicina Z, respectivamente (Fernandes et al., 2014).

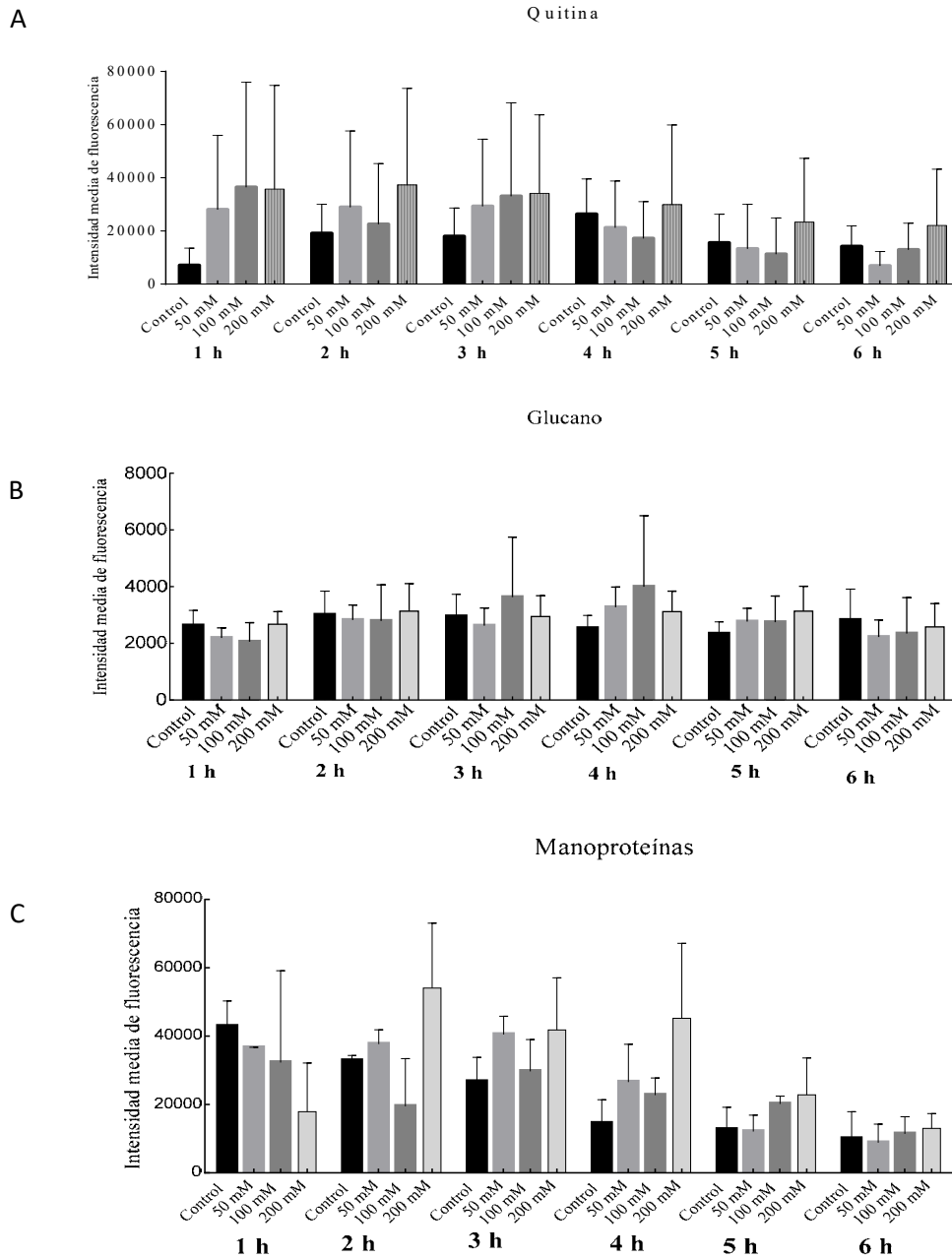


Figura 11. La inhibición de la actividad de TGasa no afecta la concentración de los componentes de la pared celular (quitina, glucano y manoproteínas). Levaduras de *C. albicans* fueron cultivadas con diferentes concentraciones de cistamina (0, 50, 100, y 200 mM) por 6 h a 28 °C, y por citometría de flujo se cuantificó la cantidad de manoproteínas, glucano y quitina cada hora. La quitina (A), glucano (B) y manoproteínas (C) fueron teñidas con calcofluor, azul de metilo y FITC-ConA, respectivamente. La intensidad media de la fluorescencia fue calculada y graficada para cada ensayo.

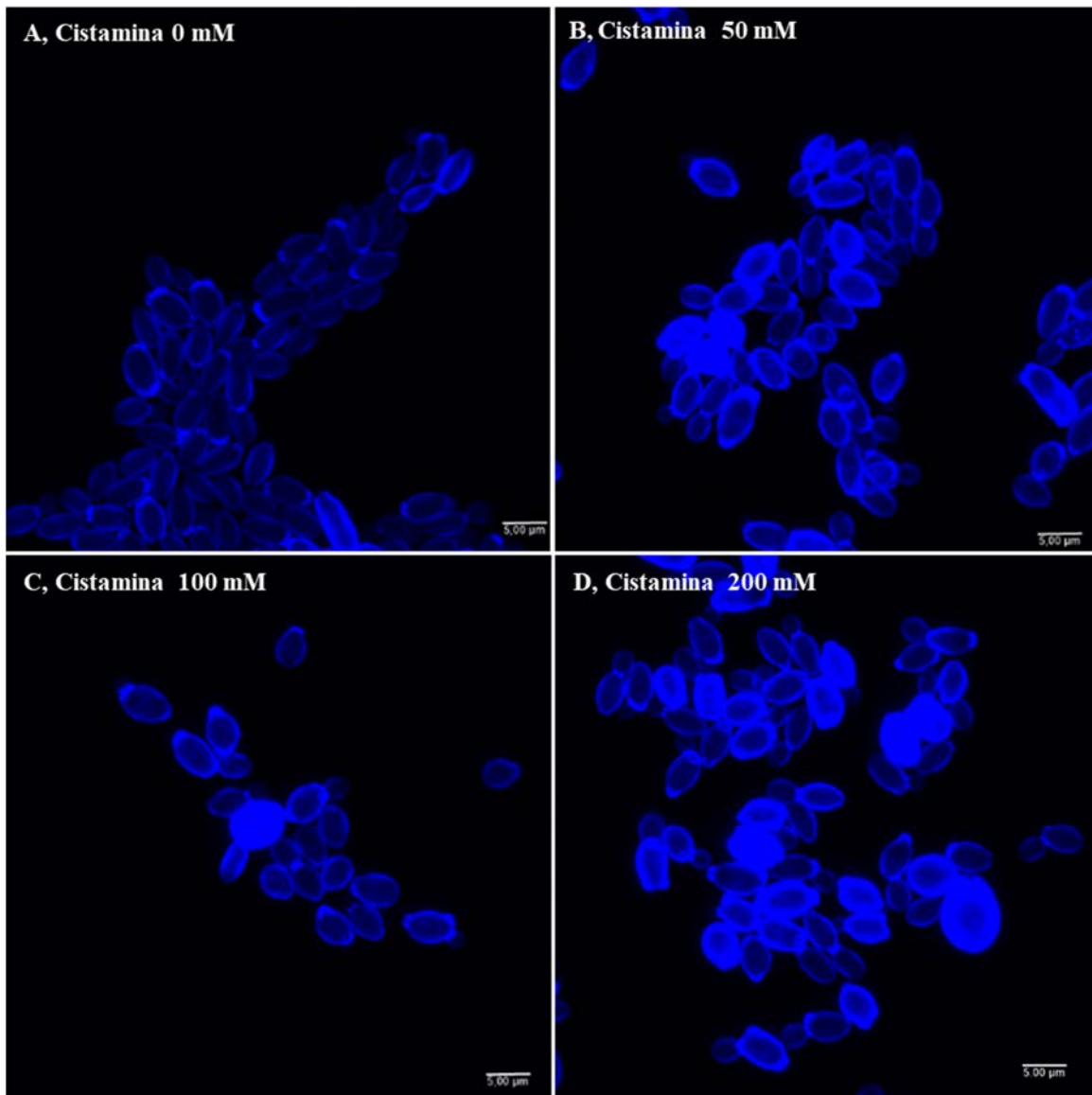


Figura 12. La inhibición de la actividad de la TGasa generó el aumento de la quitina en levaduras de mayor tamaño que las células control. Levaduras de *C. albicans* obtenidas de las curvas de crecimiento con diferentes concentraciones de cistamina fueron teñidas con calcoflúor y analizadas por microscopia confocal. Una población del 1-2% de células tratadas con cistamina (0, 50, 100 y 200 mM), mostró un aumento de la tinción de la quitina en células que se presentaron esféricas y de mayor tamaño, obtenidas a las 6 h de las curvas de crecimiento.

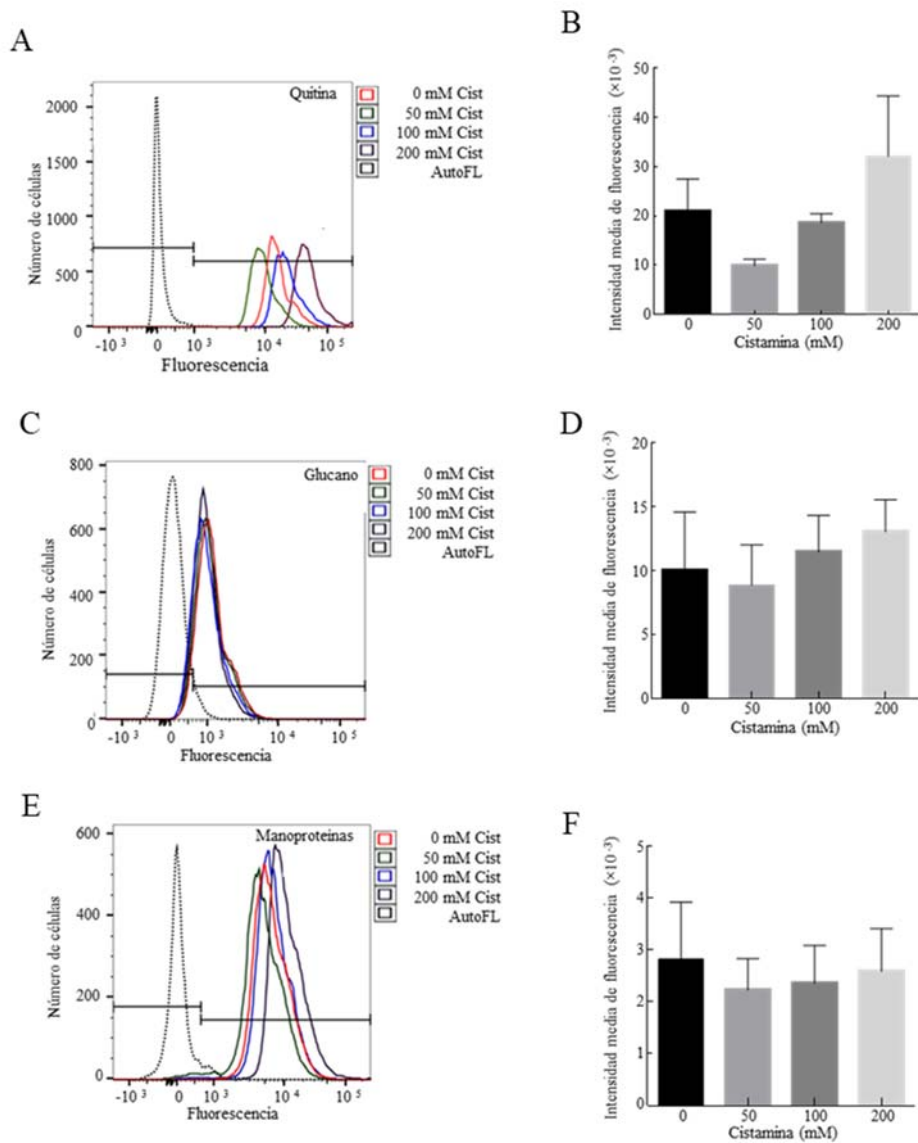


Figura 13. La inhibición de la actividad de TGasa por la cistamina, no afecta los niveles de los componentes de la pared celular. Las levaduras fueron cultivadas con diferentes concentraciones de cistamina (0, 50, 100, y 200 mM) por 6 h a 28 °C, y por citometría de flujo se cuantificó la cantidad de manoproteínas, glucano y quitina. La quitina (A y B), glucano (C y D) y manoproteínas (E y F) fueron teñidas con calcofluor, azul de metilo y FITC-ConA, respectivamente. La intensidad media de la fluorescencia fue calculada y graficada para cada experimento. Los histogramas no muestran variación estadísticamente significativa en la cantidad de estos componentes en células que crecieron en diferentes concentraciones de cistamina.

7.3 La actividad de TGasa es esencial en el proceso de transición de levadura a micelio en *C. albicans*

La transición de levadura a hifa se ha demostrado ser esencial en la virulencia de *C. albicans* (Wang, 2015). Previamente se reportó que la inhibición de la actividad de TGasa durante la miceliación causa la formación de pseudomicelio, micelios cortos y la presencia de levaduras gemando cuando se utiliza cistamina 50 mM (Ruiz-Herrera et al., 1995). Para caracterizar con mayor detalle los efectos causados por la cistamina durante la transición levadura-micelio, las células fueron incubadas sin cistamina, mostrando estructuras normales durante la transición (Fig. 14A-C). Con el incremento de las concentraciones de cistamina se encontró una dramática disminución de la longitud del micelio en la cepa de *C. albicans* CAI4. Notablemente, la cantidad de material extracelular floculante también incrementó en función de la concentración de la cistamina (Fig. 14D-L). Este efecto es similar al encontrado en respuesta al tratamiento de levaduras de *Candida tropicalis* con baicaleína o en combinación con fluconazol (Furlaneto et al., 2012).

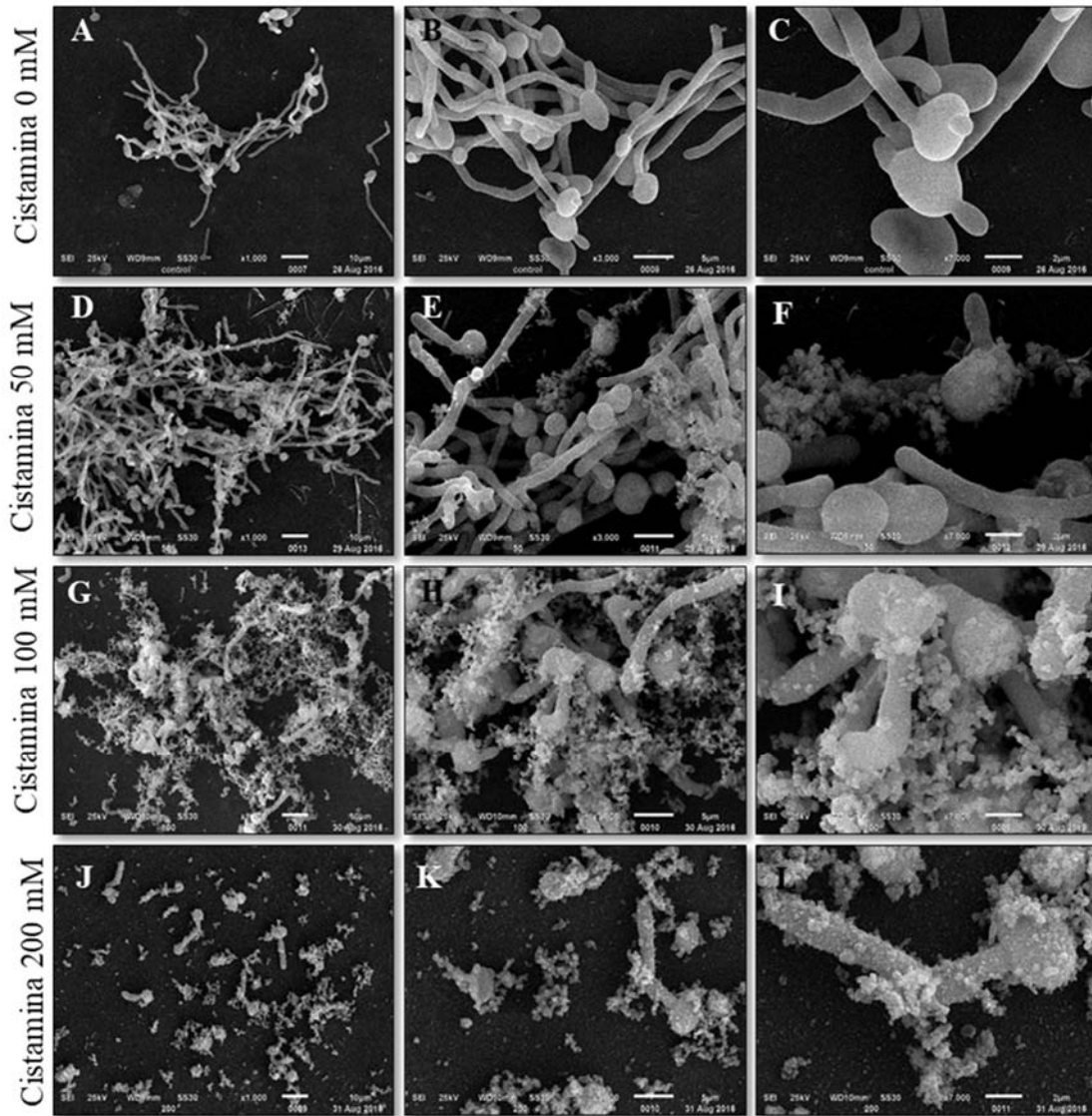


Figura 14. La inhibición de la actividad de TGasa por la cistamina afecta la formación de la hifa. Levaduras de *C. albicans* se crecieron con (D-L) o sin (A-C) cistamina en medio LEE a 37°C por 4 h y se observaron por SEM. Las micrografías de D-L muestran una disminución en la formación de la hifa y la presencia de abundante material extracelular floculante, el cual incrementó en altas concentración de cistamina.

7.4 Identificación de la proteína con actividad de TGasa en las paredes celulares de *Candida albicans*

La actividad de TGasa se ha demostrado en fracciones celulares de *S. cerevisiae* y *C. albicans*, aunque la identidad de la proteína que lleva a cabo dicha función no ha sido dilucidada (Iranzo et al., 2002; Ruiz-Herrera et al., 1995). Para identificar esta proteína, determinamos la actividad de TGasa en diferentes fracciones subcelulares, encontrándose principalmente en paredes celulares de *C. albicans* (CW, 72%), seguida de la fracción mixta de membranas (FMM, 19 %) y el citosol (S-35K, 9%) (Fig. 15A). La actividad fue reducida un 88% en la fracción de pared celular, y completamente inhibida en la FMM y citosol, utilizando cistamina 50 mM (Fig. 15B). Con estos datos, decidimos utilizar la fracción de pared celular como la principal fuente enzimática para estudios de purificación.

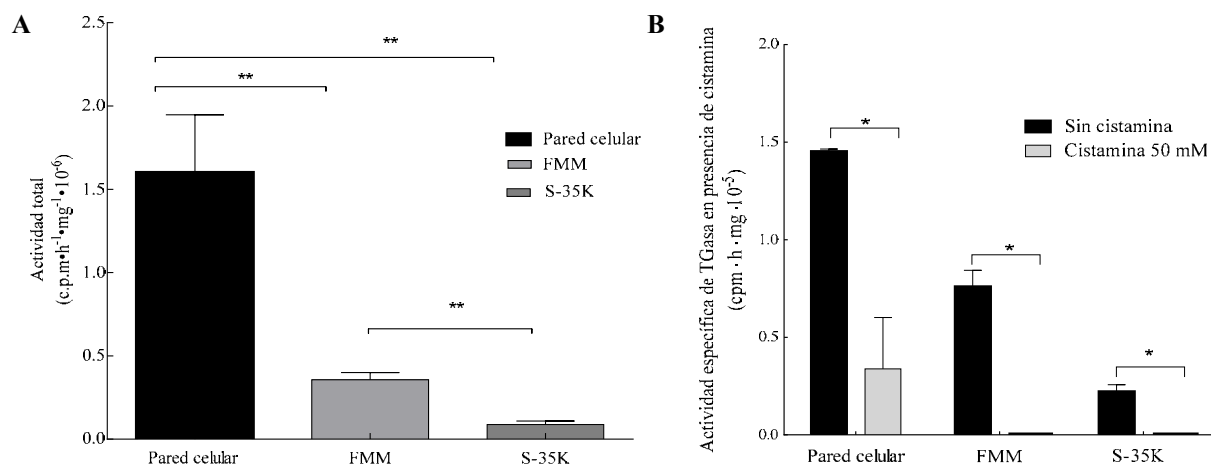


Figura 15. Determinación de la actividad de TGasa en fracciones celulares de *C. albicans*. A, la actividad total de TGasa fue determinada por incorporación de lisina [C^{14}] en pared celular, fracción mixta de membranas (FMM) y fracción soluble citosólica (S-35K). B, Actividad específica de TGasa en diferentes fracciones celulares y la inhibición por la cistamina.

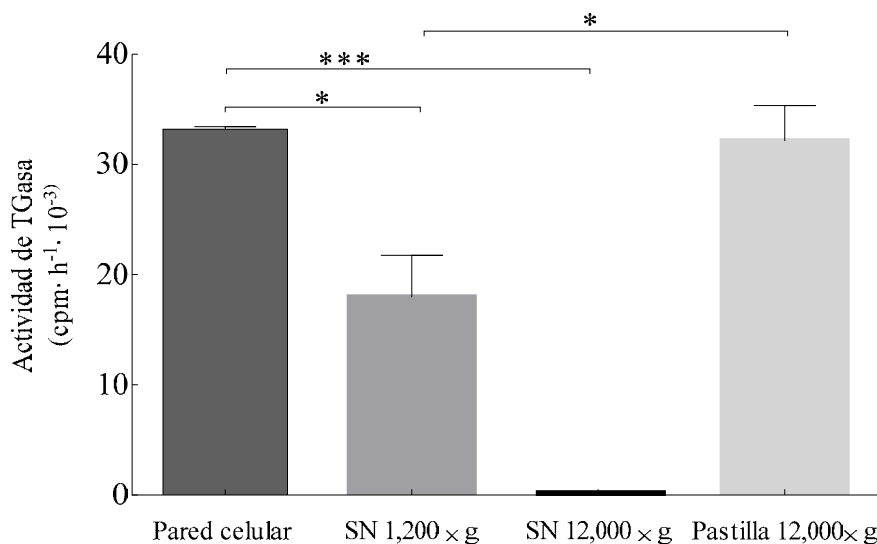


Figura 16. Determinación de la actividad de TGasa en paredes celulares de *C. albicans* tratadas con zimoliasa y quitinasa, sujetas a solubilización con urea 8 M. Las paredes celulares de *C. albicans* fueron digeridas con zimoliasa y quitinasa, desnaturalizadas con urea 8 M, renaturalizadas por diálisis, y posteriormente centrifugadas para obtener el sobrenadante y la pastilla. La actividad de TGasa fue determinada en cada una de las fracciones como se describe en Materiales y Métodos.

Diferentes metodologías fueron implementadas para intentar solubilizar la enzima activa, incluyendo digestión con zimoliasa, quitinasa y extracción con urea 8 M, en las cuales no obtuvimos resultados satisfactorios después de centrifugación a 12,000 × g, puesto que la actividad enzimática fue siempre localizada en la pastilla (Fig. 16). Por consiguiente, usamos al inhibidor MDC como una sonda fluorescente en un ensayo de actividad de TGasa para identificar a la proteína (Fig. 17). Esta prueba fue realizada con y sin Ca²⁺, y con EDTA. Esta metodología nos permitió observar tres bandas proteicas fluorescentes (Fig. 17A) llamadas ERB001, ERB002, y ERB003. La presencia del calcio cambió la movilidad de la banda ERB003 a una de mayor masa molecular (Fig. 17A) sin cambios aparentes en las otras dos bandas. La banda ERB001 fue muy delgada y perdió la fluorescencia rápidamente. La identificación de las proteínas en las tres bandas fluorescentes fue determinada por espectrometría de masas en tándem (Tabla. 2). Nosotros supusimos que la enolasa podría ser un candidato viable con actividad de TGasa ya que fue el péptido más abundante identificado

Tabla 2. Proteínas identificadas en las bandas fluorescentes provenientes del gel mostrado en la Fig. 17A.

#	Visible?	Starred?	Protein Name	Accession Number	Molecular Weight	B1	B2	B3	B4
1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	enolase [<i>Candida albicans</i>]	gi 170861 (+10)	47 kDa	41	28	0	0
2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Cluster of hypothetical protein Ca019.4716 [<i>Candida albicans</i> SC53...]	gi 46431493 [3]	50 kDa	40	0	0	0
3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	RecName: Full=Phosphoglycerate mutase; Short=PGAM; AltName: ...	gi 229463024 (+5)	27 kDa	1	26	0	0
4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	RecName: Full=Adenosylhomocysteinase; Short=AdoHcyase; AltName: ...	gi 229462755 (+5)	49 kDa	10	10	0	0
5	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	RecName: Full=Aminopeptidase 2; Flags: Precursor	gi 226722635 (+6)	104 kDa	0	9	0	0
6	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	pyruvate decarboxylase [<i>Candida albicans</i> WO-1]	gi 238881237 (+6)	62 kDa	3	7	0	0
7	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	unnamed protein product [<i>Candida albicans</i> SC5314]	gi 227286025 (+6)	38 kDa	4	7	0	0
8	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Cluster of 5-adenosylmethionine synthetase [<i>Candida albicans</i> WO...]	gi 238878455 [7]	42 kDa	0	3	6	0
9	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	dihydroxyacetone kinase [<i>Candida albicans</i> WO-1]	gi 238878667 (+5)	65 kDa	0	8	0	0
10	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	6-phosphogluconate dehydrogenase [<i>Candida albicans</i>]	gi 2309076 (+6)	57 kDa	1	6	0	0
11	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	L-ornithine transaminase, putative [<i>Candida dubliniensis</i> CD36]	gi 223643036 (+5)	47 kDa	1	6	0	0
12	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	dihydropyridyl dehydrogenase, mitochondrial precursor [<i>Candida a...</i>]	gi 238880151 (+5)	53 kDa	0	8	0	0
13	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NAD(P)H-dependent D-xylose reductase I,II, putative [<i>Candida du...</i>]	gi 223643914 (+5)	37 kDa	0	0	5	0
14	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	transaldolase [<i>Candida albicans</i> WO-1]	gi 238879833 (+4)	36 kDa	0	0	5	0
15	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	RecName: Full=5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocys...	gi 224471839 (+5)	86 kDa	0	0	5	0

Para demostrar que realmente la enolasa de *C. albicans* tiene actividad de TGasa, el gen que codifica esta proteína fue amplificado por PCR, utilizando una polimerasa de alta fidelidad (Phusion DNA polymerase), y con la finalidad de obtener un mayor número de copias del fragmento de 1,323 pb (correspondiente al ORF completo), éste fue clonado en el vector de transición pJET 1.2, para posteriormente clonarlo en el vector de expresión pCold II (Fig. 18). La proteína recombinante CaEno1 (rCaEno1) fue producida en *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS y purificada por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC) a través de una columna de NTA-Ni²⁺-agarosa, eluyéndola de la columna con imidazol 250 mM (Fig. 19). La identidad de la proteína rCaEno1 fue verificada por WB con el anticuerpo anti His-tag (Fig. 19B) y por espectrometría de masas en tándem (Fig. 20). La proteína purificada también fue usada para producir anticuerpos policlonales anti-rCaeno1, los cuales reconocen a la proteína purificada (Fig. 19A), así como un polipéptido de 47 kDa en extracto total, paredes purificadas, fracción mixta de membranas y fracción soluble de *C. albicans* (Fig.19B). Además, una banda de 120 kDa fue detectada en extractos totales y en la fracción de pared celular. Para confirmar estos resultados, se determinó la distribución de la Eno1 en

levaduras de *C. albicans* por IEM utilizando los anticuerpos policlonales anti-rCaEno1 generados en conejo. Mucha marca de oro coloidal fue distribuida en parches aislados sobre la superficie de la levadura (Fig. 21A-C). Las nanoparticulas de oro también fueron encontradas en el citoplasma de las levaduras (Fig. 21D-F). Los controles negativos con suero preinmune no mostraron marca en las células (Fig. 21G y H).

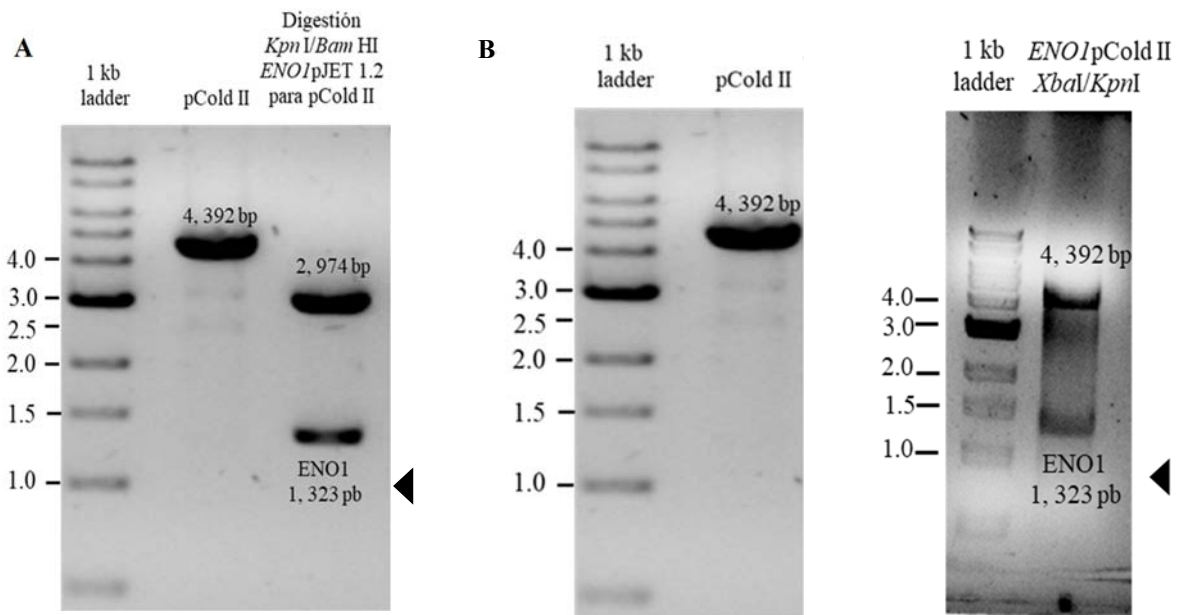


Figura 18. Clonación secuencial del gen *CaENO1* en los vectores pJET 1.2 y pCold II. El ORF del gen *CaENO1* de *C. albicans* (1,323 pb, cabeza de flecha) fue clonado en el vector pJET1.2 (A) y subclonado en el vector de expresión pCold II (4392 pb), con liberación del inserto con las enzimas *XbaI/KpnI* (B).

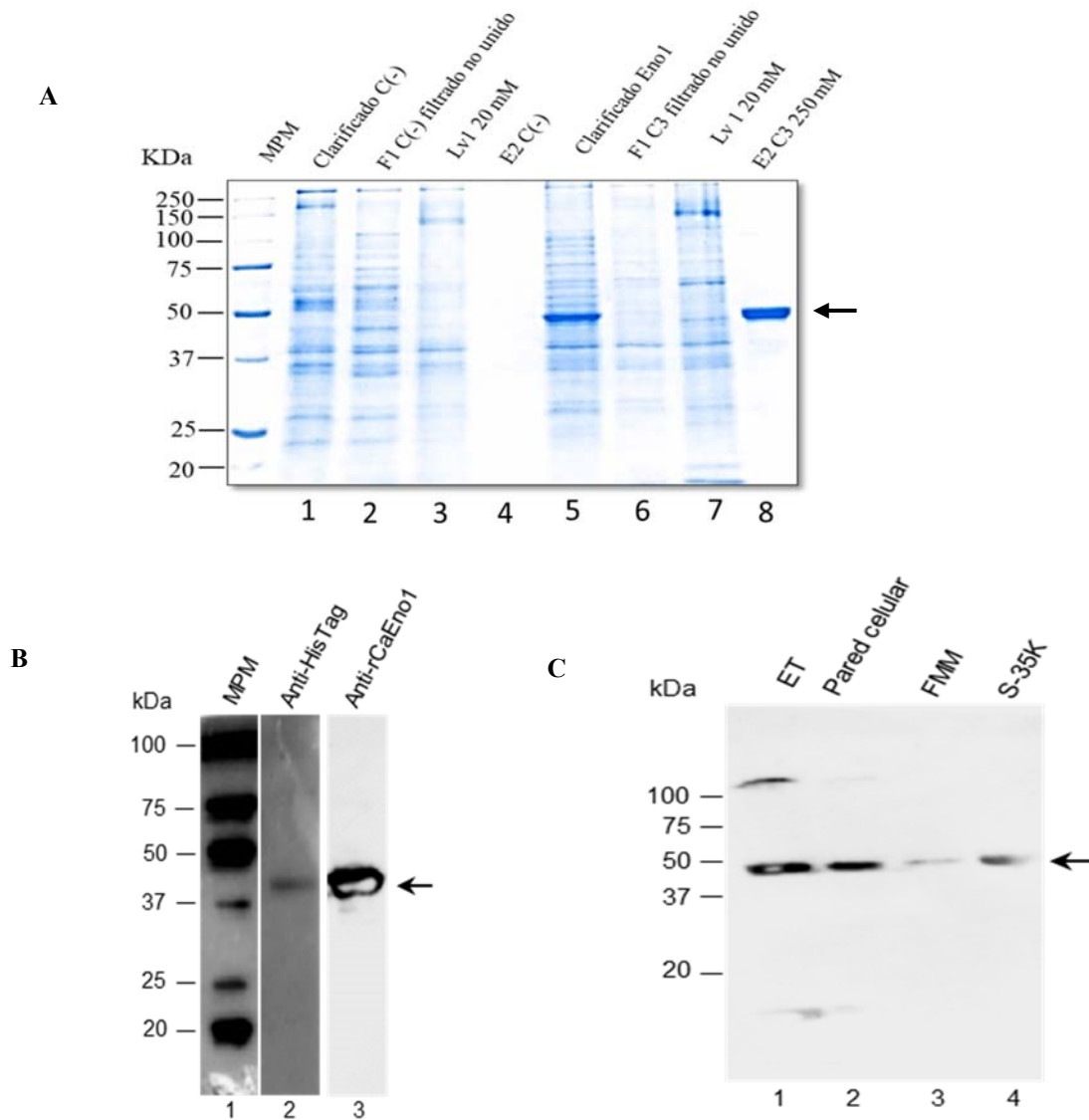


Figura 19. Expresión e inmunodetección de la proteína rCaEno1. El gen *ENO1* de *C. albicans* fue clonado en el vector de expresión pCold II y transformado en células competentes de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. La proteína Eno1 fue purificada por IMAC con una columna de Ni²⁺ NTA- agarosa en condiciones nativas, y las fracciones eluidas fueron evaluadas en un SDS-PAGE al 12% (A, carriles 5-8). El vector vacío también fue transformado en bacteria y las fracciones purificadas por una columna IMAC, y analizadas como control negativo (A, carriles 1-4). B, Western blot de la proteína recombinante purificada, usando anticuerpos anti-His-tag (carril 2) y el anti-rCaEno1 (carril 3). C, Western blot de las fracciones subcelulares de *C. albicans*. Las flechas indican a la proteína Eno1. Carril 1, extractos totales (ET); carril 2, paredes celulares; carril 3, fracción mixta de membranas (FMM); carril 4, fracción soluble (S-35K).

A

SIVPSGASTGVHEALELR
 [MW + H]⁺ = 1822.8105

LGANAILGVSLAAANAAAAAQGIPLYK
 [MW + H]⁺ = 2509.4063

VNQIGTLTESIQAANDSYAAGWGMVSHR
 [MW + H]⁺ = 3075.2451

SGETEDTFIADLSVGLR
 [MW + H]⁺ = 1809.7429

>CaEno1

MSYATKIHARYVYDSRGNPTVEVDFTTDKGLFR**SIVPSGASTGVHEALELR**DGDGKSKW
 LGKGVLKAVANVNDIIPALIKAKIDVVDQAKIDEFLLSLDGTGNKSKL**GANAILGVSLAA**
ANAAAAAQGIPLYKHIANISNAKKGKFLVPPFQNVNLGGSHAGGALAFQEFMIAPTG
 VSTFSEALRIGSEVYHNLKSLTKKKYQGSAGNVGDEGGVAPDIKTPKEALDLIMDAIDKA
 GYKGVGIAMDVASSEFYKDGKYDLDFKNPESDPKWLSPQLADLYEQLISEYPIVSI
 EDPFAEDDWDVWHFFERVGDKIQIVGDDLTVTNPTRIKTAIEKKAANALLK**VNQIGTL**
TESIQAANDSYAAGWGMVSHRSGETEDTFIADLSVGLRSGQIKTGAPARSERLAKLN
 QILRIIEELGSEAIYAGKDFQKASQL

B

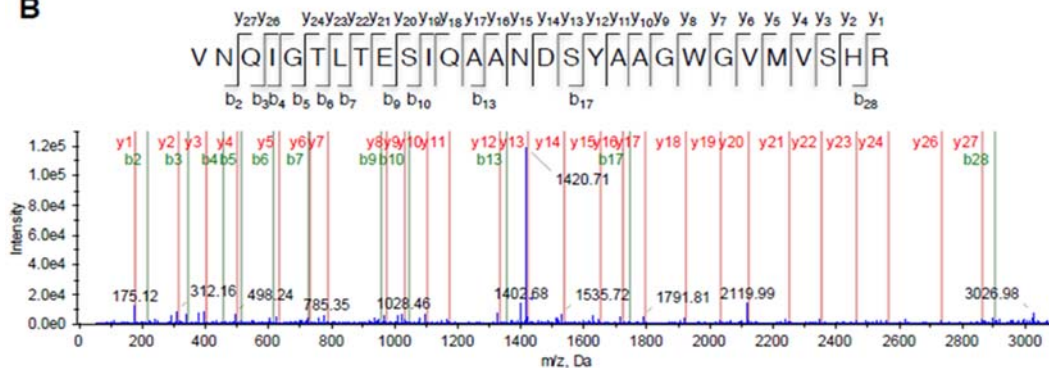


Figura 20. Identificación de la proteína recombinante enolasa 1 de *C. albicans* (rCaEno1) por espectrometría de masas en tándem. A, secuencias de los péptidos identificados por espectrometría de masas en tándem (letras negras) con más del 95% de confianza, que alcanzaron una cobertura del 20.68% del total de la secuencia de aminoácidos de la rCaEno1. Relación m/z para los correspondientes iones precursores de los péptidos identificados. B, espectro de masas del péptido VNQIGTLTESIQAANDSYAAGWGMVSHR.

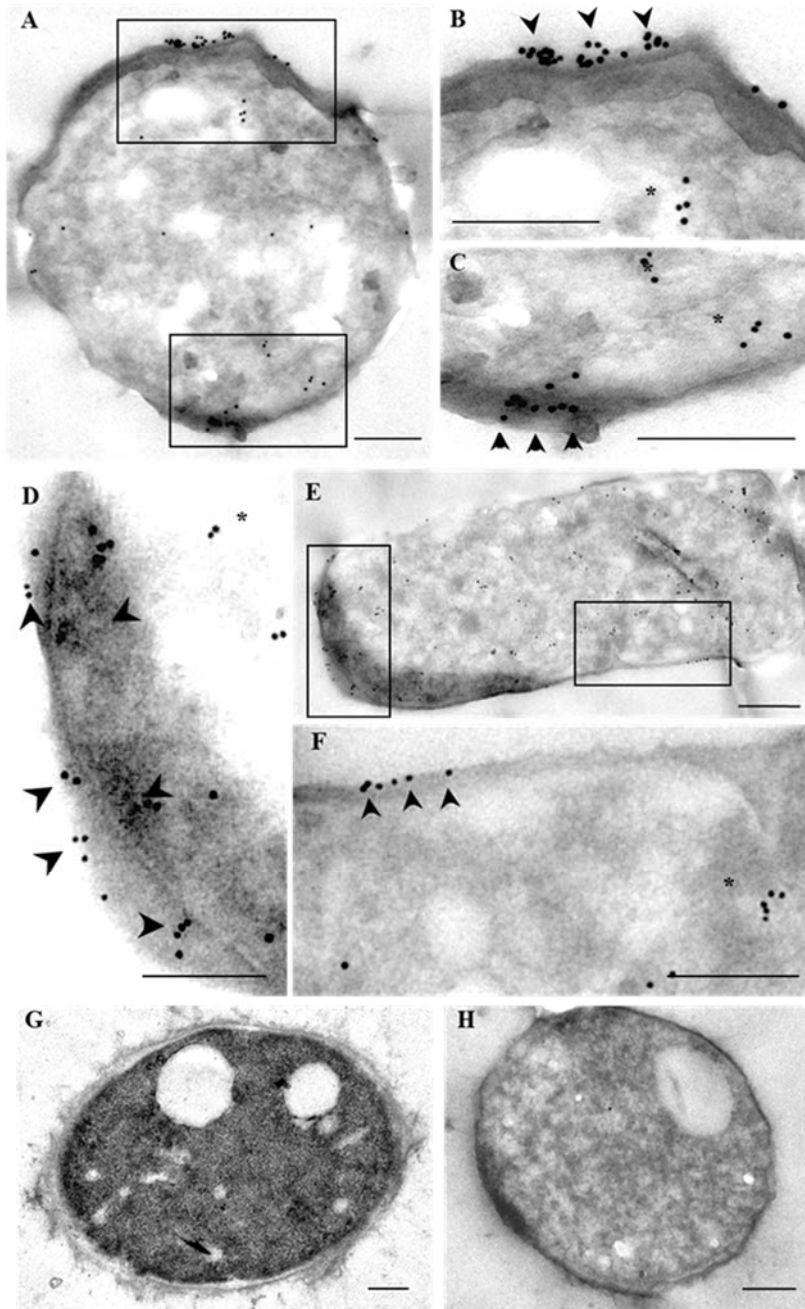


Figura 21. Inmunolocalización de la proteína Eno1 en *C. albicans*. En las micrografías A-F, inmunodetección de la proteína CaEno1 marcada con oro coloidal en diferentes regiones de las levaduras de *C. albicans*: citoplasma, cercanas a la membrana plasmática, en la pared celular interna y externa (asteriscos). G y H, control sin anticuerpo primario anti-CaEno1. La barra de escala corresponde a 200 nm.

7.5 La enolasa de *C. albicans* tiene actividad de TGasa

Para demostrar que la enolasa tiene actividad de TGasa, primero verificamos que la proteína recombinante tuviera actividad de enolasa, la cual se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorción del fosfoenolpiruvato, ya que cuando esta molécula es transformada en 2-fosfoglicerato, se observa una reducción de la densidad óptica a 240 nm de 0.2 (Fig. 22A), demostrando la actividad de enolasa, la cual fue inhibida por el anticuerpo anti-rCaEno1, así como por el ion fluoruro, un inhibidor específico de la enolasa (Kustrzeba-Wojcicka & Golczak, 2000). Como control negativo usamos un anticuerpo contra la proteína recombinante antígeno nuclear de proliferación celular de *Entamoeba histolytica* (anti-rEhPCNA), la cual no inhibió la actividad de enolasa. Esta actividad fue dependiente de iones magnesio (Fig. 22A), como previamente se había reportado (Faller, Baroudy, Johnson, & Ewall, 1977).

La actividad de TGasa fue determinada usando a la proteína rCaEno1 como fuente enzimática. Interesantemente, la proteína rCaEno1 mostró actividad de TGasa en presencia y ausencia de Ca^{2+} (Fig. 22B). Es bien sabido que la actividad de TGasa en *C. albicans* y *S. cerevisiae* es dependiente de iones calcio (Iranzo et al., 2002; Ruiz-Herrera et al., 1995). La actividad de TGasa en ausencia de calcio exógeno puede ser debida a la incorporación de este catión a la enzima durante la expresión en bacterias y fue conservado durante el proceso de purificación. Para probar esta hipótesis, usamos EDTA para quelar el calcio endógeno; como resultado, la enzima no mostró actividad de TGasa (Fig. 22B). Este comportamiento fue similar cuando la actividad de TGasa fue evaluada usando cistamina 50 mM. Para probar si el anticuerpo anti-rCaEno1 era capaz de inhibir a la enzima, realizamos un ensayo de actividad de TGasa con la proteína previamente incubada con el anticuerpo anti-rCaEno1. Sorprendentemente, este anticuerpo no inhibió la actividad de TGasa pero sí la incrementó en un 100 % (Fig. 22B). Estos resultados sugieren que podría haber dos diferentes sitios activos en la molécula de enolasa, uno para la actividad de enolasa y otro para la actividad de TGasa.

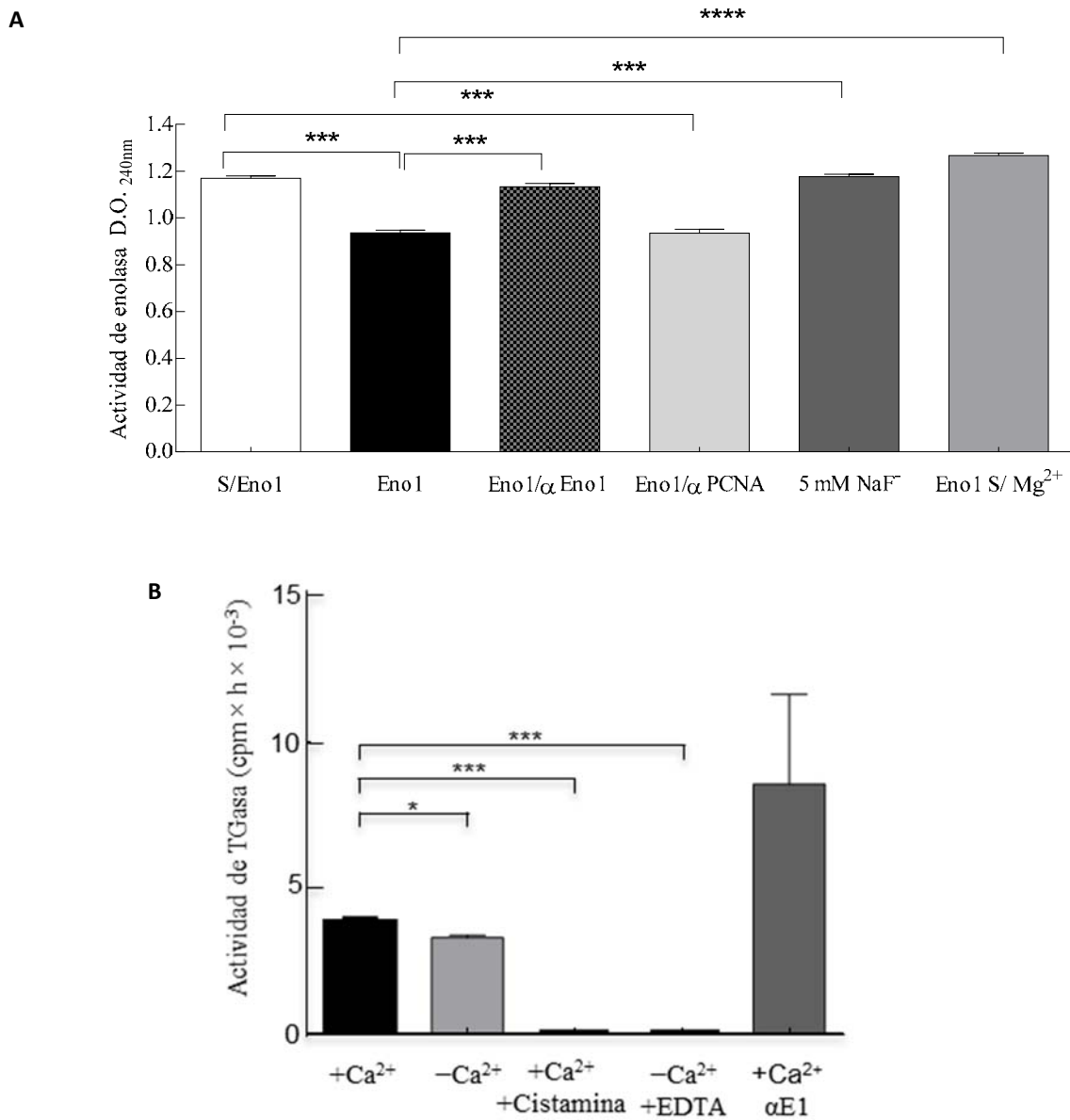


Figura 22. Determinación de las actividades de enolasa y transglutaminasa de la enzima rCaEno1. A, la actividad de enolasa se determinó utilizando la proteína rCaeno1 purificada. B, la actividad de TGasa se determinó utilizando a la proteína rCaEno1 purificada. Estos resultados nos permiten concluir que la proteína rCaEno1 tiene ambas actividades de enolasa y de transglutaminasa. Test estadístico *t* no pareado. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$. Las barras se muestran con error estándar de la media. E1, enolasa 1; S-Ab, anticuerpo específico (anti-rCaEno1); αPCNA, anticuerpos específicos (anti-rEhPCNA).

7.6 Los inhibidores de la TGasa, Cistamina y MDC afectan el proceso de miceliación de la cepa de *C. albicans* 26555

Evaluamos la inhibición de la miceliación utilizando ambos inhibidores de la actividad de TGasa, cistamina y MDC, en la cepa de *C. albicans* 26555 (Fig. 23). La cistamina disminuyó la transición levadura a micelio (Fig. 23A), como sucedió con *C. albicans* CAI4. Sin embargo, la miceliación fue mucho mayor y la cantidad de material extracelular floculante fue escasa en esta cepa, en comparación con *C. albicans* CAI4 (Fig. 14, D-L). La MDC inhibió completamente la transición de levadura a micelio en una concentración de 2 mM, sin observar un daño en la superficie celular (Fig. 23B).

Figura 23.

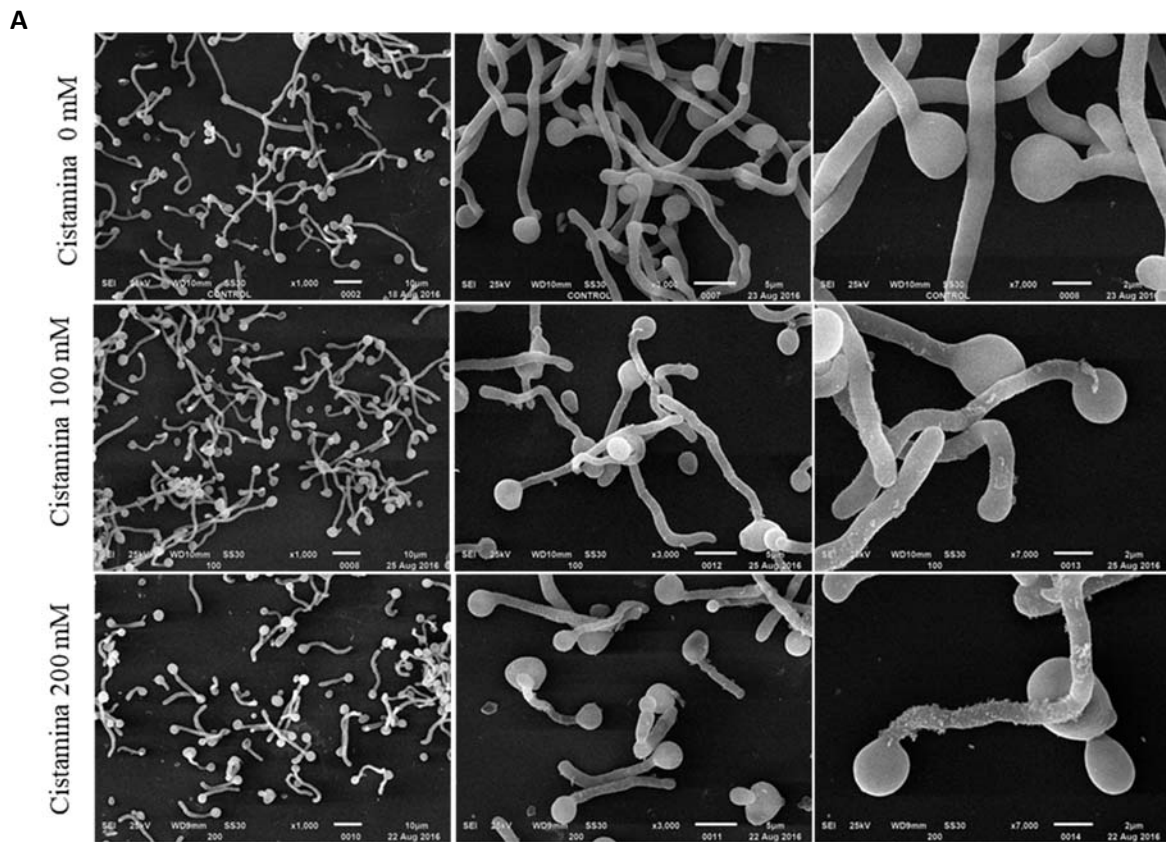


Figura 23. Continuación.

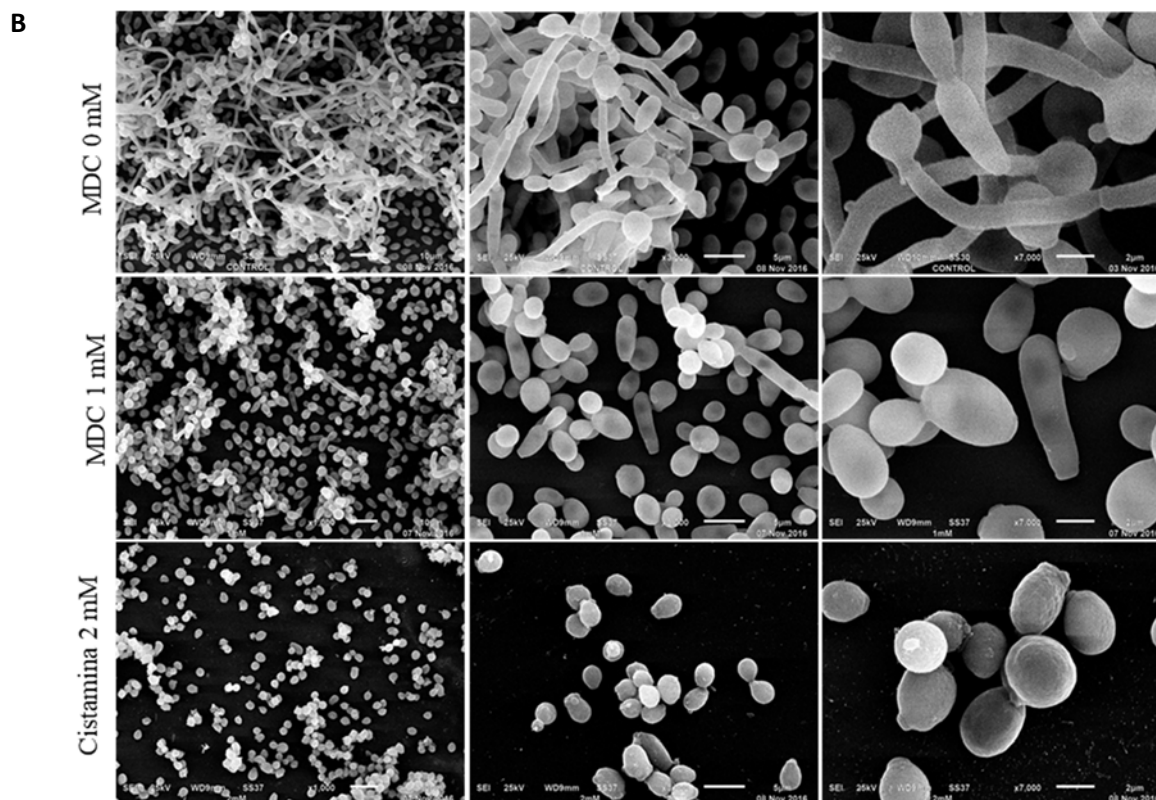


Figura 23. Efecto de la cistamina y MDC en la transición levadura a micelio de la cepa de *C. albicans* ATCC 26555. Levaduras de *C. albicans* ATCC 26555 se crecieron con o sin el inhibidor de la actividad de TGasa (cistamina o MDC) en medio LEE a 37°C por 4 h, y se observaron por SEM. A, las levaduras se incubaron con 100 y 200 mM de cistamina, mostraron disminución de la formación de hifas y escaso material extracelular. B, levaduras de *C. albicans* fueron incubadas con 1 y 2 mM de MDC, observándose una inhibición total de la formación de micelio.

7.7 Caracterización de aceptores de la TGasa en la pared celular de *C. albicans*

Con la finalidad de conocer la naturaleza de los sustratos endógenos de la TGasa, paredes purificadas fueron incubadas con lisina [C^{14}] y el material proteico secuencialmente extraído con SDS, zimoliasa y quitinasa. Los materiales solubilizados fueron analizados por SDS-PAGE al 10% y fluorografía. Del total de la cantidad de la radioactividad incorporada en las paredes celulares por acción de la actividad de la TGasa, cerca del 40% fue solubilizado por SDS, en donde la zimoliasa liberó 15% y la quitinasa el 23%. Las proteínas solubilizadas con SDS tienen una aparente masa molecular menor de 50 kDa, mientras que la masa molecular de material liberado por la quitinasa y la zimoliasa mostraron una masa molecular mayor de 180 kDa.

El análisis por espectrometría de masas de las proteínas solubilizadas con SDS al 2 %, reveló la presencia de 1046 proteínas únicas, las cuales fueron clasificadas en “Gene Ontology Panther”. Las clases más abundantes para la clasificación proteica por función molecular corresponden a las proteínas con actividades catalíticas, de unión, estructurales, y de transporte. En el caso de clase de proteínas, las proteínas más abundantes fueron de unión a ácidos nucleicos, oxidorreductasas, hidrolasas, y transferasas (Fig. 24). Por otro lado, en el caso de las proteínas liberadas con zimoliasa, identificamos 37 proteínas. Panther clasificó estas proteínas de acuerdo con su función molecular en siete categorías (Fig. 25). Cuando se agruparon de acuerdo a las clases de proteínas, fueron categorizadas en 10 grupos. La clase con más proteínas fue la de unión a ácidos nucleicos, oxidorreductasas, hidrolasas y de transporte. Finalmente, el tratamiento con quitinasa liberó 41 proteínas, las cuales fueron clasificadas por Panther en seis categorías de acuerdo con su función molecular, con actividades catalíticas, de unión, estructurales, de transporte y por clase molecular, se agruparon en nuevas categorías. Las dos más representativas fueron de unión a ácidos nucleicos y oxidorreductasas (Fig. 26). Interesantemente, la enolasa 1 fue encontrada en la extracción secuencial con SDS al 2%, zimoliasa y quitinasa.

SDS

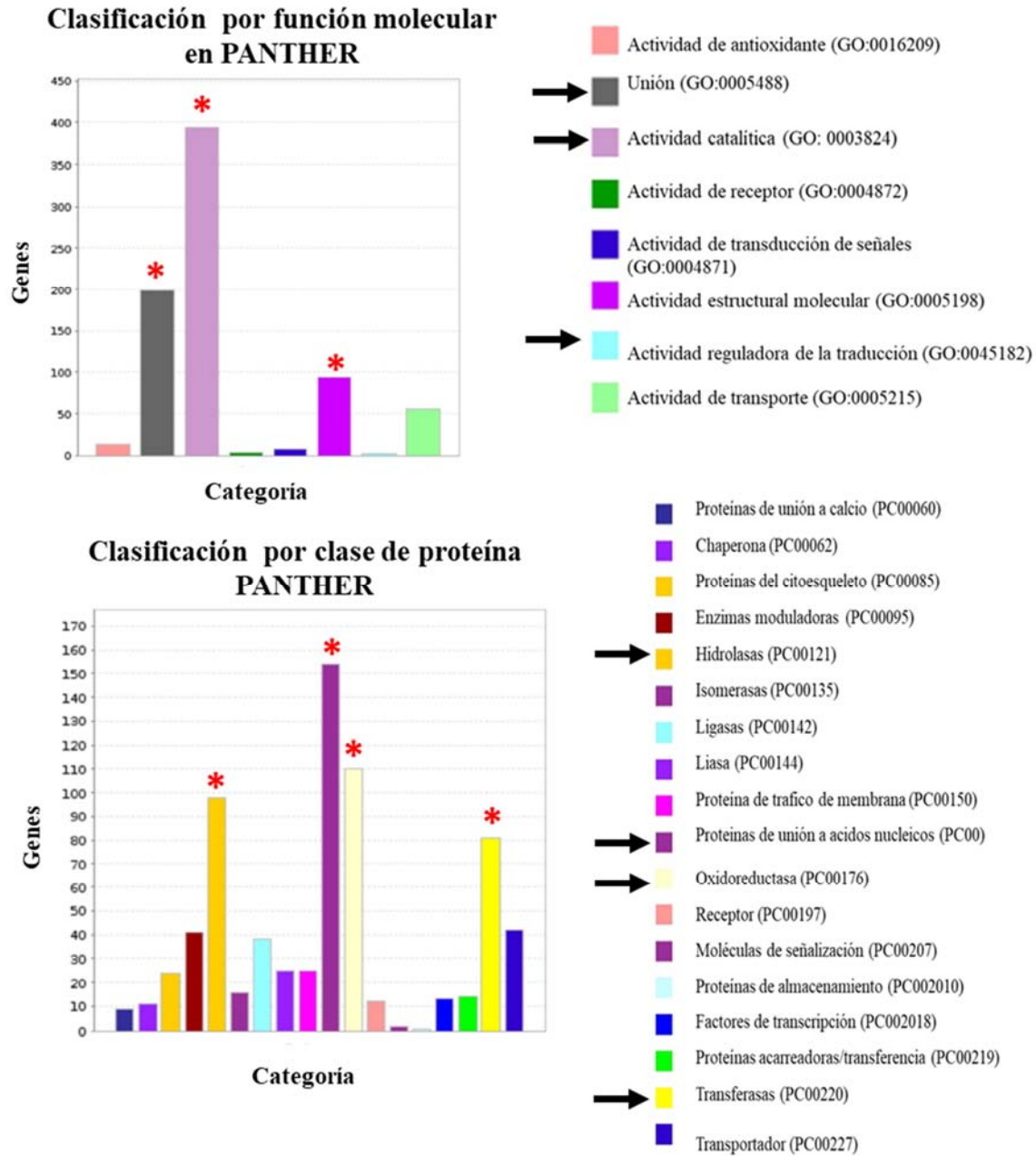


Figura 24. Clasificación de proteínas extraídas con SDS 2% en el sistema de clasificación “Gene Ontology Panther”. Las proteínas (1046) fueron categorizadas de acuerdo con su función molecular (A) y clase de proteína (B).

Zimoliasa

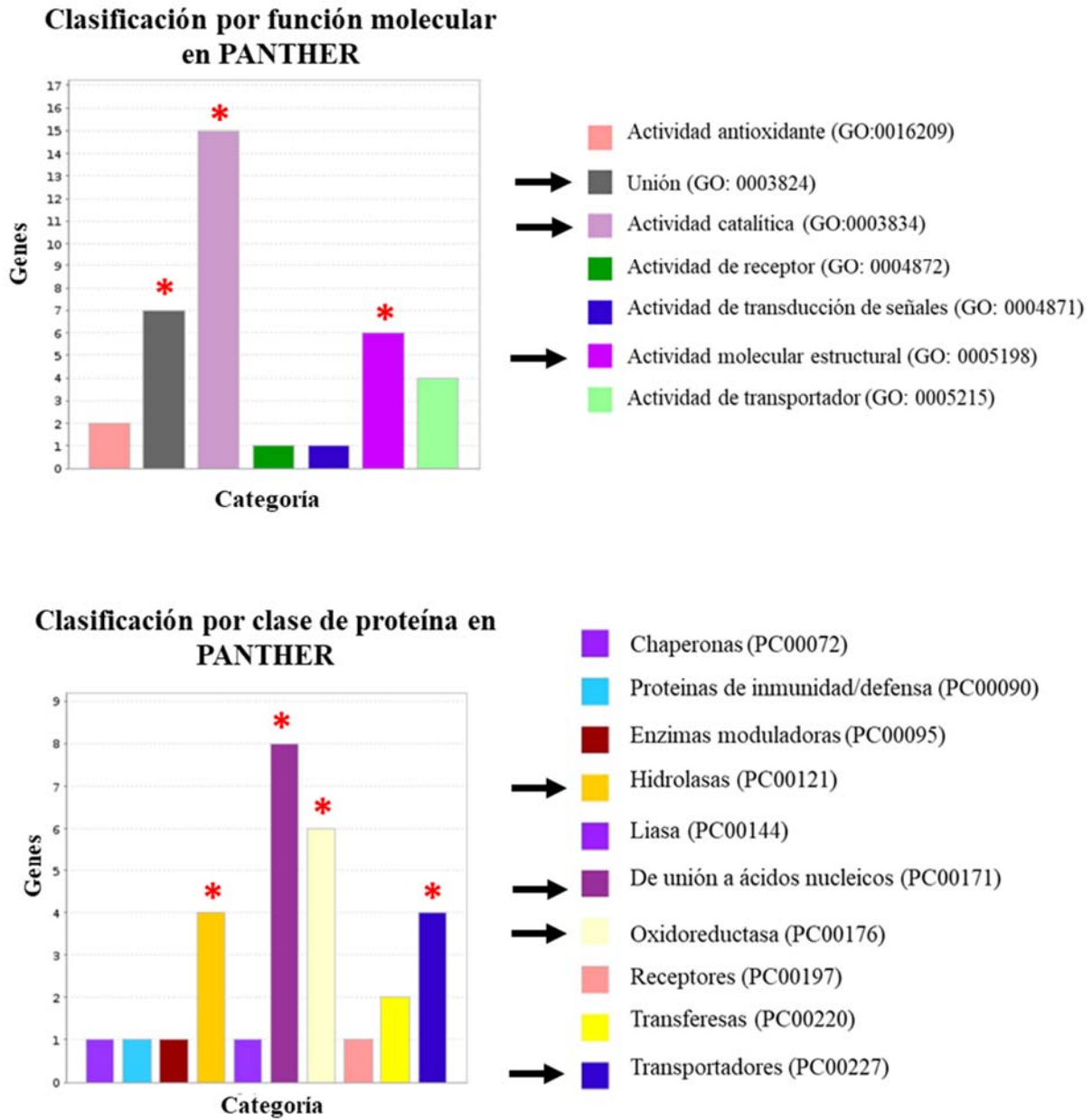


Figura 25. Clasificación de proteínas extraídas con zimoliasa en el sistema de clasificación “Gene Ontology Panther”. Las 37 proteínas fueron categorizadas de acuerdo con su función molecular (A) y clase de proteína (B).

Quitinasa

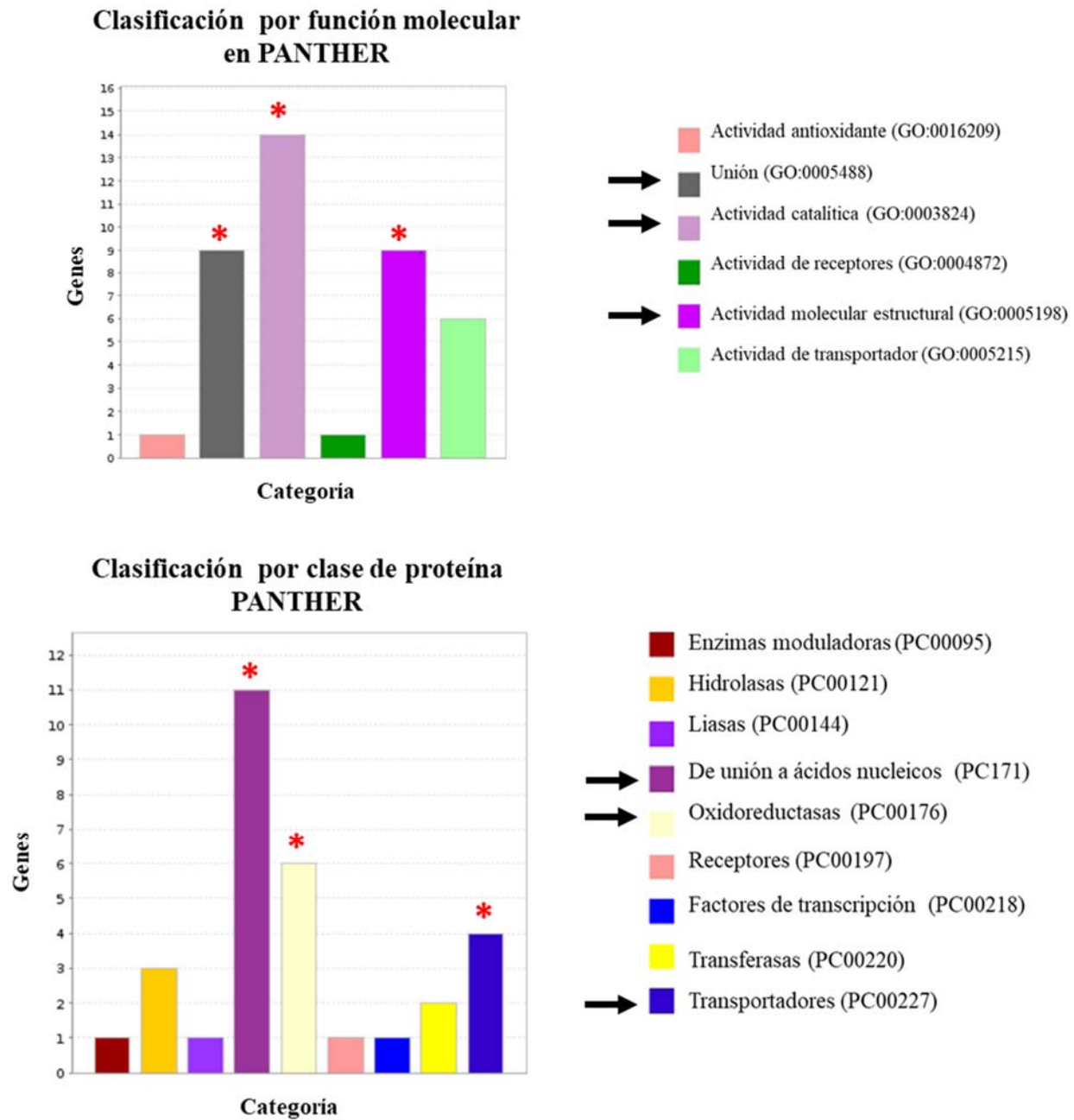


Figura 26. Clasificación de proteínas extraídas con quitinasa en el sistema de clasificación “Gene Ontology Panther”. Las 41 proteínas fueron categorizadas de acuerdo con su función molecular (A) y clase de proteína (B).

7.8 Determinación del sitio catalítico putativo de TGasa en la Eno1 de *C. albicans*

Con la finalidad de determinar el sitio activo de enolasa y TGasa en la proteína Eno1 de *C. albicans*, realizamos un alineamiento de los polipéptidos CaEno1 y ScEno1, las cuales mostraron un 78% y 88% de similitud en los 436 aminoácidos comparados, respectivamente (Fig. 27).

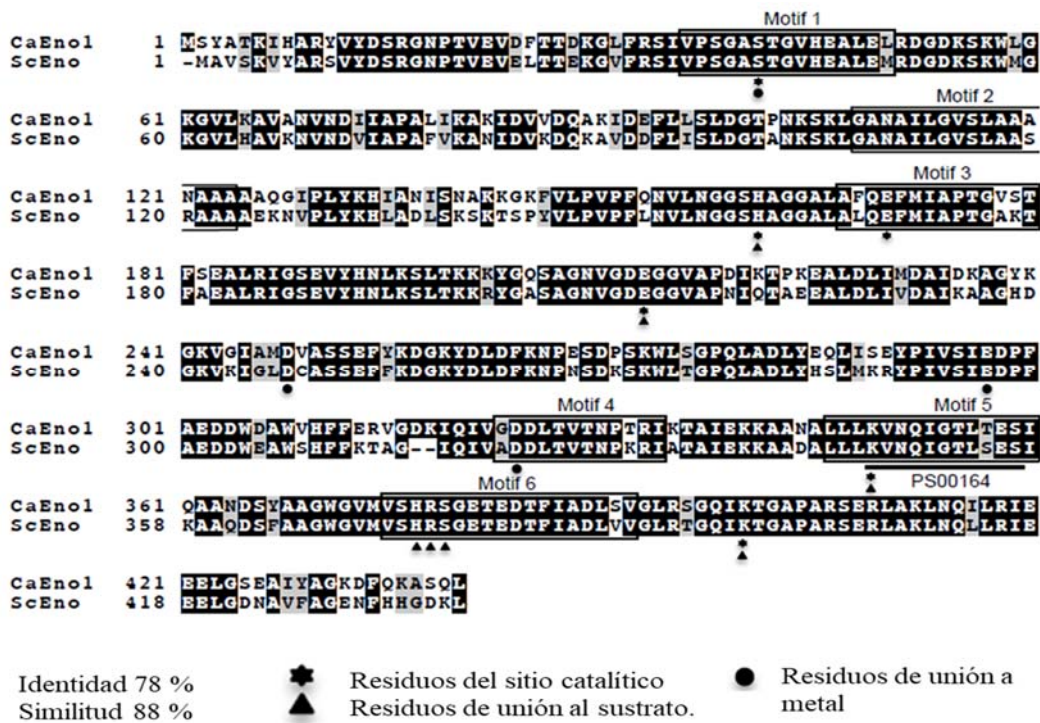


Figura 27. Alineamiento Clustal Omega de las secuencias de aminoácidos de la enolasa 1 de *C. albicans* y *S. cerevisiae*. Los residuos idénticos son resaltados en negro y los residuos conservados son resaltados en gris. Los residuos en rectángulos corresponden a los motivos 1-6 encontrados en la familia de la enolasa (PRINTS código: PR00148). Los residuos subrayados corresponden al motivo conservado PS000164 PROSITE encontrado en las enolasa. De acuerdo con la familia de dominios de proteínas conservadas cd03313: círculos, residuos de unión a metal; triángulos, residuos de unión a sustrato; asteriscos, residuos correspondientes al sitio catalítico.

La estructura CaEno1 fue obtenida por modelaje por homología en el programa Modeler, usando como la estructura de ScEno1 (PDB código 2a11) como templado (Fig. 28, A y B). La similitud estructural de ambas proteínas fue visualizada por la superposición de ambas estructuras (Fig. 28C). Adicionalmente, mostraron residuos idénticos en el sitio catalítico de enolasa, así como residuos involucrados en la unión a los iones Mg^{2+} y el sustrato (Fig. 29). Sin embargo, el potencial electrostático de la superficie de CaEno1 presentó un valor negativo, en donde la proteína ScEno1 presentó un valor de superficie más positiva (Fig. 28D y E).

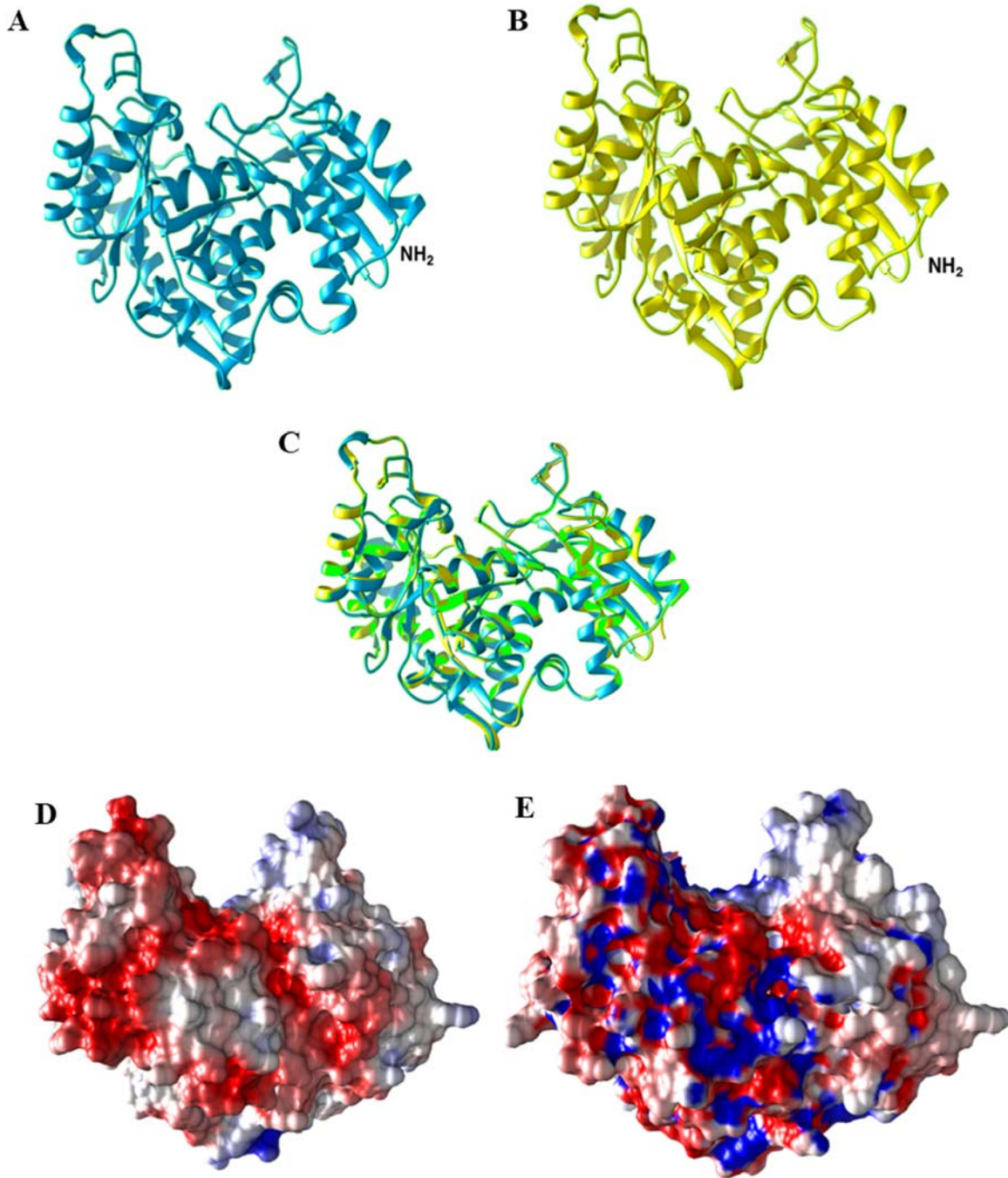


Figura 28. Comparación estructural de los modelos moleculares de las proteínas CaEno1 y ScEno1. La estructura de la CaEno1 fue teóricamente determinada por modelaje por homología usando la estructura de ScEno1 como templado, correspondiente al heterodímero compuesto de una subunidad activa y una inactiva (RCSB PDB ID 2a11) y visualizada con el programa quimera. La estructura de la CaEno1 fue solo comparada con la subunidad activa (A y B).

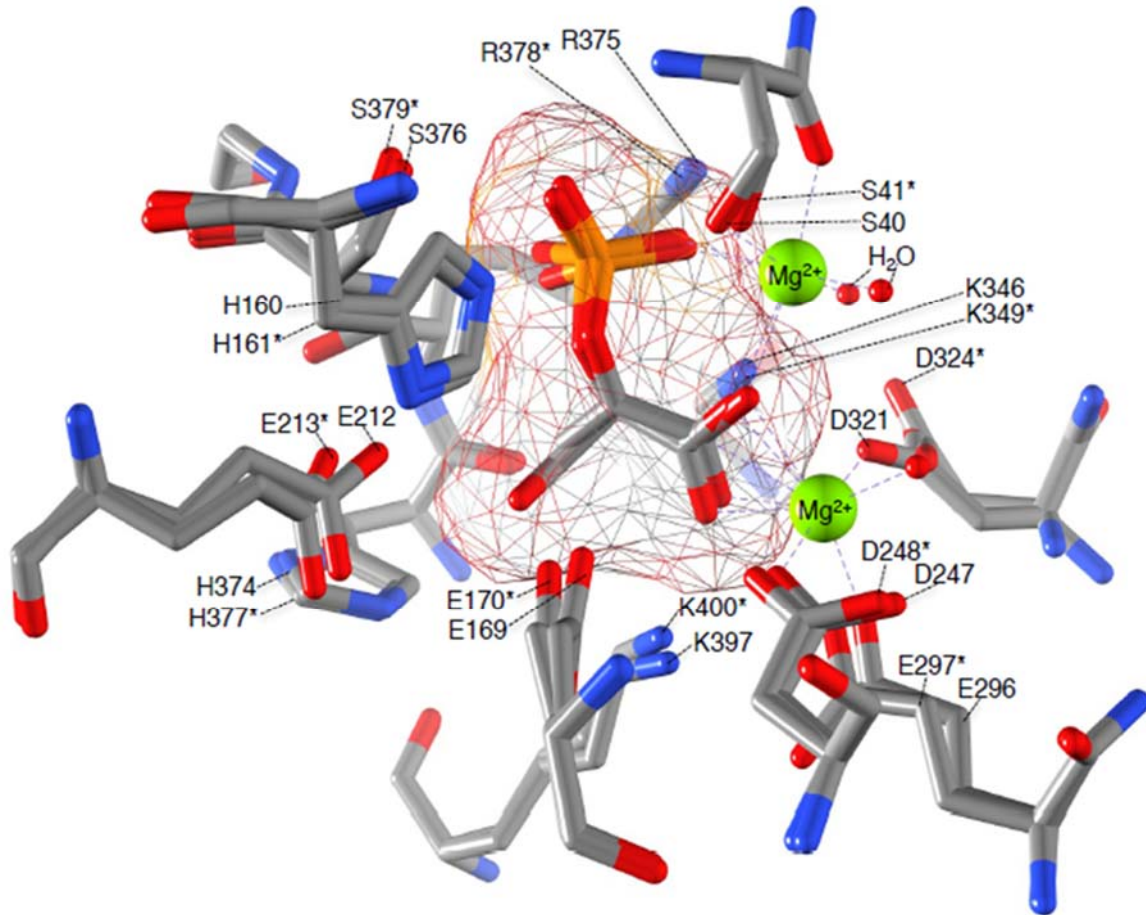


Figura 29. Comparación del sitio catalítico de las proteínas CaEno1 y ScEno1 con el fosfoenolpiruvato/2-fosfoglicerato. La superficie del sustrato/producto es representado por la malla. Los asteriscos corresponden a los residuos de la enolasa 1 de *C. albicans*.

7.9 Alineamiento de la CaEno1 con otras transglutaminasas

Para localizar regiones conservadas de TGasa en la proteína CaEno1, realizamos un alineamiento de la proteína enolasa 1 de *C. albicans* con las TGasas de *Anopheles gambiae*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Apis mellifera*, y *Homo sapiens* (TGasa y Factor XIII) con el programa Clustal Omega, mostrando una identidad de 18.72 %, 15.54 %, 18.59 %, 17.36 %, 16.85 % y 20.61 % con estas proteínas, respectivamente (Fig. 30). Aunque la identidad fue baja, identificamos un posible sitio catalítico de la TGasa (AFQEFMIAPTGVSTFSEALR) en CaEno1, el cual se muestra subrayado en la figura 29, y corresponde al motivo identificado en PROSITE, el PS00547, el cual muestra la secuencia (GT)Q(CA)WVX(SA)(GAS)(IVT)X(LMSC)R(CSAG)(LV)G (<http://prosite.expasy.org/PS0054>). Este posible sitio catalítico de la TGasa fue localizado en la estructura de la proteína CaEno1 (Fig. 31). Interesantemente, el residuo Glu170 en esta secuencia es parte del sitio catalítico de la enolasa (Fig. 31).

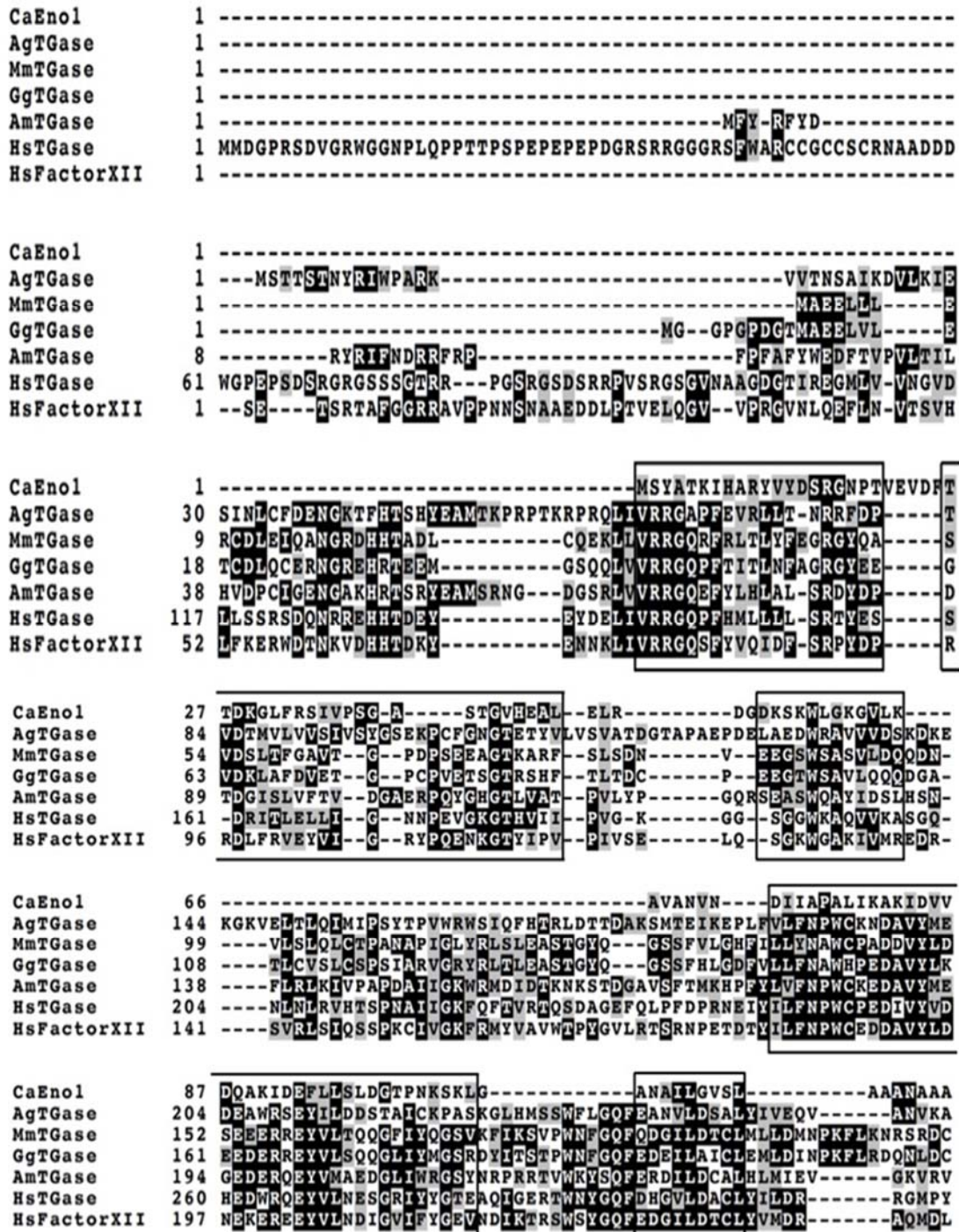


Figura 30. Alineamiento en Clustal Omega de la secuencia de la Enol de *C. albicans* otras TGases de *Anopheles gambiae* (Ag), *Mus musculus* (Mm), *Gallus gallus* (Gg), *Apis mellifera* (Am) y *Homo sapiens* (Hs).

Continuación de la figura 30.

CaEnol	125	AAQGIPLYK--HIANISNAKK-GKFVLPVPFQNVLNGGSHA---GGALAFQEFM-----
AgTGase	258	PISGNPVLVIRALSGALNTAD-GTGVLOGNWSNNYEGGTAPTSWTGSAKILOEFYDTG-E
MmTGase	212	SRRSSPIYVGRVSDMVNCND-DQGVLLGRWDNNGDGISPMAWIGSVDILRRWKEHGCO
GgTGase	221	SRRNDPVYIGRVVSAMVNCNEDHGVLGRWDNHYEDGMSPMAWIGSVDILKRRRLGCO
AmTGase	248	SARHDPVYISRVLSAAVNSPD-DNGALMGNWSNDFGGGTPPTKWLGSQKILQOYYKTR-K
HsTGase	313	GGRGDPVNVSRVLSAMVNSLD-DNGVLIGNWSGDYSRGTNPSAWVGSVEILLSYLRTG-Y
HsFactorXII	250	SGRGNPIKVS RVGSAMVNAKD-DEGVLVGSWDNIYAYGVPPSAWTGSVDILLEYRSE-N
CaEnol	173	-----IAPTGVSTFSEALRIGSEVYHNLKSLTKKKYGQSAAGNVGDEGGVAPDIKTPK
AgTGase	316	RVKYGQCWVFAGLLTVCRAIGIPSRITNFESAGDHDASLS-----
MmTGase	271	QVKYGQCWVFAAVACTVLRCLGIPTRVVTNYSAHQNSNLL-----
GgTGase	281	PVKYGQCWVFAAVACTVMRCLGVP SRVVTNYSAHDTNGNLV-----
AmTGase	306	PVKYGQCWVFSGLATICRALGLPCRVTNYSAHDTQSSLT-----
HsTGase	371	SVPYGQCWVFAGVTTVLRCLGLATRTVTNYSAHDTDTSLT-----
HsFactorXII	308	PVRYGQCWVFAGVFNFLRCLGIPARIVTNYFSAHDNDANLQ-----
CaEnol	225	EALDLIMDAIDKAGYKGVGIAMDVASSEFYKDGKYDLDFKNPESDPSKWLSGPOLA---
AgTGase	358	IDYFVDDSE-----KTGAGMT-----VDSIW-----NYHVWSEVWMOQRKDLHNPT
MmTGase	313	IEYFRNEFG-----EL-ETNK-----SEMIW-----NFHCWVESWMTRPDLQ-PG
GgTGase	323	IDRYLSETG-----ME-ERRS-----TDMIW-----NFHCWVECWMTRPDLA-PG
AmTGase	348	VDYFVDAEG-----KVMKEIN-----RDSVW-----NFHVWNEVWMKRDDIS-AE
HsTGase	413	MDIYFDENM-----KPLEHLN-----HDSVW-----NFHVWNCWMKRPDL P-SG
HsFactorXII	350	MDIFLEEDG-----NVNSKLT-----KDSVW-----NYHCWNEAWMTRPDL P-VG
CaEnol	282	-----DLYEQLISE-----YPIVSTIEDPFAEDDWDVWHVFFERVGDKIQIVG-DDL
AgTGase	398	YDGWQAVDATPQVLSGGMFKCGPCPVSAIKQGHVHVYPDGEFIIYAEVNADVVIWYSIGNDQ
MmTGase	351	YEGWQAVDPTPQERSEGTGCCPVSRAIKEGDLSTKYDAPFVFAEVNADVVDWIRODE
GgTGase	361	YDGWQAVDPTPQERSEGVYCCGPAVVKAIKEGDLQVOYDTPFVFAEVNADVVIWIVQSD-
AmTGase	387	YSGWQAVDATPQELSEYAYRCGPASVIGVKRGDVLRPYDNFVFAEVNADIVFWRYNGPT
HsTGase	452	FDGWQAVDATPQETSSTGIFCCGPCSVESIKNGLVYMKYDTPFIYAEVNSDKVYVQRQDD-
HsFactorXII	389	FGGWQAVDSTPQENS DGMVRCGPASVQAIKHGHVCFQFDAPFVFAEVNSDLIYITAKKD-
CaEnol	327	TVTNPTRIKTAIEKKAANALLKVNQIGTLTESIQAA-----NDSVYAGWGVMSHRS
AgTGase	458	NPPKPL-----EISTAQVGNISTKAVGSGKREDVTERYKY-----PELDS
MmTGase	410	GSVLKW-----MNRSLIVGQKISTKSVGRDDREDITHYKY-----PEGS
GgTGase	420	GEKPKS-----THSSVVGKNISTKSVGRDSREDITHYKY-----PEGS
AmTGase	447	OPLKLI-----QKDAYGIGQLISTKAVGKWTREDITHYKY-----PEKS
HsTGase	511	GSFKIV-----YVEEKAIGTLIVTKAISSNMREDITYLYKH-----PEGS
HsFactorXII	448	GTHVVE-----NVDATHIGKLIIVTKQIGGDGMMDITDITYK-----PEGQ

Continuación figura 30:

```

CaEnol      380  GETEDTFIADLSVGLRSGQIKTGAPAR-----SERLAKLNQILRIEELGSEAIYAGKDF
AgTGase     498  KEERDVMKTAMKYSSQR-FSSAGLAKRLLGAMVNDSNGTEDAIQLEIKC-DEELTLGTTF
MmTGase     450  PEEREVFTKANHLNKL-----AEKEETGVAMRIRV-QG-YEHGNDF
GgTGase     459  EKEREVFSKAEHEKSS-----LGEQEEGLHMRIKL-SEGANNGSDF
AmTGase     487  EEERATMLKALRQSQSL-FSRYY-----LNDEFNDVTFDFEL-RDDIVIGPPF
HsTGase     551  DAERKAVETAAAHGSKPNVYA-----NRGSAEDVAMQVEA-Q-DAVMGODL
HsFactorXII 488  EEERLALETALMYGAKKPLNTEG-----VMKSRSNVDMDFEV-E-NAVLGKDF
    
```

```

CaEnol      435  QKASQL-----
AgTGase     556  QIEVVVTCASAVSSVEVTGKLVLRDSDYTGRDMATLKVTP-FAKLEPRESKSIIVPLEY
MmTGase     489  DVFAHIGNDT-SETRECRLLLCARTVSYNGVLGPECGTED-INLTLDPYSENSIPLRILY
GgTGase     499  DVFAFISNDT-DKERECRLLRLCARTASYNGEVGPQCGFKDLLNLSLOPHMEQSVPLRILY
AmTGase     533  SVVLSIKNRSDRNEYEVSVILRVETVLYTGRVGPVKRWS-VNRVVPRTVEEARMDVSW
HsTGase     595  MVSVMLINHS-SSRRTVKLHLYLSVTFFYTGVSGTIFKETK-KEVELAPGASDRVTMPVAY
HsFactorXII 534  KLSITFRNNS-HNRYTITAYLSANITFFYTGVPKAEFKET-FDVTLEPLSFKEAVLIQA
    
```

```

CaEnol      615  GEYKTMDTHKTNLRAICTAEVKGSDRTYFKLKNFHLSVPAELSVVEHSTSG-PIAVQVD
AgTGase     547  EKYSDCLTESNLIKVRGLLIEPAANSYLAERDLYENPEIKIRVLGEPKQNRKLVAEVS
MmTGase     558  EQYGPNLTQDNMIKVVALLTEYETGDSVVAIRDVYIQNPEIKIRLGEPMQERKLVAEIR
GgTGase     592  QEYGPRLLDQCAFNVACLATVKDTNFEYFAODDFRVRKPDIAIRLENEAVVGDELKATAR
AmTGase     653  KEYRPHLVDQGAMLLNVSGHVKESGQVLAKOHTFRLRTPDLSLTLLGAVVGQECEVQIV
HsTGase     592  GEYMQLLEQASLHFFVTARINETRDVLAKQKSTVLTIPEIIKVRGTQVVGSDMTVTVE
    
```

```

CaEnol      674  LSNPLPVPLTGGRFVVEGSRYTD-PMEKKYESI-PAGETVQFIYPINLSHKGKMVVTASF
AgTGase     607  LKNPLSDPLYDCIFTVEGAGLTKEQKSVEVSDPVPAGDLVKARVDLSTDIGLEKLVVNF
MmTGase     618  LVNPLAEPLNCIFVVEGAGLTEGRIEELDPVEPQAEAKFRMEFVPRQAGLEKLMVDF
GgTGase     652  FQNPLPIPLNKRFLIEGPGLDE-QLKVKLPDPVRTGAYAECSFSMVPRYEGRATIAAKF
AmTGase     713  FKNPLPVTLTNVVFRLEGSGLQR-PKILNVGDI-GGNETVTLROSFVPRPGPRQLIASL
HsTGase     652  FTNPLKETLRNVVHLDGPGVTR-PMKKFREI-RPNSTVQWEVCRPVSGHRKLIASM
    
```

```

CaEnol      732  VSKELKNVHGDLTIDIP-----
AgTGase     667  QCDKLKSVEKYRNVIGPA-----
MmTGase     678  ESDKLTGVKGYRNVIAPLEK-----
GgTGase     711  YSNELEDVDGFVNFMVKRNGD-----
AmTGase     771  DSPQLSQVHGVIQVDVAPAPGDGGFFSDAGGDSHLGETIPMASRGGA
HsTGase     710  SSDSLRHVYGELDVQIQRRPSM-----
    
```

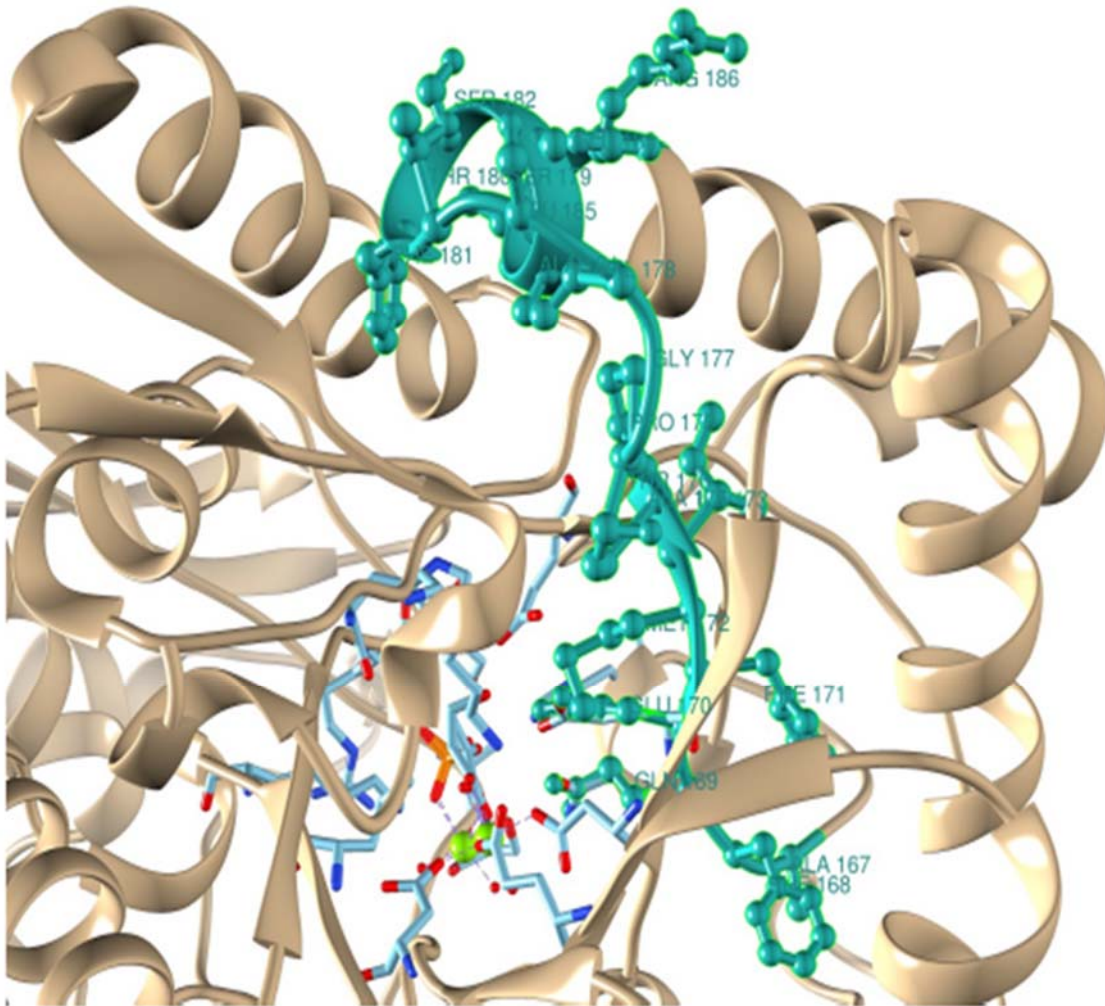


Figura 31. Identificación del sitio activo putativo de TGasa (verde) en la estructura de la CaEno1. Este corresponde al péptido AFQEMIAPTGVSTFSEALR en PROSITE PS00547 ([GT]-Q-[CA]-W-V-x- [SA]-[GAS]-[IVT]-x(2)-T-x-[LMSC]-R-[CSAG]-[LV]-G) (<http://prosite.expasy.org/PS0054>).

8. DISCUSIÓN

Candida albicans es el principal hongo patógeno en pacientes inmunocomprometidos en el mundo (Hani, Shivakumar, Vaghela, Osmani, & Shrivastava, 2015). La primera estructura que tiene contacto con el huésped es la pared celular, la cual le confiere forma, protección osmótica y defensa contra la respuesta inmune del hospedero. Los componentes de la pared celular se entrecruzan y proporcionan estabilidad a esta estructura a través de diferentes tipos de enlaces químicos. La actividad de transglutaminasa está involucrada en la formación de enlaces covalentes en la pared celular, previamente demostrada en *S. cerevisiae* y *C. albicans* (Iranzo et al., 2002; Ruiz-Herrera et al., 1995). La inhibición de la TGasa por cistamina y MDC, los cuales son inhibidores irreversible y reversible (Keillor & Apperley, 2016; Lai, Slaughter, Peoples, Hettasch, & Greenberg, 1998; Lorand & Conrad, 1984), respectivamente, incrementa la osmosensibilidad de las células después de la digestión parcial del glucano con la zimoliasa (Reyna-Beltran et al., 2018). Una disminución en la densidad óptica a 600 nm de los cultivos incubados con inhibidores de la TGasa, indicó afectación de la función protectora de la pared celular contra los cambios osmóticos generados por la degradación previa del glucano por la zimoliasa.

En este trabajo identificamos a la enolasa 1 de *C. albicans*, una de las enzimas glucolíticas encontradas en las vesículas extracelulares y en la pared celular de levaduras por Gil-Bona et al., 2015, cuya función no había sido claramente dilucidada, como una enzima con actividad de TGasa en la pared celular de *C. albicans*. Considerando la alta similitud entre la enolasa de *S. cerevisiae* y la enolasa 1 de *C. albicans*, también la enolasa de *S. cerevisiae* podría llevar a cabo la actividad de TGasa (Fig. 27). La inhibición de esta actividad por la cistamina afectó el crecimiento de las levaduras de *C. albicans* en función de la concentración del inhibidor (Fig. 5), lo cual podría ser debido a afectaciones en el ciclo celular, puesto que nuestros resultados mostrados por TEM indican cambios en el patrón de división (Figs. 6 y 7), siendo el porcentaje de afectación del 2% (a 50 y 100 mM de cistamina) y del 8.4% para 200 mM de cistamina. Estos cambios en la afectación del patrón de división celular se observaron a nivel de ultraestructura, específicamente en la pared celular, los cuales

también fueron observados por SEM (Fig. 6). Además, se encontró la presencia de material fibrilar, aparentemente unido a la pared celular, el cual fue observado únicamente en las células de mayor tamaño que el promedio (Fig. 6). Para corroborar esta hipótesis, nosotros planteamos como perspectivas de este trabajo evaluar el ciclo celular en células que fueron tratadas con cistamina, por citometría de flujo y microscopía confocal, utilizando marcadores de ciclo celular como ciclinas D, E, A y B.

Además de la presencia de material fibrilar en las células más grandes que el promedio, la capa externa de la pared celular parece estar ausente en estas células. Este material fibrilar podría corresponder a manoproteínas, puesto que estas se encuentran en la capa más externa de la pared celular y se han observado como fibras paralelas entre sí y perpendiculares a la superficie celular (Fig. 6) (Chaffin, 2008; Munro, 2013; Ruiz-Herrera et al., 2006). También observamos la acumulación de material electrón denso en la superficie de las paredes celulares (Fig. 8), el cual parece ser diferente al material fibrilar observado por SEM; estas discrepancias en los resultados podrían deberse a los métodos diferentes utilizados en los estudios.

El aumento de material electrón denso, además de restos de membranas, cuerpos lipídicos, así como de vesículas dentro de las vacuolas (Fig. 7, B-D), sugirió incremento de la autofagia, como resultado del estrés generado en las células por la inhibición de la actividad de TGasa; este proceso fue confirmado al evaluar el incremento del marcador de autofagia, la proteína Atg8, en relación con la concentración de cistamina utilizada en los cultivos (Fig. 9C). En condiciones normales de cultivo, se lleva a cabo la autofagia, pero con baja actividad. La proteína Atg8, junto con el resto de la maquinaria autofágica, se encuentran en el citoplasma en un sitio muy cercano a la vacuola denominado PAS; la forma citoplasmática de la proteína Atg8 tiene una masa molecular de 16 kDa, la cual, durante la autofagia, se procesa mediante la adición de una molécula de fosfatidiletanolamina (PE), para localizarse en las estructuras de doble membrana, lo cual modifica su masa molecular a 14 kDa. En este estudio, encontramos la forma modificada de Atg8, observada como un barrido que abarca desde los 14 kDa a los 16 kDa (Fig. 9G). La forma procesada del Atg8 no fue observada en las células usadas como un control, incluso con el implemento de la

electroforesis de SDS-PAGE en gradiente del 4 al 20% en presencia del agente desnaturalizante urea 6 M. La banda de 125 kDa detectada en los ensayos de Western blot disminuye con el incremento de las concentraciones de cistamina utilizadas (Fig. 9C), la cual podría corresponder a la proteína Atg8 asociada con otras proteínas de la maquinaria autofágica en un complejo que no fue disgregado con el buffer de Laemmli. Estos datos se corroboraron por la detección de la proteína Atg8 por inmunofluorescencia (Fig. 10, B-D).

Además, la notable inhibición de la actividad de TGasa no afectó la cantidad de los componentes de la pared celular en los tiempos evaluados (una a seis horas), aunque parece observarse una oscilación en los contenidos a los diferentes tiempos para los tres componentes (Fig. 11). Analizando el contenido de quitina por microscopía confocal, se observó una mayor fluorescencia a las seis horas (Fig. 12), que fue el tiempo en el que se encontró una mayor afectación en la curva de crecimiento. Sin embargo, no se observó variación significativa para los componentes mayoritarios de la pared, quitina, glucano, y manoproteínas (Fig. 13).

Otro proceso que es considerado esencial en la patogenicidad de *C. albicans* es la transición levadura a micelio (Lo et al., 1997). Al evaluar este proceso, nuestros resultados mostraron que la actividad de TGasa es requerida para esta transición, puesto que ambos inhibidores de la TGasa, la cistamina y la MDC, bloquearon la miceliación en *C. albicans* 26555 (Fig. 23) y para el caso del primer inhibidor el proceso en la cepa *C. albicans* CAI4 (Fig. 14). Sin embargo, hubo diferencias en la respuesta de las células a la inhibición. La cepa CAI4 mostró más secreción de material floculante que la cepa ATCC 26555, así como hifas cortas. Estas diferencias podrían ser atribuidas a la delección del gen *Ura3* en la cepa CAI4, el cual es un gen esencial en la miceliación (Kirsch & Whitney, 1991). Esta mutación es pleiotrópica porque también afecta los niveles de expresión citosólicos de las proteínas: Ura3p, Hpt1p, Ald5p, Sgt2p, Pmm1p, IPF6037, Aro8p, Ade2p, Ura5p, Eft2p, Aro10p, Hem13p, Rps12p, Toa2p, y IPF4328 (Brand, MacCallum, Brown, Gow, & Odds, 2004). Estas proteínas tienen diferentes funciones en el metabolismo. Hpt1p, Ade2p, y Ura5p están involucradas en el metabolismo de purinas y pirimidinas. Hem13p y Ald5p participan en la biosíntesis del grupo hemo, donde Aro8p y Aro10p tiene un papel en el recambio de

aminoácido aromáticos. Finalmente, Rps12p, Eft2p, y IPF6037p participan en los procesos de transcripción o traducción (Brand et al., 2004). Aunque nosotros no probamos la virulencia de las células tratadas con cistamina, creemos que esta característica podría estar afectada, pues *C. albicans*, después del tratamiento con cistamina, no es capaz de filamentar, lo cual se ha reportado ser esencial durante el proceso de invasión en tejidos por *C. albicans* (Lo et al., 1997).

La identificación de CaEno1 como una proteína con dos funciones no es única. La enolasa se ha descrito como una proteína multifuncional que también tiene funciones no glucolíticas en varias especies. En *C. albicans* fue inmunolocalizada usando los anticuerpos anti-CaEno1 generados en conejo, en donde la proteína enolasa fue inmunodetectada muy cercana a la membrana plasmática, en el citoplasma, en la pared interna y externa de las células de levadura de *C. albicans* (Fig. 21). Interesantemente, en humanos la α -enolasa es considerada una proteína multifuncional cuyas funciones incluyen, un papel como factor neurotrópico, proteína de estrés involucrada en hipoxia, proteína de choque térmico o como parte de los centrosomas (Johnstone, Waisman, & Rattner, 1992). Adicionalmente, la α -enolasa tiene la capacidad de unión a proteínas del citoesqueleto, tal como la F-actina y la tubulina (Diaz-Ramos, Roig-Borrellas, Garcia-Melero, & Lopez-Aleman, 2012). Además, interactúa con APIP (proteína de interacción APAF1), MRI1 (homólogo en levadura de la metiltioribosa isomerasa), ADI1 (acireductona dioxigenasa), ADD2 (aduccina 2 β), ADD1 (aduccina 1 β), ADD3 (aduccina 3 γ), SMS (espermina sintasa) y UBA6 (enzima activadora del modificador tipo ubiquitina 6) (base de datos String). Nuestros resultados bioinformáticos muestran que la proteína CaEno1 interactúa con varias proteínas de la vía glucolítica en *S. cerevisiae*, incluyendo PGI1 (fosfoglucoasa isomerasa), TPI1 (triosa fosfato isomerasa), CDC19 (piruvato cinasa), TDK1 (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa 1) TDK2 (gliceraldehído deshidrogenasa 2), TDH3 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa isoenzima 3), PYK2 (piruvato cinasa), PGK1 (3-fosfoglicerato cinasa), GPM1 (fosfoglicerato mutasa tetramérica) y la ENO2 (enolasa II) (de acuerdo con la base de datos String). La enolasa de *S. cerevisiae* tiene una función adicional como chaperona de unión a preMSK1p para el importe del tRNA a la mitocondria (Entelis, 2006), la cual también podría ser una función en *C. albicans*. La enolasa 1 de *C. albicans* interactúa con Cbk1 (cinasa 1 en

la biosíntesis de la pared celular) (base de datos BioGRID) (Diaz-Ramos, 2012), una cinasa Ser/Thr que pertenece a la RAM (regulación del factor de transcripción Ace2p y morfogénesis polarizada), la cual es una red de señalización involucrada en el crecimiento polarizado, morfogénesis de la separación celular y formación del biofilm ((Bharucha et al., 2011; Gutierrez-Escribano et al., 2011; Gutierrez-Escribano et al., 2012; McNemar & Fonzi, 2002; Song et al., 2008).

Por otra parte, la enolasa 1 es considerada el antígeno más abundante en pacientes con candidiasis y confiere una ventaja para la invasión cuando se une a la plasmina e induce fibrinólisis (Jong et al., 2003; Klingspor, Stintzing, & Tollemar, 1997). Estudios previos indican que la mutante nula es susceptible a varias drogas, no filaminta y tiene reducida virulencia en ratones (Ko, Hsiao, Chen, & Yang, 2013). En *S. cerevisiae*, la enolasa recombinante causa fusión vacuolar *in vitro*, y la mutación nula de este gen generó fragmentación vacuolar como un resultado de la fisión vacuolar (Decker & Wickner, 2006).

Las proteínas CaEno1 y ScEno1 tienen un 78% de identidad y 88% de similitud en los 436 aminoácidos comparados (Fig. 27). La estructura de la CaEno1 fue obtenida por homología con el programa Modeler, usando la estructura de la ScEno1 (código 2a11 en PDB) como templado (Fig. 28), la cual tiene buena calidad como se muestra por Verify3D (98.40% de los residuos tuvieron un puntaje promedio de ≥ 0.2 3D-1D), Errat (factor de calidad total de proteína 89.744). La proteína CaEno1 se clasificó en la base de datos CATH como un miembro de la superfamilia de las enolasas con el código 3.20.20.120, el cual indica que la CaEno1 que contiene principalmente α -hélices y cadenas β -plegadas y tiene un dominio barril α - β tipo TIM. La similitud entre ambas proteínas fue evidenciada por la superposición de las dos estructuras (Fig. 28C). Adicionalmente, las dos estructuras tienen residuos catalíticos idénticos, como los residuos de unión al Mg^{2+} o de unión al sustrato (Fig. 29). Sin embargo, el potencial electrostático de superficie de CaEno1 tiene un valor negativo, mientras que el de ScEno1 tiene un valor de superficie positivo. Esto podría generar diferencias en la interacción de estas enolasas con otras proteínas. Debido a la similitud de las dos proteínas, ScEno1 podría tener actividad de transglutaminasa.

Nuestros datos indican que la enolasa no muestra el mismo sitio catalítico para las actividades de enolasa y transglutaminasa, pues los anti-rCaEno1 solo inhiben la actividad de enolasa. Contrariamente, favorece la reacción de transamidación (Fig. 22) debido a posibles cambios conformacionales en la proteína, lo cual ha sido demostrado con la TG2 de humano. En este caso, los cambios conformacionales están involucrados en el control de la actividad enzimática y son importantes para la regulación de los autoanticuerpos en la enfermedad celiaca (Iversen, 2014).

Un alineamiento con el programa Clustal Omega mostró que la proteína CaEno1 tiene una identidad de 18.72, 15.54, 18.59, 17.36, 16.85, y 20.61% con las transglutaminasas de *Anopheles gambiae*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Apis mellifera*, y *Homo sapiens* (TGasa y Factor XIII), respectivamente. Sin embargo, la similitud aumentó en algunas cajas conservadas (Fig. 30). Incluso, aunque la identidad sea baja, identificamos un posible sitio catalítico de la TGasa (AFQEFMIAPTGVSTFSEALR) en CaEno1, el cual se muestra subrayado en la Fig. 30, la cual corresponde al dominio identificado en PROSITE con la clave PS00547 y cuya secuencia corresponde a (GT)Q(CA)WVX(SA)(GAS)(IVT)X(LMSC)R(CSAG)(LV)G (<http://prosite.expasy.org/PS0054>). Este posible sitio catalítico de la TGasa fue localizado en la estructura de la proteína CaEno1 (Fig. 31). Interesantemente, el residuo Glu-170 en esta secuencia es parte del sitio catalítico de la enolasa (Fig. 31). Otros residuos (AFQEFMIA) están localizados en una cadena β plegada, la cual se encuentra cercana al sitio activo de la enolasa. Los residuos restantes se localizan en una α hélice. Esto podría sugerir que el sitio activo de la TGasa necesita un cambio conformacional para ser funcional, dependiendo del pH y la presencia de iones calcio. Previamente, han sido descritos dos estados conformacionales de la TG2 humana, la conformación abierta y la conformación cerrada. La presencia del GTP sin Ca^{2+} induce la conformación cerrada de la TG2, la cual no tiene actividad de TGasa; cuando sólo está presente el Ca^{2+} , la conformación de la TGasa es abierta y tiene actividad de TGasa (Iversen, 2014). Nosotros consideramos que la presencia de iones calcio, el pH y la concentración de los sustratos, al igual que en la TG2 de humano, promueve que la enolasa lleve a cabo la función de TGasa. Para corroborar esta hipótesis, nosotros

pretendemos cristalizar la proteína CaEno1 en condiciones de actividad de TGasa para la determinación de su estructura por difracción de rayos X.

Por último, procedimos a la identificación de los posibles blancos que usa la TGasa en las reacciones de transamidación en la pared celular. La digestión del glucano por la liticasa o la zimoliasa causa la formación de protoplastos o esferoplastos, los cuales son altamente sensibles al choque osmótico. Así, la TGasa cataliza la formación de enlaces isopeptídicos entre la lisina [^{14}C] y proteínas de bajo y alto peso molecular, proporcionando protección osmótica a las células (Reyna-Beltran & Iranzo, 2018). Con la finalidad de conocer la naturaleza de las proteínas que son sustratos endógenos de la TGasa en la pared celular de *C. albicans*, realizamos digestión secuencial con SDS, zimoliasa y quitinasa. Interesantemente, encontramos por espectrometría de masas de las proteínas marcadas con lisina [^{14}C], liberadas por SDS, una diversidad de proteínas (1046) con diferentes funciones en la célula, incluyendo glucólisis, funciones mitocondriales, traducción, estrés por choque térmico, proteínas de membrana, proteínas estructurales, proteínas de unión a ácidos nucleicos, entre otras. El promedio de masa molecular de estas proteínas es alrededor de los 50 kDa, aunque muchas también se encontraron en un alto peso molecular (entre 50 y 220 kDa). Esta diferencia en el peso molecular nos sugiere la unión por enlaces iónicos a otras proteínas de la pared celular o que estas proteínas podrían no tener la longitud completa en la pared celular, y los fragmentos podrían ser entrecruzados a otros componentes de la pared celular por acción de la transglutaminasa. Por otro lado, el número de proteínas liberadas por acción de la zimoliasa y quitinasa de forma secuencial, fue mucho menor (37 y 41 proteínas, respectivamente). Las proteínas liberadas por la zimoliasa fueron principalmente subunidades ribosomales, proteínas glucolíticas, proteínas de choque térmico, y seis proteínas de pared celular, las cuales corresponden: a la proteína 4 parecida a la aglutinina (A0AID8PQ89), quitinasa 2 (P40953), proteína 1 parecida a la aglutinina (Q5A8T4), proteína 14 unida covalentemente a la pared celular (Q5AFN8), la superóxido dismutasa de Cu de superficie celular (Q5AD07), y la proteína 2 responsable del pH (O13318), la cual tiene actividad de 1,3- β -glucanosiltransferasa. Interesantemente, el promedio de la masa molecular de estas proteínas estuvo entre los 16 y 268 kDa, indicando que ellos son

entrecruzados de forma covalente al glucano o a otros componentes de la pared celular para ensamblarse a complejos de alto peso molecular por acción de la actividad de TGasa.

Las proteínas liberadas con quitinasa fueron similares a las liberadas con la zimoliasa y podrían estar unidas a la quitina o al glucano. Por ello, es necesario la realización de más estudios para determinar el papel de estas proteínas en la pared celular. Recientemente, se publicó la composición de vesículas extracelulares (EVs) aisladas de *C. albicans* (Gil-Bona et al., 2015), en las cuales se encontraron proteínas similares a las descritas en este trabajo. Algunas de estas incluyen proteínas involucradas en oxidación-reducción, metabolismo, traducción, estrés, transporte, vías de señalización y función mitocondrial. Sin embargo, la función de estas proteínas en la EVs aún es desconocida. Sin embargo, creemos que debemos realizar más experimentos para confirmar estos resultados. También es necesario determinar con mayor certeza, las proteínas que son entrecruzadas por la TGasa y que estén marcadas con ^{14}C . Para ello, es necesario conocer la composición isotópica de las proteínas intactas y aportar así, mayores evidencias de las proteínas que son entrecruzadas covalentemente por la TGasa.

9. Conclusiones

1. La inhibición de la TGasa con cistamina afectó la velocidad de crecimiento celular en levaduras de *C. albicans*.
2. Esta inhibición también alteró el patrón de división celular de manera dependiente de la concentración de cistamina utilizada.
3. En respuesta al estrés por la cistamina se indujo el proceso de autofagia.
4. La inhibición de la TGasa no alteró las cantidades de quitina, glucano y manoproteínas de la pared celular, pero sí la organización de la pared celular que conduce a una mayor osmosensibilidad.
5. Se identificó a la enolasa 1 en la pared celular como la responsable de la actividad de TGasa. Esto se demostró expresando la proteína recombinante rCaEno1 y midiendo las actividades de enolasa y de TGasa.
6. Los anticuerpos anti-rCaEno1 inhibieron la actividad de enolasa, pero no la actividad de TGasa, lo cual sugiere que estas actividades enzimáticas están en la misma proteína, y no comparten el mismo sitio catalítico.
7. Los experimentos de inmunolocalización por microscopía electrónica corroboraron la presencia de la enolasa en la pared celular.
8. Los resultados estructurales del putativo sitio catalítico de TGasa muestran que no se comparte con el sitio catalítico de enolasa.
9. La inhibición de la TGasa por la cistamina afecta negativamente el proceso de miceliación en *C. albicans* CAI4. Además, este inhibidor y la MDC también inhiben este proceso en *C. albicans* 26555. Por este y otros resultados de otro laboratorio, la TGasa se establece como un posible blanco terapéutico.

10. Perspectivas

1. Cristalizar la enolasa 1 de *C. albicans* en condiciones para la actividad de enolasa y de transglutaminasa, con la finalidad de identificar el sitio catalítico de la TGasa.
2. Identificar las proteínas marcadas con ^{14}C por espectrometría de masas.
3. Realizar estudios de ciclo celular para determinar si hay una afectación del mismo.
4. Diseñar nuevos inhibidores de la TGasa con potencial uso clínico.

11. Bibliografía

- (CDC), U. S. D. o. H. a. H. S. C. f. D. C. a. P. (2013). Antibiotic resistance threats in the United States. CDC, Atlanta, GA. .
- Adams, D. J. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, 150(Pt 7), 2029-2035. doi: 10.1099/mic.0.26980-0
- Aeschlimann, D., & Paulsson, M. (1994). Transglutaminases: protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids. *Thromb Haemost*, 71(4), 402-415.
- Amberg, D. C. (2005). *Methods in yeast genetics : a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*: 2005 edition. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, [2005] ©2005.
- Angiolella, L., Facchin, M., Stringaro, A., Maras, B., Simonetti, N., & Cassone, A. (1996). Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics. *J Infect Dis*, 173(3), 684-690.
- Avilan, L., Gualdrón-López, M., Quinones, W., González-González, L., Hannaert, V., Michels, P. A., & Concepción, J. L. (2011). Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites-perspectives for its use as a therapeutic target. *Enzyme Res*, 2011, 932549. doi: 10.4061/2011/932549
- Baba, M., Osumi, M., Scott, S. V., Klionsky, D. J., & Ohsumi, Y. (1997). Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J Cell Biol*, 139(7), 1687-1695.
- Barsigian, C., Fellin, F. M., Jain, A., & Martínez, J. (1988). Dissociation of fibrinogen and fibronectin binding from transglutaminase-mediated cross-linking at the hepatocyte surface. *J Biol Chem*, 263(28), 14015-14022.
- Bechtel, J. T., Winant, R. C., & Ganem, D. (2005). Host and viral proteins in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol*, 79(8), 4952-4964. doi: 10.1128/jvi.79.8.4952-4964.2005
- Beninati, S., & Folk, J. E. (1988). Covalent polyamine-protein conjugates: analysis and distribution. *Adv Exp Med Biol*, 250, 411-422.
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*, 4(165), 165rv113. doi: 10.1126/scitranslmed.3004404
- Bulik, D. A., Olczak, M., Lucero, H. A., Osmond, B. C., Robbins, P. W., & Specht, C. A. (2003). Chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in response to supplementation of growth medium with glucosamine and cell wall stress. *Eukaryot Cell*, 2(5), 886-900.
- Cabib, E., Blanco, N., Grau, C., Rodríguez-Pena, J. M., & Arroyo, J. (2007). Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to beta(1-6)glucan in the

- Saccharomyces cerevisiae cell wall. *Mol Microbiol*, 63(3), 921-935. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05565.x
- Cabib, E., Roberts, R., & Bowers, B. (1982). Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. *Annu Rev Biochem*, 51, 763-793. doi: 10.1146/annurev.bi.51.070182.003555
- Cabib, E., Roh, D. H., Schmidt, M., Crotti, L. B., & Varma, A. (2001). The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem*, 276(23), 19679-19682. doi: 10.1074/jbc.R000031200
- Calderone, R., Sun, N., Gay-Andrieu, F., Groutas, W., Weerawarna, P., Prasad, S., . . . Li, D. (2014). Antifungal drug discovery: the process and outcomes. *Future Microbiol*, 9(6), 791-805. doi: 10.2217/fmb.14.32
- Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue), D233-238. doi: 10.1093/nar/gkn663
- Carneiro, C. R., Postol, E., Nomizo, R., Reis, L. F., & Brentani, R. R. (2004). Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect*, 6(6), 604-608. doi: 10.1016/j.micinf.2004.02.003
- Castaldo, C., Vastano, V., Siciliano, R. A., Candela, M., Vici, M., Muscariello, L., . . . Sacco, M. (2009). Surface displaced alfa-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein. *Microb Cell Fact*, 8, 14. doi: 10.1186/1475-2859-8-14
- Cohen, C. M., Dotimas, E., & Korsgren, C. (1993). Human erythrocyte membrane protein band 4.2 (pallidin). *Semin Hematol*, 30(2), 119-137.
- Cutler, J. E. (2001). N-glycosylation of yeast, with emphasis on *Candida albicans*. *Med Mycol*, 39 Suppl 1, 75-86.
- Chaffin, W. L. (2008). *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72(3), 495-544. doi: 10.1128/mmbr.00032-07
- Chertova, E., Chertov, O., Coren, L. V., Roser, J. D., Trubey, C. M., Bess, J. W., Jr., . . . Ott, D. E. (2006). Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *J Virol*, 80(18), 9039-9052. doi: 10.1128/jvi.01013-06
- Chung, S. I. (1972). Comparative studies on tissue transglutaminase and factor XIII. *Ann N Y Acad Sci*, 202, 240-255.
- de Groot, P. W., de Boer, A. D., Cunningham, J., Dekker, H. L., de Jong, L., Hellingwerf, K. J., . . . Klis, F. M. (2004). Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot Cell*, 3(4), 955-965. doi: 10.1128/ec.3.4.955-965.2004
- Donofrio, F. C., Calil, A. C., Miranda, E. T., Almeida, A. M., Benard, G., Soares, C. P., . . . Mendes Giannini, M. J. (2009). Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*:

- isolation and identification as a fibronectin-binding protein. *J Med Microbiol*, 58(Pt 6), 706-713. doi: 10.1099/jmm.0.003830-0
- Douglas, C. M., D'Ippolito, J. A., Shei, G. J., Meinz, M., Onishi, J., Marrinan, J. A., . . . Kurtz, M. B. (1997). Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(11), 2471-2479.
- Dranginis, A. M., Rauceo, J. M., Coronado, J. E., & Lipke, P. N. (2007). A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71(2), 282-294. doi: 10.1128/mubr.00037-06
- Duran, J. M., Anjard, C., Stefan, C., Loomis, W. F., & Malhotra, V. (2010). Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *J Cell Biol*, 188(4), 527-536. doi: 10.1083/jcb.200911154
- Ecker, M., Deutzmann, R., Lehle, L., Mrsa, V., & Tanner, W. (2006). Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to beta-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem*, 281(17), 11523-11529. doi: 10.1074/jbc.M600314200
- Edwards, S. R., Braley, R., & Chaffin, W. L. (1999). Enolase is present in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*, 177(2), 211-216.
- Elorza, M. V., Murgui, A., & Sentandreu, R. (1985). Dimorphism in *Candida albicans*: contribution of mannoproteins to the architecture of yeast and mycelial cell walls. *J Gen Microbiol*, 131(9), 2209-2216. doi: 10.1099/00221287-131-9-2209
- Eroles, P., Sentandreu, M., Elorza, M. V., & Sentandreu, R. (1997). The highly immunogenic enolase and Hsp70p are adventitious *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology*, 143 (Pt 2), 313-320. doi: 10.1099/00221287-143-2-313
- Escalona-Montano, A. R., Ortiz-Lozano, D. M., Rojas-Bernabe, A., Wilkins-Rodriguez, A. A., Torres-Guerrero, H., Mondragon-Flores, R., . . . Aguirre-Garcia, M. M. (2016). *Leishmania mexicana*: promastigotes and amastigotes secrete protein phosphatases and this correlates with the production of inflammatory cytokines in macrophages. *Parasitology*, 143(11), 1409-1420. doi: 10.1017/s0031182016000949
- Esgleas, M., Li, Y., Hancock, M. A., Harel, J., Dubreuil, J. D., & Gottschalk, M. (2008). Isolation and characterization of alpha-enolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*. *Microbiology*, 154(Pt 9), 2668-2679. doi: 10.1099/mic.0.2008/017145-0
- Faller, L. D., Baroudy, B. M., Johnson, A. M., & Ewall, R. X. (1977). Magnesium ion requirements for yeast enolase activity. *Biochemistry*, 16(17), 3864-3869.
- Fernandes, C., Anjos, J., Walker, L. A., Silva, B. M., Cortes, L., Mota, M., . . . Goncalves, T. (2014). Modulation of *Alternaria infectoria* cell wall chitin and glucan synthesis by cell wall synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(5), 2894-2904. doi: 10.1128/aac.02647-13

- Folk, J. E. (1980). Transglutaminases. *Annu Rev Biochem*, 49, 517-531. doi: 10.1146/annurev.bi.49.070180.002505
- Folk, J. E., & Finlayson, J. S. (1977). The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. *Adv Protein Chem*, 31, 1-133.
- Fradin, C., Slomianny, M. C., Mille, C., Masset, A., Robert, R., Sendid, B., . . . Poulain, D. (2008). Beta-1,2 oligomannose adhesin epitopes are widely distributed over the different families of *Candida albicans* cell wall mannoproteins and are associated through both N- and O-glycosylation processes. *Infect Immun*, 76(10), 4509-4517. doi: 10.1128/iai.00368-08
- Free, S. J. (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv Genet*, 81, 33-82. doi: 10.1016/b978-0-12-407677-8.00002-6
- Fujii, T., Shimoi, H., & Iimura, Y. (1999). Structure of the glucan-binding sugar chain of Tip1p, a cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 1427(2), 133-144.
- Gil-Navarro, I., Gil, M. L., Casanova, M., O'Connor, J. E., Martinez, J. P., & Gozalbo, D. (1997). The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J Bacteriol*, 179(16), 4992-4999.
- Gow, N. A., van de Veerdonk, F. L., Brown, A. J., & Netea, M. G. (2011). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*, 10(2), 112-122. doi: 10.1038/nrmicro2711
- Harding, T. M., Hefner-Gravink, A., Thumm, M., & Klionsky, D. J. (1996). Genetic and phenotypic overlap between autophagy and the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Biol Chem*, 271(30), 17621-17624.
- Hatakeyama, K., & Yoneyama, T. (1998). A sensitive assay for the enzymatic activity of GTP cyclohydrolase I. *Methods Mol Biol*, 100, 265-272.
- He, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, 43, 67-93. doi: 10.1146/annurev-genet-102808-114910
- Herrera-Aguirre, M. E., Luna-Arias, J. P., Labra-Barrios, M. L., & Orozco, E. (2010). Identification of four *Entamoeba histolytica* organellar DNA polymerases of the family B and cellular localization of the Ehodp1 gene and EhODP1 protein. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 734898. doi: 10.1155/2010/734898
- Herrero, E., Valentín, E., & Sentandreu, R. (1985). Effect of α -factor on individual wall mannoproteins from *Saccharomyces cerevisiae* a cells. *FEMS Microbiol Lett*, 27(3), 293-297. doi: 10.1111/j.1574-6968.1985.tb00685.x
- Hettasch, J. M., & Greenberg, C. S. (1994). Analysis of the catalytic activity of human factor XIIIa by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 269(45), 28309-28313.
- Hiller, E., Heine, S., Brunner, H., & Rupp, S. (2007). *Candida albicans* Sun41p, a putative glycosidase, is involved in morphogenesis, cell wall biogenesis, and biofilm formation. *Eukaryot Cell*, 6(11), 2056-2065. doi: 10.1128/ec.00285-07

- Hofs, S., Mogavero, S., & Hube, B. (2016). Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *J Microbiol*, 54(3), 149-169. doi: 10.1007/s12275-016-5514-0
- Holland, M. J., & Holland, J. P. (1978). Isolation and identification of yeast messenger ribonucleic acids coding for enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and phosphoglycerate kinase. *Biochemistry*, 17(23), 4900-4907.
- Horie, M., & Irisawa, H. (1989). Dual effects of intracellular magnesium on muscarinic potassium channel current in single guinea-pig atrial cells. *J Physiol*, 408, 313-332.
- Horisberger, M., & Clerc, M. F. (1988). Ultrastructural localization of anionic sites on the surface of yeast, hyphal and germ-tube forming cells of *Candida albicans*. *Eur J Cell Biol*, 46(3), 444-452.
- Hubbard, T. J., Ailey, B., Brenner, S. E., Murzin, A. G., & Chothia, C. (1999). SCOP: a Structural Classification of Proteins database. *Nucleic Acids Res*, 27(1), 254-256.
- Iida, H., & Yahara, I. (1985). *Yeast heat-shock protein of Mr 48,000 is an isoprotein of enolase* (Vol. 315).
- Iranzo, M., Aguado, C., Pallotti, C., Canizares, J. V., & Mormeneo, S. (2002). Transglutaminase activity is involved in *Saccharomyces cerevisiae* wall construction. *Microbiology*, 148(Pt 5), 1329-1334. doi: 10.1099/00221287-148-5-1329
- Jentoft, N. (1990). Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci*, 15(8), 291-294.
- Jeon, J. H., Lee, H. J., Jang, G. Y., Kim, C. W., Shim, D. M., Cho, S. Y., . . . Kim, I. G. (2004). Different inhibition characteristics of intracellular transglutaminase activity by cystamine and cysteamine. *Exp Mol Med*, 36(6), 576-581. doi: 10.1038/emm.2004.74
- Jong, A. Y., Chen, S. H., Stins, M. F., Kim, K. S., Tuan, T. L., & Huang, S. H. (2003). Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol*, 52(Pt 8), 615-622. doi: 10.1099/jmm.0.05060-0
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., . . . Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo j*, 19(21), 5720-5728. doi: 10.1093/emboj/19.21.5720
- Kapteyn, J. C., Hoyer, L. L., Hecht, J. E., Muller, W. H., Andel, A., Verkleij, A. J., . . . Klis, F. M. (2000). The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol*, 35(3), 601-611.
- Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Dijkgraaf, G. J., & Klis, F. M. (1994). Identification of beta-1,6-glucosylated cell wall proteins in yeast and hyphal forms of *Candida albicans*. *Eur J Cell Biol*, 65(2), 402-407.

- Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Dijkgraaf, G. J., Van den Ende, H., & Klis, F. M. (1995). Covalent association of beta-1,3-glucan with beta-1,6-glucosylated mannoproteins in cell walls of *Candida albicans*. *J Bacteriol*, *177*(13), 3788-3792.
- Kapteyn, J. C., ter Riet, B., Vink, E., Blad, S., De Nobel, H., Van Den Ende, H., & Klis, F. M. (2001). Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol*, *39*(2), 469-479.
- Kapteyn, J. C., Van Egmond, P., Sievi, E., Van Den Ende, H., Makarow, M., & Klis, F. M. (1999). The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta 1,6-glucan-deficient mutants. *Mol Microbiol*, *31*(6), 1835-1844.
- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., . . . Ohsumi, Y. (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol*, *147*(2), 435-446.
- Klis, F. M. (1994). Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast*, *10*(7), 851-869. doi: 10.1002/yea.320100702
- Klis, F. M., Boorsma, A., & De Groot, P. W. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *23*(3), 185-202. doi: 10.1002/yea.1349
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., & Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, *26*(3), 239-256.
- Kollar, R., Petrakova, E., Ashwell, G., Robbins, P. W., & Cabib, E. (1995). Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1-->3)-glucan. *J Biol Chem*, *270*(3), 1170-1178.
- Kollar, R., Reinhold, B. B., Petrakova, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., Drgonova, J., . . . Cabib, E. (1997). Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem*, *272*(28), 17762-17775.
- Kustrzeba-Wojcicka, I., & Golczak, M. (2000). Enolase from *Candida albicans*-- purification and characterization. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, *126*(1), 109-120.
- Latge, J. P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol*, *66*(2), 279-290. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x
- Lesage, G., & Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, *70*(2), 317-343. doi: 10.1128/mmbr.00038-05
- Lesage, G., Shapiro, J., Specht, C. A., Sdicu, A. M., Menard, P., Hussein, S., . . . Bussey, H. (2005). An interactional network of genes involved in chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genet*, *6*, 8. doi: 10.1186/1471-2156-6-8
- Lipke, P. N., & Kurjan, J. (1992). Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol Rev*, *56*(1), 180-194.
- Loewy, A. G. (1984). The N epsilon-(gamma-glutamic)lysine cross-link: method of analysis, occurrence in extracellular and cellular proteins. *Methods Enzymol*, *107*, 241-257.

- Lommel, M., & Strahl, S. (2009). Protein O-mannosylation: conserved from bacteria to humans. *Glycobiology*, *19*(8), 816-828. doi: 10.1093/glycob/cwp066
- Longatti, A., & Tooze, S. A. (2009). Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death Differ*, *16*(7), 956-965. doi: 10.1038/cdd.2009.39
- Lorand, L., & Conrad, S. M. (1984). Transglutaminases. *Mol Cell Biochem*, *58*(1-2), 9-35.
- Lorand, L., & Graham, R. M. (2003). Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *4*(2), 140-156. doi: 10.1038/nrm1014
- Lussier, M., Sdicu, A. M., Shahinian, S., & Bussey, H. (1998). The *Candida albicans* KRE9 gene is required for cell wall beta-1, 6-glucan synthesis and is essential for growth on glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(17), 9825-9830.
- Lynch-Day, M. A., & Klionsky, D. J. (2010). The Cvt pathway as a model for selective autophagy. *FEBS Lett*, *584*(7), 1359-1366. doi: 10.1016/j.febslet.2010.02.013
- Manners, D. J., Masson, A. J., & Patterson, J. C. (1973). The structure of a beta-(1 leads to 3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem J*, *135*(1), 19-30.
- Micanovic, R., Procyk, R., Lin, W., & Matsueda, G. R. (1994). Role of histidine 373 in the catalytic activity of coagulation factor XIII. *J Biol Chem*, *269*(12), 9190-9194.
- Mio, T., Adachi-Shimizu, M., Tachibana, Y., Tabuchi, H., Inoue, S. B., Yabe, T., . . . Yamada-Okabe, H. (1997). Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* GSC1/FKS1 and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol*, *179*(13), 4096-4105.
- Mizushima, N., & Klionsky, D. J. (2007). Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr*, *27*, 19-40. doi: 10.1146/annurev.nutr.27.061406.093749
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell*, *15*(3), 1101-1111. doi: 10.1091/mbc.E03-09-0704
- Morgan, J., Meltzer, M. I., Plikaytis, B. D., Sofair, A. N., Huie-White, S., Wilcox, S., . . . Teutsch, S. M. (2005). Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infect Control Hosp Epidemiol*, *26*(6), 540-547. doi: 10.1086/502581
- Mrsa, V., & Tanner, W. (1999). Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast*, *15*(10a), 813-820. doi: 10.1002/(sici)1097-0061(199907)15:10a<813::aid-yea421>3.0.co;2-y
- Munro, C. A. (2013). Chitin and glucan, the yin and yang of the fungal cell wall, implications for antifungal drug discovery and therapy. *Adv Appl Microbiol*, *83*, 145-172. doi: 10.1016/b978-0-12-407678-5.00004-0

- Muszbek, L., Adany, R., & Mikkola, H. (1996). Novel aspects of blood coagulation factor XIII. I. Structure, distribution, activation, and function. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 33(5), 357-421. doi: 10.3109/10408369609084691
- Nombela, C., Gil, C., & Chaffin, W. L. (2006). Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol*, 14(1), 15-21. doi: 10.1016/j.tim.2005.11.009
- Norice, C. T., Smith, F. J., Jr., Solis, N., Filler, S. G., & Mitchell, A. P. (2007). Requirement for *Candida albicans* Sun41 in biofilm formation and virulence. *Eukaryot Cell*, 6(11), 2046-2055. doi: 10.1128/ec.00314-07
- Ogino, T., Yamadera, T., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., & Mizumoto, K. (2001). Enolase, a cellular glycolytic enzyme, is required for efficient transcription of Sendai virus genome. *Biochem Biophys Res Commun*, 285(2), 447-455. doi: 10.1006/bbrc.2001.5160
- Oliveira, D. L., Freire-de-Lima, C. G., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Rodrigues, M. L., & Nimrichter, L. (2010). Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infect Immun*, 78(4), 1601-1609. doi: 10.1128/iai.01171-09
- Oliveira, D. L., Nakayasu, E. S., Joffe, L. S., Guimaraes, A. J., Sobreira, T. J., Nosanchuk, J. D., . . . Rodrigues, M. L. (2010). Characterization of yeast extracellular vesicles: evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis. *PLoS One*, 5(6), e11113. doi: 10.1371/journal.pone.0011113
- Pancholi, V. (2001). Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci*, 58(7), 902-920.
- Piatigorsky, J. (2003). Gene sharing, lens crystallins and speculations on an eye/ear evolutionary relationship. *Integr Comp Biol*, 43(4), 492-499. doi: 10.1093/icb/43.4.492
- Poulain, D. (2015). *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Crit Rev Microbiol*, 41(2), 208-217. doi: 10.3109/1040841x.2013.813904
- Poulain, D., & Jouault, T. (2004). *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr Opin Microbiol*, 7(4), 342-349. doi: 10.1016/j.mib.2004.06.011
- Poulain, D., Tronchin, G., Dubremetz, J. F., & Biguet, J. (1978). Ultrastructure of the cell wall of *Candida albicans* blastospores: study of its constitutive layers by the use of a cytochemical technique revealing polysaccharides. *Ann Microbiol (Paris)*, 129(2), 141-153.
- Protchenko, O., Ferea, T., Rashford, J., Tiedeman, J., Brown, P. O., Botstein, D., & Philpott, C. C. (2001). Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 276(52), 49244-49250. doi: 10.1074/jbc.M109220200

- Ruiz-Herrera, J., Elorza, M. V., Valentin, E., & Sentandreu, R. (2006). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res*, 6(1), 14-29. doi: 10.1111/j.1567-1364.2005.00017.x
- Ruiz-Herrera, J., Iranzo, M., Elorza, M. V., Sentandreu, R., & Mormeneo, S. (1995). Involvement of transglutaminase in the formation of covalent cross-links in the cell wall of *Candida albicans*. *Arch Microbiol*, 164(3), 186-193.
- Sardi, J. C., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes Giannini, M. J. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*, 62(Pt 1), 10-24. doi: 10.1099/jmm.0.045054-0
- Scott, S. V., Hefner-Gravink, A., Morano, K. A., Noda, T., Ohsumi, Y., & Klionsky, D. J. (1996). Cytoplasm-to-vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(22), 12304-12308.
- Sentandreu, R., Mormeneo, S., & Ruiz-Herrera, J. (1994). *Biogenesis of the Fungal Cell Wall*.
- Serrano-Fujarte, I., Lopez-Romero, E., & Cuellar-Cruz, M. (2016). Moonlight-like proteins of the cell wall protect sessile cells of *Candida* from oxidative stress. *Microb Pathog*, 90, 22-33. doi: 10.1016/j.micpath.2015.10.001
- Shahinian, S., & Bussey, H. (2000). beta-1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 35(3), 477-489.
- Shaw, M. L., Stone, K. L., Colangelo, C. M., Gulcicek, E. E., & Palese, P. (2008). Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathog*, 4(6), e1000085. doi: 10.1371/journal.ppat.1000085
- Shematek, E. M., Braatz, J. A., & Cabib, E. (1980). Biosynthesis of the yeast cell wall. I. Preparation and properties of beta-(1 leads to 3)glucan synthetase. *J Biol Chem*, 255(3), 888-894.
- Sillitoe, I., Lewis, T. E., Cuff, A., Das, S., Ashford, P., Dawson, N. L., . . . Orengo, C. A. (2015). CATH: comprehensive structural and functional annotations for genome sequences. *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue), D376-381. doi: 10.1093/nar/gku947
- Sorgo, A. G., Heilmann, C. J., Dekker, H. L., Brul, S., de Koster, C. G., & Klis, F. M. (2010). Mass spectrometric analysis of the secretome of *Candida albicans*. *Yeast*, 27(8), 661-672. doi: 10.1002/yea.1775
- Strockbine, N. A., Largen, M. T., Zweibel, S. M., & Buckley, H. R. (1984). Identification and molecular weight characterization of antigens from *Candida albicans* that are recognized by human sera. *Infect Immun*, 43(2), 715-721.
- Sundstrom, P., & Aliaga, G. R. (1994). A subset of proteins found in culture supernatants of *Candida albicans* includes the abundant, immunodominant, glycolytic enzyme enolase. *J Infect Dis*, 169(2), 452-456.

- Surarit, R., Gopal, P. K., & Shepherd, M. G. (1988). Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol*, *134*(6), 1723-1730. doi: 10.1099/00221287-134-6-1723
- Swenerton, R. K., Zhang, S., Sajid, M., Medzihradzky, K. F., Craik, C. S., Kelly, B. L., & McKerrow, J. H. (2011). The oligopeptidase B of *Leishmania* regulates parasite enolase and immune evasion. *J Biol Chem*, *286*(1), 429-440. doi: 10.1074/jbc.M110.138313
- Titorenko, V. I., Keizer, I., Harder, W., & Veenhuis, M. (1995). Isolation and characterization of mutants impaired in the selective degradation of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha*. *J Bacteriol*, *177*(2), 357-363.
- Torimura, T., Ueno, T., Kin, M., Harada, R., Nakamura, T., Kawaguchi, T., . . . Sata, M. (2001). Autocrine motility factor enhances hepatoma cell invasion across the basement membrane through activation of beta1 integrins. *Hepatology*, *34*(1), 62-71. doi: 10.1053/jhep.2001.25546
- Tristan, C., Shahani, N., Sedlak, T. W., & Sawa, A. (2011). The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell Signal*, *23*(2), 317-323. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.08.003
- Tsukada, M., & Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, *333*(1-2), 169-174.
- Tsutsumi, S., Gupta, S. K., Hogan, V., Tanaka, N., Nakamura, K. T., Nabi, I. R., & Raz, A. (2003). The enzymatic activity of phosphoglucose isomerase is not required for its cytokine function. *FEBS Lett*, *534*(1-3), 49-53.
- Tuttle, D. L., Lewin, A. S., & Dunn, W. A., Jr. (1993). Selective autophagy of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *Eur J Cell Biol*, *60*(2), 283-290.
- Urban, C., Sohn, K., Lottspeich, F., Brunner, H., & Rupp, S. (2003). Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell. *FEBS Lett*, *544*(1-3), 228-235.
- van Deventer, H. J., Goessens, W. H., van Vliet, A. J., & Verbrugh, H. A. (1996). Anti-enolase antibodies partially protective against systemic candidiasis in mice. *Clin Microbiol Infect*, *2*(1), 36-43.
- Van Rinsum, J., Klis, F. M., & van den Ende, H. (1991). Cell wall glucomannoproteins of *Saccharomyces cerevisiae* mnn9. *Yeast*, *7*(7), 717-726. doi: 10.1002/yea.320070707
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., & Delvaux, F. R. (2003). Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol*, *61*(3), 197-205. doi: 10.1007/s00253-002-1200-8
- Walker, L. A., Munro, C. A., de Bruijn, I., Lenardon, M. D., McKinnon, A., & Gow, N. A. (2008). Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog*, *4*(4), e1000040. doi: 10.1371/journal.ppat.1000040
- Wang, Y. (2015). Looking into *Candida albicans* infection, host response, and antifungal strategies. *Virulence*, *6*(4), 307-308. doi: 10.1080/21505594.2014.1000752

- Wessels, J. G. H. (1986). *Cell Wall Synthesis in Apical Hyphal Growth* (Vol. 104).
- Yee, V. C., Pedersen, L. C., Le Trong, I., Bishop, P. D., Stenkamp, R. E., & Teller, D. C. (1994). Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(15), 7296-7300.



The *Candida albicans* ENO1 gene encodes a transglutaminase involved in growth, cell division, morphogenesis, and osmotic protection

Received for publication, August 3, 2017, and in revised form, December 13, 2017. Published, Papers in Press, January 31, 2018, DOI 10.1074/jbc.M117.810440

Elizabeth Reyna-Beltrán^{†1},  María Iranzo[§], Karla Grisel Calderón-González[‡], Ricardo Mondragón-Flores[¶], María Luisa Labra-Barrios[‡],  Salvador Mormeneo[§], and Juan Pedro Luna-Arias^{‡2}

From the Departamentos de [†]Biología Celular and [¶]Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN), C.P. 07360, Ciudad de México, México and the [§]Department de Microbiologia i Ecologia, Facultat de Farmacia, Unidad de Microbiología, Universitat de València, 46100 Valencia, España

Edited by Joseph M. Jez

Candida albicans is an opportunistic fungus that is part of the normal microflora commonly found in the human digestive tract and the normal mucosa or skin of healthy individuals. However, in immunocompromised individuals, it becomes a serious health concern and a threat to their lives and is ranked as the leading fungal infection in humans worldwide. As existing treatments for this infection are non-specific or under threat of developing resistance, there is a dire necessity to find new targets for designing specific drugs to defeat this fungus. Some authors reported the presence of the transglutaminase activity in *Candida* and *Saccharomyces*, but its identity remains unknown. We report here the phenotypic effects produced by the inhibition of transglutaminase enzymatic activity with cystamine, including growth inhibition of yeast cells, induction of autophagy in response to damage caused by cystamine, alteration of the normal yeast division pattern, changes in cell wall, and inhibition of the yeast-to-mycelium transition. The latter phenomenon was also observed in the *C. albicans* ATCC 26555 strain. Growth inhibition by cystamine was also determined in other *Candida* strains, demonstrating the importance of transglutaminase in these species. Finally, we identified enolase 1 as the cell wall protein responsible for TGase activity. After studying the inhibition of enzymatic activities with anti-CaEno1 antibodies and through bioinformatics studies, we suggest that the enolase and transglutaminase catalytic sites are localized in different domains of the protein. The aforementioned data indicate that TGase/Eno1 is a putative target for designing new drugs to control *C. albicans* infection.

Fungal infections cause more than 1.3 million deaths worldwide, principally in individuals who have HIV infections or two or more pathological conditions (1, 2). Although there are more than 150 species of *Candida*, ~20 species are known to cause human infections; *Candida albicans* is the most frequent causative agent of candidiasis and is the leading fungal infection (3, 4). This opportunistic fungus is a human commensal that can be isolated from normal mucosae or cutaneous microflora of healthy individuals (2). However, when patients receive prolonged treatments with antibiotics, chemotherapy, or immunosuppressive agents or are in surgical intensive care units, their condition can turn this usually commensal yeast into a pathogen implicated in life-threatening invasive candidiasis (3–6). Another serious concern that must be considered is the increasing number of cases reporting *Candida* resistance to antifungal drugs (4). Thus, *Candida* infection constitutes a clinical problem worldwide due to the difficulty of treating systemic candidiasis (7). There is a dire necessity to find new molecular targets for developing new drugs against this fungus.

C. albicans is characterized by a complex interplay with its host by the expression of fungal virulence factors that result in adherence, invasion, and cell damage (8), which constitute a set of molecular tools that have evolved to overcome the defensive lines of body. Fungal cell wall is the main structure in contact with the host and is essential for cell integrity. It protects cells against several environmental stress conditions, including dehydration, osmotic changes, heat, cold, immune system response, or attack by other microorganisms (9–12). Moreover, it has a role in adhesion to host cells through adhesins, as well as in cross-talk with hosts through the glycan code (9). The cell wall is mainly composed of proteins, glycans, and lower amounts of chitin (9–12). Cell wall proteins, which are generally heavily mannosylated via *O*- and *N*-linkages, function as cross-linking enzymes, structural elements, adhesins, and environmental stress sensors, and they protect fungal cells from environmental change (9–13). Two classes of covalently-bound fungal cell wall proteins (CWPs)³ have been identified,

This work was supported in part by the National Council of Science and Technology (Conacyt) of Mexico and the Department of Cell Biology at Cinvestav-IPN (to J. P. L.-A.) and Spanish Ministry of Innovation and Science Grant AGL 2011-29382 (to S. M.). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

✂ Author's Choice—Final version free via Creative Commons CC-BY license.

This article contains Figs. S1–S14, Tables S1–S6, supporting “Experimental procedures,” and supporting Refs. 1–4.

¹ Recipient of a Ph.D. scholarship from Conacyt.

² To whom correspondence should be addressed: Dept. de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN), Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, C.P. 07360, Ciudad de México, México. Tel.: 52-55-57474016; E-mails: jpluna@cinvestav.mx, jpluna@cell.cinvestav.mx, jpluna2003@gmail.com.

³ The abbreviations used are: CWP, cell wall protein; CFW, calcofluor white; TGase, transglutaminase; EV, extracellular vesicle; PDB, Protein Data Bank; IEM, immunoelectron microscopy; MDC, monodansylcadaverine; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; Ni²⁺-NTA, Ni²⁺-nitrilotriacetic acid; PEP, phosphoenolpyruvate; EP, elec-

glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent CWPs and Pir-CWPs (9–11), that can be extracted by treating cell walls with mild alkali (alkali-sensitive linkage, ASL). The *Saccharomyces cerevisiae* Cwp2 (ScCwp2) is a very small GPI wall protein containing a Pir repeat involved in linking ScCwp2 to β -1,3-glycan to increase wall integrity (10, 13). There are other proteins that lack homology to Pir proteins, designated alkali-sensitive linkage cell wall proteins (ASL-CWPs), that are covalently linked by mild alkali-sensitive chemical bonds to the cell walls of *C. albicans* and *S. cerevisiae* (9, 10, 13). In addition, other proteins are linked to CWPs through disulfide bonds (14).

Covalent linkages are established between most wall components to provide stability to the cell wall. Proteins of the Gas family have been described as the main cross-linkers of wall polymers (11). However, other proteins are involved in this function. Transglutaminases (TGases) are multifunctional enzymes involved in several post-translational modifications, including protein cross-linking, amine incorporation, and deamination. The best known TGase activity is cross-linking through a transamidation reaction between the side chains of Gln and Lys residues, resulting in the formation of *N*- ϵ -(γ -glutamyl)lysine amide bonds (15). These enzymes are usually Ca^{2+} -dependent, although in the case of some microorganisms and rodent intestinal mucosa, TGases also act as Ca^{2+} -independent enzymes (16, 17). TGases are widely distributed in animals, plants, and microorganisms and have key roles in several biological processes, including growth regulation, differentiation, cellular adhesion, and maintenance of tissue integrity. Human TGase 2 is involved in the stabilization of the extracellular matrix and modulates the fibronectin–integrin interaction (18, 19). It is involved in a number of diseases, including Alzheimer's disease, Huntington's disease, Crohn's disease, fibrosis, cancer metastasis, and other diseases (20). In addition, TGase is also involved in cross-linking cell wall components in *Chlamydomonas reinhardtii* (21). Given the importance of TGases in the development of serious diseases, much research has focused on exploring specific TGase inhibitors with a therapeutic purpose (22).

TGase activity was previously reported in the cell walls of *C. albicans* and *S. cerevisiae*. This enzyme establishes covalent cross-links between proteins, and its activity is affected by the specific inhibitor cystamine, which decreases the incorporation of several proteins into the cell wall and avoids regeneration of protoplasts, as well as the yeast-to-mycelium transition, indicating a role in the formation of covalent cross-links between wall proteins and chitin and/or glucan (23, 24). In this work, we report the identification of enolase 1 as the cell wall protein that has TGase activity, as well as the phenotypic changes produced by inhibition of TGase. Taken together, our data indicate that TGase is a putative target for designing new drugs to control *C. albicans* infection.

Results

Determination of transglutaminase activity in the cell walls of *C. albicans*

The standard protocol to determine TGase activity measures the incorporation of radioactive putrescine as a diamino acid analogue into TCA-precipitable material (23, 24). To determine TGase activity in cell walls (CW), we used a similar protocol, except that purified cell walls were used as the source of both TGase enzyme and endogenous acceptors. Using this procedure, there were many quantitative problems due to the non-specific adsorption of putrescine, which produced high levels of radioactivity in the negative controls. To confirm the presence of radioactive putrescine cross-linked to proteins in the TCA-precipitable material, this fraction was solubilized with zymolyase and analyzed by paper chromatography (Fig. 1A). Nearly 40% of total [^{14}C]putrescine radioactivity was found at the origin, indicating that the substrate was cross-linked to high-molecular-weight molecules. Approximately 40% of radioactivity corresponded to unincorporated [^{14}C]putrescine, whereas the remaining radioactivity was distributed through the paper. This was likely due to non-specific adsorption, as confirmed by paper chromatography performed with radioactive putrescine alone (Fig. 1A).

The use of either radioactive putrescine or lysine as substrates for TGase from guinea pig liver was evaluated (Table S1). In this assay, the incorporation of radioactive substrates was similar, as well as the inhibition of the TGase activity observed with cystamine. Therefore, we determined TGase activity using [^{14}C]lysine and purified *C. albicans* cell walls. TGase activity was dependent on time up to 3–4 h (Fig. 1B). The presence of EDTA inhibited TGase activity, similar to that produced by cystamine or boiling preparations used in the assay (Fig. 1B).

Characterization of TGase acceptors from cell walls

To study wall-endogenous acceptors of TGase, purified cell walls were incubated with [^{14}C]lysine as described and sequentially extracted with SDS, zymolyase, and chitinase. In each case, solubilized materials were analyzed by 10% SDS-PAGE and fluorography. From the total amount of radioactivity incorporated into cell walls by the action of TGase activity, nearly 40% was solubilized by SDS, whereas zymolyase released 15% and chitinase 23%, respectively. SDS-solubilized proteins had apparent molecular masses of less than 50 kDa, whereas the material released by either zymolyase or chitinase showed molecular masses greater than 180 kDa, *i.e.* the chitinase-released proteins of the highest molecular mass (Fig. 1C). The mass spectrometry analysis of the proteins solubilized with 2% SDS in the radioactive region of the gel shown in Fig. 1C revealed the presence of 1046 unique proteins (Table S2). These proteins were classified with the Gene Ontology Panther Classification System (Fig. S1). The most abundant classes for molecular function corresponded to proteins with catalytic, binding, structural, and transporter activities. In the case of protein classes, the most abundant proteins were nucleic acid-binding, oxidoreductases, hydrolases, and transferases. In the case of the proteins released with zymolyase, we identified 37

trostatic potential; IMAC, immobilized metal affinity chromatography; GPI, glycosylphosphatidylinositol; ASL, alkali-sensitive linkage; CW, cell wall; MMF, mixed membrane fraction; anti-rEhPCNA, anti-recombinant *E. histolytica* PCNA; TEM, transmission electron microscopy; SEM, scanning electron microscopy; SN, supernatant; WB, Western blotting.

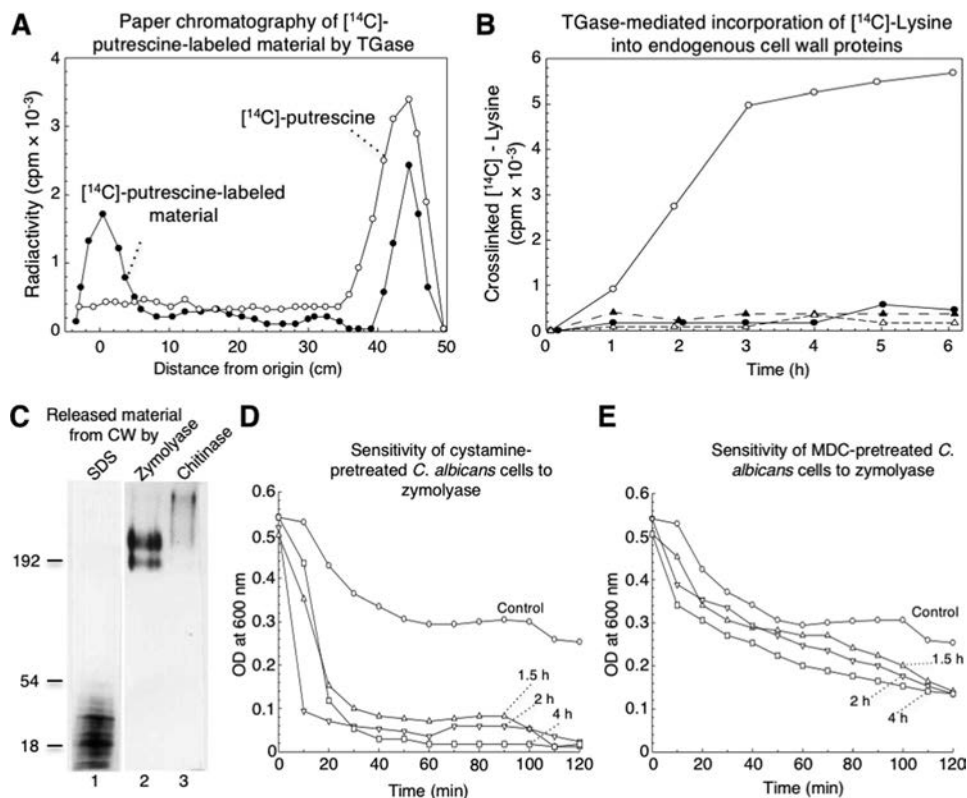


Figure 1. [¹⁴C]Lysine cross-linked by TGase activity was found in low- and high-molecular-weight cell wall proteins and inhibition of TGase enzyme by cystamine and MDC induced changes in cell wall that sensitized cells to zymolyase treatment. *A*, paper chromatography of [¹⁴C]putrescine-labeled material performed by *C. albicans* TGase activity and released from CW by zymolyase (filled circles). Solubilized fraction containing 20,000 cpm analyzed by paper chromatography was described under the "Experimental procedures." [¹⁴C]Putrescine substrate was also analyzed as a control (open circles). *B*, transglutaminase-mediated incorporation of [¹⁴C]lysine into endogenous cell wall proteins. Reaction mixtures containing similar aliquots of cell walls and 2.5 μCi of [¹⁴C]lysine with no cystamine (open circles) or with 50 mM cystamine (filled circles), boiled enzymatic source (open triangles), or 2 mM EDTA (filled triangles) were incubated for the indicated times; radioactivity in TCA-precipitable material was quantified. *C*, labeled samples with [¹⁴C]lysine were sequentially released from cell walls by SDS, zymolyase, and chitinase and analyzed by 10% SDS-PAGE and fluorography. 10,000 cpm of labeled fractions were loaded in each lane. Lane 1, SDS-released material; lane 2, zymolyase-released material; lane 3, chitinase-released material. *D* and *E*, inhibition of TGase by cystamine and MDC increased sensitivity of *C. albicans* cells to treatment with zymolyase. Cells of *C. albicans* (adjusted to OD_{600 nm} = 0.5) previously incubated without (circles) or with 100 mM cystamine (*D*) or 3.5 mM MDC (*E*) for 1.5 h (triangles), 2 h (inverted triangles), and 4 h (squares) were treated with 50 μg ml⁻¹ zymolyase 20T for up to 120 min. At the indicated times, OD_{600 nm} of cultures was monitored.

proteins (Table S3). Panther classified these proteins according to molecular function in seven categories, with catalytic, binding, and structural the most frequent categories (Fig. S2). According to protein class, they were categorized in 10 groups. The classes with more proteins were nucleic acid-binding proteins, oxidoreductases, hydrolases, and transporters. Finally, the treatment with chitinase released 41 proteins (Table S4), which were classified by Panther in six molecular function categories, with catalytic, binding, structural, and transporter activities the most represented, although according to molecular class, they were grouped in nine categories. The two most represented were nucleic acid-binding and oxidoreductase proteins (Fig. S3). Remarkably, enolase 1 was found in the proteins sequentially extracted with 2% SDS, zymolyase, and chitinase.

TGase activity is a key molecule that confers stability to the *C. albicans* cell wall

To study the role of TGases in the osmosensitivity of cells after digestion with zymolyase, *C. albicans* yeast cells were incubated with 100 mM cystamine or 3.5 mM MDC for 1.5, 2, and 4 h before treatment with glucanases for up to 120 min. Cell

cultures treated with zymolyase alone showed a decrease in absorbance at 600 nm of 40% at 60 min that was maintained for the entire incubation time, while cells incubated with cystamine for different times achieved a loss in absorbance of ~70% at 20 min of incubation with zymolyase, which slowly decreased up to 95% at 100 min (Fig. 1D). In the case of impaired osmotic protection by the inhibition of TGase activity by MDC, this effect was not as dramatic as that shown with cystamine. A decrease of 30% in absorbance was observed in the first 20 min, reaching a maximum of 70% at 120 min of incubation (Fig. 1E). Thus, the inhibition of TGase activity by cystamine and MDC affects the osmotic protection of the cell wall after glucan digestion with zymolyase.

Growth curves of *C. albicans* cells grown at different cystamine concentrations showed an inhibition of growth cultures as a function of concentration of cystamine. Maximum inhibition was obtained at 200 mM at 6 h of incubation (Fig. 2A, inset). However, the optical density of cultures was almost the same as the control at 24 h, meaning that the cystamine effect reverted. To test this hypothesis, a second dose of cystamine was added to cultures at 6 h (Fig. 2B). A clear effect of cystamine on growth rate was observed and persisted until 24 h of incu-

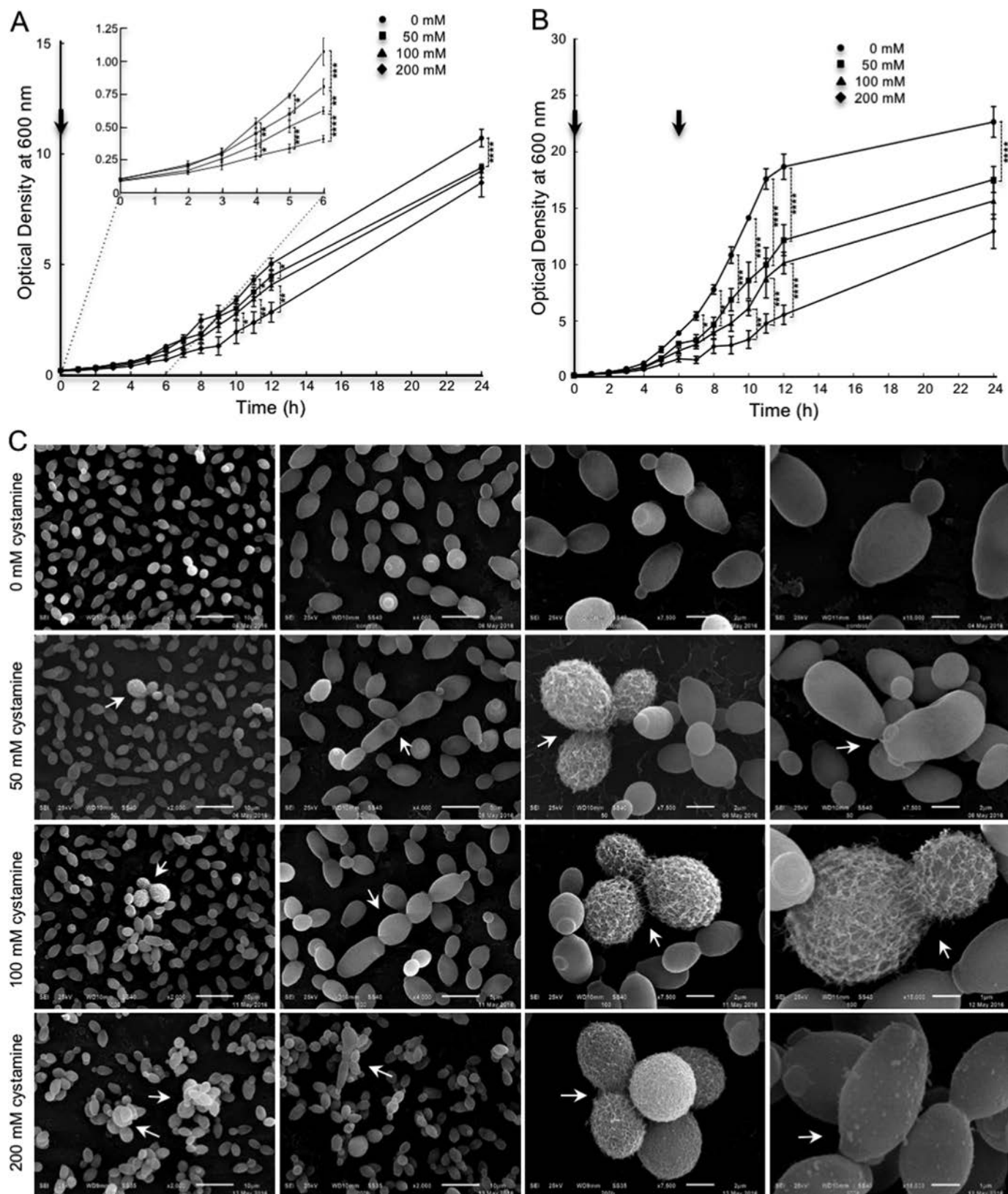


Figure 2. Effect of inhibition of TGase on growth curve and surface of *C. albicans* yeast cells. *A* and *B*, yeast cells were grown at different concentrations of cystamine (0, 50, 100, and 200 mM) for up to 24 h in rich medium. Additional amounts of cystamine similar to concentrations used at the beginning of the experiment were added to each culture at 6 h (*B*). *Arrows*, addition of fresh cystamine. *C*, in the presence of cystamine, some cells displayed visible fibrillar structures on the surface as visualized by SEM. Moreover, an alteration in division patterns was observed with low frequency (near 2.0% at 50 and 100 mM cystamine; 8.4% at 200 mM cystamine). Remarkably, most cells grown at 200 mM cystamine showed variable numbers of protuberances of different sizes, ranging on average 100 nm in diameter. *Arrows*, alterations in division patterns. *Arrowheads*, protuberances. Statistical analysis, unpaired *t* test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$. Bars are shown with standard error of mean.

bation. At this time, the optical density of the culture incubated with 200 mM cystamine was only half the value of the control culture. This means that cystamine transiently inhibits growth rate. Moreover, to determine whether this effect is due to a reversible effect or instability of cystamine, two experiments were carried out previously.⁴ When culture media from yeast cell cultures grown in cystamine with little or no growth were removed and used with fresh cells, cystamine worked properly. However, to analyze a possible instability of the product, fresh media with the different concentrations of cystamine were previously incubated under the same conditions of the experiment for 3 days, and cells were then inoculated, obtaining similar results with those described in this paper.

Cells obtained from the growth curve at 6 h of incubation with different concentrations of cystamine were analyzed by SEM to evaluate possible morphological changes (Fig. 2A, inset). A population corresponding to 4.3, 3.2, and 4.3% for 50, 100, and 200 mM cystamine, respectively, showed defects in cell separation. Moreover, fibrillar material on the cell surface of cystamine-treated cells appeared on the biggest cells only. They corresponded to 1–2% of cells treated with either 50 or 100 mM cystamine, whereas the affected cells were 8.4% in 200 mM cystamine (Fig. 2C). Remarkably, protrusions of ~100 nm in diameter on the cell surface were visualized in cells treated only with 200 mM cystamine (Fig. 2C), which can be extracellular vesicles, cell debris, or small cell wall expansions due to the osmotic shock.

Next, the changes in the ultrastructure of cells were investigated using cells grown for 6 h with 0, 50, 100, and 200 mM cystamine. An accumulation of electron-dense material in vacuoles was observed, which was augmented with increasing amounts of cystamine (Fig. 3, A–D, arrows). Some vacuoles contained lipid droplets (Fig. 3, D and E, stars), and others occupied most of the cytoplasm (Fig. 3E, 200 mM cystamine). These data suggest an increase in the degradation rate of intracellular material, characteristic of the autophagy process in yeast cells (25). TEM of thin section of cells grown with no TGase inhibitor show the characteristic morphology of yeast cells. When cells were cultured in cystamine-containing medium, an alteration of the division pattern was observed; some cells have two budding sites on opposite poles (Fig. 3E, 50 mM cystamine); other cells budded, but the separation of the mother-daughter cell was not completed. Moreover, some cells began the budding process at other sites (Fig. 3E, 100 and 200 mM cystamine). An analysis at $\times 200,000$ revealed loss of electron-dense material in inner walls when cells were treated with cystamine (Fig. 3F, 50, 100, and 200 mM cystamine), with accumulation of electron-dense material in the outer wall (Fig. 3F, stars) compared with control cells. Furthermore, an increase in the number of small vesicles near the plasma membrane was seen. These data suggest that TGase activity inhibition affects the organization of cell wall components and induces increased autophagy in response to the stress caused by cystamine.

To demonstrate the increase in autophagy, we evaluated the level of the LC3/Atg8 autophagy protein marker (25). We performed an alignment of human LC3 and *S. cerevisiae* and *C. albicans* Atg8 homologous proteins to identify the sequence around lysine 40 recognized by the anti-human LC3/Atg8 polyclonal antibody (Fig. S4). This domain in *Candida* Atg8 showed 36.4% identity and 59% similarity to human LC3. Western blot analysis of whole-protein extracts from cells grown in 0, 50, 100, and 200 mM cystamine for 6 h revealed a significant increase in Atg8/LC3 proteins bound to autophagosome membranes (LC3-II, lipid-bound form of LC3 protein with a molecular mass of 14 kDa) with increasing amounts of cystamine (Fig. 3, G–J). However, the unmodified Atg8/LC3 16-kDa band was not observed. Interestingly, we also observed a decrease in a 125-kDa band with increasing concentrations of cystamine (Fig. 3H). Cells grown without cystamine also showed bands of 14 and 125 kDa when the nitrocellulose membrane was overexposed to chemiluminescence film (Fig. 3I). To improve the resolution of the 14- and 16-kDa bands, we performed a Western blot (WB) analysis of samples in a 12% SDS-polyacrylamide gel containing 6 M urea (Fig. 3K). We observed the nearly complete disappearance of the 125-kDa band, as well as the presence of a band between 14 and 16 kDa. As we did not observe a good resolution between the 14- and 16-kDa bands in this analysis, we performed a WB assay of electrophoresed samples in an SDS-polyacrylamide gradient gel (4–20%; 15 \times 17-cm gel) containing 6 M urea. In this case, all the proteins identified by anti-LC3A/B antibodies were in the 14–16-kDa range. Interestingly, we detected a small amount of the band corresponding to the processed Atg8 polypeptide as a smear, which can indicate that the 16-kDa band can also contain the processed protein. Another important observation is that this smear was not observed in the sample obtained from cells grown without cystamine, indicating no autophagy or very low autophagy. This was confirmed by immunofluorescence with the anti-LC3A/B antibody that showed no autophagy or a very low level of autophagy in normal cells (Fig. S5). Staining was only observed in cystamine-treated cells and was similar when rapamycin was used as an inducer of autophagy. These results confirm the increase in autophagy during TGase activity inhibition by cystamine in *C. albicans* cells.

Inhibition of TGase activity with cystamine does not affect the amount of chitin, glucan, and mannoproteins in *C. albicans* yeast cell walls

We have previously shown changes in yeast cell walls by TEM, as well as the major accessibility of the β -1,3-exoglucanase present in zymolyase for its target when cells were preincubated with different concentrations of cystamine. These results suggest variation in the amounts of different cell wall components. To test this hypothesis, the amounts of chitin, glucan, and mannoproteins were evaluated in yeast cells grown with different concentrations of cystamine for 1–6 h by flow cytometry. Cells were stained more with calcofluor at 200 mM cystamine at 6 h under confocal microscopy (Fig. 4A). However, no significant changes were obtained at different culture time intervals. For example, we show the quantitative results for chitin (Fig. 4, B and C), glucan (Fig. 4, D and E), and mannoproteins

⁴ M. Iranzo and S. Mormeneo, unpublished results.

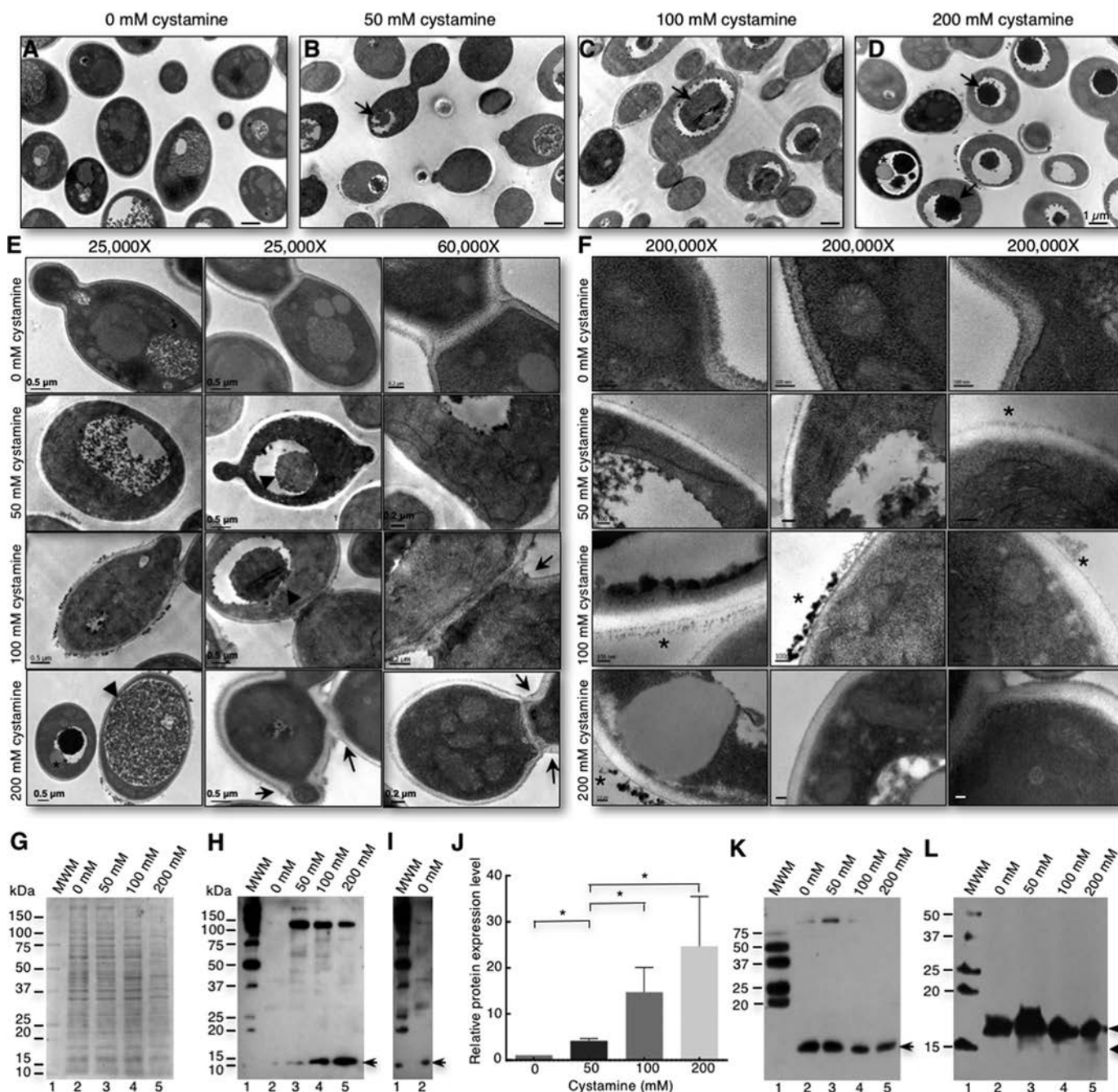


Figure 3. Inhibition of TGase activity by cystamine induces an increase in autophagy response in *C. albicans* yeast cells. A–D, yeast cells cultured for 6 h in 0, 50, 100, and 200 mM cystamine were harvested and analyzed by TEM. An increase in electron-dense material in vacuoles (D, arrows) was observed and directly correlated with an increase in cystamine concentration. Furthermore, some cells displayed electron-dense material (stars) on the surface of cell walls only when grown in cystamine (A–F). E, alteration to cell division (arrows) was clearly seen in some cells. F, magnification of cell wall sections showed loss of density to electrons, and electron-dense material accumulation on the surface. Scale bar, 100 nm. G, SDS-PAGE of whole-cell extracts obtained from cells grown at 6 h in 0, 50, 100, and 200 mM cystamine. H, immunoblot of proteins shown in G using anti-LC3A/B antibodies. Arrow, 14-kDa band; MWM, protein molecular weight markers. J, overexposure to chemiluminescence film of lanes 1 and 2 from Western blot shown in I. Arrow, 14-kDa band. I, overexposure of lanes 1 and 2 (control without cystamine) from the Western blot shown in H. J, graph of relative expression levels of PE-Atg8 protein showing augmented protein in cells treated with increasing concentrations of cystamine. K, Western blot of samples electrophoresed through a 12% SDS-polyacrylamide gel containing 6 M urea and revealed with anti-LC3A/B antibodies. L, Western blot of samples electrophoresed through a SDS-polyacrylamide gradient gel (4–20%; 15 × 17-cm gel) containing 6 M urea and revealed with anti-LC3A/B antibodies. *, $p < 0.05$ (unpaired t test). Bars are shown with standard error of mean.

(Fig. 4, F and G) obtained at 6 h, which are contrary to results obtained by treating *Alternaria infectoria* cells with other anti-fungal drugs, where changes in the amounts of chitin or glucan were observed using echinocandins and nikkomycin Z, respectively (26).

TGase activity is essential for the yeast-to-mycelium transition in *C. albicans*

The conversion from yeast to hyphae has been shown to be essential for the virulence of *C. albicans* (27). It was previ-

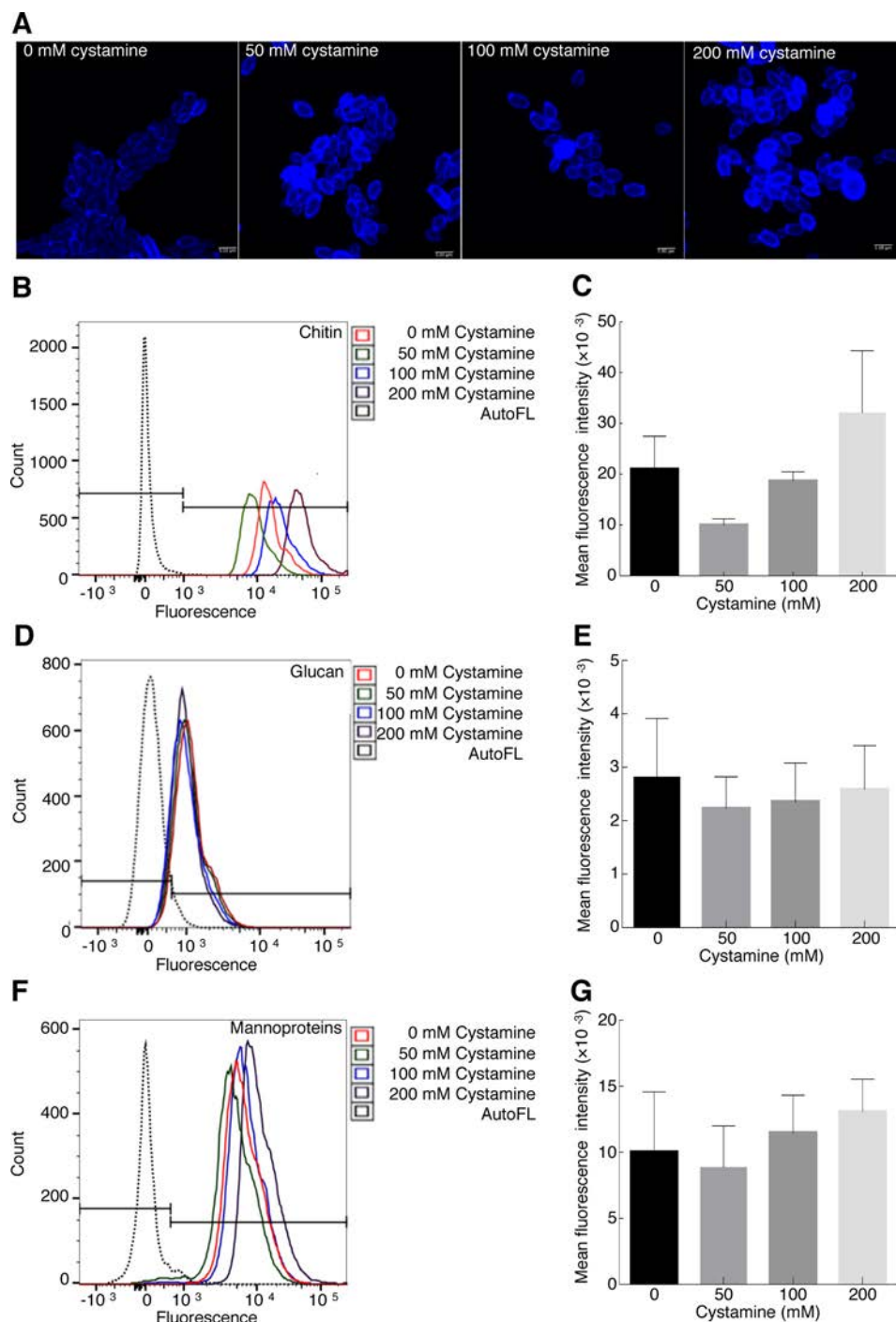


Figure 4. Inhibition of TGase activity by cystamine does not affect level of cell wall components. Yeast cells were grown with different concentrations of cystamine (0, 50, 100, and 200 mM) for 6 h at 28 °C, and amounts of mannoproteins, glucan, and chitin were determined by flow cytometry. Chitin staining was first evaluated by fluorescence confocal microscopy using calcofluor (A). Chitin (B and C), glucan (D and E), and mannoproteins (F and G) were stained with CFW, methyl blue, and FITC-ConA, respectively. Mean fluorescence intensity was calculated for each experiment and graphed. Histograms did not show statistically significant variation in the amount of these components in cells grown at different cystamine concentrations. AutoFL, autofluorescence.

ously reported that inhibition of TGase activity during myceliation causes the formation of pseudomycelia, short mycelia, and the presence of budding yeasts when 50 mM cystamine was used (23). To characterize in more detail the effects caused by cystamine during the yeast-to-mycelium transition, cells incubated without cystamine showed normal structures during transition (Fig. 5, A–C). With increas-

ing concentrations of cystamine, the length of mycelia dramatically diminished in the *C. albicans* CAI4 strain. Notably, the amount of extracellular flocculent material also increased as a function of cystamine concentration (Fig. 5, D–L). This effect is similar to that found in response to treatment of *Candida tropicalis* yeast cells with only baicalin or in combination with fluconazole (28).

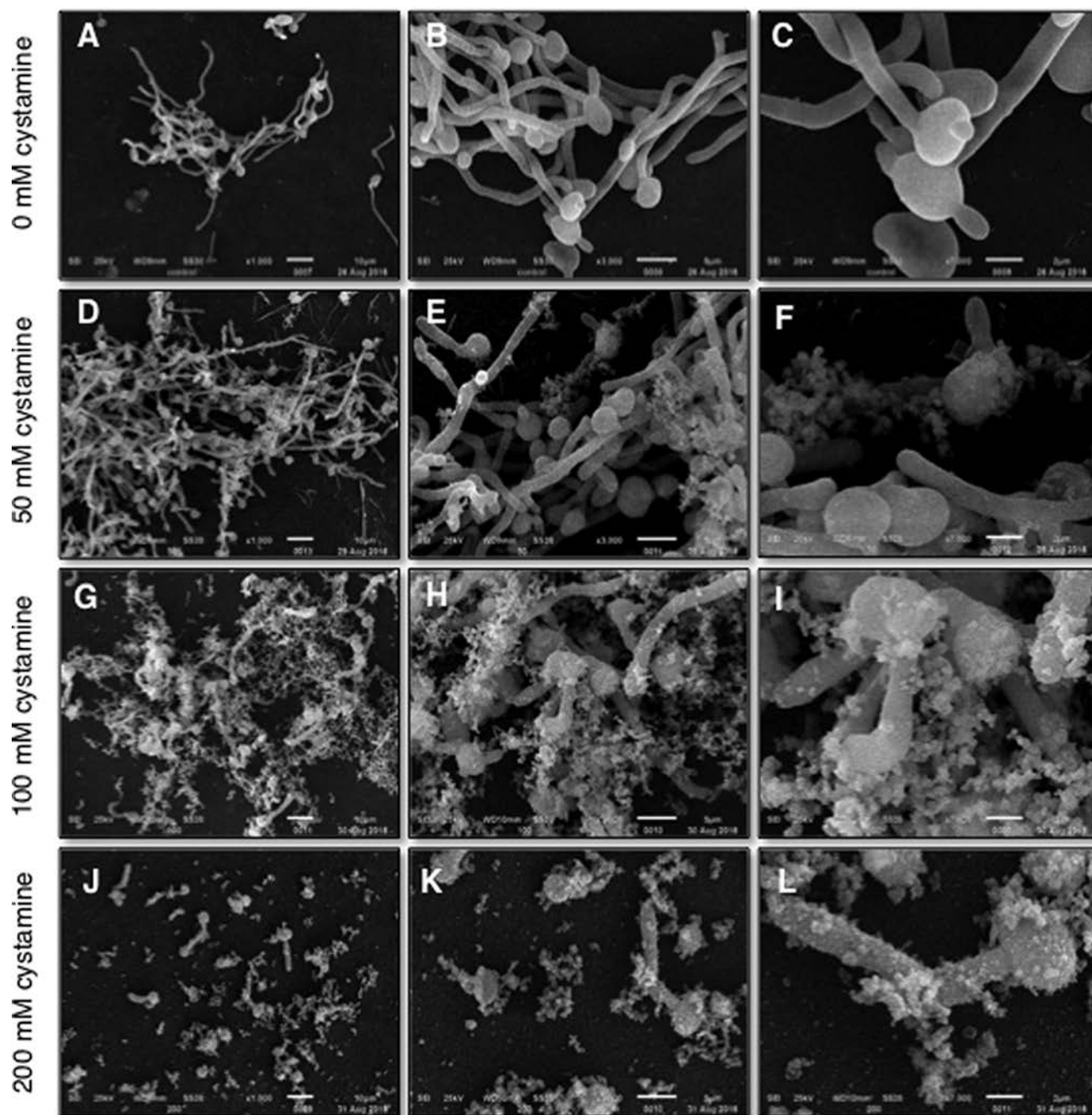
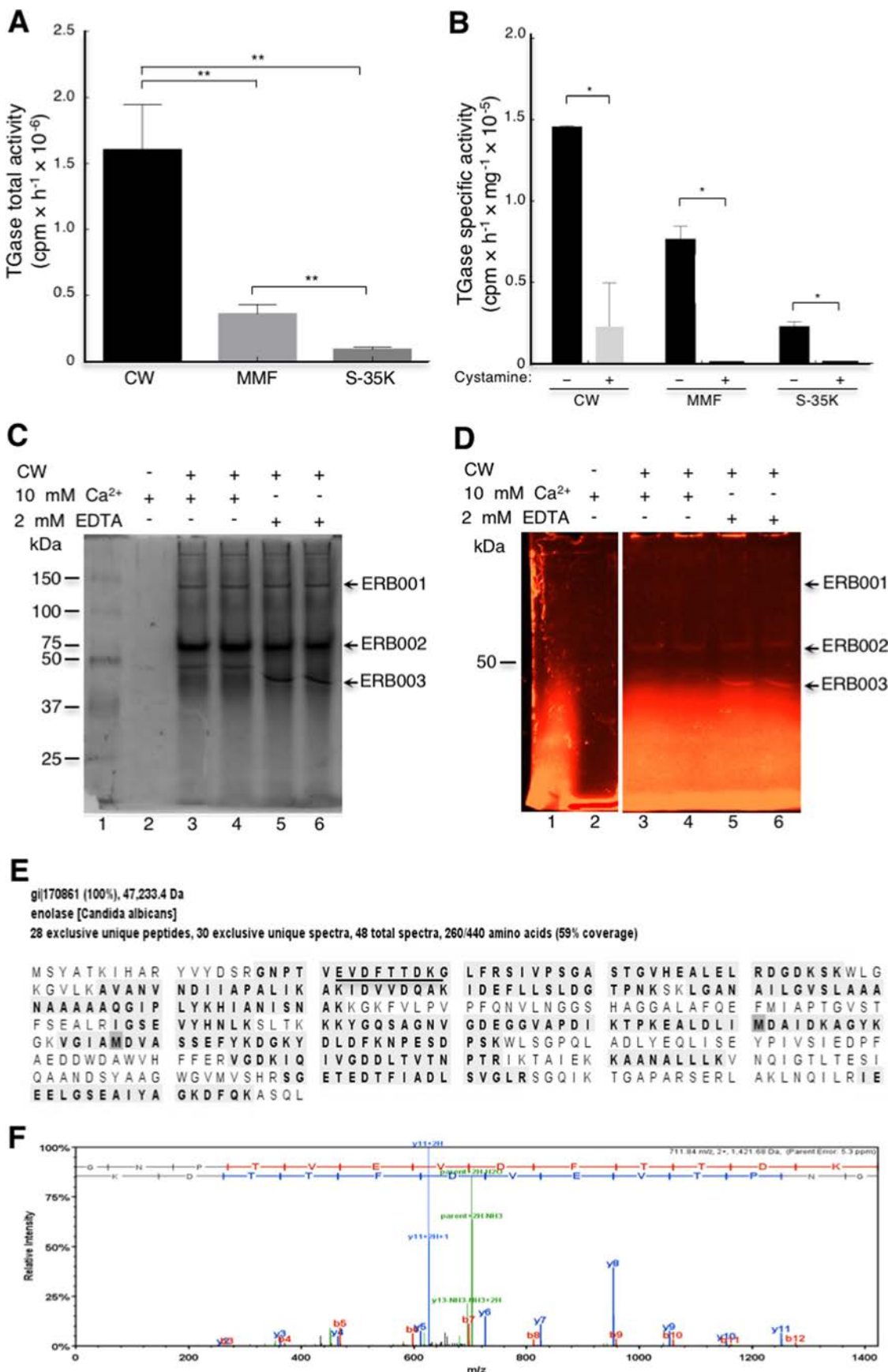


Figure 5. Inhibition of TGase activity by cystamine severely affects hypha formation. Yeast cells were grown with (D–L) or without (A–C) cystamine in LEE medium at 37 °C for 4 h and observed by SEM. Images in D–L revealed a decrease in hypha formation and the presence of huge amounts of flocculent extracellular material, which increased at higher concentrations of cystamine.

Identification of a protein with TGase activity in the cell walls of *C. albicans*

TGase activity has been demonstrated in multiple cellular fractions in *S. cerevisiae* and *C. albicans*, but the identity of the protein responsible for TGase activity has remained elusive (23, 24). To identify this protein, we determined the TGase activity mainly associated with *C. albicans* cell walls (CW, 72%), followed by the mixed membrane fraction (MMF, 19%) and cytosol (S-35K, 9%) (Fig. 6A). Activity was reduced 88% in CW fraction, although it was completely inhibited in MMF and S-35K by 50 mM cystamine (Fig. 6B). Therefore, we used the CW frac-

tion as the enzymatic source for purification studies. Several approaches were used to solubilize the functional enzyme, including digestions with zymolyase, chitinase, and extractions with 8 M urea, with no results; after centrifugation at $12,000 \times g$, enzymatic activity was always located in the pellet (Fig. S6). Thus, we decided to use MDC inhibitor as a fluorescent probe in a TGase activity assay to identify the protein (Fig. 6, C and D). The assay was performed with and without Ca^{2+} and with EDTA. This approach allowed us to observe three fluorescent protein bands (Fig. 6D) named ERB001, ERB002, and ERB003. The presence of calcium shifted the mobility of the ERB003



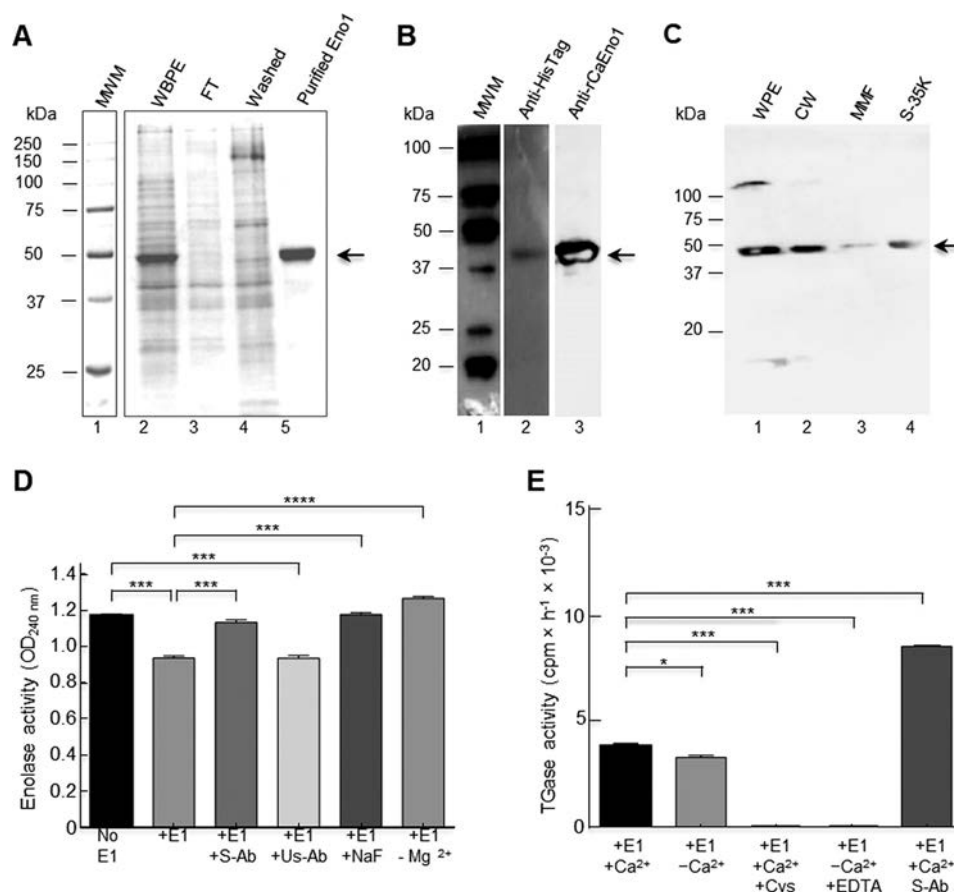


Figure 7. Recombinant enolase1 from *C. albicans* has TGase activity. The *C. albicans* *ENO1* gene was cloned in the pCold II plasmid and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-competent cells; protein production was induced at 23 °C for 24 h. **A**, Eno1 protein was purified by IMAC with a Ni²⁺-NTA-agarose column in native conditions as described, and elution fractions were evaluated by 12% SDS-PAGE; MWM, protein molecular weight markers. Empty vector was also transformed in bacteria and passed through the same IMAC column, and the fractions obtained were also analyzed as a negative control (data not shown). **B**, Western blot of purified recombinant protein using anti-His-tag polyclonal antibodies (lane 2) and rabbit anti-rCaEno1 protein (lane 3). **C**, Western blot of *C. albicans* cell fractions using anti-rCaEno1 polyclonal antibodies. WPE, whole-protein extracts; CW, cell wall fraction; MMF, mixed membrane fraction; S-35K, soluble cytosolic fraction. Arrows indicate Eno1 protein. **D**, enolase activity was determined with purified rCaEno1 protein. **E**, TGase activity determined with purified rCaEno1 protein. These results allowed us to conclude that rCaEno1 protein has both enolase and transglutaminase activities. Statistical unpaired *t* test. *, *p* < 0.05; ***, *p* < 0.001; ****, *p* < 0.0001. Bars are shown with standard error of mean. E1, enolase 1; S-Ab, specific antibodies (anti-rCaEno1); Us-Ab, unspecific antibodies (anti-rEhPCNA); Cys, cystamine.

band to a higher molecular mass (Fig. 6, C and D), with no apparent changes for the other two bands. The ERB001 band was tiny and lost its fluorescence very quickly. Identification of proteins in the three fluorescent bands was performed by tandem mass spectrometry (Tables S5 and S6). Interestingly, we identified enolase as a putative candidate TGase enzyme because the most peptides were identified in the ERB002 and ERB003 bands. As an example, we show the peptides identified for enolase corresponding to 59% coverage of the enolase sequence (Fig. 6E). These findings corroborate previous results locating enolase in yeast cell walls (29).

To demonstrate the putative TGase activity of enolase, the gene encoding this protein was cloned into pCold II, and the

native recombinant CaEno1 (rCaEno1) produced in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS was purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) through a Ni²⁺-NTA-agarose column using 250 mM imidazole (Fig. 7A). The identity of the rCaEno1 protein was verified by Western blotting with anti-His-tag antibodies (Fig. 7B, lane 2) and tandem mass spectrometry (Fig. S7). Purified protein was also used to produce rabbit polyclonal anti-rCaEno1 antibodies, which recognized the purified protein (Fig. 7B, lane 3), as well as a polypeptide of 47 kDa in whole-cell extracts, purified cell walls, and a mixture of the membrane fraction and soluble fraction of *C. albicans* yeast cells (Fig. 7C). Moreover, a 120-kDa band was detected in whole-cell extracts and the cell wall fraction (barely seen). To

Figure 6. Determination of TGase activity in cell fractions obtained from *C. albicans* yeast cells and identification of protein with TGase activity. **A**, total TGase activity was determined by incorporation of [¹⁴C]lysine in CW, MMF, and cytosolic soluble fraction (S-35K). **B**, specific TGase activity of different cellular fractions and inhibition by cystamine. **C** and **D**, to identify the protein with TGase activity, MDC-specific TGase inhibitor was used to localize the TGase protein by fluorescence in native 7.5% polyacrylamide gels using the cell wall fraction as an enzymatic source. **C**, Gel stained with Coomassie Brilliant Blue. **D**, fluorescent image of gel shown in C before staining with Coomassie Blue. A negative control without cell wall was also analyzed in this experiment but is not shown in figure. Arrows indicate fluorescent bands isolated for mass spectrometry analysis. **E**, peptides identified by mass spectrometry (28 unique peptides) obtained from ERB003 band in D are shown shaded. **F**, tandem mass spectrum of EVDFTTDKG peptide (underlined in E). Statistical unpaired *t* test. *, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01. Bars are shown with standard error of mean.

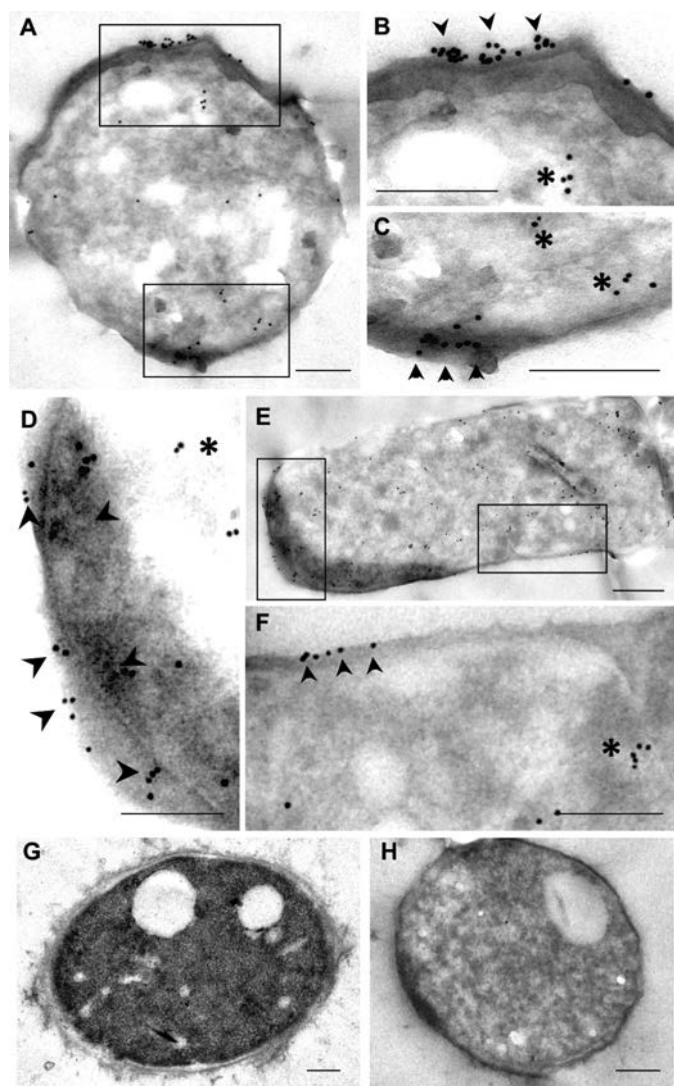


Figure 8. IEM localization of ENO1 in *C. albicans*. Micrographs A–C and D–F correspond to low and high magnifications of two sets of yeasts processed for immuno-gold labeling for detection of ENO1. G corresponds to a yeast processed to preserve general ultrastructure. H corresponds to the negative control incubated with normal rabbit serum. Scale bar, 0.2 μ m.

confirm these results, the distribution of Eno1 in *Candida* yeasts was determined by the IEM technique using the rabbit anti-rCaEno1 polyclonal antibody we generated. Most of the gold labeling was distributed in isolated patches over the surface of yeast (Fig. 8, A–F, arrowheads). Gold nanoparticles were also found in the cytoplasm of yeasts (Fig. 8, A–F, asterisks). Negative controls with preimmune serum did not show labeling in cells (Fig. 8H).

C. albicans enolase has TGase activity

To demonstrate the TGase activity of enolase, we first demonstrated the enolase activity of rCaEno1. Enolase activity was spectrophotometrically determined by measuring the absorption of phosphoenolpyruvate. When this molecule was transformed in 2-phosphoglycerate, a reduction of 0.2 in the OD_{240 nm} was observed (Fig. 7D) demonstrating enolase activity. This was inhibited by the anti-rCaEno1 antibody as well as fluoride ion, a specific inhibitor of enolase (30). As a negative

control, we used anti-recombinant *Entamoeba histolytica* proliferating cell nuclear antigen (anti-rEhPCNA) antibodies with no inhibition of enolase activity. This activity was fully dependent on magnesium ions (Fig. 7D), as has been reported (31).

TGase activity was determined using the rCaEno1 protein as an enzyme source. Notably, rCaEno1 showed TGase activity in the presence and absence of Ca²⁺ (Fig. 7E). It is well-known that TGase activity in *C. albicans* and *S. cerevisiae* is dependent on calcium ions (23, 24). The activity of TGase in the absence of exogenous calcium could be due to the incorporation of this cation in enzymes during expression in bacteria and was conserved through the purification process. To test this hypothesis, we use EDTA to chelate endogenous calcium; consequently, the enzyme showed no activity (Fig. 7E). This behavior was similar when TGase activity was tested in 50 mM cystamine. To assess whether the anti-rCaEno1 antibody was also able to inhibit this enzymatic activity, we performed a TGase activity reaction with the protein previously incubated with the anti-rCaEno1 antibody. Surprisingly, this antibody did not inhibit TGase activity but increased it 100% (Fig. 7E). These results suggest that there are two different active sites in the enolase molecule.

TGase activity is essential for growth in several strains of *C. albicans*

To determine whether TGase activity was necessary for growth in other *C. albicans* strains, we cultured eight strains in solid media containing 0, 25, 50, and 100 mM cystamine (Fig. S8A). There were differences in sensitivity to cystamine concentration between yeast strains, with almost complete inhibition for 100 mM cystamine. When 0–3 mM MDC were tested, differences in susceptibility to inhibitor among strains were seen; 3 mM MDC completely inhibited growth in all strains (Fig. S8B).

Cystamine and MDC TGase inhibitors affect the myceliation of *C. albicans* 26555 strain

We tested the inhibition of myceliation by both cystamine and MDC TGase inhibitors using the *C. albicans* 26555 strain as an example (Fig. 9). Cystamine inhibited the yeast-to-mycelium transition (Fig. 9A), as occurs with the *C. albicans* CAI4 strain. However, the mycelium was longer, and the amount of extracellular flocculent material was lower in *C. albicans* 26555 than *C. albicans* CAI4 (Fig. 5). In addition, MDC completely inhibited the yeast-to-mycelium transition in 2 mM MDC, with no visible damage to its cell surface (Fig. 9B).

Discussion

C. albicans is the main opportunistic pathogenic fungus in immunocompromised patients worldwide (32). The principal structure of *C. albicans* in contact with host cells is the cell wall, which mainly confers osmotic protection, cellular shape, and defense against host immune response. Cell wall components are cross-linked and provide stability to this structure through different types of chemical bridges. TGase is involved in enzymatic activities in cell walls and the formation of covalent cross-links previously demonstrated in *S. cerevisiae* and *C. albicans* (23, 24). Inhibition of TGase by cystamine and MDC, which are

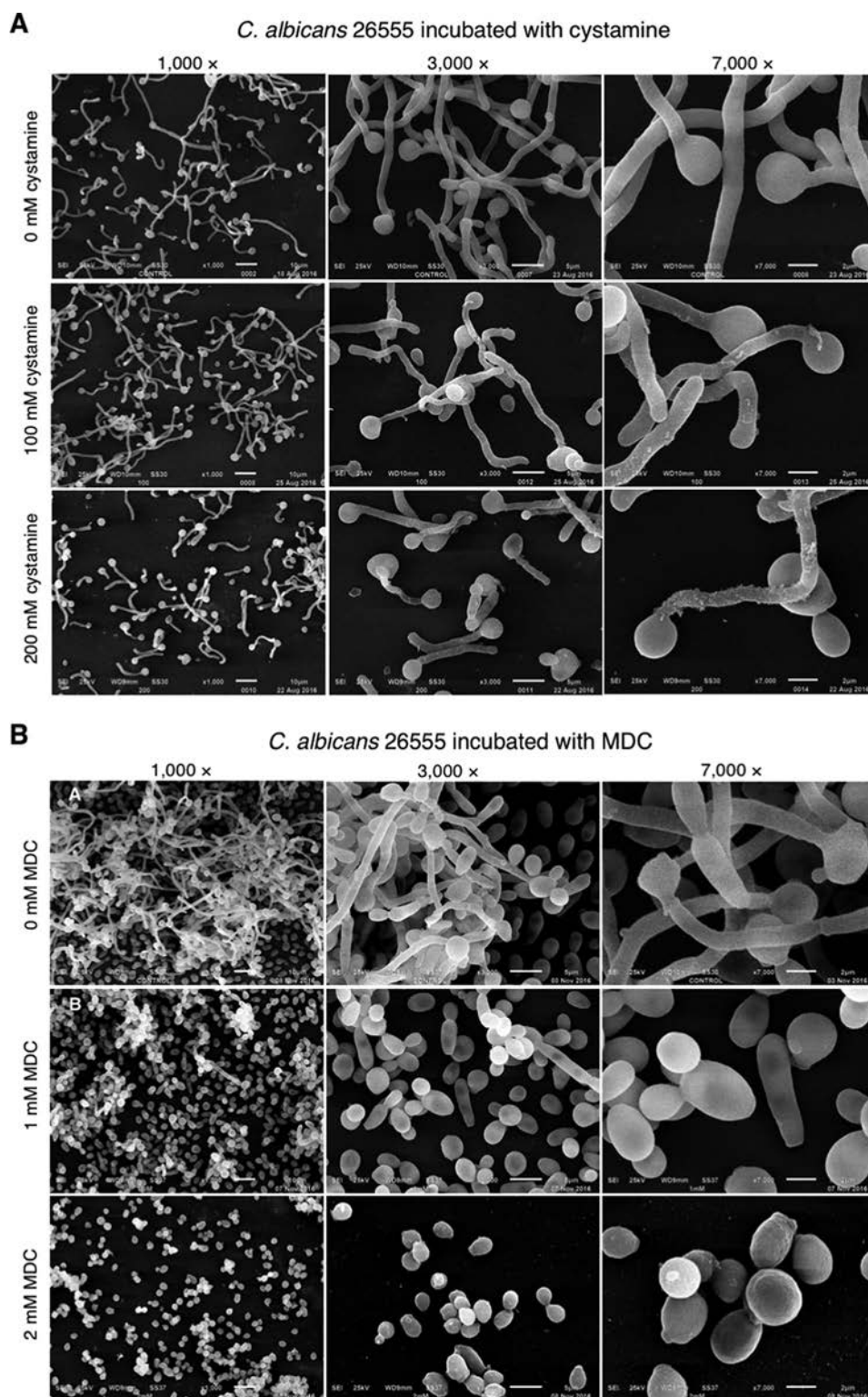


Figure 9. Effect of cystamine and MDC on yeast-to-mycelium transition of *C. albicans* ATCC 26555 strain. Different strains of *C. albicans* were grown in YNB medium overnight, and serial 10^{-1} dilutions were used to inoculate YPD solid media containing 0, 25, 50, and 100 mM cystamine (A) or 0–3 mM MDC (B). Starting concentration of cells used was 3×10^6 cells/ml.

irreversible and reversible inhibitors (33–35), respectively, increased the osmosensitivity of cells after partial digestion of glucan with zymolyase (Fig. 1, D and E). A decrease in the optical density at 600 nm of cultures with inhibited TGase indicated that the protective role of the cell wall against osmotic shock

was diminished as a result of the easier access of glucanase from zymolyase to glucan. It is well-known that the hydrolysis of glucan by lyticase or zymolyase (two commercial preparations of glucanases) causes the formation of protoplasts or spheroplast, which are highly sensitive to osmotic shock. Thus, TGase

TGase role in *C. albicans* biology

catalyzed the formation of isopeptide chemical bonds between the [¹⁴C]lysine and proteins of both low- and high-molecular masses (Fig. 1C) to bring osmotic protection to cells.

The mass spectrometry analysis of the labeled proteins released with SDS revealed a great diversity of proteins (1046) with different functions in the cell, including glycolysis, mitochondrial functions, translation, heat shock stress, membrane proteins, structural proteins, nucleic acid-binding proteins, among many others. The average molecular masses of these proteins were below 50 kDa; however, there were many proteins with high-molecular masses (between 50 and 220 kDa). Because the range of molecular masses of proteins in the gel that we cut for mass spectrometry analysis was lower than 50 kDa, these proteins then might not have their full length in the cell wall, and their fragments could have been cross-linked to other components of the cell wall by the transglutaminase. The number of proteins released with zymolyase and chitinase was lower (37 and 41, respectively). The proteins released by zymolyase were mainly ribosomal subunits, glycolytic proteins, heat-shock proteins, and six cell wall proteins, which correspond to agglutinin-like protein 1 (Q5A8T4), agglutinin-like protein 4 (A0A1D8PQB9), chitinase 2 (P40953), the covalently-linked cell wall protein 14 (Q5AFN8), the cell-surface Cu-only superoxide dismutase (Q5AD07), and the pH-responsive protein 2 (O13318), which has 1,3- β -glucanoyltransferase activity. Interestingly, their molecular average masses were between 16 and 268 kDa, indicating that they are cross-linked to glucan or other cell wall components to ensemble large complexes. The proteins released with chitinase were similar to those released with zymolyase and might be linked to chitin or other cell wall components. More studies are needed to determine the role of these proteins identified in the cell wall. Recently, the molecular composition of extracellular vesicles (EVs) isolated from *C. albicans* was published (36), finding some similar proteins as those described in our work. Some of them included proteins involved in oxidation/reduction, metabolism, translation, stress, transporter, signaling pathways, and mitochondrial function. However, their function in EVs remains unknown as well.

The inhibition of TGase by cystamine affected the growth of yeast cells as a function of inhibitor concentration (Fig. 2). Damage caused by this inhibition included changes to the cell division pattern (Figs. 2C and 3E) and cell wall ultrastructure because of the changes observed by SEM (Fig. 2C) and TEM (Fig. 3, E and F). The presence of fibrillar material apparently linked to the cell wall was seen on the cell surface of the biggest cells only (Fig. 2C). In addition, the external layer of the cell wall seems to be absent in these cells and can correspond to mannoproteins, as these molecules are located at the outermost layer of the cell wall (9, 10, 12). We also observed the accumulation of electron-dense compounds on the surface of cell walls (Fig. 3, E and F), which seems to be different to the fibrillar material observed by SEM. However, these differences could be due to the different techniques used.

The increase in electron-dense material in vacuoles (Fig. 3, A–D) could be suggestive of autophagy, as confirmed by an increase in the Atg8 autophagy marker with increasing concentrations of cystamine (Fig. 3, G and J) and by the presence of the

modified form of Atg8 seen as a smear ranging between 14 and 16 kDa (Fig. 3L). The processed form of Atg8 was not observed in control cells even though we used SDS-PAGE gradient gels with 6 M urea. The 125-kDa band detected in Western blottings that decreased with increasing amounts of cystamine (Fig. 3H) could correspond to the Atg8 protein associated with other proteins into a complex that was not disrupted with Laemmli buffer (Fig. 3, G–J). However, this complex was almost completely disrupted when the SDS-polyacrylamide gel contained 6 M urea (Fig. 3, K and L). This electrophoretic analysis also allowed the observation of the 16-kDa band in the control sample, which was not previously observed, suggesting that the epitope that is recognized by the antibody was not exposed even though we used Laemmli buffer. This observation was also confirmed when we performed the detection of the Atg8 protein by immunofluorescence analysis (Fig. S5).

Moreover, the noteworthy inhibition of TGase did not affect the amounts of cell wall components, *i.e.* chitin, glucan, and mannoproteins at 6 h of incubation with cystamine (Fig. 4), which also remained unchanged at the previous time points of incubation with cystamine, but their organization might be altered, as observed by TEM (Fig. 3F). Notably, the growth inhibition caused by cystamine and MDC was observed in different *C. albicans* strains that displayed variation in sensitivity to inhibitors (Fig. S8), thus confirming the importance of TGase in a number of *C. albicans* strains.

Another process that is considered essential for *C. albicans* pathogenicity is the yeast-to-mycelium transition (37). Our results showed that TGase activity is required for this transition. Notably, the inhibition of TGase activity in the *C. albicans* CAI4 strain was also observed for *C. albicans* ATCC 26555 (Figs. 5 and 8). However, there were differences in the response of cells to inhibition. The CAI4 strain showed more secreted flocculent material than the ATCC 26555 strain, as well as more and longer mycelia. These differences might be attributed to the deletion of the *Ura3* gene in the CAI4 strain, which is an essential gene in myceliation (38). This mutation also affected the cytosol expression levels of *Ura3p*, *Hpt1p*, *Ald5p*, *Sgt2p*, *Pmm1p*, *IPF6037*, *Aro8p*, *Ade2p*, *Ura5p*, *Eft2p*, *Aro10p*, *Hem13p*, *Rps12p*, *Toa2p*, and *IPF4328* (39). These proteins have different roles in metabolism. *Hpt1p*, *Ade2p*, and *Ura5p* are involved in purine and pyrimidine metabolism. *Hem13p* and *Ald5p* are involved in heme biosynthesis, whereas *Aro8p* and *Aro10p* play a role in the turnover of aromatic amino acids. Finally, *Rps12p*, *Eft2p*, and *IPF6037p* participate in transcription or translation (39). Although the virulence of cystamine-treated cells has not been examined, it is expected that virulence will be affected because *C. albicans* that are unable to form filaments are not virulent (37).

The identification of *CaEno1* as a protein with two functions is not unique. Enolase has been described as a multifunctional protein that also exhibits non-glycolytic functions in several species. The human α -enolase is considered a moonlighting protein because it has many functions, including a role as a neurotrophic factor, as a stress protein involved in hypoxia, heat-shock proteins, or as part of centrosomes (40). In addition, it has binding capacities for cytoskeleton proteins such as F-actin and tubulin (41). Moreover, it interacts with APIP (APAF1

interacting protein), MRI1 (methylthioribose-1-phosphate isomerase yeast homologue), ADI1 (acireductone dioxygenase 1), ADD2 (adducin 2 β), ADD1 (adducin 1 α), ADD3 (adducin 3 γ), SMS (spermine synthase), and UBA6 (ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6) (String database). CaEno1 interacts with several proteins of the glycolytic pathway in *S. cerevisiae*, including PGI1 (phosphoglucose isomerase), TPI1 (triose-phosphate isomerase), CDC19 (pyruvate kinase), TDK1 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1), TDK2 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2), TDH3 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isozyme 3), PYK2 (pyruvate kinase), PGK1 (3-phosphoglycerate kinase), GPM1 (tetrameric phosphoglycerate mutase), and ENO2 (enolase II) (String database). The *S. cerevisiae* enolase has an additional function as a chaperone bound to preMSK1p for importing tRNA to mitochondria (42). The *C. albicans* enolase 1 interacts with Cbk1 (Cell wall Biosynthesis Kinase 1) (BioGRID database) (41), a Ser/Thr kinase that belongs to the RAM (Regulation of *Ace2p* transcription factor and polarized Morphogenesis) signaling network involved in polarized growth, cell separation morphogenesis, and biofilm formation (43–47).

Furthermore, enolase is considered the major antigen in patients with candidiasis and confers an advantage for invasion when bound by plasmin to induce fibrinolysis (48, 49). The null mutant was more susceptible to several drugs, did not show hyphal growth, and had reduced virulence in mice (50). In *S. cerevisiae*, the recombinant enolase causes vacuole fusion *in vitro*, and the null mutation of this gene generates vacuole fragmentation as a result of reduced vacuole fusion (51).

The CaEno1 and ScEno1 polypeptides have 78% identity and 88% similarity in the 436 compared amino acids (Fig. S9). The CaEno1 structure was obtained by homology modeling with the Modeler program, using the structure of ScEno1 (PDB code 2al1) as a template (Fig. S10), and it had good quality as shown by Verify3D (98.40% of residues had an averaged 3D–1D score of ≥ 0.2), Errat (overall protein quality factor 89.744), and Ramachandran plot (Fig. S11). CaEno1 is classified by the CATH database as a member of the enolase superfamily with the code 3.20.20.120, which indicates that CaEno1 is a protein mainly containing α -helices and β -strands and has a TIM-type α - β -barrel. The similarity between the two proteins was evidenced by superimposing both structures (Fig. S10C). In addition, they have identical catalytic residues, as well as residues involved in binding the Mg²⁺ ions and substrate (Fig. S12). However, the electrostatic potential of the CaEno1 surface has a negative value, whereas that of ScEno1 has a more positive surface value (Fig. 10, D and E). This may produce differences in proteins that interact with the two proteins. Because of the similarity of these two proteins, ScEno1 might also have transglutaminase activity, as it localizes in yeast cell walls that also have TGase activity (24).

Our data indicate that enolase does not share the same catalytic site for enolase and TGase enzymatic activities, because anti-rCaEno1 antibodies only inhibited enolase activity. Instead, it favored the transamidation reaction (Fig. 7, D and E) due to putative conformational changes in the protein, as demonstrated for human TG2. In this case, the conformational changes are involved in controlling enzymatic activity and are

important for regulating the enzymatic activity of autoantibodies in celiac disease (52).

An alignment with Clustal Omega program showed that CaEno1 has an identity of 18.72, 15.54, 18.59, 17.36, 16.85, and 20.61% with transglutaminases from *Anopheles gambiae*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Apis mellifera*, and *Homo sapiens* (TGase and Factor XII), respectively. However, the similarity increases in some conserved boxes (Fig. S13). Even though the identity is low, we identified a putative TGase catalytic site (AFQEFMIAPTGVSTFSEALR) in CaEno1, which is shown underlined in Fig. S13, and it corresponds to the PROSITE PS00547 identifier with the sequence (GT)Q(CA)WVX(SA)(GAS)(IVT)X(2)TX(LMSC)R(CSAG)(LV)G (<http://prosite.expasy.org/PS00547>).⁵ This putative TGase catalytic site was localized in the CaEno1 protein structure (Fig. S14). Interestingly, the Glu-170 residue in this sequence is part of the catalytic site of enolase (Fig. S12). Other residues (AFQEFMIA) are located in a β -sheet, which is localized close to the enolase active site. The remaining residues are located in an α -helix. This could suggest that the TGase active site needs a conformational change to be functional, depending on pH and the presence of calcium ions. There have been described two conformations for human TG2, open and closed. The presence of GTP without Ca²⁺ induced the closed conformation of TG2 with no TGase activity; when Ca²⁺ is present only, the TG2 conformation is open and therefore the protein is active (52). However, the answer for CaTGase will be revealed by the X-ray structure determination in the conditions used for the measurement of the activity of enolase and/or transglutaminase.

In conclusion, the aforementioned data spotlight TGase as a key molecule involved in cell wall remodeling during cell division and yeast-to-mycelium transition and as a putative molecular target for designing new drugs to specifically attack this important medical fungus.

Experimental procedures

C. albicans strains and culture conditions

We used the following *C. albicans* strains: *C. albicans* ATCC 26555; *C. albicans* CAI4 (ura3/ura3 Δ :: imm434) (53); *C. albicans* 1392; *C. albicans* 1394; *C. albicans* 1002; *C. albicans* 1675; *C. albicans* 1676; *C. albicans* 1687; and *C. albicans* 1439. The last seven strains were obtained from the Colección Española de Cultivos Tipo. All yeast strains were grown in liquid or solid YPD (1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% glucose) or YNB (Gibco) at 28–30 °C. For *C. albicans* CAI4, YPD medium was supplemented with 25 μ g/ml uridine.

To study the effects of cystamine on growth, *C. albicans* CAI4 yeast cells were previously grown in YPD medium (1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% glucose) supplemented with uridine (25 μ g/ml) at 30 °C overnight at 200 rpm in a water bath incubator (New Brunswick Scientific). Aliquots were withdrawn and inoculated in each of four Erlenmeyer flasks containing 100 ml of fresh media with different concentrations of cystamine (0, 50, 100, and 200 mM) to an initial optical density

⁵ Please note that the JBC is not responsible for the long-term archiving and maintenance of this site or any other third party hosted site.

TGase role in *C. albicans* biology

of 0.1 at 600 nm and incubated at 30 °C and 200 rpm for 24 h. During incubation, aliquots were withdrawn several times to determine the OD of cultures. For the inhibition experiments of other *C. albicans* strains, the same protocol was used, excluding uridine. Alternatively, MDC was used at different concentrations (0–4 mM).

Induction of myceliation in *C. albicans*

Yeast cells were grown in Lee's medium (23, 24) supplemented with 25 µg/ml uridine for the *C. albicans* CAI4 strain, with shaking at 200 rpm and 30 °C for 16 h. The cells were harvested by centrifugation, washed twice with distilled water, resuspended at a concentration of 200 µg/ml (dry weight) in sterile deionized water, and kept at 4 °C for 48 h. Adequate volumes of cells were used to inoculate fresh Lee's medium ($OD_{600\text{ nm}} = 0.2$) and were incubated with different concentrations of cystamine (0, 50, 100, and 200 mM) at 37 °C and 200 rpm for 4 h to inhibit myceliation. In some cases, yeast cells were also incubated in 0, 1, and 2 mM MDC at 37 °C and 200 rpm for 4 h. Finally, cells were analyzed using a scanning electron microscope from the National Laboratory of Experimental Services (LaNSE) at Cinvestav-IPN.

Fractionation of yeast cells

Cell-free extracts were obtained by mixing cells with 4 g of glass beads (0.5 mm in diameter, BioSpec Products) per g of cell pellet and were broken by vigorous agitation in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 µg/ml pepstatin A) for periods of 30 s on a vortex mixer and cooling periods of 1 min in ice until all cells were completely disrupted. Extracts were centrifuged at $1200 \times g$ at 4 °C in a 5810R Eppendorf centrifuge, and sedimented walls were washed twice in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), twice with 2 M NaCl, and twice with deionized water and then kept on ice. The supernatant was centrifuged at $105,000 \times g$ in a 90 Ti rotor in a Beckman Coulter Optima TM L-100 XP Ultracentrifuge for 1 h at 4 °C to obtain the soluble fraction (S-35K) and the mixed membrane fraction (MMF) and processed immediately to determine TGase activity.

Sequential extraction of cell wall proteins with SDS, zymolyase, and chitinase

Purified cell walls, previously labeled with [^{14}C]lysine, were sequentially extracted with SDS, zymolyase (Miles Laboratories), and chitinase (Sigma) as described (24, 54). Briefly, the treatment with 2% SDS was performed in a boiling water bath for 10 min, and solubilized proteins were recovered by centrifugation at $3000 \times g$ for 10 min at room temperature. The remaining insoluble material was washed by centrifugation with water, ethanol, and water, and this process was repeated. The material was treated with 1 mg/ml zymolyase 20T containing 1 mM PMSF at 30 °C for 3 h, and solubilized material was separated by centrifugation. Finally, the pellet was treated with 0.5 mg/ml chitinase in 10 mM phosphate buffer, pH 7.0, at 30 °C for 3 h, and solubilized material was collected. Radioactivity in all samples was quantified as above. Samples extracted with SDS were precipitated with 75% ethanol at 4 °C and washed three times with ethanol by centrifugation. Samples containing

10,000 cpm were electrophoresed in 10% SDS-polyacrylamide gels, stained with Coomassie Brilliant Blue, incubated with Amplify solution (GE Healthcare) as recommended, dried, and exposed to Kodak X-Omat S films at -70 °C for 1 month (24).

Paper chromatography

Purified radioactive cell walls were sequentially solubilized with 2% SDS, 1 mg/ml zymolyase, and 0.5 mg/ml chitinase, as described previously. The released proteins were separated from insoluble residue by centrifugation at $3000 \times g$ for 10 min at room temperature, and radioactivity was quantified. Samples containing 10,000 cpm were analyzed by electrophoresis in 10% SDS-polyacrylamide gels and fluorography. Alternatively, samples were analyzed by paper chromatography in saturated phenol with water into an ammoniac atmosphere. To determine the distribution of radioactivity, paper chromatograms were cut into 1-cm strips to determine radioactivity in a liquid scintillation counter (see below).

Determination of enzymatic activities

For the initial measurement of transglutaminase activity, 2.5 µCi of [^{14}C]putrescine (specific activity 108 mCi/mmol) or 2.5 µCi of [^{14}C]lysine (specific activity 9.2 mCi/mmol) were used in reaction mixtures containing 1% (w/v) *N,N'*-dimethyl casein, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, and the enzymatic source in a final volume of 1 ml. A commercial TGase from guinea pig liver (Sigma) was used in some assays. Later on, aliquots of different cellular fractions were used to determine the transglutaminase activity in reaction mixtures containing 2 mM CaCl_2 , 0.25 µCi [^{14}C]lysine (326.0 mCi/mmol, Matrix Laboratories) in a final volume of 0.25 ml of buffer A. Following 2–6 h of incubation at 30 °C with shaking, reactions were stopped by adding 2 ml of 10% (w/v) TCA, kept on ice for 2 h, filtered through glass fiber filters (2.5 cm in diameter, Whatman) using a vacuum filtration manifold (Millipore), washed twice with 2 ml of cold 5% TCA, twice with 2 ml of cold 70% ethanol, and dried at room temperature. Finally, radioactivity was measured in glass vials containing 5 ml of Ready Protein Liquid Scintillation Mixture (Beckman) and a Beckman LS6000 SC liquid scintillation counter.

Enolase activity was determined spectrophotometrically by measuring the reduction of absorbance at 240 nm of phosphoenolpyruvate (PEP) due to conversion into 2-phosphoglycerate (30). The reaction mixture contained 50 mM imidazole, pH 6.8, 400 mM KCl, 1 mM PEP, and 3 mM MgSO_4 in a final volume of 200 µl. The activity was evaluated by measuring changes in absorbance at 28 °C for 1 min after the addition of purified recombinant enolase. A decrease in absorbance of 0.2 corresponds to the conversion of 0.226 µmol of substrate (30). For inhibition studies of enolase, we used anti-recombinant *C. albicans* Eno1 (rCaEno1) antibodies and anti-recombinant rEhP-CNA antibodies (see below).

Procedure followed to solubilize TGase activity from cell walls

Cell walls were double-digested with zymolyase and chitinase for 4 h at room temperature, followed by denaturing with 8 M urea and subsequent renaturation by sequential dialysis with 5 and 2 M urea, and 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, each 12 h at 4 °C. Sample was then centrifuged at $1200 \times g$ for 10 min in an

Eppendorf centrifuge at 4 °C; the pellet was discarded, and supernatant (named SN 1200 × g) was centrifuged at 12,000 × g for 30 min at 4 °C. Pellet and supernatant (SN 12,000 × g) were separated and kept on ice. Pellet was resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 (Pellet 12,000 × g) (Fig. S1). Finally, TGase activity was determined in CW, the two SN and final pellet as described.

SEM

Yeast cells were grown in the absence or presence of different concentrations of cystamine for 6 h as described, harvested by centrifugation, washed three times with 1× PBS, and fixed with 2.5% glutaraldehyde in 1× PBS for 1 h. After fixation, small drops of samples were placed on specimen supports coated with concanavalin A (Sigma) and postfixed with 2% osmium tetroxide in 1× PBS for 1 h. Preparations were gradually dehydrated in different concentrations of ethanol (50, 60, 70, 80, and 90%) for 10 min each, and three times in 100% ethanol for 15 min each. Next, samples were submitted to critical point drying with CO₂ in a Samdry-780 apparatus (Tousimis Research, Rockville, MD) and metallization in a Denton Vacuum Desk II (Denton Vacuum, Morestown, NJ). Finally, cells were observed through a Jeol JSM-6510LV scanning electron microscope from LaNSE at Cinvestav-IPN.

TEM

Cells were fixed for at least 1 h in 3% glutaraldehyde in 1× PBS at room temperature. Samples were washed three times with 1× PBS each for 10 min, placed in a 1% osmium tetroxide solution in 1× PBS for 2 h at room temperature, washed thoroughly with water, and stained with 0.1% uranyl acetate overnight at room temperature. Next, samples were dehydrated with different concentrations of ethanol (50, 60, and 70%) for 10 min each, and then with 80, 90, and 100% ethanol for 15 min each. As propylene oxide was used as a transitional solvent, it was changed twice, each time for 10 min. Samples were placed in a 1:1 mixture of DER 736 epoxy resin and absolute ethanol for 3 h at room temperature, and in a 3:1 epoxy resin/ethanol mixture overnight at room temperature. The next day, samples were transferred to a 100% epoxy resin and incubated for 2 h at room temperature, placed in embedding molds, and polymerized for 24 h at 60 °C. Thin sections were cut using a Leica EM UC7 ultramicrotome and a glass knife. Thin sections (60–80 nm) on copper grids were stained with 1% uranyl acetate and Reynold's lead citrate. They were analyzed through a JEOL 1400 transmission electron microscope from LaNSE at Cinvestav-IPN.

Calcofluor staining of chitin for confocal microscopy

Yeast cells (10 million), obtained from the growth curve at 6 h of incubation as described, were fixed in 70% ethanol for 15 min, washed twice with 1× PBS for 30 s each, incubated with 100 μg/ml CFW (Sigma) for 5 min, washed twice with distilled water, and observed with a DAPI-compatible filter set in a Leica TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems, Mexico City, Mexico).

Quantification of chitin, mannoproteins, and glucan by flow cytometry

To measure the amount of chitin (55), 1.5-ml aliquots of cultured cells grown in YPD medium with 0, 50, 100, and 200 mM cystamine at an initial OD_{600 nm} of 0.2 were harvested (1.5 ml) at 1-h intervals up to 6 h by centrifugation at 500 × g in an Eppendorf microcentrifuge at 4 °C, washed twice with sterile distilled water, permeabilized with 70% ethanol, washed twice with distilled water, and stained without (to measure autofluorescence) or with 50 μg/ml CFW for 15 min at room temperature. One million cells were washed as before and analyzed through a flow cytometer (BD LSRFortessa from LaNSE at Cinvestav-IPN) to quantify CFW fluorescence (using a DAPI-compatible filter set). In each experiment, fluorescence emitted by 20,000 cells was determined using simple gated forward-scattered light *versus* side-scattered light parameters. The mean intensity of fluorescence emitted for stained (positive population) or no-stained (autofluorescence or negative population) yeast cells was analyzed and processed with FlowJo 10.0.6 software (Tree Star, Inc., Ashland, OR).

For quantification of mannoproteins, staining of cells with fluorescein-labeled concanavalin A (FITC-ConA, Vector Laboratories) was performed at the same time intervals as described previously. Cells were washed twice with 1× PBS, permeabilized with 70% ethanol, incubated with 2 μg/ml FITC-ConA in 1× PBS for 30 min at room temperature, washed twice with 1× PBS, and analyzed in the flow cytometer. The maximum excitation wavelength was 495 nm, and the maximum emission wavelength was 515 nm.

Glucan content was determined as follows: cells were washed twice with 1× PBS, permeabilized with 70% ethanol, washed twice with 1× PBS, and incubated in 0.5 mg/ml methyl blue (Sigma) for 5 min at room temperature. The cells were then analyzed by flow cytometry using an excitation wavelength of 410 nm and emission wavelength at 455 nm.

In each experiment, the staining index (SI) was calculated as shown in Equation 1 (56),

$$SI = \frac{(M_1 - M_2)}{2} \cdot S \quad (\text{Eq. 1})$$

where M_1 is the mean fluorescence intensity of the positive population; M_2 is the mean fluorescence intensity of the negative population, and S is the standard deviation of the mean fluorescence intensity of the negative population.

Western blotting

For *C. albicans* Atg8 immunodetection, we used the LC3A/B rabbit polyclonal antibody (Cell Signaling Technology), which recognizes LC3-I and LC3-II (16 and 14 kDa, respectively). Yeast cells were grown in different concentrations of cystamine for 6 h; yeast cell walls were separated by centrifugation, and remaining supernatants were electrophoresed in 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Mexico City, Mexico). Membranes were blocked with 5% skim milk (Difco) in 0.05% Tween 20 in 1× PBS (PBS-T) for 4 h at room temperature and incubated with 1:250 dilutions of LC3A/B primary antibody in 5% skim

TGase role in *C. albicans* biology

milk in PBS-T overnight at 4 °C. Next, membranes were washed 10 times with PBS-T for 10 min each at room temperature and incubated with a 1:20,000 dilution of goat anti-rabbit IgG antibody (Zymed Laboratories Inc.) in 5% skim milk in PBS-T for 2 h at room temperature. After washing membranes as described, immunoreactivity was detected by chemiluminescence with a 1:8 dilution of the SuperSignal West Femto maximum sensitivity substrate kit (Pierce, Mexico City, Mexico) using High Performance Chemiluminescence Films (GE Healthcare, Mexico City, Mexico). Digital images of Western blottings were obtained with a Gel Doc EZ Imager system and processed with Image Lab software (both from Bio-Rad). As molecular mass markers, we used Strep-tagged Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad), which were visualized by chemiluminescence with the Precision Protein StrepTactin-HRP conjugate (Bio-Rad). For the identification of rCaEno1 protein, we used either mouse anti-His-tag monoclonal antibodies (1:5,000 dilution; Roche Applied Science) or rabbit anti-rCaEno1 polyclonal antibodies (1:20,000 dilution), following the procedure described above.

Identification of TGase protein using a fluorescent TGase inhibitor MDC probe

Cell walls from *C. albicans* were simultaneously digested with 60 units of chitinase (Sigma) and 100 units of zymolyase (Zymo Research) overnight at room temperature. This fraction was used as the enzymatic source in the TGase activity assay. Digested cell walls (200 μ l) were mixed with 0.2 mM MDC, 1 mM PMSE, 1 μ g/ml pepstatin A, with no CaCl₂ or EDTA, and with 10 mM CaCl₂ or 2 mM EDTA, and incubated for 1 h at 4 °C. Proteins were separated by non-denaturing 7.5% polyacrylamide gels, and fluorescence was visualized at 350 nm with the Gel Doc EZ Imager system (Bio-Rad). Finally, fluorescent bands were excised and submitted to mass spectrometry (MS/MS) analysis for protein identification to the Proteomics Division at the University of Florida Interdisciplinary Center for Biotechnology Research.

Expression of recombinant *C. albicans* Eno1 protein and generation of anti-rCaEno1 polyclonal antibodies

Full-length *CaENO1* gene (1323 bp) flanked by KpnI and BamHI restriction sites was amplified by PCR using genomic DNA using the following primers, CaENO1pColdII_Fw(5'-CGGGGTACCATGTCTTACGCCACTAAAATCCA-3') and CaENO1pColdII_Rv(5'-CGCGGATCCTTACAATTGAGAA-GCCTTTTGGA-3'), and cloned into the pJET1.2/blunt vector (Thermo Fisher Scientific). It was then subcloned into the pColdII (Takara) plasmid in the mentioned restriction sites to generate the pColdII/CaEno1 plasmid, which was transformed into *E. coli* BL21 (DE3)pLysS (Invitrogen) competent cells. The induction of recombinant CaEno1 protein (rCaEno1) was achieved with 0.5 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside for 24 h at 23 °C in Luria-Bertani medium at 200 rpm. Cells were harvested by centrifugation at 4000 \times g for 20 min and resuspended in 12 ml of buffer A (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 7.4) containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 μ g/ml pepstatin A, 10 mM imidazole, and 1 mg/ml lysozyme. Cells were incubated at 4 °C for 1 h and sonicated three times in

ice for 10 s at 60% amplitude in a CPX 130PB Ultrasonic Processor (Cole-Parmer, Verno Hills, IL) with cooling for 1 min in ice between each sonication cycle, and the cell-free extract was obtained by centrifugation at 10,000 \times g for 30 min at 4 °C. Purification of the rCaEno1 protein was performed by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using a Ni²⁺-NTA-agarose column (7.0 \times 0.9 cm, 1 ml gel, Sigma). The column was washed with 4 volumes of buffer A, and the rCaEno1 protein bound to the column was eluted with 4 volumes of buffer E (50 mM Tris-HCl, 250 mM imidazole, pH 7.4) at 4 °C, collecting 1-ml fractions.

The identity of the purified rCaEno1 polypeptide was verified by Western blotting and tandem mass spectrometry with a 4800 MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems) from LaNSE (Cinvestav-IPN). The obtained MS/MS spectra were compared against the *C. albicans* SC5314 (ATCC MYA-2876) database uploaded from UniProt Knowledgebase using the Protein Pilot software version 4.0 (SCIEX, Mexico City, Mexico) and the Paragon algorithm as search engine.

To determine enolase and TGase activities, purified rCaEno1 protein was passed through a Sephadex G-25 column (5.7 \times 0.7 cm) and collected as a V₀ fraction in either 15 mM phosphate buffer, pH 6.8, or 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, respectively.

Rabbit polyclonal antibodies against rCaEno1 protein were produced as described (57), using 50 μ g of purified protein in each immunization. We used rabbits from the Laboratory Animals Production and Experimentation Unit (UPEAL) at Cinvestav-IPN, following the general principles of care and use of animals approved by the Ethics Committee from UPEAL-LaNSE at Cinvestav-IPN. Rabbit polyclonal anti-rEhPCNA antibodies were obtained from the purified protein as described above, using the pRSET A-*Ehpcna* plasmid encoding the full-length open reading frame (GenBankTM accession number XM_646418.1). Both antibodies were immunoadsorbed to their corresponding nitrocellulose-immobilized recombinant proteins, previously blocked with bovine serum albumin (BSA), eluted with 100 mM glycine, pH 2.3, and immediately neutralized with 1 M Tris-HCl, pH 8.0.

Bioinformatics analysis

The primary sequence alignment of CaEno1 (GenBankTM accession number AAB46358.1) and ScEno1 (GenBankTM accession number AAA88712.1) was performed using the Clustal Omega program (version 1.2.4) at the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)⁵ (59) and visualized with the BoxShade program at the ExPASy Bioinformatics Resource Portal (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).⁵ The structure of CaEno1p was obtained by homology modeling using the Modeler Program at the ModWeb Server for Protein Structure Modeling (version r189, <https://modbase.compbio.ucsf.edu/modweb/>),⁵ selecting the best and longest scoring model with very low slow fold assignment methods. The query protein (residues 4–440) was modeled, using as a template the corresponding region of the ScEno1p (residues 2–436), which was engineered to obtain a heterodimer composed of one active and one inactive subunit (RCSB Protein Data Bank code 2al1). Protein structures were visualized with UCSF Chimera (version 1.10.2, build 40686,

<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).⁵ The structures were compared with the Match Maker module of Chimera, using the Needleman-Wunsch algorithm and the BLOSUM62 matrix for best-aligning pair of chains. Quality model evaluation was performed with VERIFY_3D and ERRAT programs at the Structure Analysis and Verification Server version 4 (SAVES) from the Molecular Biology Institute UCLA (<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>).⁵ Ramachandran plots were obtained with the RAMPAGE program at the University of Cambridge (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).⁵ The CaEno1 homology model was deposited in the Protein Model Database from CASPUR and the Biocomputing Group of the Department of Biochemical Sciences of the University of Rome “LA Sapienza” (<https://bioinformatics.cineca.it/PMDB/>),⁵ with the identifier PM0081054. To determine the surface electrostatic potential (EP) of CaEno1p and ScEno1p, the PDB files were converted to a PQR format using the PDB2PQR (version 2.1.1) server at the National Biomedical Computation Resource website (<http://nbcrc.ucsd.edu/>)⁵ employing the default parameters in the program (force field, PARSE; optimization of hydrogen bonding network) and pH 6.8 (pH of enolase activity assay). The EP of molecular models was determined with Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) software following the web link mentioned above. Finally, the EP on the protein surface was visualized with Chimera (setting values between -5 (red) to +5 (blue) kcal/mol). The BioGRID (the Biological General Repository for Interaction Datasets, <https://thebiogrid.org/>)⁵ and functional protein association networks with the STRING program (<https://string-db.org/>)⁵ (60) were used to determine interactions maps and interactors for enolase. The structural classification of enolase was performed at the CATH/Gene3D (version 4.1) website (<http://www.cathdb.info/>)⁵ (61). A search of domains was performed in the Protein Sequence Analysis and Classification database at the European Bioinformatics Institute (InterPro, <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).⁵

Immunolocalization of Eno1 in *C. albicans* by IEM

Detection of Eno1 in *C. albicans* was achieved by electron microscopy following a procedure previously reported (58). Yeasts were washed with PBS and then fixed with a mixture of 4% paraformaldehyde and 0.05% glutaraldehyde in 0.2 M PIPES, pH 7.0, for 1 h at room temperature. After thorough washings with PBS, yeasts were blocked by incubation in 10% fetal calf serum in PBS, washed with PBS, then dehydrated, and then embedded in increasing concentrations of ethanol and LR White resin (London Resin, Polysciences, Inc.). Yeast embedded in resin were polymerized in gelatin capsules overnight, under UV light, at 4 °C. Immunogold labeling was carried out in thin sections obtained with an ultra-microtome (Reichert Jung, Austria) and then mounted on Formvar-covered nickel grids. Grids with the sections were floated on drops of the following solutions: (a) 0.1% skim milk and PBS-T (PBS and 0.05% Tween 20) for 30 min to diminish non-specific labeling; (b) rabbit antibody against Eno1 recombinant protein at a 1:20 dilution in PBS-T for 1 h at room temperature and overnight at 4 °C, and (c) goat anti-rabbit polyclonal antibody coupled to 10-nm gold particles for 2 h at room temperature (Zymed Laboratories Inc.

and Thermo Fisher Scientific) (1:40 dilution in PBS-T). Grids were washed in every step with PBS-T and in the last step with PBS and distilled water. Sections were contrasted with 3% uranyl acetate and then examined in a transmission electron microscope (TEM, JEOL 1400x, JEOL Ltd., Japan). As negative control, sections were incubated with serum from a normal rabbit diluted in PBS-T and then with secondary antibodies coupled to gold particles. Identification of subcellular structures positive to Eno1 was performed using thin sections of yeasts that were processed to preserve the ultrastructure. Briefly, cells were fixed for 1 h in 2.5% glutaraldehyde. After thorough washings in PBS, cells were fixed for 1 h in 1% OsO₄ at 4 °C, rinsed with PBS, gradually dehydrated in ethanol, and finally embedded in Spurr's resin. Thin sections were obtained with ultramicrotome and stained with saturated uranyl acetate dissolved in ethanol and a saturated aqueous lead citrate. Copper grids with the sections were examined in the TEM. Digital images were obtained and processed with Adobe Photoshop software.

Author contributions—J. P. L. A., E. R. B., M. I., and S. M. designed research. J. P. L. A., E. R. B., M. I., S. M., M. L. L. B., R. M. F., and K. G. C. G. performed research. J. P. L. A., E. R. B., M. I., R. M. F., and S. M. analyzed data. J. P. L. A., E. R. B., M. I., and S. M. wrote the manuscript.

Acknowledgments—We thank Irais Stephanie Ramírez Serrano for help with rCaEno1 antibody production in rabbits and Emmanuel Ríos-Castro from the Genomics, Proteomics and Metabolomics Unit at the National Laboratory of Experimental Services (LaNSE) at Cinvestav-IPN for the mass spectrometry analysis of labeled proteins. We thank Sirenia González Pozos from the Electronic Microscopy Unit and Víctor Hugo Rosales from the Flow Cytometry Unit (both from LaNSE at Cinvestav-IPN) and Monica Edith Mondragón Castela from the Department of Biochemistry at Cinvestav-IPN for their technical support to this project.

References

1. Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G., and White, T. C. (2012) Hidden killers: human fungal infections. *Sci. Transl. Med.* **4**, 165rv13 [Medline](#)
2. Calderone, R., Sun, N., Gay-Andrieu, F., Groutas, W., Weerawarna, P., Prasad, S., Alex, D., and Li, D. (2014) Antifungal drug discovery: the process and outcomes. *Future Microbiol.* **9**, 791–805 [CrossRef Medline](#)
3. Sardi, J. C., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., and Mendes Giannini, M. J. (2013) *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J. Med. Microbiol.* **62**, 10–24 [CrossRef Medline](#)
4. United States Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2013) Antibiotic resistance threats in the United States. CDC, Atlanta, GA
5. Morgan, J., Meltzer, M. I., Plikaytis, B. D., Sofair, A. N., Huie-White, S., Wilcox, S., Harrison, L. H., Seaberg, E. C., Hajjeh, R. A., and Teutsch, S. M. (2005) Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **26**, 540–547 [CrossRef Medline](#)
6. Poulain, D. (2015) *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Crit. Rev. Microbiol.* **41**, 208–217 [CrossRef Medline](#)
7. Chin, V. K., Lee, T. Y., Rusliza, B., and Chong, P. P. (2016) Dissecting *Candida albicans* infection from the perspective of *C. albicans* virulence and omics approaches on host-pathogen interaction: A review. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1643 [CrossRef Medline](#)

8. Höfs, S., Mogavero, S., and Hube, B. (2016) Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *J. Microbiol.* **54**, 149–169 [CrossRef Medline](#)
9. Ruiz-Herrera, J., Elorza, M. V., Valentin, E., and Sentandreu, R. (2006) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* **6**, 14–29 [CrossRef Medline](#)
10. Chaffin, W. L. (2008) *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 495–544 [CrossRef Medline](#)
11. Free, S. J. (2013) Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv. Genet.* **81**, 33–82 [Medline](#)
12. Munro, C. A. (2013) Chitin and glucan, the yin and yang of the fungal cell wall, implications for antifungal drug discovery and therapy. *Adv. Appl. Microbiol.* **83**, 145–172 [CrossRef Medline](#)
13. Ecker, M., Deutzmann, R., Lehle, L., Mrsa, V., and Tanner, W. (2006) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to β -1,3-glucan by new protein-carbohydrate linkage. *J. Biol. Chem.* **281**, 11523–11529 [CrossRef Medline](#)
14. Lesage, G., and Bussey, H. (2006) Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 317–343 [CrossRef Medline](#)
15. Keillor, J. W., Clouthier, C. M., Apperley, K. Y., Akbar, A., and Mulani, A. (2014) Acyl transfer mechanisms of tissue transglutaminase. *Bioorg. Chem.* **57**, 186–197 [CrossRef Medline](#)
16. Griffin, M., Casadio, R., and Bergamini, C. M. (2002) Transglutaminase: nature's biological glues. *Biochem. J.* **368**, 377–396 [CrossRef Medline](#)
17. Lorand, L., and Graham, R. M. (2003) Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 140–156 [CrossRef Medline](#)
18. Akimov, S. S., Krylov, D., Fleischman, L. F., and Belkin, A. M. (2000) Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion co-receptor for fibronectin. *J. Cell Biol.* **148**, 825–838 [CrossRef Medline](#)
19. Del Duca, S., Verderio, E., Serafini-Fracassini, D., Iorio, R., and Cai, G. (2014) The plant extracellular transglutaminase: what mammal analogues tell. *Amino Acids* **46**, 777–792 [CrossRef Medline](#)
20. Eckert, R. L., Kaartinen, M. T., Nurminskaya, M., Belkin, A. M., Colak, G., Johnson, G. V., and Mehta, K. (2014) Transglutaminase regulation of cell function. *Physiol. Rev.* **94**, 383–417 [CrossRef Medline](#)
21. Waffenschmidt, S., Kusch, T., and Woessner, J. P. (1999) A transglutaminase immunologically related to tissue transglutaminase catalyzes cross-linking of cell wall proteins in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **121**, 1003–1015 [CrossRef Medline](#)
22. Keillor, J. W., Apperley, K. Y., and Akbar, A. (2015) Inhibitors of tissue transglutaminase. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 32–40 [CrossRef Medline](#)
23. Ruiz-Herrera, J., Iranzo, M., Elorza, M. V., Sentandreu, R., and Mormeneo, S. (1995) Involvement of transglutaminase in the formation of covalent cross-links in the cell wall of *Candida albicans*. *Arch. Microbiol.* **164**, 186–193 [CrossRef Medline](#)
24. Iranzo, M., Aguado, C., Pallotti, C., Cañizares, J. V., and Mormeneo, S. (2002) Transglutaminase activity is involved in *Saccharomyces cerevisiae* wall construction. *Microbiology* **148**, 1329–1334 [CrossRef Medline](#)
25. Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J. Cell Biol.* **147**, 435–446 [CrossRef Medline](#)
26. Fernandes, C., Anjos, J., Walker, L. A., Silva, B. M., Cortes, L., Mota, M., Munro, C. A., Gow, N. A., and Gonçalves, T. (2014) Modulation of *Alternaria infectoria* cell wall chitin and glucan synthesis by cell wall synthase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 2894–2904 [CrossRef Medline](#)
27. Wang, Y. (2015) Looking into *Candida albicans* infection, host response, and antifungal strategies. *Virulence* **6**, 307–308 [CrossRef Medline](#)
28. Furlaneto, M. C., Andrade, C. G., Furlaneto-Maia, L., Galvão de França, E. J., and Pereira Moralez, A. T. (2012) in *Scanning Electron Microscopy* (Kazmiruk, V., ed) pp. 295–310, InTechOpen, London, UK
29. Edwards, S. R., Braley, R., and Chaffin, W. L. (1999) Enolase is present in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**, 211–216 [CrossRef Medline](#)
30. Kustrzeba-Wójcicka, I., and Golczak, M. (2000) Enolase from *Candida albicans*—purification and characterization. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **126**, 109–120 [CrossRef Medline](#)
31. Fallor, L. D., Baroudy, B. M., Johnson, A. M., and Ewall, R. X. (1977) Magnesium ion requirements for yeast enolase activity. *Biochemistry* **16**, 3864–3869 [CrossRef Medline](#)
32. Hani, U., Shivakumar, H. G., Vaghela, R., Osmani, R. A., and Shrivastava, A. (2015) Candidiasis: a fungal infection—current challenges and progress in prevention and treatment. *Infect. Disord. Drug Targets* **15**, 42–52 [CrossRef Medline](#)
33. Lorand, L., and Conrad, S. M. (1984) Transglutaminases. *Mol. Cell. Biochem.* **58**, 9–35 [CrossRef Medline](#)
34. Keillor, J. W., and Apperley, K. Y. (2016) Transglutaminase inhibitors: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **26**, 49–63 [CrossRef Medline](#)
35. Lai, T. S., Slaughter, T. F., Peoples, K. A., Hettasch, J. M., and Greenberg, C. S. (1998) Regulation of human tissue transglutaminase function by magnesium-nucleotide complexes. *J. Biol. Chem.* **273**, 1776–1781 [CrossRef Medline](#)
36. Gil-Bona, A., Llama-Palacios, A., Parra, C. M., Vivanco, F., Nombela, C., Monteoliva, L., and Gil, C. (2015) Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. *J. Proteome Res.* **14**, 142–153 [CrossRef Medline](#)
37. Lo, H. J., Köhler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G. R. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**, 939–949 [CrossRef Medline](#)
38. Kirsch, D. R., and Whitney, R. R. (1991) Pathogenicity of *Candida albicans* auxotrophic mutants in experimental infections. *Infect. Immun.* **59**, 3297–3300 [Medline](#)
39. Brand, A., MacCallum, D. M., Brown, A. J., Gow, N. A., and Odds, F. C. (2004) Ectopic expression of *URA3* can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of *URA3* at the RPS10 locus. *Eukaryot. Cell* **3**, 900–909 [CrossRef Medline](#)
40. Johnstone, S. A., Waisman, D. M., and Rattner, J. B. (1992) Enolase is present at the centrosome of HeLa cells. *Exp. Cell Res.* **202**, 458–463 [CrossRef Medline](#)
41. Díaz-Ramos, A., Roig-Borrellas, A., García-Melero, A., and López-Alemany, R. (2012) α -Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 156795 [Medline](#)
42. Entelis, N., Brandina, I., Kamenski, P., Krashennnikov, I. A., Martin, R. P., and Tarassov, I. (2006) A glycolytic enzyme, enolase, is recruited as a cofactor of tRNA targeting toward mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **20**, 1609–1620 [CrossRef Medline](#)
43. McNemar, M. D., and Fonzi, W. A. (2002) Conserved serine/threonine kinase encoded by *CBK1* regulates expression of several hypha-associated transcripts and genes encoding cell wall proteins in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **184**, 2058–2061 [CrossRef Medline](#)
44. Song, Y., Cheon, S. A., Lee, K. E., Lee, S. Y., Lee, B. K., Oh, D. B., Kang, H. A., and Kim, J. Y. (2008) Role of the RAM network in cell polarity and hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **19**, 5456–5477 [CrossRef Medline](#)
45. Bharucha, N., Chabrier-Rosello, Y., Xu, T., Johnson, C., Sobczynski, S., Song, Q., Dobry, C. J., Eckwahl, M. J., Anderson, C. P., Benjamin, A. J., Kumar, A., and Krysan, D. J. (2011) A large-scale complex haploinsufficiency-based genetic interaction screen in *Candida albicans*: analysis of the RAM network during morphogenesis. *PLoS Genet.* **7**, e1002058 [CrossRef Medline](#)
46. Gutiérrez-Escribano, P., González-Novo, A., Suárez, M. B., Li, C. R., Wang, Y., de Aldana, C. R., and Correa-Bordes, J. (2011) CDK-dependent phosphorylation of Mob2 is essential for hyphal development in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **22**, 2458–2469 [CrossRef Medline](#)
47. Gutiérrez-Escribano, P., Zeidler, U., Suárez, M. B., Bachellier-Bassi, S., Clemente-Blanco, A., Bonhomme, J., Vázquez de Aldana, C. R., d'Enfert, C., and Correa-Bordes, J. (2012) The NDR/LATS kinase Cbk1 controls the activity of the transcriptional regulator Bcr1 during biofilm formation in *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* **8**, e1002683 [CrossRef Medline](#)

48. Klingspor, L., Stintzing, G., and Tollemar, J. (1997) Deep *Candida* infection in children with leukaemia: clinical presentations, diagnosis and outcome. *Acta Paediatr.* **86**, 30–36 [CrossRef Medline](#)
49. Jong, A. Y., Chen, S. H., Stins, M. F., Kim, K. S., Tuan, T. L., and Huang, S. H. (2003) Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *J. Med. Microbiol.* **52**, 615–622 [CrossRef Medline](#)
50. Ko, H. C., Hsiao, T. Y., Chen, C. T., and Yang, Y. L. (2013) *Candida albicans* *ENO1* null mutants exhibit altered drug susceptibility, hyphal formation, and virulence. *J. Microbiol.* **51**, 345–351 [CrossRef Medline](#)
51. Decker, B. L., and Wickner, W. T. (2006) Enolase activates homotypic vacuole fusion and protein transport to the vacuole in yeast. *J. Biol. Chem.* **281**, 14523–14528 [CrossRef Medline](#)
52. Iversen, R., Mysling, S., Hnida, K., Jørgensen, T. J., and Sollid, L. M. (2014) Activity-regulating structural changes and autoantibody epitopes in transglutaminase 2 assessed by hydrogen/deuterium exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 17146–17151 [CrossRef Medline](#)
53. Fonzi, W. A., and Irwin, M. Y. (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**, 717–728 [Medline](#)
54. Mormeneo, S., Marcilla, A., Iranzo, M., and Sentandreu, R. (1994) Structural mannoproteins released by β -elimination from *Candida albicans* cell walls. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**, 131–136 [CrossRef Medline](#)
55. Amberg, D. C., Burke, D. J., and Strathern, J. N. (2005) *Methods in Yeast Genetics. A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
56. Maecker, H. T., Frey, T., Nomura, L. E., and Trotter, J. (2004) Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. *Cytometry A* **62**, 169–173 [Medline](#)
57. Herrera-Aguirre, M. E., Luna-Arias, J. P., Labra-Barrios, M. L., and Orozco, E. (2010) Identification of four *Entamoeba histolytica* organellar DNA polymerases of the family B and cellular localization of the *Ehodp1* gene and EhODP1 protein. *J. Biomed. Biotechnol.* 734898 [CrossRef Medline](#)
58. Escalona-Montaña, A. R., Ortiz-Lozano, D. M., Rojas-Bernabé, A., Wilkins-Rodriguez, A. A., Torres-Guerrero, H., Mondragón-Flores, R., Mondragón-Gonzalez, R., Becker, I., Gutiérrez-Kobeh, L., and Aguirre-García, M. M. (2016) *Leishmania mexicana*: promastigotes and amastigotes secrete protein phosphatases and this correlates with the production of inflammatory cytokines in macrophages. *Parasitology* **143**, 1409–1420 [CrossRef Medline](#)
59. Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., and Lopez, R. (2015) The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res.* **43**, W58–W584 [CrossRef Medline](#)
60. Szklarczyk, D., Franceschini, A., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Minguez, P., Doerks, T., Stark, M., Muller, J., Bork, P., Jensen, L. J., and von Mering, C. (2011) The String database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res.* **39**, D561–D568 [CrossRef Medline](#)
61. Sillitoe, I., Lewis, T. E., Cuff, A. L., Das, S., Ashford, P., Dawson, N. L., Furnham, N., Laskowski, R. A., Lee, D., Lees, J., Lehtinen, S., Studer, R., Thornton, J. M., and Orengo, C. A. (2015) CATH: comprehensive structural and functional annotations for genome sequences. *Nucleic Acids Res.* **43**, D376–D381 [CrossRef Medline](#)

The *Candida albicans* ENO1 gene encodes a transglutaminase involved in growth, cell division, morphogenesis, and osmotic protection

Elizabeth Reyna-Beltrán, María Iranzo, Karla Grisel Calderón-González, Ricardo Mondragón-Flores, María Luisa Labra-Barrios, Salvador Mormeneo and Juan Pedro Luna-Arias

J. Biol. Chem. 2018, 293:4304-4323.

doi: 10.1074/jbc.M117.810440 originally published online January 31, 2018

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M117.810440](https://doi.org/10.1074/jbc.M117.810440)

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 58 references, 19 of which can be accessed free at <http://www.jbc.org/content/293/12/4304.full.html#ref-list-1>