

Respuesta de *Candida albicans* tras su interacción con el macrófago: análisis proteómico y estudio de marcadores de apoptosis

Realizada por Virginia Cabezón Soriano en el departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Profesora Concha Gil.

La defensa de la Tesis tuvo lugar el 19 de junio de 2009, en el salón de Actos "Colegio Oficial de farmacéuticos de Madrid" del nuevo aulario de la Facultad de Farmacia de la UCM.

1. Resumen

C. albicans es un hongo patógeno oportunista que forma parte de la microbiota normal. En individuos sanos se mantiene un equilibrio entre las defensas del huésped y la expresión de los factores de virulencia, pero en situaciones de inmunosupresión puede causar diferentes tipos de infecciones que van desde candidiasis superficiales en piel y mucosas hasta candidiasis invasivas.

Debido al importante papel que tienen los macrófagos en el control de la infección por *C. albicans* y eliminación de este agente patógeno, en el presente trabajo nos planteamos profundizar en el estudio de la interacción *C. albicans*-macrófago para poder complementar estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación. Para ello se llevaron a cabo diferentes abordajes: (1) estudios de expresión diferencial de proteínas de *C. albicans* mediante electroforesis 2D-PAGE convencional utilizando el ratio macrófago-levadura 1:5, (2) estudios de expresión diferencial de proteínas mediante la tecnología 2D-DIGE con el ratio macrófago-levadura 1:1 y (3) estudio de marcadores de apoptosis en la levadura tras su interacción con el macrófago con el fin de demostrar la hipótesis generada previamente.

Este estudio reveló que la levadura responde modulando la expresión de diversas proteínas implicadas en diferentes procesos biológicos como el metabolismo y energía, transporte celular, respuesta a estrés oxidativo, biogénesis de componentes celulares y destino proteico, además de proteínas de función desconocida. Estos cambios en la expresión de proteínas reflejan un intento de adaptación por parte de la levadura al ambiente hostil en el que se encuentra en el interior del fagosoma. Esta respues-

ta varía dependiendo del ratio macrófago-levadura utilizado en los estudios de interacción.

El análisis de redes de interacción de genes/proteínas de *C. albicans* con proteínas implicadas en apoptosis descritas en la literatura, reveló la existencia de señales tanto apoptóticas como anti-apoptóticas en la levadura tras 3 horas de interacción con el macrófago. Además, pudimos confirmar nuestra hipótesis previa de muerte por apoptosis de *C. albicans* tras su interacción con el macrófago a distintos tiempos, mediante el estudio de varios marcadores: fragmentación del DNA, producción de ROS, actividad caspasa, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear, marcadores típicos de una célula apoptótica.

Por otro lado, para profundizar en los estudios proteómicos, es importante analizar subproteomas. La membrana plasmática de la levadura es esencial para su supervivencia y para la interacción patógeno-hospedador. Ésta contiene proteínas que median importantes funciones como señalización, transporte, generación del potencial de membrana y biosíntesis de la pared celular. Hemos puesto a punto un protocolo para la extracción de proteínas de membrana plasmática que pudiera aplicarse en posteriores estudios de interacción. Se probaron distintos métodos basados en: (1) la formación de protoplastos, (2) rotura mecánica de las células, (3) ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y (4) tratamiento con Na_2CO_3 . De este modo, mediante cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas, pudimos identificar un total de 42 proteínas previamente descritas como proteínas de membrana plasmática, de las 225 que aparecen anotadas en las bases de datos *Candida Genome Database*. Además se identificaron 20 proteínas asociadas a membrana plasmática y 21 proteínas de función desconocida con dominios transmembrana predichos.

2. Reseña del Grupo de Investigación

El grupo de investigación de la Dra. Concha Gil desarrolla su actividad científica en el departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Este grupo de investigación se ha consolidado en los últimos años como grupo dedicado fundamentalmente a la Biología Molecular de levaduras, principalmente de la levadura patógena *C. albicans* y de la levadura modelo *S. cerevisiae*. Además, han puesto a punto técnicas para estudiar la virulencia y diversos

aspectos de la interacción con el hospedador (sobre todo con los macrófagos) de distintos mutantes de *C. albicans* obtenidos por manipulación genética.

Es uno de los grupos pioneros en España dentro del área de la proteómica. Su experiencia en proteómica viene avalada por publicaciones en revistas internacionales y numerosas invitaciones a congresos nacionales e internacionales especializados, participación en Proyectos Europeos así como la coordinación y participación en diferentes Comités de organizaciones internacionales: EuPA (Asociación Europea de Sociedades de Proteómica, www.eupa.org), y HUPO (Organización mundial del Proteoma Humano, www.hupo.org), y por la creación de una base de datos de proteínas que es referencia para otros muchos grupos de investigación COMPLUYEAST-2DPAGE (<http://compluyeast2dpag.dacya.ucm.es/>).

Este grupo ha promovido la creación de la Unidad de Genómica y Proteómica en la Universidad Complutense de Madrid. La Dra. Concha Gil es responsable de la Unidad de Proteómica UCM-Parque Científico de Madrid, laboratorio perteneciente a ProteoRed, desde donde se han puesto a punto numerosas técnicas proteómicas que se dan como servicio a muchos grupos de investigación de la UCM, otras universidades, CSIC, hospitales y empresas privadas.

Las dos líneas principales del grupo son: el estudio de la interacción *Candida*-macrófago (1) y la identificación y caracterización de proteínas para el desarrollo de métodos de diagnóstico, pronóstico e inmunoprevención frente a las candidiasis invasivas (2).

