

resistant ST17 *Enterococcus faecium* harbouring an INC18:Tn1546 plasmid in a haemo-oncology Ward of a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother* 67: 832-836.

Medina-Pascual MJ, Valdezate S, Villalon P, Garrido N, Rubio V, Sáez-Nieto JA. (2012) Identification, molecular characterization and antimicrobial susceptibility of genovars of the *Burkholderia cepacia* complex in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 3385-3396.

Sáez Nieto JA, Valdezate, Medina MJ, Carrasco G, Garrido N, Villalon P, Ortega M, Navarro A, Rubio V. (2012) Taxonomía polifásica de bacterias patógenas y ambientales relacionadas con casos de infección. *MONOGRAFÍAS DE BACTERIOLOGÍA Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.* 1: 1-117.

Rubio V, Valdezate S, Alvarez D, Villalon P, Medina MJ, Salcedo C, Sáez Nieto JA. (2012) Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibilities and resistance mechanisms of *Streptococcus pyogenes* isolates resistant to erythromycin and tetracycline in Spain (1994-2006). *BMC Microbiology* 12: 215.

Villalon P, Valdezate S, Medina MJ, Carrasco Vindel A, Sáez Nieto JA. (2013) Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, caerbpem hydrolysing oxacillinase and metallo-beta-lactamase genes, and of common insertion sequences in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. *J Antimicrob Chemother* 68: 550-553.

Salvadó M, Plasencia V, Segura C, Gómez J, Medina M^aJ, Sáez Nieto JA, Castellanos S, Horcajada JP. (2013) Infection due to *Actinobaculum spp.*: Report of 12 patients in Spain. *J Infect* 66: 107-113.

Transducción de señal y respuesta inmunitaria en hongos patógenos humanos

Elvira Román, Rosalía Díez-Orejas, Rebeca Alonso-Monge y Jesús Pla
Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia,
Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España



De izquierda a derecha, V. Urrialde, AD. Prieto, B. Huertas, E. van de Plassche, I. Correia, E. Román, R. Díez Orejas, R. Alonso-Monge, J. Pla y C. Gómez-Pavón.

Nuestro grupo de trabajo lleva muchos años dedicándose al estudio de una levadura patógena del ser humano, *Candida albicans*. Este microorganismo forma parte de

nuestra microbiota, comportándose como un comensal, y tan solo en condiciones en las que se produce una alteración de las defensas del huésped, principalmente de tipo

inmunológico, puede producirnos enfermedades que se llaman, colectivamente, candidiasis. Aunque las infecciones fúngicas no tienen la relevancia de las bacterianas, principalmente debido a su menor incidencia, pueden ser de enorme gravedad en ciertas situaciones. En palabras de un médico clínico, cuando un paciente trasplantado o con una deficiencia genética grave adquiere una de estas infecciones puede llegar a convertirse en una auténtica «placa de Petri» que permite el crecimiento incontrolado del microorganismo. *C. albicans* es, probablemente, el mejor modelo de hongo patógeno que existe hoy día. Es un microorganismo fácil de cultivar en el laboratorio, aunque presentaba hasta hace pocos años una serie de inconvenientes que dificultaba su manipulación genética, tales como su diploidía, ausencia de ciclo sexual y la ausencia de plásmidos naturales. En la actualidad, sin embargo, se ha secuenciado su genoma y se han descrito numerosas herramientas (parte de ellas por nuestro grupo de trabajo) tales como genes reporteros (Figura 1), sistemas de expresión regulada o de delección génica. Presenta además, el fenómeno del dimorfismo, proceso por el cual la forma de levadura cambia a forma hifal, lo que le permite invadir y escapar a la acción de las células fagocíticas.

Nuestro grupo se ha centrado, desde hace bastantes años ya, en el estudio de las rutas de señalización mediadas por quinasas de tipo MAP en este hongo. La línea empezó a dar sus frutos cuando Federico Navarro, que actualmente lleva una línea de investigación en microorganismos ambientales en nuestro Departamento, clonó el homólogo del gen *SLT2* de *Saccharomyces cerevisiae*, con el que la profesora M. Molina desarrollaba un trabajo sobre genes de autólisis en levadura iniciado años atrás por los Dres. C. Nombela y A. Durán. Estas rutas, de las que se conocen cuatro hasta el momento en *C. albicans*, desencadenan respuestas celulares frente a situaciones de estrés muy diversas, como cambios en la osmolaridad del medio, en el potencial redox o daños en la superficie de la célula fúngica. Su activación por fosforilación permite al hongo desencadenar una respuesta transcripcional y así adaptarse y sobrevivir a dichos cambios. Desde el punto de vista funcional, son muy específicas del estímulo inicial y existen estrechas interconexiones entre sus elementos que regulan su activación, inhibición o desactivación. Su enorme complejidad funcional las convierte en un auténtico «sistema nervioso» del hongo, esencial para percibir el entorno y los cambios que en él se producen.

Nuestros proyectos en los últimos años han sido subvencionados tanto por programas nacionales (Programa Nacional de Biotecnología) como transnacionales (ERANET-Pathogenomics) y han ido encaminados a identificar, en primer lugar, los elementos que intervienen en estas rutas, utilizando en buena medida, la levadura no patógena *S. cerevisiae* como hospedador genético. Una segunda etapa ha consistido en caracterizar su papel en el funcionamiento del hongo, y en especial en tres procesos como son 1) la transición dimórfica, responsable del cambio de morfología de levadura a hifa; 2) la construcción de la pared celular,

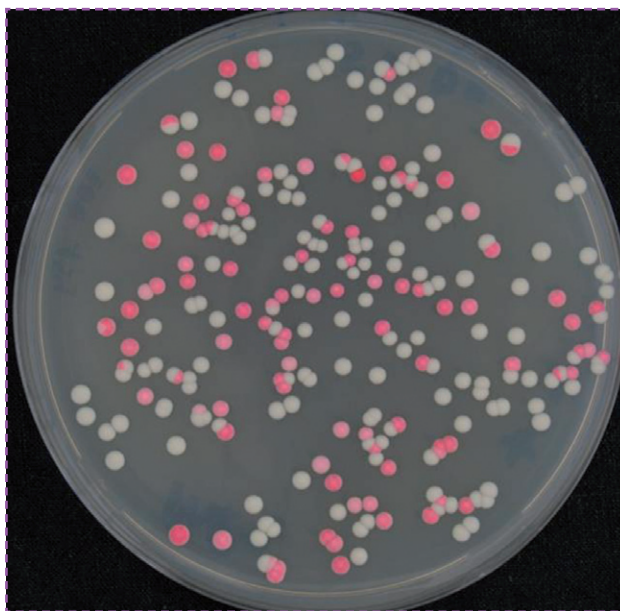


Fig. 1. Placa de Petri en la que muestran colonias de *C. albicans* que portan un gen reportero que emite fluorescencia verde (GFP, color blanco) y roja (DsRed, rojo). Tesis de AD. Prieto.

estructura de enorme importancia como mediador de la interacción con las células del hospedador y posible diana de antifúngicos y 3) la respuesta de defensa frente a daños oxidativos, de gran importancia para el control de la infección por células inmunitarias. Algunas de estas rutas regulan la transición dimórfica, la construcción de la pared celular y la capacidad de responder al daño oxidativo, lo que parece explicar su menor virulencia en ciertos modelos animales.

En nuestro trabajo, utilizamos diferentes aproximaciones experimentales y metodologías. La genética ha sido —y es— esencial para la construcción de cepas, mientras que usamos la bioquímica, la inmunodetección en geles de acrilamida o la citometría de flujo para la cuantificación de la activación de dichas rutas o la expresión de determinados genes reporteros. Utilizamos también aproximaciones ómicas, como la proteómica o transcriptómica, para caracterizar la respuesta global de la levadura en las situaciones de estrés celular.

El trabajo con una levadura patógena nos dirige, obviamente, a estudiar aspectos de interés clínico relacionados con la interacción con el hospedador. Por ello, y utilizando los mutantes que vamos generando, analizamos procesos como la adhesión del hongo, usando diferentes modelos *in vitro* y *ex vivo* o la fagocitosis mediada por macrófagos, neutrófilos o células dendríticas (ver Figura 2). Igualmente, estamos desarrollando y caracterizando un modelo de comensalismo en ratón, que pensamos supone una buena

aproximación metodológica para conocer los mecanismos que condicionan la translocación de esta levadura a través del tracto gastrointestinal y su diseminación hacia órganos internos.

Recientemente, hemos orientado más nuestro trabajo hacia el estudio de la respuesta inmunitaria, crucial en el control de las candidiasis. Estamos, por ejemplo, usando cepas obtenidas en nuestro grupo como vehículos recombinantes para expresar un antígeno modelo *in vivo* y estudiar así el patrón (anticuerpos, tipo de respuesta celular) de respuesta inmunitaria que produce. También estamos caracterizando el papel del receptor CCR6 en la infección fúngica mediante la utilización de ratones *knock out* en este receptor. Una de las metas a corto/medio plazo es desarrollar de herramientas (genes reporteros) y metodologías experimentales (microscopía o luminiscencia) para poder visualizar *in vivo* el curso de una infección fúngica. Ello creemos que puede ser de gran utilidad el diseño de estrategias que permitan el control de la infección fúngica.

Nuestro grupo consta de unas 5-10 personas, entre personal de plantilla, becarios pre y post doctorales y estudiantes de últimos cursos de licenciatura, normalmente de la licenciatura de Farmacia. Además, colaboramos científicamente con diversos grupos de investigación, tanto en nuestro país como extranjeros, que tienen unas temáticas afines a las nuestras como los siguientes:

- Dr. E. Herrero, Dept. Ciencias Médicas Básicas, Universidad de Lleida.
- Dr. JE Pérez Ortín, Dept. De bioquímica, Universidad deValencia.
- Dr. ML Gil y D. Gozalbo, Dept.de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia.
- Dr. S. Panwar, Jawaharlal Nehru University, Nueva Delhi, India.
- Dr. R. Calderone, Georgetown University Medical Center, Washington DC, USA.
- Dr. J. Ernst, Dept. Biologie, Universidad Heinrich Heine, Dusseldorf, Alemania.
- Dr. U. von Andrian, Dept. de Patología, Facultad Medicina, Universidad Harvard, USA.
- Dr. B. Hube, Dept. of Microbial Pathogenicity Mechanisms, Hans-Knoell-Institute, Jena, Alemania.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Monge R, Roman E, Arana DM, Prieto D, Urrialde V, Nombela C, and Pla J.** (2010) The Sko1 protein represses the yeast-to-hypha transition and regulates the oxidative stress response in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* 47: 587-601.
- Arana DM, Alonso-Monge R, Du, C, Calderone R, and Pla J.** (2007) Differential susceptibility of mitogen-activated protein kinase pathway mutants to oxidative-mediated killing by phagocytes in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Microbiol* 9: 1647-1659.
- Arana DM, Nombela C, and Pla J.** (2010) Fluconazole at subinhibitory concentrations induces the oxidative- and nitrosative-responsive genes *TRR1*, *GRE2* and *YHB1*, and enhances the resistance of *Candida albicans* to phagocytes. *J Antimicrob Chemother* 65: 54-62.

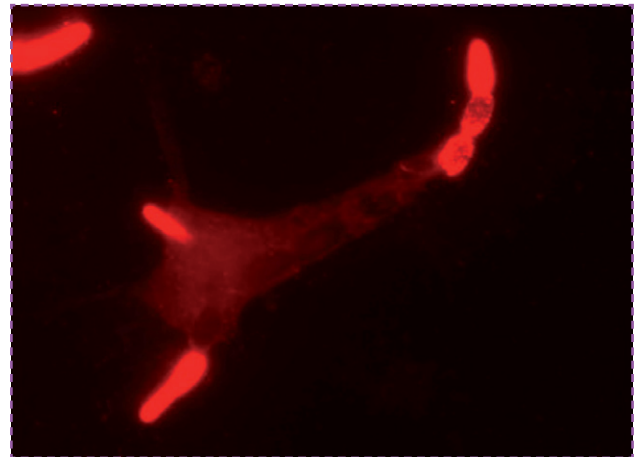


Fig. 2. Macrófago en el proceso de ingestión de *C. albicans*. Como se puede observar, la forma hifal empieza a emerger y acabará finalmente provocando la muerte del macrófago. Tesis D. Molina Arana.

- Arana DM, Prieto D, Roman E, Nombela C, Alonso-Monge R and Pla J.** (2009) The role of the cell wall in fungal pathogenesis. *Microb Biotechnol* 2: 308-320.
- Correia I, Alonso-Monge R, and Pla J.** (2010) MAPK cell-cycle regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Future Microbiol* 5: 1125-1141.
- Díez-Orejas R, and Fernandez-Arenas E.** (2008) *Candida albicans*-macrophage interactions: genomic and proteomic insights. *Future Microbiol* 3: 661-681.
- Ernst JF, and Pla J.** (2011) Signaling the glycoshield: maintenance of the *Candida albicans* cell wall. *Int J Med Microbiol* 301: 378-383.
- Fernandez-Arenas E, Bleck CK, Nombela C, Gil C, Griffiths G and Díez-Orejas R.** (2009) *Candida albicans* actively modulates intracellular membrane trafficking in mouse macrophage phagosomes. *Cell Microbiol* 11: 560-589.
- Galan-Diez M, Arana DM, Serrano-Gomez D, Kremer L, Casasnovas JM, Ortega M, et al.** (2010) *Candida albicans* beta-glucan exposure is controlled by the fungal *CEK1*-mediated mitogen-activated protein kinase pathway that modulates immune responses triggered through dectin-1. *Infect Immun* 78: 1426-1436.
- Herrero de DC, Roman E, Díez C, Alonso-Monge R, and Pla J.** (2013) The transmembrane protein Opy2 mediates activation of the Cek1 MAP kinase in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* 50: 21-32.
- Li D, Williams D, Lowman D, Monteiro MA, Tan X, Kruppa M, et al.** (2009) The *Candida albicans* histidine kinase Chk1p: signaling and cell wall mannan. *Fungal Genet Biol* 46: 731-741.
- Relloso M, Aragonese-Fenoll L, Lasarte S, Bourgeois C, Romera G, Kuchler K, et al.** (2012) Estradiol impairs the Th17 immune response against *Candida albicans*. *J Leukoc Biol* 91: 159-165.
- Román E, Cottier F, Ernst JF and Pla J.** (2009) Msb2 signaling mucin controls activation of Cek1 mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 8: 1235-1249.
- Szafrański-Schneider E, Swidergall M, Cottier F, Tielker D, Roman E, Pla J and Ernst JF.** (2012) Msb2 Shedding Protects *Candida albicans* against Antimicrobial Peptides. *PLoS Pathog* 8: e1002501.