

Análisis proteómico de la matriz extracelular (ME) de biopelículas formadas por mutantes del hongo *Candida albicans* para genes que codifican proteínas que contienen el dominio CFEM rico en cisteína y genes implicados en glicosilación

Rosario Blanes¹, Ana M. Pérez¹, Amelia Murgui², Manuel Casanova¹, Ángel Domínguez³, José P. Martínez¹

¹Departamento de Microbiología y Ecología, ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universitat de València/Estudi General (UVEG), Valencia, e ³Instituto de Microbiología Bioquímica, Universidad de Salamanca, Salamanca (España)

Introducción

Candida albicans es un hongo patógeno oportunista capaz de producir graves infecciones sistémicas en individuos inmunocomprometidos. Entre los atributos biológicos que le confieren a *C. albicans* su potencial patogénico, la capacidad de formar biopelículas parece jugar un papel esencial. Las biopelículas son comunidades celulares altamente organizadas con una compleja estructura tridimensional, adheridas a un sustrato sólido (biológico o no biológico), en la que las células se encuentran embebidas en una matriz exocelular (ME) formada por polisacáridos, proteínas y otros componentes minoritarios. La ME juega un papel crítico en el mantenimiento de la integridad estructural de las biopelículas y en la protección de las células frente a factores externos adversos como el sistema inmunitario y/o el tratamiento con antimicrobianos [1]. Por lo tanto, un mejor conocimiento a nivel molecular y funcional de los constituyentes mayoritarios de la ME podría ser esencial en el desarrollo de nuevas estrategias para el diagnóstico, prevención y control de las candidiasis [2].

La formación de biopelículas es un proceso biológico muy complejo durante el cual las células fúngicas deben establecer múltiples interacciones con el entorno ambiental. En este contexto, se ha descrito la presencia en *C. albicans* de una familia de proteínas que contienen un dominio formado por 8 cisteínas, denominado CFEM (common in several fungal extracellular membrane proteins), y que pueden actuar como receptores de superficie, en transducción de señales, y como moléculas de adhesión en las interacciones huésped-parásito [3]. Nuestro grupo dispone de una colección de cepas con mutaciones en genes que codifican la síntesis de proteínas de la familia CFEM, en concreto los genes

PGA10 (también designado como *RBT51* y *HPB1*) y *WAP1*, que forman biopelículas muy frágiles y con poca capacidad de adherencia al sustrato (Figura 1) frente a lo observado en la cepa parental CAI4-*URA3* (Fig. 1) [4]. Por otro lado, dado que los resultados descritos en la bibliografía [5] indican que el componente mayoritario presente en la ME de las biopelículas formadas por *C. albicans* son carbohidratos, también se consideró interesante determinar la capacidad de formar biopelículas de mutantes de este hongo deficientes en glicosilación. En concreto se estudiaron mutantes para los genes *MNN9* y *ALG5*, que al igual que en el caso anterior formaron biopelículas muy frágiles y con poca capacidad de adherencia al sustrato (Figura 1).

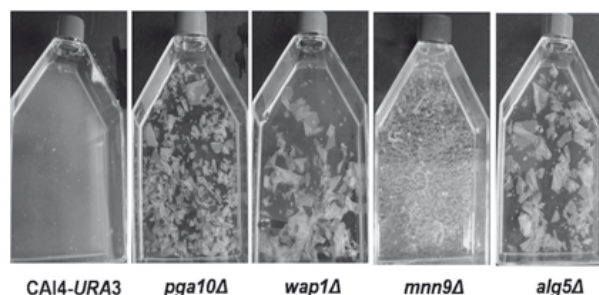


Figura 1. Aspecto macroscópico de las biopelículas formadas por las diferentes cepas de *C. albicans* analizadas.

Material y métodos

Biopelículas de 48 h formadas por las cepas de *C. albicans* analizadas fueron tratadas con etanol al 60% durante 60 min. Los extractos etanólicos resultantes fueron concentrados mediante liofilización, valorándose su concentración proteica mediante el método de Bradford [6]. Seguidamente se determinó el patrón polipeptídico asociado a cada extracto mediante electroforesis bidimensional en geles de

poliacrilamida del 12% (en la segunda dimensión). Los perfiles proteicos se muestran en la Figura 2.

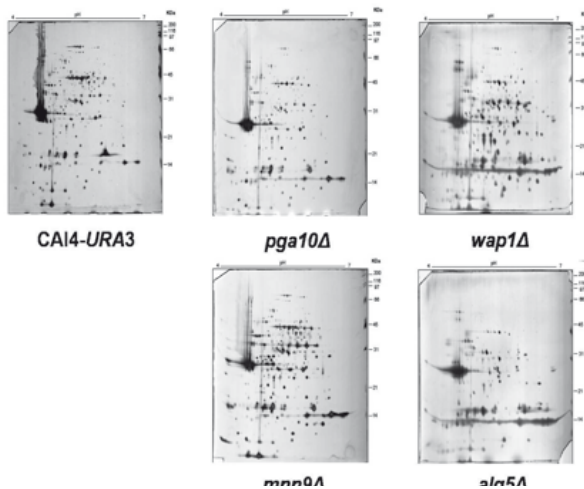


Figura 2. Análisis mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida de los extractos obtenidos por tratamiento con etanol al 60% de las biopelículas formadas por las diferentes cepas de *C. albicans* estudiadas y que se muestran en la Fig. 1.

Resultados y Conclusiones

El análisis comparativo de los diferentes extractos ha puesto de manifiesto la existencia de diferencias cualitativas y cuantitativas en los respectivos perfiles proteicos (Figura 2), detectándose especies que se expresan diferencial y/o mayoritariamente en la ME de la cepa parental (CAI4-URA3) o de las cepas mutantes para los genes *PGA10*, *WAP1*, *MNN9* y *ALG5*. La identidad de estos polipéptidos está siendo investigada en estos momentos mediante

análisis proteómico por espectrometría de masas (MALDI/MALDI-TOF).

Referencias

- [1] Branda SS, Vik S, Friedman L y Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005;13:20-6.
- [2] Thomas DP, Viudes A, Monteagudo C, Lazzell AL, Saville SP, López-Ribot JL. A proteomic-based approach for the identification of *Candida albicans* protein components present in a subunit vaccine that protects against disseminated candidiasis. *Proteomics* 2006;6:6033-41.
- [3] Kulkarni RD, Kelkar HS, Dean RA. An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. *Trends Biochem Sci* 2003;28:118-21.
- [4] Pérez A, Pedrós B, Murgui A, Casanova M, López-Ribot JL, Martínez JP. Biofilm formation by *Candida albicans* mutants for genes coding fungal proteins exhibiting the eight-cysteine-containing CFEM domain. *FEMS Yeast Res* 2006;6:1074-84.
- [5] Baillie GS y Douglas LJ. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:397-403.
- [6] Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.