Interacción microorganismo-hospedador
Proyecto Proteoma Humano

Ahinara Amador, Ana Gil de Bona, Elvira Marín, Catarina Oliveira Vaz, Aida Pitarch, Jose Antonio Reales-Calderón, Perceval Vellosillo, Gloria Molero, Lucía Monteoliva y Concha Gil

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid

conchagil@ucm.es

Foto de grupo. Integrantes del grupo de investigación a principios del 2014: de izquierda a derecha: Concha Gil, Lucía Monteoliva, Elvira Marín, Perceval Vellosillo, Ana Gil de Bona, Ahinara Amador, Catarina Oliveira Vaz, Laurence Devolder, Jose Antonio Reales-Calderón y Aida Pitarch.

El grupo de investigación denominado *«Interacción microorganismo hospedador. Proyecto Proteoma Humano»* es uno de los grupos de investigación consolidados de la Universidad Complutense de Madrid (http://www.ucm.es/candida). Actualmente está formado por 10 miembros, 5 de ellos doctores y otros 5 que están realizando su tesis doctoral incluido un bioinfomático, y está coordinado por las Dras Concha Gil, Lucía Monteoliva y Gloria Molero. El trabajo del grupo ha estado financiado a través de proyectos europeos, nacionales y de la Comunidad de Madrid y forma parte de la Red de Enfermedades Infecciosas (REIPI), del Programa PROMPT (Programas i+d grupos de la Comunidad de Madrid: http://www.prompt.es/). El grupo pertenece al Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia y está integrado en el Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS).

Nuestros intereses científicos tienen su origen en proyectos focalizados en la búsqueda de nuevas dianas de agentes antifúngicos bajo la dirección de los Drs. César Nombela y Miguel Sánchez. Dentro del proyecto EUROFAN (Análisis funcional del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*) una de las estrategias utilizadas para búsqueda de estas dianas, fue el estudio global de las proteínas implicadas en la formación de la pared celular de *S. cerevisiae* (Pardo *et al.*, 1999; 2000). Para la realización de estos estudios fue necesaria la implementación de una serie de

tecnologías proteómicas, como la electroforesis bidimensional (2D-PAGE) para la separación de proteínas y la espectrometría de masas para la identificación y caracterización de las mismas. La experiencia adquirida en el desarrollo de dichas tecnologías así como el interés por su implantación en España supuso un impulso importante para la creación de Unidad de Proteómica de la UCM-PCM. Esta Unidad, que está coordinada por la Dra Concha Gil, está integrada por 5 personas y da servicio de proteómica a numerosos investigadores. Además, ha formado parte de ProteRED desde 2005 y actualmente forma parte de la Plataforma de Recursos Biomoleculares y Bioinformáticos (PRB2) financiada por el ISCIII.

Actualmente, nuestro grupo de investigación está centrado en el estudio de la interacción microorganismo-hospedador y en la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de las candidiasis invasivas, utilizando distintas aproximaciones proteómicas y moleculares.

INTERACCIÓN *CANDIDA ALBICANS*-HOSPEDADOR

En particular, estudiamos el hongo patógeno oportunista *C. albicans,* agente causal de las candidiasis, con el propósito de conocer mejor los mecanismos moleculares implicados en los procesos de comensalismo y virulencia de este hongo. Desde el punto de vista del hospedador estudiamos la activación de rutas de señalización en células inmunes tras la interacción con *C. albicans*.

Dentro del estudio de proteínas de *C. albicans* que interaccionan con el hospedador, hemos descrito la relevancia de la proteína Ecm33 en la formación de la pared celular y virulencia (Martinez-López *et al.,* 2004, 2006, 2008). También se han estudiado distintos subproteómas de la superficie celular relevantes en la relación del hongo con el hospedador: el proteoma de la pared celular (Pitarch *et al.,* 2002), el surfoma, o conjunto de proteínas presentes en la superficie del hongo que contactan con el hospedador (Hernáez *et al.,* 2010; Vialás *et al.,* 2012) o el proteoma de membrana plasmática (Cabezón *et al.,* 2009). Además, también se ha utilizado proteómica de alto rendimiento o *«shotgun»* para obtener una visión global del proteoma de células de *C. albicans*. De esta forma, se ha construido el PeptideAtlas de *Candida albicans* que incluye la identificación de 22.000 péptidos distintos de sobre 2500 proteínas de esta levadura (41 % de todo el genoma) (Vialás *et al.,* 2014) (https://db.systemsbiology.net/sbeams/cgi/PeptideAtlas/buildDetails?atlas_build_id=323).

Las técnicas de proteómica de expresión diferencial se han utilizado para el estudio de cambios proteicos en procesos tan relevantes para la virulencia de *C. albicans* como la transición levadura-hifa (Monteoliva *et al.,* 2011) o la interacción *C. albicans*-macrofago. En estos ensayos de interacción hemos estudiado tanto cambios en la levadura (Fernández-Arenas *et al.,* 2007) como en el macrófago (Martínez-Solano *et al.* 2009, Reales-Calderón *et al.,* 2014) en este último caso analizando además la respuesta inmunológica mediante el estudio del perfil fosfoproteómico

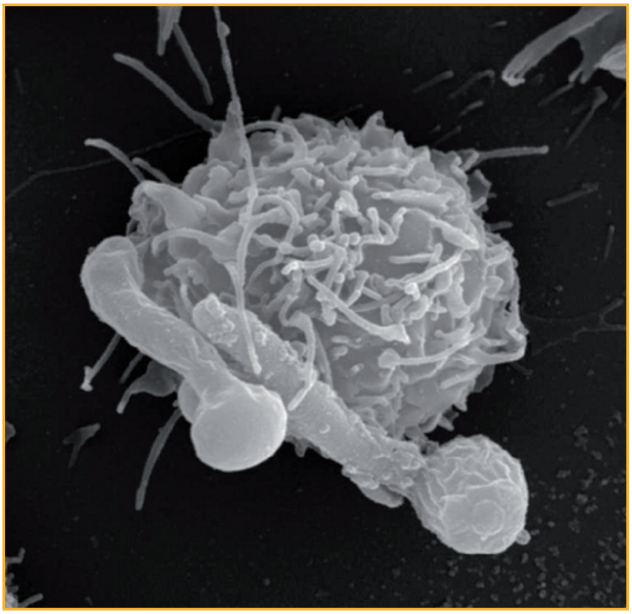

Figura 1. Microfotografía de un macrófago interaccionando con *C. albicans*

de macrofagos tras la interacción (Reales-Calderón *et al.,* 2013). Combinando datos genómicos, proteómicos y bioinformáticos (Fernández-Arenas *et al.,* 2007) pudimos realizar una hipótesis sobre la muerte por apoptosis de *Candida* en el interior de los macrófagos.

Finalmente, para la validación de los resultados obtenidos en los estudios proteómicos a gran escala, además de utilizar otro tipo de aproximaciones de biología molecular o celular, estamos utilizando proteómica dirigida o *Selected Reaction Monitoring*» (SRM) que permite elegir un conjunto de proteínas de interés que pueden ser detectadas y cuantificadas con una alta reproducibilidad y sensibilidad. Actualmente estamos estudiando la apoptosis de las células de *Candida* en el interior de los macrófagos detectando y cuantificando más de 50 proteínas relacionadas con la muerte celular programada.

Todos nuestros datos proteómicos se incluyen en la base de datos desarrollada por nuestro grupo y denominada **Proteopathogen** (Vialas *et al.,* 2009) (http://proteopathogen2.dacya.ucm.es/).

BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LAS CANDIDIASIS INVASIVAS

Otro de los objetivos de este grupo de investigación es la búsqueda de nuevos biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de las candidiasis invasivas. Para ello, hemos puesto a punto la inmunoproteómica, o análisis proteómico de la respuesta serológica aplicada a la identificación de nuevos biomarcadores clínicos y dianas terapéuticas frente a las candidiasis invasivas. Hemos combinado la inmuno-

proteómica con análisis bioinformáticos para descifrar la respuesta serológica de pacientes con candidiasis invasivas frente al inmunoma de la pared celular de *C. albicans* (Pitarch *et al.*, 2006). Este estudio ha revelado dos nuevos biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de estas infecciones (anticuerpos frente Bgl2 y Eno1 de la pared celular, respectivamente), así como dos nuevos candidatos para el diseño de futuras vacunas frente a las candidiasis invasivas (Bgl2 y Eno1 de la pared celular). Otros estudios inmunoproteómicos usando extractos de *C. albicans* han permitido la identificación de más de cuarenta candidatos para la detección precoz de las candidaisis invasivas (Pitarch *et al.*, 2004). Varios de estos biomarcadores se han validado tanto analítica como clínicamente en ensayos de prototipos, obteniendo resultados satisfactorios (Pitarch *et al.*, 2007; 2008). Además, mediante herramientas de la biología computacional, hemos identificado un panel reducido de biomarcadores (anticuerpos frente a Met6, Hsp90, Pgk1, Ssb1 y Gap1) que permite predecir el pronóstico de estas micosis oportunistas con una buena precisión. Este modelo se validó mediante un ensayo de prototipos independiente tanto analítica como clínicamente, mediante la expresión heteróloga de las proteínas y su uso como reactivos de inmunodiagnóstico. Se confirmó el valor de pronóstico de este panel de proteínas para las candidiasis invasivas, mostrando su utilidad para su extrapolación futura al laboratorio clínico (Pitarch *et al.*, 2011). Además, actualmente estamos desarrollando un array de proteínas NAPPA (Nucleic Acid Programmable Protein Array) que incluye los antígenos anteriores para detectar anticuerpos que permitan realizar un diagnóstico y un pronóstico de la candidiasis invasivas.

El grupo forma parte de una red europea que trata de profundizar en los mecanismos moleculares de las interacciones entre patógenos fúngicos y el hospedador (ImResFun; http://www.imresfun.org/index.php). Dicha red está formada por grupos de investigación punteros distribuidos por la Comunidad Europea, favoreciendo el intercambio de conocimiento y la interacción de los miembros integrantes de los grupos.

PROYECTO PROTEOMA HUMANO (HPP) HTTP://COMMUNITY.UV.ES

Así mismo, estamos implicados en el Proyecto Proteoma Humano (HPP) en colaboración con otros grupos en España. En dicho proyecto desarrollamos métodos de proteómica dirigida SRM para detectar proteínas codificadas por el cromosoma 16 («*Chromosome-centric HPP*» o C-HPP) (Segura *et al.*, 2013; 2014) con especial énfasis en las proteínas desconocidas. Para ello estamos expresando dichas proteínas y desarrollando métodos de SRM para tratar de detectarlas en matrices biológicas. Paralelamente, estamos integrando la metodología adquirida para desarrollar la parte del HPP aplicado a la Biología y a la Enfermedad («*Biology/Disease HPP*» o B/D-HPP). En nuestro caso, estudiando proteínas de interés en la respuesta inmune en las candidiasis, micosis e infecciones en general.

BIBLIOGRAFÍA

Cabezon V, Llama-Palacios A, Nombela C, Monteoliva L y Gil C. Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome. (2009) Proteomics 9: 4770-4786.

Fernández-Arenas E, Cabezón V, Bermejo C, Arroyo J, Nombela C, Diez-Orejas R, Gil C. (2007) Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction. Molecular and Cellular Proteomics. 6: 460-78

Hernaez Ml, Ximenez-Embun P, Martinez-Gomariz M, Gutierrez D, Nombela C y Gil C. Identification of *Candida albicans* exposed surface proteins in vivo by a rapid proteomic approach. (2010). Journal of Proteomics 73: 1404 - 1409.

Martinez-Lopez R, Monteoliva L, Diez-Orejas R, Nombela C y Gil C. The GPI-anchored protein CaEcm33p is required for cell wall integrity, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. (2004) Microbiology. 150: 3341-54.

Martinez-Lopez R, Park H, Myers CL, Gil C y Filler SG. *Candida albicans* Ecm33p is important for normal cell wall architecture and interactions with host cells. (2006) Eukaryotic Cell. 5: 140-7.

Martínez-López R, Nombela C, Diez-Orejas R, Monteoliva L y Gil C. Immunoproteomic analysis of the protective response obtained from vaccination with *Candida albicans* ecm33 cell wall mutant in mice. (2008) Proteomics. 8: 2651-64

Martinez-Solano, L. Reales-Calderón JA, Nombela C, Molero G, Gil C. Proteomics of RAW 264.7 macrophages upon interaction with heat-inactivated *Candida albicans* cells unravel an anti-inflammatory response. (2009) Proteomics 9: 2995-3010.

Monteoliva L, Martinez-Lopez R, Pitarch A, Hernaez ML, Serna A, Nombela C, Albar JP y Gil C. Quantitative proteome and acidic subproteome profiling of *Candida albicans* yeast-to-hypha transition. (2011) Journal of Proteome Research 10: 502-517.

Pardo M, Monteoliva L, Pla J, Sánchez M, Gil C y Nombela C. Two-dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts: a novel approach to study the cell wall. (1999) Yeast. 15: 459-72.

Pardo M, Ward M, Bains S, Molina M, Blackstock W, Gil C y Nombela C. A proteomic approach for the study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall biogenesis. (2000) Electrophoresis. 21: 3396-410.

Pitarch A, Sánchez M, Nombela C y Gil C. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. (2002) Molecular and Cellular Proteomics. 1: 967-82.

Pitarch A, Abian J, Carrascal M, Sánchez M, Nombela C y Gil C. Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. (2004) Proteomics. 4: 3084-106.

Pitarch A, Jiménez A, Nombela C, Gil C. Decoding serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses. (2006) Molecular and Cellular Proteomics. 5: 79-96.

Pitarch A, Nombela C y Gil C. Reliability of antibodies to *Candida* methionine synthase for diagnosis, prognosis and risk stratification in systemic candidiasis: A generic strategy for the prototype development phase of proteomic markers. (2007) Proteomics and Clinical Applicattions 1:1221-42.

Pitarch A, Jiménez A, Nombela C y Gil C. Serological proteome analysis to identify systemic candidiasis patients in the intensive care unit: Analytical, diagnostic and prognostic validation of anti-*Candida* enolase antibodies on quantitative clinical platforms. (2008) Proteomics and Clinical Appications. 2: 596-618.

Pitarch A, Nombela C y Gil C. (2011). Prediction of the clinical outcome in invasive candidiasis patients based on molecular fingerprints of

five anti-*Candida* antibodies in serum. Molecular and Cellular Proteomics 10: M110.004010.

Reales-Calderon JA, Sylvester M, Strijbis K, Jensen ON, Nombela C, Molero G y Gil C. *Candida albicans* induces pro-inflammatory and anti-apoptotic signals in macrophages as revealed by quantitative proteomics and phosphoproteomics. (2013) Journal of Proteomics 91: 106-135.

Reales-Calderón JA, Aguilera-Montilla N, Corbí AL, Molero G, Gil C. Proteomic characterization of human proinflammatory M1 and anti-inflammatory M2 macrophages and their response to *Candida albicans* (2014) Proteomics. 2014.doi: 10.1002/pmic.201300508.

Segura V, Medina-Aunon JA, Guruceaga E, Gharbi SI, Gonzalez-Tejedo C, Sanchez del Pino MM, Canals F, Fuentes M, Casal JI, Martinez-Bartolome S, Elortza F, Mato JM, Arizmendi M, Abian J, de Oliveira E, Gil C, Vivanco F, Blanco F, Albar JP y Corrales F. Spanish Human Proteome Project: dissection of chromosome 16. (2013) Journal of Proteome Research 12: 112-122.

Segura V, Medina-Aunon JA, Mora MI *et al.*, Surfing transcriptomic landscapes. A step beyond the annotation of chromosome 16 proteome. (2014) Journal of Proteome Research 13: 158-172.

Vialas V, Nogales-Cadenas R, Nombela C, Pascual-Montano A y Gil C. Proteopathogen, a protein database for studying *Candida albicans*-host interaction. (2009) Proteomics. 9: 4664-8.

Vialas V, Perumal P, Gutierrez D, Ximenez-Embun P, Nombela C, Gil C y Chaffin WL. Cell surface shaving of *Candida albicans* biofilms, hyphae, and yeast form cells. (2012) Proteomics 12: 2331 - 2339.

Vialas V, Sun Z, Loureiro y Penha CV, Carrascal M, Abián J, Monteoliva L, Deutsch EW, Aebersold R, Moritz RL, Gil C. (2014) A *Candida albicans* PeptideAtlas. Journal of Proteomics. 2014 97:62-8.

CCCCC Group

Ciclinas, CDK's, Ciclo Celular, Cáncer

Elisabet Bállega, Samuel Bru, Sergio García, Sara Hernández, Joan Marc Martínez, Eva Quandt, Natalia Ricco, Javier Jiménez y Josep Clotet

Dept. de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona.

jclotet@uic.es

Foto de grupo. Miembros actuales del grupo CCCCC durante el descanso de una reunión de trabajo. Desde la derecha: Samuel Bru, Sara Hernández, Sergio García, Joan Marc Martínez, Elisabet Bállega, Eva Quandt, Josep Clotet y Javier Jiménez (falta Natalia Ricco).