

F1

Análisis del perfil transcripcional de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* frente a compuestos antifúngicos *in vitro*

Adriana Castillo, Adriana Celis y Silvia Restrepo

Departamento de microbiología/Laboratorio de Micología y Fitopatología, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. E-mail: acelis@uniandes.edu.co

Fusarium es un hongo filamentosos de amplia distribución y de gran importancia por ser patógeno de plantas y del ser humano. En el ser humano está asociado a micosis superficiales, como la onicomycosis y la queratitis micótica en pacientes inmunocompetentes. Sin embargo, en pacientes inmunodeprimidos la infección puede ser diseminada y generalmente conlleva la muerte del paciente debido a la alta tasa de fallo terapéutico como consecuencia de la alta resistencia del hongo a los antifúngicos. Este trabajo tuvo como objetivo analizar el perfil de expresión génica de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* tras la exposición de los aislamientos a posaconazol y anfotericina B, mediante (RNA-Seq) en una plataforma HiSeq de Illumina; la confirmación de los genes de mayor importancia se realizó mediante qRT-PCR, para evaluar el perfil de expresión diferencial y compararlo posteriormente con genes de importancia implicados en la resistencia. Se encontró que en los aislamientos tratados con los antifúngicos los genes asociados a la síntesis del ergosterol y a la estructura de la pared celular, entre otros, estaban expresados diferencialmente en comparación con el control. Con este estudio se contribuye al avance en el conocimiento y la comprensión de los mecanismos de resistencia del hongo, lo que mejora la implementación de estrategias para el tratamiento en busca de una mayor probabilidad de éxito terapéutico.

F2

Estudio inmunómico de *Scedosporium prolificans* frente a sIgA humana

Aize Pellon, Andoni Ramirez-Garcia, Aitziber Antoran, Idoia Buldain, Xabier Guruceaga, Aitor Rementeria y Fernando L. Hernando

Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología. Fac. Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa, España. E-mail: aize.pellon@ehu.es

El patógeno emergente *Scedosporium prolificans* es causante de infecciones graves, a menudo mortales, cuyo tratamiento sigue siendo muy difícil debido en gran medida a la alta resistencia a un amplio repertorio de antifúngicos. Además, estas infecciones aparecen con mayor frecuencia en individuos inmunodeprimidos, por lo que el sistema inmunológico parece jugar un papel muy importante para evitarlas. Por ello, el objetivo de este trabajo fue la identificación, mediante técnicas proteómicas, de antígenos reconocidos específicamente por sIgA de saliva humana. Las diferencias de inmunoreactividad entre las formas de conidio y micelio se evaluaron mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) frente a sIgA de saliva de individuos inmunocompetentes. Para el estudio molecular se obtuvieron extractos proteicos de *S. prolificans*, tanto de conidios como de hifas, rompiendo las células mediante agitación en un molino de bolas. Las proteínas fueron precipitadas mediante el método acetona/TCA y, a continuación, separadas por punto isoelectrico y peso molecular mediante electroforesis bidimensional. Mediante *western blot* (WB) se detectaron las proteínas reconocidas por sIgA presentes en la saliva, y se identificaron mediante espectrometría de masas.

En este trabajo se describe la antigenicidad de *S. prolificans* frente a sIgA humana, observándose, tanto por IFI como por WB, un mayor reconocimiento de las proteínas conidiales en comparación con las de la hifa. Las proteínas identificadas en este estudio pueden representar dianas importantes para el desarrollo de terapias, como la inmunoterapia pasiva, que permitan combatir las infecciones por este hongo.

Referencia: Pellon *et al.* (2014). *Scedosporium prolificans* immunomes against human salivary immunoglobulin A. *Fungal Biol.* 2014;118:94-105.

F3

Comparación de la sensibilidad a antifúngicos de cepas de *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* e híbridas (AD) aisladas en España

Carlos Linares¹, Ferry Hagen², Jaques Meis² y M^a Francisca Colom¹

¹Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, UMH, Sant Joan D'Alacant, España.

²Departamento de Microbiología Médica y Enfermedades Infecciosas, CWZ, Nimega, Países Bajos. E-mail: carloslinares.gc@gmail.com

Antecedentes: *Cryptococcus neoformans* es un basidiomiceto que presenta dos variedades: *C. neoformans* var. *grubii*, que corresponde al serotipo A, y *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D). Dichas variedades pueden producir un híbrido por reproducción sexual (serotipo AD). Las variedades no-*grubii* presentan una gran importancia en Europa, ya que más del 20% de los casos de criptococosis en Europa son producidos por ambas.

Objetivos: Genotipar las cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* e híbridos de diferentes regiones de la geografía española y estudiar su sensibilidad a diversos antifúngicos.

Métodos: Se estudio el genotipo (AFLP), el tipo sexual y la sensibilidad a los antifúngicos (método CLSI) de 61 cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* y de aislamientos híbridos de nuestro país desde 1997.

Resultados: De las 61 cepas estudiadas el 70% eran híbridas (AFLP3), perteneciendo 22 cepas a un nuevo grupo (AFLP3*). El estudio de sensibilidad a los antifúngicos mostró que las cepas híbridas son más resistentes al fluconazol, posaconazol e isoconazol, presentando también cepas con mayor resistencia a la anfotericina B, itraconazol y voriconazol. Por otra parte, las cepas AFLP3* presentaron unos valores de CMI superiores para la anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol e isoconazol al compararlos con el resto de cepas AFLP3 estudiadas.

Conclusiones: En España el aislamiento de *C. neoformans* var. *neoformans* es menos frecuente que el de cepas híbridas AD, siendo estas más resistentes al tratamiento convencional de la criptococosis. El genotipado muestra un subgrupo del genotipo AFLP3 (AFLP3*) aislado por primera vez en España, que además presenta mayor resistencia a los antifúngicos.

F4

Diversidad filogenética de cepas pertenecientes al complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti* aisladas de trigo de España

Gemma Castellá y F. Javier Cabañes

Grupo de Micología Veterinaria, Departamento de Sanidad y Anatomía Animales, Facultad de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España.

E-mail: gemma.castella@uab.cat

La contaminación superficial y la infección con *Fusarium* en los cereales es de gran importancia, ya que las especies de este género pueden actuar como fitopatógenos y productores de micotoxinas. El trigo es el cereal más producido en la Unión Europea, siendo España el quinto país productor de este cereal. Existe poca información sobre las especies de *Fusarium* asociadas al trigo en España, especialmente al trigo que no presenta síntomas de enfermedad. Las especies que más frecuentemente se han aislado a partir de trigo con fusariosis son *Fusarium equiseti*, *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum*. *F. equiseti* pertenece al complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC), un grupo genéticamente muy diverso que comprende 30 especies filogenéticas y con capacidad de producir tricotecenos. En este estudio hemos analizado la diversidad filogenética de 51 aislamientos que morfológicamente se identificaron como pertenecientes al FIESC y que fueron aisladas de trigo sin síntomas de enfermedad cultivado en tres regiones diferentes de España. Para ello se ha secuenciado un fragmento del gen del factor de elongación 1 α y se ha realizado el análisis filogenético utilizando el método de máxima parsimonia e inferencia bayesiana. Se obtuvieron 18 haplotipos pertenecientes a 7 especies filogenéticas diferentes. Las cepas que morfológicamente se identificaron como *F. equiseti* se agruparon en dos especies filogenéticas diferentes, FIESC-5 y FIESC-14. Se ha observado también cierta correlación entre algunas especies filogenéticas y regiones geográficas concretas. Los resultados obtenidos muestran la potencial contribución del complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti* en la contaminación con micotoxinas del trigo producido en España.

Financiación: Proyecto AGL2010-22182-C04-02. Ministerio de Ciencia e Innovación.

F5

Identificación rápida de *Aspergillus* sección *Fumigati* mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

Inmaculada Quiles¹, Nieves Seara¹, Teresa Peláez², Jesús Mingorance¹ y Julio García-Rodríguez¹

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Paz, IdiPaz, Madrid, España. ²Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España. E-mail: mariaqm80@gmail.com

Durante los últimos años se han descrito nuevas especies de *Aspergillus* morfológicamente similares a *Aspergillus fumigatus* y se han agrupado en la sección *Fumigati*. El propósito de este estudio fue desarrollar un método rápido y preciso de identificación de *Aspergillus* sección *Fumigati* mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Se construyó una base de datos local de referencia utilizando 38 cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* caracterizadas mediante secuenciación del gen de la β -tubulina. Los espectros se obtuvieron utilizando el sistema MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Alemania).

La base de datos incluye los espectros de 8 *Aspergillus fumigatus*, 7 *Aspergillus lentulus*, 5 *Aspergillus hiratsukae*, 5 *Aspergillus fumigatiaffinis*, 3 *Aspergillus Aspergillus viridinutans*, 2 *Aspergillus novofumigatus*, 3 *Neosartorya udagawae*, 3 *Neosartorya pseudofischeri*, 1 *Neosartorya glabra* y 1 *Neosartorya fischeri*. Para validar la base de datos se utilizaron 21 cepas pertenecientes a *Aspergillus* sección *Fumigati* caracterizadas mediante secuenciación: 6 *A. fumigatus*, 5 *A. fumigatiaffinis*, 2 *A. viridinutans*, 2 *A. novofumigatus*, 2 *A. hiratsukae*, 1 *A. lentulus*, 2 *N. udagawae*, 1 *N. pseudofischeri*. Se controló diariamente durante 5 días su crecimiento y esporulación, y las cepas se procesaron para la extracción de proteínas utilizando etanol-fórmico, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados del proceso se expresaron como log (score) índice de 0 a 3. Se aplicaron las recomendaciones del fabricante de $> 2,0$ para la identificación de la especie y $> 1,7$ para la identificación del género.

Dieciséis de las 21 cepas testadas fueron correctamente identificadas por MALDI-TOF. Tres teleomorfos fueron correctamente identificados, pero obtuvieron menor MALDI-score ($< 1,7$). En 2 aislamientos con una esporulación atípica no se encontraron picos. MALDI-TOF es una herramienta útil y rápida para la identificación precisa de *Aspergillus* sección *Fumigati*.

F6

Genetic determinants responsible for the adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* strains to different ecological niches

Ricardo Franco-Duarte, Daniela Bessa, Filipa Gonçalves, Paula Sampaio, Dorit Schuller y Célia Pais

Centro de Biología Molecular e Ambiental (CBMA), Departamento de Biologia, Universidade do Minho, Braga, Portugal. E-mail: ricardofilipeduarte@bio.uminho.pt

The maintenance of microbial species in different environments is associated with adaptive microevolutionary changes that are not completely understood. *Saccharomyces cerevisiae* strains undergo genomic changes such as gene amplifications, chromosomal length variations, copy number changes and chromosomal rearrangements associated with generation of phenotypic heterogeneity useful for different technological applications. However, continuous utilization of yeast strains for industrial purposes has introduced artificial selective pressures that are reflected by genome polymorphisms and consequent phenotypic diversity. One example is the emergence of *S. cerevisiae* strains as human pathogens, causing clinically relevant infections. The new approaches of integrative data mining, developed with great potential to relate genotype with phenotype, may contribute to understand the genomic variations in strains from these environments. From our strain collection, four clinical isolates and four isolates from natural environments were selected. Genomic DNA was sequenced at EMBL (Heidelberg), using an Illumina HiSeq2000 analyzer. All reads were aligned with the yeast genome reference and comparative analysis was performed to evaluate intra-genomic variation. Several SNPs, frameshift insertions and deletions were detected, having a stochastic distribution along the genome. Phenotypic and metabolic characterizations were also accomplished and analysis is currently underway to compare data sets and conclude about the genetic determinants that are in the basis of a clinical phenotype.

Funding: *This work was financed in part by the project TRANSBIO (FP7 / n°289603)*

F7

Estudio taxonómico de hongos del suelo de interés biotecnológico: el género *Myceliophthora*

Yasmina Marín-Félix¹, Alberto Miguel Stchigel¹, Andrew N. Miller², Josep Guarro¹ y José Francisco Cano-Lira¹

¹Unidad de Micología y Microbiología Ambiental, Universidad Rovira i Virgili, Reus, España;

²Prairie Research Institute, Illinois Natural History Survey, Champaign, USA.

E-mail: yasmina.marin@urv.cat.

Myceliophthora es un género de hongos perteneciente a la familia *Chaetomiaceae* (orden Sordariales). Su interés biotecnológico se debe a su potencial para producir enzimas termoestables y a su capacidad de degradar material ligno-celulósico. Cuatro aislamientos, identificados morfológicamente como *Myceliophthora* spp, fueron obtenidos en cultivo puro a partir de la activación de esporas latentes en muestras de suelos del Parque Nacional *Great Smoky Mountains* (Tennessee, USA). El aislamiento FMR 12372 presentaba ascomas con células peridiales verrugosas y ascosporas de forma irregular con un poro germinativo terminal a cada extremo. Dichas características no coincidían con las de ninguna otra especie previamente descrita. Los aislamientos FMR 12369 y FMR 12783 se caracterizaban por presentar un peridio verrugoso y ascosporas elipsoidales con un poro subterminal a cada extremo, los cuales terminaban de forma aguda, características descritas previamente para *Myceliophthora verrucosa*. El aislamiento FMR 13215 solo presentaba estructuras reproductivas asexuales, produciendo blastoconidios de paredes tuberculadas, de incoloros a marrones, naciendo terminal o lateralmente sobre las hifas o sobre células hinchadas, en cadenas de hasta cuatro conidios. Estas características eran compatibles con las de *Myceliophthora heterothallica*. Se llevó a cabo un análisis filogenético con las secuencias nucleotídicas de los dominios D1–D3 del gen 28S del ARN ribosómico, confirmándose el género y constatándose que las especies aceptadas hasta el momento en *Myceliophthora* no formaban un único clado. Se procedió entonces a realizar un análisis conjunto de la región ITS y de los fragmentos del factor de elongación (*EF1*) de la ADN polimerasa y de la ARN polimerasa II (*RPB2*). Los resultados mostraron que el género *Myceliophthora* se divide claramente en cuatro clados correspondientes a cuatro géneros: *Myceliophthora* (compuesto por *Myceliophthora lutea*), *Corynascus* y dos géneros nuevos, *Crassicarpon* y *Thermospora*. Mediante el estudio polifásico se demuestra que el aislamiento FMR 12372 representa una nueva especie de *Corynascus* (*Corynascus fumimontanus*), y que los tres aislamientos restantes corresponden a *Thermospora heterothallica* (FMR 13215) y *Corynascus verrucosus* (FMR 12369 y FMR 12783).

F8

Polimorfismo de la región promotora de los genes *CgYPS1*, *CgYPS7*, *CgYPS10/11* codificantes de yapsinas (Yps) de *Candida glabrata*

Elías Cortés-Acosta, César Hernández-Rodríguez, J. Antonio Ibarra-García y Lourdes Villa Tanaca

Departamento de Microbiología/Laboratorio de Genética Microbiana, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN, México DF, México. E-mail: elias_krsp@hotmail.com

La levadura patógena oportunista *Candida glabrata* posee potenciales factores de virulencia como adhesinas y yapsinas (Yps). Estas últimas son un tipo de aspartil-proteasas que se localizan en las envolturas celulares, unidas por un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI). En particular, *C. glabrata* tiene 12 genes *CgYPS* codificantes de Yps, a diferencia de otras especies de *Candida* que albergan entre uno y seis genes. Los estudios de diversidad y evolución molecular se han enfocado principalmente a las secuencias codificantes de los genes, mientras que las regiones promotoras se han descuidado. El objetivo de este trabajo fue analizar la diversidad intraespecífica (polimorfismo) de las regiones promotoras de los genes *CgYPS1*, *CgYPS7*, *CgYPS10* y *CgYPS11* de una colección compuesta por 46 cepas de *C. glabrata* de diferente origen clínico, con el fin de confirmar si la variación en la secuencia promotora es responsable de la expresión diferencial de un mismo gen. El polimorfismo de las regiones promotoras fue detectado por PCR-DGGE y secuenciación. El análisis bioinformático de los sitios de unión a factores de transcripción (TFBS) sugiere que *CgYPS1* y *CgYPS7* se expresan en condiciones de estrés nutricional, osmótico y de pared celular. Los genes *CgYPS10* y *CgYPS11* presentan TFBS aparentemente regulados por glucosa. Los genes *CgYPS1*, *CgYPS7*, *CgYPS10* y *CgYPS11* se sobreexpresaron significativamente a las 6 h posinoculación (RT-qPCR), en condiciones de inanición de fuente de carbono y nitrógeno, así como en medio YPD con blanco de calcoflúor (estrés de pared). Nuestros resultados sugieren que las Yps podrían desempeñar un importante papel para contender las condiciones de estrés durante el proceso de infección.

Funding: SIP20141333

F9

La ruta CWI y la ruta PKA regulan la expresión génica en respuesta a inhibidores de glucán-sintasa en levaduras

Enrique Bravo, Raúl García, Ana Belén Sanz, Sonia Díez-Muñíz, Victoria Mascaraque, Cesar Nombela, José Manuel Rodríguez-Peña y Javier Arroyo

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid, España.

E-mail:enriquebravo@farm.ucm.es

Situaciones de estrés sobre la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* conducen a una respuesta transcripcional relacionada con la adaptación de la célula a estas condiciones de estrés. Entre los compuestos que desestabilizan la pared celular se encuentran los antifúngicos de la familia de las equinocandinas, como la caspofungina. El objetivo fundamental del presente trabajo ha consistido en caracterizar en *S. cerevisiae* la respuesta transcripcional consecuencia del tratamiento con caspofungina, así como los mecanismos de regulación implicados. Se han analizado, mediante *microarrays* de ADN, los perfiles transcripcionales globales de la cepa silvestre (BY4741) y de los mutantes *slt2Δ* y *wsc1Δ* (MAPK y sensor de la ruta CWI respectivamente), en presencia y ausencia de caspofungina, comprobando que toda la respuesta es dependiente de Wsc1. Respecto a Slt2, se identificaron genes tanto dependientes (36,4%) como independientes de esta MAPK (63,6%).

El análisis bioinformático de los datos globales de expresión sugería tanto la participación de la ruta Ras/PKA como la de la calcineurina en la respuesta Slt2 independiente. Mediante experimentos de *microarrays* utilizando un mutante *bcy1Δ* (subunidad reguladora de PKA), un doble mutante *msn2/4Δ* (factor de transcripción dependiente de PKA) y un mutante *crz1Δ* (factor de transcripción de la ruta de la calcineurina) se comprobó la participación mayoritaria de Bcy1 y, en menor medida, de Msn2/4 y Crz1 (resultados confirmados mediante PCR cuantitativa).

De acuerdo con esto, la acumulación de glicógeno (compuesto que se acumula en condiciones de inhibición de PKA) se encuentra bloqueada en los mutantes *bcy1Δ*, *msn2/4Δ* pero no en los mutantes de la ruta CWI. Todos estos resultados sugieren que la adaptación de la levadura al daño por caspofungina requiere una regulación mediada por la ruta CWI y por la ruta PKA e identifican una nueva conexión de ambas rutas con la implicación del sensor Wsc1.

F10

El sulfato de neomicina activa la ruta de integridad celular en *Saccharomyces cerevisiae*

Esmeralda Alonso-Rodríguez, Humberto Martín y María Molina

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia UCM, IRYCIS. Madrid. España.

E-mail: esmeralda.alonso@hotmail.com

La ruta de integridad celular (CWI) regula la respuesta al daño en la pared celular en distintos hongos, y concretamente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Así, la ruta CWI se activa bien por agentes químicos que alteran esta estructura, tales como el rojo Congo, blanco de calcofluor, caspofungina o zimoliasa, o bien por estrés físico, como un choque hipoosmótico o altas temperaturas. La señalización a través de esta ruta se inicia con la estimulación de los mecanosensores Mid2 y Wsc1, localizados en la superficie celular, que detectan el estrés en la pared celular y promueven la activación de la GTPasa Rho1, que a su vez activa una cascada de proteínas kinasas cuyo último resultado es la fosforilación de la MAPK Slt2.

Recientemente hemos identificado al sulfato de neomicina como un nuevo estímulo activador de la ruta CWI. Este aminoglucósido, inhibidor de la síntesis de proteínas bacterianas, promueve la fosforilación de Slt2 y la inducción transcripcional de genes reporteros bajo el control del promotor de MLP1, un gen que se induce en condiciones de activación de la ruta por el factor de transcripción Rlm1, regulado por la MAPK Slt2. De acuerdo con esto, mutantes afectados en componentes esenciales de la ruta CWI muestran sensibilidad a la neomicina. Además de estos componentes, hemos identificado algunas proteínas adicionales, como el adaptador Nbp2, necesarias para una correcta señalización hasta la MAPK Slt2 en respuesta al tratamiento con sulfato de neomicina. El análisis de la respuesta transcripcional global de la levadura a este antibiótico revela una inducción de genes relacionados con la pared celular y la biosíntesis de aminoácidos.

F11

Validación de una versión de Slt2 sensible a análogos de ATP en la búsqueda de nuevos sustratos de esta MAPK de la ruta de integridad celular de *Saccharomyces cerevisiae*

Pablo Fernández-Piñar, Raquel Arroyo, Esmeralda Alonso, María Molina y Humberto Martín

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia UCM, IRYCIS, Madrid. España.

E-mail: humberto@ucm.es

En *Saccharomyces cerevisiae* se conocen cinco rutas de transmisión de señales mediadas por MAP quininas, siendo una de ellas la ruta de integridad celular (CWI) que, entre otras funciones, es esencial para el mantenimiento de una pared celular estable. La MAPK que opera en esta ruta, Slt2, fosforila sustratos necesarios para llevar a cabo la respuesta adecuada, como es el factor de transcripción Rlm1, o bien implicados en la modulación de la transmisión de la señal a través de la propia ruta, como es el caso de la MKP (MAPK fosfatasa) Msg5. La amplia variedad de funciones que ejerce esta MAPK indica, sin embargo, la existencia de sustratos adicionales. Con el fin de identificar nuevos sustratos hemos desarrollado una versión de la MAPK Slt2 sensible a análogos voluminosos de ATP (Slt2as), que es inhibida específicamente por este tipo de moléculas. Esta versión también acomoda análogos de ATPγS, que portan un grupo tiofosfato, y que provoca por tanto la tiofosforilación selectiva de los sustratos de esta MAPK, permitiendo su detección con anticuerpos específicos. Con estos reactivos hemos puesto a punto ensayos quinasa *in vitro* que nos han permitido confirmar la fosforilación de Rlm1 por Slt2 o comprobar que la fosforilación de Msg5 ocurre tanto en el dominio N-terminal regulatorio como en el C-terminal catalítico de esta fosfatasa.

De forma paralela, se han buscado en bases de datos proteínas que interaccionen físicamente con la MAPK Slt2 y que presenten motivos consenso de fosforilación por MAPKs. Así se han identificado 83 posibles sustratos de Slt2, presentando 540 posibles sitios de fosforilación por MAPKs, de los cuales 239 han sido ya descritos experimentalmente como sitios fosforilados.

F12

Las proteasas vacuolares de *Candida glabrata* y su papel en la autofagia

J.L. Cortez-Sánchez¹, V.M. Cueto-Hernández¹, E. Cortés-Acosta¹, M.A. Sepúlveda-González^{1,2}, J. Xicohtencatl-Cortés², J.A. Ibarra-García¹ y L. Villa-Tanaca¹

¹Depto. Microbiología/Laboratorio de Genética Microbiana, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. ²Hospital Infantil de México Federico Gómez. México D. F., México.

E-mail: luis cortez@hotmail.com

La autofagia es la principal vía de degradación de proteínas y organelos que mantiene la homeostasis celular en situaciones de estrés, ya que este proceso permite el reciclaje de material intracelular. En *Saccharomyces cerevisiae* algunas proteasas como la proteasa A (PrA) y la aminopeptidasa 1 (Ape1), tienen un papel relevante en este proceso, mientras que en el patógeno oportunista *Candida glabrata* no se conoce su función. Se evaluaron mediante RT-qPCR los cambios en la expresión de los genes codificantes de las proteasas PrA (*PEP4cg*), Ape1 (*LAP4cg*) y Ape3 (*APE3cg*) en diferentes condiciones nutricionales que asemejan la autofagia. Los resultados de expresión mostraron que en medio rico en nutrientes (YPD) hay disminución en un 80% de *PEP4cg*, mientras que en un medio mínimo (YNB) hay un aumento del 100%. Por otro lado, en diferentes condiciones de estrés, como pH 4, o en ausencia de una fuente de nitrógeno o de carbono, hubo una disminución del 40% en la expresión. Esto sugiere que PrA podría tener un papel en un medio limitado en nutrientes, pero no en aquellos carentes de nitrógeno o carbono. La expresión de los genes *LAP4cg* y *APE3cg* disminuyó en ausencia de carbono y aumentó en ausencia de nitrógeno (36 y 3 veces, respectivamente). Resultó interesante que la actividad enzimática de Ape1 y Ape3 en extractos celulares aumentara en ausencia de ambas fuentes (carbono y nitrógeno). La discrepancia entre expresión a nivel de transcritos y actividad enzimática, podría deberse a una regulación diferente en los dos niveles de expresión. La localización subcelular de las proteasas estudiadas, se confirmó en vacuolas purificadas de *C. glabrata*. Los resultados sugieren que PrA, Ape1 y Ape3 tienen un papel diferencial en condiciones que simulan la autofagia.

Funding: SIP20141333

F13

En *Saccharomyces cerevisiae*, Mtl1 preserva la correcta función mitocondrial y la supervivencia celular en quiescencia, a través de la regulación negativa de Tor1 y PKA, de manera independiente de Ras2

Venkatraghavan Sundaram¹, Mima I. Petkova¹, Nuria Pujol-Carrion¹ y M^a Angeles de la Torre-Ruiz¹

¹Departamento de Ciències Mèdiques Bàsiques, IRB-Lleida, Universidad de Lleida, Lleida, España.
E-mail: madelatorre@cmb.udl.cat

Saccharomyces cerevisiae es un excelente sistema modelo para el estudio del envejecimiento celular en células quiescentes. En este trabajo mostramos que Mtl1, un receptor transmembrana, miembro de la ruta de integridad celular (Pkc1-MAPK), posee una función promotora de la extensión cronológica de la vida (CLS). La ausencia de Mtl1 acorta la CLS y altera la función mitocondrial. Todo ello provoca los siguientes efectos en la célula: a) menor consumo de oxígeno durante las fases diauxica y estacionaria, b) aumento de la respiración desacoplada, c) incremento del potencial de membrana mitocondrial y d) descenso de la actividad aconitasa. Todos estos fenotipos responden a un problema de señalización celular y son suprimidos tras la delección de *TOR1* y, en menor medida, tras la inactivación de la función PKA. Bcy1 es una subunidad inhibidora de PKA, Mtl1 regula su estabilidad y su fosforilación en condiciones quiescentes y tras la depleción de glucosa. Nuestros resultados indican que Mtl1, en condiciones de quiescencia y ayuno de glucosa, señala hacia la inhibición de TORC1 lo que induce la fosforilación de Bcy1 y la consecuente inhibición de PKA, aunque no se descarta la posibilidad de que haya otras dianas de regulación a partir de TORC1. Así pues, Mtl1 conecta la función mitocondrial con TOR y PKA en quiescencia, siendo la glucosa la principal molécula señalizadora.

F14

Identificación de nuevas proteínas fosfatasa que regulan negativamente la señalización mediada por MAPKs en *Saccharomyces cerevisiae*

Almudena Sacristán, Humberto Martín y María Molina

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia UCM, IRYCIS, Madrid. España.

E-mail: molmifa@ucm.es

La fosforilación es un mecanismo esencial en la activación y, por tanto, en la transducción de las señales a través de las proteínas-quinasa que componen los módulos de MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases). Por tanto, las proteínas-fosfatasa capaces de eliminar grupos fosfato de dichas quinasa juegan un papel esencial en la regulación negativa de la señalización a través de estas rutas. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado algunas proteínas-fosfatasa que realizan esta función, incluyendo serín-treonin -fosfatasa, tirosina fosfatasa o fosfatasa de especificidad dual, capaces estas últimas de eliminar grupos fosfato tanto de residuos serina y treonina como de tirosina. Sin embargo, la habitual redundancia funcional de estos reguladores negativos en las rutas de MAPKs dificulta tremendamente la identificación de todos los integrantes del “fosfatoma” regulador de la señalización por MAPKs. Con el objetivo de identificar nuevas proteínas-fosfatasa, hemos llevado a cabo un rastreo de múltiples proteínas-fosfatasa y proteínas reguladoras de éstas que, en condiciones de sobreexpresión, eliminan la letalidad producida por la hiperactivación de la ruta de apareamiento, mediada por la MAPK Fus3, y de mantenimiento de la integridad celular (CWI), en la que opera la MAPK Slt2. Así hemos identificado a la tirosín-fosfatasa Ptp1, que es capaz de regular negativamente ambas rutas. Mediante experimentos de copurificación hemos demostrado su interacción física tanto con Fus3 como con Slt2.

F15

La MAP quinasa Slt2 participa en la función vacuolar y en la organización del citoesqueleto de actina en mutantes afectados por estrés oxidativo endógeno en *Saccharomyces cerevisiae*

Nuria Pujol-Carrión¹, Mima I. Petkova¹, Venkatraghavan Sundaram¹, Luis Serrano² y M^a Angeles de la Torre-Ruiz¹

Dept. Ciències Mèdiques Bàsiques. Institut de Recerca Biomèdica. Universitat de Lleida. Av. Rovira, 80-25198-Lleida. España. ²*Dept. Producció Vegetal. ETSEA. Universitat de Lleida. Av. Rovira Roure, 191-25191-Lleida. España. E-mail: nuriapuj@hotmail.com*

El estrés oxidativo induce una despolimerización transitoria del citoesqueleto de actina y también provoca fragmentación vacuolar. En condiciones de estrés oxidativo causado por el peróxido de hidrógeno, la proteína MAP quinasa Slt2, es necesaria para la repolarización del citoesqueleto de actina y para promover la fusión vacuolar. En este trabajo, mostramos que los mutantes *grx3grx4* y *grx5* son modelos celulares de estrés oxidativo endógeno causado por la alteración de la homeostasis del hierro, lo que afecta a las funciones vacuolares y provoca desorganización del citoesqueleto de actina. En el doble mutante *grx3grx4*, la sobreexpresión de Slt2 suprime los defectos en las funciones vacuolares y restablece la organización del citoesqueleto de actina. Slt2 ejerce este efecto independientemente de los niveles intracelulares de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y de la homeostasis del hierro. La delección de *SLT2* en el doble mutante *grx3grx4* genera una letalidad sintética respecto a la función vacuolar, induciendo una elevada fragmentación de este orgánulo. El hecho de *Vps4* y *Vps73*, dos proteínas vacuolares, sean capaces de suprimir la fragmentación vacuolar y de restaurar la correcta polarización del citoesqueleto de actina en el triple mutante *grx3grx4slt2*, refuerza la hipótesis de que Slt2 juega un papel importante en la homeostasis de la vacuola en relación con la dinámica de la actina. En este trabajo también mostramos que la sobreexpresión de Slt2 favorece la fusión vacuolar en los mutantes afectados por estrés oxidativo endógeno: *sod1*, *grx5* y *grx3grx4slt2*, y que ello ocurre a través de un mecanismo que es dependiente del citoesqueleto de actina.

F16

Genotipado de múltiples aislamientos de *Aspergillus fumigatus*, ¿hay diferencias en los patrones de clonalidad entre pacientes infectados o colonizados?

Pilar Escribano^{1,2,3}, Laura Judith Marcos-Zambrano^{1,2}, Teresa Peláez^{1,2,3,4}, Emilio Bouza^{1,2,3,4} y Jesús Guinea^{1,2,3,4}

¹Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid; ²Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid; ³CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES (CB06/06/0058), Madrid; ⁴Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
E-mail: pilar.escribano.martos@gmail.com

Objetivos: El estudio de la diversidad genética de *A. fumigatus* en muestras del tracto respiratorio inferior puede desvelar diferencias en los patrones de clonalidad entre pacientes infectados o colonizados. Hemos realizado un estudio de epidemiología molecular para determinar los patrones de clonalidad de cepas de *A. fumigatus* en ambos tipos de pacientes.

Métodos: Se estudiaron 189 pacientes con aspergilosis pulmonar invasora probada/probable, o colonización asintomática (n=75/114) ingresados en el hospital desde enero de 2005 a diciembre de 2012, con aislamiento de ≥ 2 colonias de *A. fumigatus* en muestras clínicas. Se estudiaron 344 muestras [esputos (n=230), aspirados bronquiales (n=86), lavados broncoalveolares (n=27), y biopsias pulmonares (n=1)]. Cada colonia de *A. fumigatus* se subcultivó independientemente y se identificó por secuenciación del gen de la β -tubulina. Un total de 1147 aislamientos se genotiparon por STRAf. La diversidad genotípica se describió para cada grupo de pacientes.

Resultados: Se encontraron un total de 341 genotipos y la diversidad genética total fue de 0,99. En los 75 pacientes con aspergilosis se estudiaron 568 aislamientos procedentes de 167 muestras. En los 114 pacientes colonizados se estudiaron 579 aislamientos procedentes de 177 muestras. La diversidad genética fue mayor en los pacientes colonizados (nº alelos= 222, Índice de Simpson=0.99) que en los pacientes con aspergilosis (nº alelos= 207, Índice de Simpson=0.87). Además, el número de genotipos distintos fue mayor en los pacientes colonizados (n=196) que en los pacientes con aspergilosis (n=165). Sin embargo, los pacientes con aspergilosis mostraron una mayor policlonalidad. Se encontraron más de 2 genotipos en el 64% y 45% de los pacientes con aspergilosis y colonizados respectivamente. Los esputos y los aspirados bronquiales mostraron mayor policlonalidad que los lavados broncoalveolares.

Conclusión: Aunque la diversidad genética fue mayor en pacientes colonizados, los pacientes con aspergilosis mostraron una mayor policlonalidad. El análisis por muestra demostró que muestras obtenidas por procedimientos estériles presentaron una menor policlonalidad.

F17

La proteína Rho-GAP Rga7 es necesaria para la correcta citoquinesis de la levadura de fisión independientemente de su actividad catalítica

Rebeca Martín-García, Pedro M. Coll y Pilar Pérez

Instituto de Biología Funcional y Genómica. CSIC/ Universidad de Salamanca, Salamanca.

España. E-mail: piper@usal.es

Las GTPasas de la familia Rho regulan importantes procesos celulares en eucariotas, como la morfogénesis. Estas proteínas están reguladas negativamente por las proteínas denominadas GAPs (GTPase activating proteins). Rga7 es una de las 9 proteínas GAPs presentes en la levadura de fisión. Además de un dominio GAP posee un dominio F-BAR en la región N-terminal. Las proteínas con dominios F-BAR actúan como conectores entre el córtex celular y el citoesqueleto y están implicadas en procesos de generación de curvatura de membranas y tubulación. Rga7 participa en citocinesis y es necesaria para que se produzca correctamente. En concreto, Rga7 es necesaria para el mantenimiento de la tensión e integridad del anillo de actomiosina durante la contracción, para la correcta formación del septo y para la separación celular. Estas funciones de Rga7 en citoquinesis y en la integridad celular son independientes de su actividad catalítica GAP, mientras que requieren el dominio F-BAR. Rga7 coopera con otras dos proteínas F-BAR, denominadas Cdc15 e Imp2, que son necesarias para la citocinesis y, mediante coinmunoprecipitación, hemos demostrado que interacciona con Imp2 y con la Paxilina. Nuestros resultados sugieren que Rga7 forma parte de un complejo de proteínas que anclan el anillo de actomiosina a la membrana para así coordinar la contracción y la formación del septo.

F18

Cryptococcus venezuelensis* sp nov y *Cryptococcus avilensis* sp nov, dos nuevas especies de levaduras aisladas de *Eucalyptus camaldulensis

Dania García¹, Mireya Mendoza², Primavera Alvarado², Elvia Diaz² y José F. Cano-Lira¹

¹Unitat de Micologia. IISPV. Facultat de Medicina. Universitat Rovira i Virgili. 43201-Reus-Tarragona-España; ²Departamento de Micología, Instituto de Biomedicina, Caracas, Venezuela. E-mail: jose.cano@urv.cat

Antecedentes: *Cryptococcus* es un género polifilético formado por más de 100 especies distribuidas en los órdenes Tremellales, Filobasidiales y Cystofilobasidiales (Tremelomycetes). Aunque la mayoría de las especies del género son saprofitas, algunas de ellas son responsables de patologías en el hombre y los animales. En Venezuela, la mayoría de los casos reportados de criptococosis se asocian con *Cryptococcus neoformans* y, en menor grado, con *Cryptococcus gatti*, todos ellos relacionados con pacientes inmunocromprometidos.

Objetivos: Investigar las poblaciones de eucaliptos introducidas en el Parque Natural “El Ávila” como posibles reservorios naturales de *Cryptococcus* spp.

Métodos: Se procesaron muestras de tronco y corteza para determinar las poblaciones de levaduras presentes. Se caracterizaron fenotípica y molecularmente (amplificación y secuenciación de las regiones ITS y los dominios del gen 26S del ARNr) todos los aislamientos. Las secuencias obtenidas se alinearon y se establecieron sus filogenias mediante *Maximum Likelihood* (ML) y análisis Bayesiano (BI).

Resultados: Se obtuvieron dos tipos de colonias oscuras a partir del tronco y de la corteza de un mismo árbol de la especie *Eucalyptus camaldulensis*. Los análisis filogenéticos mostraron que nuestros aislamientos correspondían a nuevos linajes para el género *Cryptococcus* dentro del orden Filobasidiales, agrupándose con el género *Syzygospora*. Nuestros aislamientos se agrupan con las especies del clado *Syzygospora s. str.*, muy próximas a las especies micoparasíticas *Syzygospora alba* y *Syzygospora pallida*, ambas caracterizadas por presentar estados asexuales levaduriformes además de formar blastoconidios. Aunque la taxonomía del género *Cryptococcus* necesita ser revisada, nuestras especies se proponen en este género en base a que no son fermentadoras y a las reacciones positivas ante el DBB, hidrólisis de la urea y a la producción de polisacáridos extracelulares (almidón).

Conclusiones: Se proponen dos nuevas especies para el género *Cryptococcus*: *Cryptococcus venezuelensis* y *Cryptococcus avilensis*.

F19

Cell wall adhesins involved in host-pathogen interactions of the pathogenic yeast *C. glabrata*

Albert D. de Boer¹, Emilia Gómez Molero¹, Manuel Merino García de la Reina¹, Antonio Mas² and Piet WJ de Groot¹

¹Laboratorium for Medical Mycology and ²Molecular Virology, Regional Center for Biomedical Research, University of Castilla–La Mancha, Albacete, Spain. E-mail: piet.degroot@uclm.es

Candida glabrata is a frequent cause of mucosal and life-threatening bloodstream infections in immunocompromised individuals. The cell wall of *C. glabrata*, consisting of a network of stress-bearing polysaccharides and an external layer of glycoproteins, plays an important role in the host-pathogen interactions that underlie the establishment of infections. Adhesion of yeast cells to host surfaces or abiotic medical materials is the first step in this process and it is mediated by cell wall-localized adhesins. In the recent past, we have developed bioinformatic and mass spectrometric methodology to identify covalently-bound cell wall proteins. In a bioinformatics approach, we showed that *C. glabrata* contains an exceptionally large number of at least 66 genes encoding adhesin-like GPI proteins, many of which are located in (sub)telomeric regions. These putative adhesin proteins are divided into different subfamilies, one of which is the well-studied family of Epa lectins. Mass spectrometric analysis of *C. glabrata* cells grown to stationary phase or *in vitro* biofilms identified novel adhesin-like proteins, and expression analysis showed that their genes are expressed in biofilm-embedded cells. This suggests that these proteins may be important virulence determinants of *C. glabrata*. Current work in our laboratory is aimed at elucidating the regulation and function of these novel adhesins through the use of heterologous expression systems. We are also studying the expression and wall incorporation of novel adhesins in a set of clinical *C. glabrata* isolates in relation to adhesion and other surface-related properties. Proteomics studies of isolates with hyperadherence phenotypes identified novel wall adhesins that have not been encountered in laboratory strains thus these provide valuable research targets towards developing novel strategies for treatment and prevention of fungal disease.

F20

Deleciones y duplicaciones espontáneas de segmentos cromosómicos identificadas por resecuenciación genómica en *Fusarium oxysporum*

Elena Perez-Nadales¹, Leszek P. Pryszcz^{2,3}, Toni Gabaldón^{2,3,4} y Antonio Di Pietro¹

¹Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, Córdoba, España; ²Bioinformatics and Genomics Programme, Centro de Regulación Genómica (CRG), Barcelona, España; ³Universitat Pompeu Fabra (UPF), 08003 Barcelona, España; ⁴Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Pg. Lluís Companys 23, 08010 Barcelona, España. E-mail: ge2penae@uco.es

Los aislamientos naturales del hongo patógeno *Fusarium oxysporum* presentan una elevada inestabilidad fenotípica asociada con cambios en el crecimiento, desarrollo y virulencia. Se conoce poco sobre las bases genéticas de este fenómeno. Hemos observado que el mutante $\Delta rho1$ de *F. oxysporum*, que presenta un fenotipo de colonia severamente reducido, origina sectores de crecimiento rápido, fácilmente detectables tras 2-3 días de cultivo en medio sólido estándar. Se aislaron esporas de estos sectores para su caracterización fenotípica y se obtuvieron subcultivos a los que se denominó «revertientes». Dichos revertientes mostraban cambios fenotípicos estables y heterogéneos en varias condiciones de crecimiento, como en presencia de distintas fuentes de nutrientes o como resistencia a drogas que dañan la pared celular. Con el fin de estudiar los mecanismos genéticos implicados, se realizó el análisis del genoma completo de varios de los revertientes aislados mediante la técnica de secuenciación de nueva generación o Next Generation Sequencing (NGS). La caracterización de las reorganizaciones genéticas reveló la presencia de variaciones en el número de copia (CVN), un tipo de mutación que implica deleciones y/o duplicaciones segmentales de más de 1 Kb. Las CVNs detectadas mediante predicción bioinformática variaban entre 3,6 y 930 Kb y estaban distribuidas por todo el genoma, algunas con localización en regiones subteloméricas. Varias de estas CVNs se confirmaron experimentalmente mediante PCR y PCR cuantitativa en tiempo real. Recientemente, hemos identificado nuevas condiciones de cultivo en las que la cepa silvestre produce sectores de crecimiento rápido con frecuencias similares al mutante $\Delta rho1$, lo que indica que el mecanismo implicado es independiente de la mutación $\Delta rho1$. Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo intrínseco de inestabilidad genómica en *F. oxysporum* que induce reorganizaciones internas del genoma durante el crecimiento mitótico, contribuyendo con ello a la plasticidad genómica de este importante hongo patógeno.

Referencia

Martínez-Rocha AL, Roncero MI, López-Ramírez A, Mariné M, Guarro J, Martínez-Cadena G, Di Pietro A (2008) Cell Microbiol 10:1339-51.