

## Análisis mediante 2D-DIGE de la interacción con sangre de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* potencialmente patógena aislada de suplementos dietéticos

Carolina Hernández-Haro, Lucía Monteoliva, Gloria Molero, Concha Gil, María Molina

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia (UCM). Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid, Spain.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es conocida por su papel en la elaboración de pan y de bebidas alcohólicas tales como el vino, la cerveza o la sidra. Además, esta levadura es también consumida en forma de suplementos dietéticos y de probióticos lo que implica el consumo de las células de levadura vivas. Los efectos beneficiosos en el hospedador derivados de este consumo son conocidos; sin embargo, no se han estudiado los posibles efectos indeseables, sin duda debido a que *S. cerevisiae* se ha considerado siempre un microorganismo seguro para uso alimentario. En los últimos años, la bibliografía clínica muestra que la incidencia de infecciones causadas por *S. cerevisiae* ha aumentado de manera significativa en pacientes inmunodeprimidos [1], por lo que actualmente *S. cerevisiae* se incluye en el grupo de “patógenos oportunistas emergentes” [2-3]. Para estudiar la posible relación entre la ingesta de células vivas de *S. cerevisiae*, a través del consumo de suplementos dietéticos y probióticos, y las infecciones en humanos, se probó la virulencia de diferentes cepas en modelo murino de infección sistémica observándose un 50% de muerte de ratones con una de las cepas, por lo que se planteó el análisis de los posibles rasgos de virulencia asociados a estos *S. cerevisiae* patógenos [4]. El objetivo de este trabajo es la identificación de proteínas potencialmente implicadas en la virulencia, para lo cual se ha realizado un estudio comparativo de la expresión diferencial mediante el sistema 2D-DIGE de proteínas de extractos citoplasmáticos de una cepa procedente de dichos suplementos dietéticos caracterizada como virulenta y una cepa de laboratorio avirulenta. Las muestras se obtuvieron tras la interacción de las células de levadura con sangre humana a distintos tiempos (0, 1.5 y 3 horas) a 37°C y en condiciones semiaeróbicas. Se utilizó la sangre humana debido a que la diseminación de la levadura en el torrente sanguíneo constituye una etapa esencial para el desarrollo de infección sistémica. Los extractos de proteína de tres réplicas biológicas se marcaron con los fluorocromos Cy3 o Cy5 y el

estándar interno con Cy2 y se separaron en 9 geles que, tras la detección de fluorescencia, se analizaron con el módulo BVA (*Biological Variation Analysis*) del software DeCyder. Se realizaron comparaciones entre cepas y entre tiempos de interacción con sangre mediante análisis 2-ANOVA detectándose: 43 manchas proteicas de expresión diferencial al comparar los distintos tiempos (2-ANOVA-condición tiempo  $\leq 0.05$ ) de las cuales se han identificado 25, 391 manchas proteicas al comparar las 2 cepas (2-ANOVA-condición cepa  $\leq 0.05$ ) de las cuales se han identificado 96 y 41 manchas proteicas al comparar las distintas cepas en los distintos tiempos (2-ANOVA-interacción  $\leq 0.05$ ) de las cuales se han identificado 19. Entre estas proteínas, se encuentran proteínas metabólicas, chaperonas y ATP sintasas. Además, podemos destacar que entre las proteínas de expresión diferencial identificadas también se encuentran proteínas de la sangre. Esto podría ser debido a una fuerte unión de estas proteínas a las levaduras. Actualmente se están identificando el resto de las proteínas de expresión diferencial.

Carolina Hernández Haro es becaria FPI del MICINN. El trabajo está financiado por el proyecto AGL2006-12710-C02-02/ALI de la DGICYT del MEC. Proyecto coordinado con el grupo de investigación de las Dras. Amparo Querol y M<sup>a</sup> Teresa Fernández-Espinar del IATA (Valencia).

### Referencias

- [1] Enache-Angoulvant A y Hennequin C. Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. *Clin Infect Dis* 2005;41:1559-68.
- [2] Murphy A y Kavanagh K. Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen, Implications for biotechnology. *Enz Microbial Technol* 1999;25:551-7.
- [3] Muñoz P, Bouza E, Cuenca-Estrella M, Eiros JM, Pérez MJ, Sánchez-Somolinos M et al. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an emerging infectious

disease. Clin Infect Dis 2005;40:1625-34.

- [4] De Llanos R, Querol A, Permán J, Gobernado M y Fernández-Espinar M T. Food and probiotic

strains from *Saccharomyces cerevisiae* species as a possible origin of systemic infection. Int J Food Microbiol 2006;110:286-90.

## Análisis comparativo de diferentes aproximaciones para el estudio del proteoma de *Saccharomyces cerevisiae*

Dolores Gutiérrez<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Luisa Hernaéz<sup>1</sup>, Montserrat Martínez-Gomariz<sup>1</sup>, María Posada<sup>1</sup>, Concha Gil<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Proteómica. Universidad Complutense de Madrid-Parque Científico de Madrid (UCM-PCM).

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid

En los últimos años el gran desarrollo de los espectrómetros de masas y las técnicas de fraccionamiento de péptidos y proteínas ha permitido el estudio de muestras complejas de proteínas. A pesar de ello aún estamos lejos de conseguir el análisis completo de proteomas o subproteomas.

*Saccharomyces cerevisiae* es un organismo modelo desde el inicio en proteómica, para estimar la capacidad real de una tecnología dada en el estudio profundo de un proteoma. Además, cuando esta levadura esta creciendo en fase logarítmica hay evidencias de que más de 4500 proteínas son expresadas en un amplio rango dinámico, desde 100 copias por célula para aquellas proteínas menos abundantes hasta millones de copias por célula para las proteínas más abundantes. En la actualidad, se ha cubierto más del 50% de su proteoma, aplicando diferentes combinaciones de fraccionamiento y diferentes equipamientos de espectrometría de masas [1]

La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE) ha demostrado ampliamente su utilidad en la capacidad de separación de proteínas aportando gran información acerca del contenido proteico celular [2]. Sin embargo, presenta algunas desventajas importantes, como la limitada cantidad de muestra que se puede cargar en el gel, y la inadecuada resolución de proteínas hidrofóbicas o de elevado peso molecular. Alternativamente, las técnicas cromatográficas para la separación de péptidos y proteínas permiten reducir la complejidad de la muestra y aumentar el número de proteínas identificadas.

La técnica de separación mediante isoelectroenfoque en solución resuelve proteínas o péptidos en función de su punto isoeléctrico (pI). Las fracciones resultantes están en solución lo que permite acoplarlas a un segundo paso de fraccionamiento como cromatografía líquida y su posterior análisis por espectrometría de masas en *tandem* (MS/MS). Esta metodología parece altamente efectiva y reproducible siendo incluso compatible con la cuantificación de proteínas por marcaje con iTRAQ [3].

En este trabajo hemos diseñado cuatro aproximaciones proteómicas diferentes en las que se combinan diversas técnicas de fraccionamiento y análisis por espectrometría de masas para comparar la capacidad de las distintas estrategias para la caracterización del proteoma de esta levadura (Figura 1). Los experimentos se detallan a continuación:

Experimento 1: Proteínas intactas son separadas mediante isoelectroenfoque, utilizando tiras de 12 cm con un rango de PH de 3-10 con una resolución de 0.6, seguido de digestión triptica de cada fracción y nano-RP-HPLC acoplada *on-line* a ESI-MS/MS (LTQ) y *off-line* a MALDI-MS/MS (4800 MALDI-TOF/TOF de Applied Biosystems) para la identificación de proteínas. Experimento 2: Digestión triptica del extracto proteico seguido de separación de los péptidos según pI mediante *Off-Gel* usando las mismas tiras que para la separación de proteínas. Las diferentes fracciones se separaron mediante RP-HPLC acoplado a MS/MS de la misma manera que en el experimento 1. Experimento 3: Digestión de proteínas seguida de cromatografía bidimensional *off-line* (SCX y nano-RP-HPLC) acopladas a espectrometría