



Caracterización de un proteoma mínimo:

Mycoplasma genitalium

Noemí Párraga Niño

Abril 2012



Caracterización de un proteoma mínimo:

Mycoplasma genitalium

**Memoria presentada por Noemí Párraga Niño, licenciada en Biología,
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.**

**Trabajo realizado en el Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la
Universitat Autònoma de Barcelona, bajo la dirección de
Dr. Enrique Querol Murillo y de Dr. Mario Ferrer Navarro**

Noemí Párraga Niño

Dr. Enrique Querol Murillo

Dr. Mario Ferrer Navarro

La paciencia es un árbol de raíz amarga pero de frutos muy dulces.

Proverbio persa

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| ABREVIATURAS | 1 |
| I. INTRODUCCIÓN | 5 |
| I.A. MICOPLASMAS | 7 |
| I.B. <i>Mycoplasma genitalium</i> | 11 |
| I.B.1. MEMBRANA PLASMÁTICA DE <i>Mycoplasma genitalium</i> | 13 |
| I.B.2. PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE <i>Mycoplasma genitalium</i> | 14 |
| I.C. PROTEÓMICA | 17 |
| I.C.1. GELES BIDIMENSIONALES | 21 |
| I.C.1.1. Preparación de la muestra | 21 |
| I.C.1.2. Primera dimensión: isoelectroenfoque | 24 |
| I.C.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS | 27 |
| I.C.2.1. Breve introducción histórica | 27 |
| I.C.2.2. Instrumentación | 28 |
| I.C.2.3. MALDI-TOF | 29 |
| I.C.2.4. Electrospray | 30 |
| I.D. PROTEÓMICA DE MEMBRANA | 33 |
| I.D.1. MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA | 35 |
| I.D.1.1. Fraccionamiento de proteínas hidrofóbicas por separación de fases | 35 |
| I.D.1.2. Marcaje selectivo de las regiones expuestas en la membrana plasmática | 38 |
| I.D.2. INMUNOPROTEÓMICA | 40 |
| I.E. PROTEÓMICA EN <i>Mycoplasma genitalium</i> | 42 |
| II. OBJETIVOS | 45 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 49 |
| III. A. CULTIVO CELULAR | 51 |
| III.A.1. MEDIO DE CULTIVO SP4 | 51 |
| III.A.1.1. Base SP4 | 51 |
| III.A.1.2. Complementos | 51 |
| III.A.1.3. Preparación del extracto de levadura | 52 |
| III.A.1.4. Preparación de yeastolate | 52 |

| | |
|--|-----------|
| III.A.2. MEDIO DE CULTIVO MM14 | 52 |
| III.A.2.1. Base | 52 |
| III.A.2.2. Fuentes de carbono | 52 |
| III.A.2.3. Vitaminas | 53 |
| III.A.2.4. Bases nucleicas | 53 |
| III.A.2.5. Lípidos | 53 |
| III.A.2.6. Otros | 54 |
| III.A.3. CEPA UTILIZADA Y CONSERVACIÓN | 54 |
| III.A.4. CONDICIONES DE CULTIVO | 54 |
| | |
| III.B. ANÁLISIS MASIVO DEL PROTEOMA TOTAL DE <i>Mycoplasma genitalium</i> | 56 |
| III.B.1. Protocolo de obtención de muestra total | 56 |
| III.B.2. Protocolo de marcaje de muestra total mediante biotina | 57 |
| III.B.2.1. Protocolo de marcaje con sulfo-NHS-SS-Biotina del proteoma total | 58 |
| III.B.2.2. Purificación de las proteínas marcadas con sulfo-NHS-SS-Biotina | 59 |
| III.B.2.3. Precipitación de proteínas con acetona | 60 |
| | |
| III.C. ANÁLISIS DEL PROTEOMA TOTAL EN MEDIO MÍNIMO | 61 |
| III.C.1. Preparación del extracto proteico total de células cultivadas en MM14 | 61 |
| | |
| III.D. FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS HIDROFÓBICAS CON TRITÓN X-114 | 62 |
| III.D.1. Preparación de la muestra para el fraccionamiento con TX-114 | 62 |
| III.D.2. Fraccionamiento con TX-114 | 62 |
| III.D.3. Precipitación de proteínas solubles en TX-114 | 64 |
| | |
| III.E. IDENTIFICACIÓN DEL SURFOMA | 65 |
| III.E.1. Preparación de los fluoróforos | 65 |
| III.E.2. Marcaje de muestra: extracto total | 66 |
| III.E.3. Marcaje selectivo de proteínas expuestas en la superficie celular | 67 |
| | |
| III.F. MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS | 70 |
| III.F.1. SDS-PAGE MONODIMENSIONAL | 70 |
| III.F.1.1. Disoluciones necesarias para el SDS-PAGE | 70 |
| III.F.1.2. Composición del SDS-PAGE | 71 |
| III.F.1.3. Condiciones utilizadas para correr el SDS-PAGE | 71 |

| | |
|---|------------|
| III.F.2. GELES BIDIMENSIONALES | 72 |
| III.F.2.1. Preparación de la muestra para la electroforesis bidimensional | 72 |
| III.F.2.2. Limpieza de la muestra para el isoelectroenfoque | 73 |
| III.F.2.3. Determinación de la concentración proteica de la muestra | 74 |
| III.F.2.4. Isoelectroenfoque | 75 |
| III.F.2.4.a. Rehidratación de las tiras de isoelectroenfoque | 75 |
| III.F.2.4.b. Proceso de isoelectroenfoque | 76 |
| III.F.2.5. Equilibrado de las tiras de isoelectroenfoque | 80 |
| III.F.2.6. Segunda dimensión | 82 |
| III.F.2.6.a. Descripción del sistema | 82 |
| III.F.2.6.b. Preparación de los geles de acrilamida | 82 |
| III.F.2.6.c. Preparación del sistema | 84 |
| III.F.2.6.d. Transferencia de la primera dimensión con la segunda | 84 |
| III.F.2.6.e. Condiciones recomendadas para correr la segunda dimensión | 87 |
| III.G. WESTERN BLOT | 88 |
| III.G.1. OBTENCIÓN DE SUERO | 88 |
| III.G.2. TRANSFERENCIA EN SEMI-DRY | 89 |
| III.G.3. ENSAYO INMUNOLOGICO | 90 |
| III.G.4. REVELADO DE LA MEMBRANA | 91 |
| III.H. TINCIONES | 92 |
| III.H.1. TINCIÓN CON PLATA | 92 |
| III.H.2. TINCIÓN CON COOMASSIE R-250 | 93 |
| III.I. ANÁLISIS DE IMAGEN | 94 |
| III.J. DIGESTIÓN TRIPTICA | 95 |
| III.J.1. PROCESAMIENTO DE LOS GELES | 95 |
| III.J.2. DESTINCIÓN DE LOS SPOTS TEÑIDOS CON PLATA | 95 |
| III.J.3. REDUCCIÓN Y ALQUILACIÓN | 96 |
| III.J.4. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA | 97 |
| III.J.5. LIMPIEZA Y CONCENTRADO DE LAS MUESTRAS | 99 |
| III.K. ESPECTROMETRÍA DE MASAS | 101 |

| | |
|---|-----|
| III.K.1. MALDI-TOF | 101 |
| III.K.1.1. Descripción del sistema | 101 |
| III.K.1.2. Preparación estándar de muestra con HCCA para placa AnchorChip™ | 104 |
| III.K.1.3. Lavado y regeneración de la placa AnchorChip™ | 106 |
| III.K.2. ELECTROSPRAY | 107 |
| III.K.2.1. Cromatografía líquida | 107 |
| III.K.2. 2. Identificación de proteínas y análisis de resultados | 107 |
| | |
| III.L. BIOINFORMÁTICA | 109 |
| | |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 111 |
| | |
| IV. A. PROTEOMA TOTAL DE <i>Mycoplasma genitalium</i> | 113 |
| IV.A.1. Identificación del proteoma total cultivado en medio SP4 | 114 |
| IV.A.1.1. Identificación del proteoma total cultivado en medio SP4 | 116 |
| IV.A.1.2. Identificación del proteoma total cultivado en medio SP4 mediante marcaje con biotina | 121 |
| IV.A.2. Identificación del proteoma total cultivado en medio mínimo | 127 |
| IV.A.2.1. Identificación del proteoma total cultivado en medio mínimo: Pase 1 | 128 |
| IV.A.2.2. Identificación del proteoma total cultivado en medio mínimo: Pase 2 | 132 |
| | |
| IV. B. ANÁLISIS DEL PROTEOMA SOLUBLE EN TX-114 DE <i>Mycoplasma genitalium</i> | 139 |
| IV.B.1. Separación de fases de proteínas hidrofóbicas con TX-114: 2DE/MALDI | 139 |
| IV.B.2. Separación de fases de proteínas hidrofóbicas con TX-114: GeLCMS | 147 |
| | |
| IV.C. IDENTIFICACIÓN DEL SURFOMA DE <i>Mycoplasma genitalium</i> | 154 |
| | |
| IV.D. INMUNOMA | 163 |
| | |
| IV.E. CONCLUSIONES | 173 |
| | |
| BIBLIOGRAFÍA | 175 |
| ANNEXO | 185 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|--|
| 2DE | Electroforesis bidimensional |
| A | Adenina |
| ABC | Cassette de unión a ATP |
| ACN | Acetonitrilo |
| ASB-14 | Amidosulfobetaina 14 |
| ATCC | Colección Americana de cultivos tipo |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BSA | Albumina de suero bovino |
| C | Citosina |
| CHAPS | 3-(cloroamido propil)- dimetilamonio-1-propanosulfato |
| CMRL | Connaught Medical Research Laboratories medium 1066 |
| COG | Clusters of Orthologous Groups |
| Da | Dalton |
| DIGE | Electroforesis en gel diferencial |
| DMF | Dimetilformamida |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DTT | Ditiotreitol |
| DUF | Domain of unknown function |
| G | Guanina |
| GeLCMS | Gel electrophoresis – Liquid chromatography - Mass spectrometry |
| <i>H. influenza</i> | <i>Haemophilus influenza</i> |
| IEF | Enfoque isoeléctrico |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| IPG | Gradiente pH inmovilizado |
| LAMP | Proteína de membrana asociada a lípido |
| M | Molar |
| MALDI-TOF | Desorción/ionización láser asistida por matriz – tiempo de vuelo |
| <i>m/z</i> | Relación masa - carga |
| μm | Micromol |

| | |
|----------------------|---|
| <i>M. genitalium</i> | <i>Mycoplasma genitalium</i> |
| MM14 | Medio mínimo 14 |
| MW | Masa molecular |
| mRNA | Acido ribonucleico mensajero |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleótido |
| Nano-HPLC | Nanocromatografía líquida de alta presión |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NP-40 | Nonidet P-40 |
| ORF | Marco de lectura abierto |
| Pb | Par de bases |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| pI | Punto isoeléctrico |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo |
| PTM | Modificaciones post-traduccionales |
| PTS | Sistema fosfotransferasa para azúcares |
| RNA | Acido ribonucleico |
| rRNA | Acido ribonucleico ribosomal |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico |
| SERPA | Análisis del proteoma serológico |
| SP4 | Medio para Spiroplasma 4 |
| T | Timina |
| TBP | Tributilfosfina |
| TFA | Ácido trifluoroacético |
| Torr | Unidad de presión |
| tRNA | Acido ribonucleico de transferencia |
| TX-114 | Tritón 114 |

I. INTRODUCCIÓN

I.A- MICOPLASMAS

Los micoplasmas son los microorganismos auto-replicativos más pequeños que pueden ser cultivados axénicamente. Forman un grupo de procariotas con unas 190 especies diferentes de bacterias Gram positivas.

Estos microorganismos contienen un conjunto mínimo de estructuras esenciales para el crecimiento y replicación: una membrana plasmática, ribosomas y un genoma consistente en una molécula circular de DNA doble hebra. A diferencia del resto de procariotas, los micoplasmas no tienen pared celular y consecuentemente están organizados en una clase separada, los *mollicutes* (mollis, suave; cutes, piel). Estos diversos microorganismos son parásitos de un amplio rango de huéspedes, incluyendo humanos, animales, insectos, plantas y células en cultivo [1, 2]. A los micoplasmas se les ha apodado “crabgrass” (traducción literal: ladillas de la hierba) de los cultivos celulares porque sus infecciones son persistentes, frecuentemente difíciles de detectar y curar [3]. La contaminación de los cultivos celulares por micoplasmas representa un serio problema en los laboratorios de investigación así como en industrias biotecnológicas que emplean cultivos celulares. El origen de las contaminaciones por micoplasmas está en los componentes de los medios de cultivo, en particular en el suero, o en la flora bucal del personal técnico [4].

El “coccus” es la forma básica de todos los micoplasmas en cultivo siendo el diámetro de los “coccus” más pequeños capaces de reproducirse de unos 300 nm (Figura I.1.A). En la mayoría de cultivos de micoplasmas, suelen aparecer formas alargadas o filamentosas (hasta 100 μm de largo y sobre 0.4 μm de ancho). Los filamentos tienden a producir estructuras miceloides ramificadas, por este motivo se les conoce con el nombre de micoplasmas (myces, hongo; plasma, una forma). Los micoplasmas se reproducen por fisión binaria, pero la división citoplasmática frecuentemente puede tener lugar después de la replicación genómica, resultando en la formación de filamentos multinucleados [5] tal y como se indica en la figura I.2.

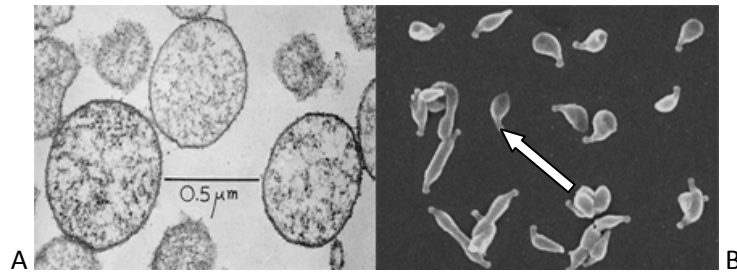


Fig. I.1. A: Micrografía electrónica de una célula de micoplasma. Las células están limitadas por una única membrana. El citoplasma contiene unos finos hilos que serían secciones del cromosoma y los ribosomas que son observados como gránulos oscuros (foto de RM Cole, Bethesda, <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch037.htm>).
B: Micrografía electrónica de barrido de células de *Mycoplasma genitalium*. Pueden observarse algunas células en proceso de división, así como también se puede apreciar la organela terminal que dirige el movimiento e invasión.

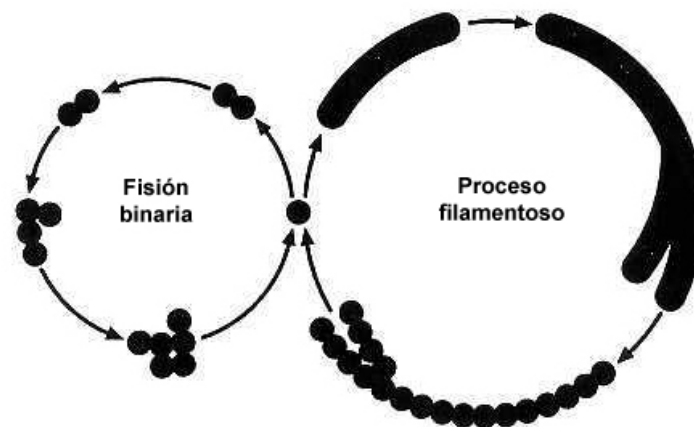


Fig. I.2. Representación esquemática del modo de reproducción de los micoplasmas. Las células se pueden dividir ya sea por fisión binaria o se alargan formando filamentos multinucleados, que subsecuentemente se rompen para formar cuerpos "coccoides".

Algunas especies del género *Mycoplasma* poseen organelas de anclaje, los cuales, en *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium* y *Mycoplasma penetrans* aparecen con forma de punta (Figura I.1.B). *Mycoplasma pneumoniae* es un patógeno del tracto respiratorio y se adhiere al epitelio respiratorio a través de la organela de anclaje [6]. Algunos micoplasmas patógenos humanos exhiben movilidad en superficies cubiertas de líquido, pero la organela de anclaje siempre lidera el movimiento, indicando también su importancia en la movilidad [7]. Una de las características del crecimiento de estos microorganismos, y que facilita su reconocimiento, es la peculiar forma de huevo frito que forman las colonias. Estas colonias

están formadas por una zona central de crecimiento que penetra en el agar y una zona periférica que permanece sobre el agar, tal y como se muestra en la figura I.3.

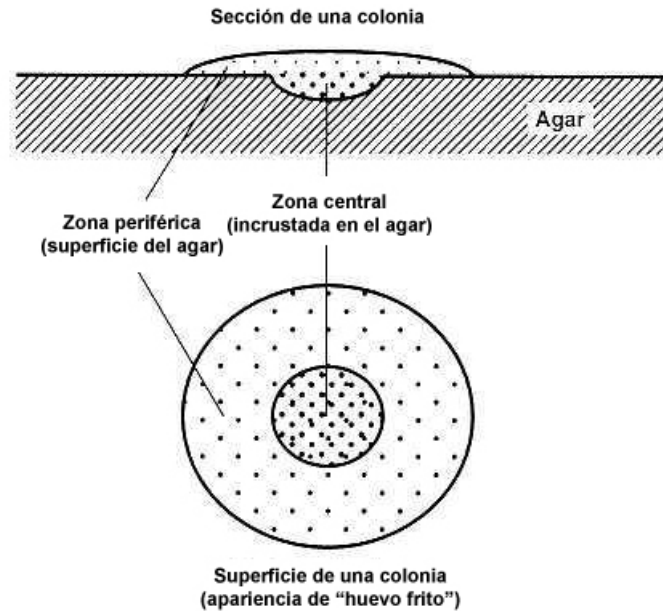


Fig. I.3. Morfología típica de una colonia de Mycoplasma con morfología de huevo frito.

La carencia de pared celular así como de membranas intracitoplasmáticas facilita la separación de la membrana de los micoplasmas en una forma relativamente pura. La membrana de los micoplasmas está compuesta, al igual que otros procariotas, por $2/3$ de proteína y $1/3$ de lípidos. La composición de los lípidos se asemeja a la de otros procariotas excepto por el gran contenido en colesterol en la membrana de los micoplasmas que requieren esteroides. Este factor sumado a la falta de pared celular, hace que la membrana plasmática de los micoplasmas se asemeje más a la de eucariotas que no a la de los procariotas. Las proteínas de membrana expuestas en la superficie celular son los determinantes antigénicos principales en los micoplasmas [5]. De ahí la importancia de conocer en profundidad cuales son las proteínas expuestas en la membrana de los microorganismos patógenos, como es el caso de *Mycoplasma genitalium*. Antiserosos que contengan anticuerpos para alguna de estas proteínas de membrana inhiben el crecimiento y el metabolismo de los micoplasmas, y en presencia del complemento, provocan lisis celular. Estas propiedades son utilizadas en varios test serológicos para diferenciar entre especies y serotipos del genero *Mycoplasma*, así como para detectar anticuerpos contra micoplasmas en el suero de pacientes [8].

El genoma de los micoplasmas es típicamente procariota, consistente en una molécula circular de DNA doble hebra. Los genomas de los micoplasmas están caracterizados por un bajo contenido en G+C (32%) y por la utilización preferencial de codones que contengan adenina y uracilo, sobretodo en la tercera posición. Lo más interesante es el uso del codón universal de stop, UGA, como codón para el triptófano en algunos micoplasmas, como es el caso de *Mycoplasma genitalium* [4]. Los genomas de los micoplasmas son de los más pequeños conocidos en un procariota autoreplicativo. El genoma de los mollicutes presenta muy pocos genes, en algunos micoplasmas el número estimado es ligeramente inferior a 500 [9], que es aproximadamente diez veces menos que en *Escherichia coli* [10]. Así, los micoplasmas carecen de bastantes actividades enzimáticas y rutas metabólicas, por lo tanto sus requerimientos nutricionales son complejos, dependiendo de un modo de vida parasitario [11].

La dependencia de los micoplasmas de su huésped para la obtención de nutrientes explica el elevado nivel de dificultad en el cultivo de estos organismos en un laboratorio. Los complejos medios necesarios para el cultivo de los micoplasmas incluyen sueros, que proveen de ácidos grasos y colesterol para la síntesis de la membrana, entre otros.

Existe consenso en que sólo una pequeña fracción de los micoplasmas existentes en la naturaleza han sido cultivados [4]. Algunos de los micoplasmas cultivables crecen extremadamente lentos. *Ureaplasma urealyticum*, un patógeno del tracto urogenital humano, crece muy poco *in vitro*, alcanzando títulos máximos de 10⁷ células por mililitro de cultivo.

La glucosa y otros carbohidratos metabolizables pueden ser utilizados como fuente de energía por micoplasmas fermentativos que poseen la ruta glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas. La mayoría de micoplasmas poseen, aunque truncado, un sistema respiratorio terminado en flavín, que desempeña la fosforilación oxidativa, generando finalmente ATP. La degradación de arginina por la ruta de la arginina dihidrolasa ha sido propuesta como fuente principal de ATP en micoplasmas no fermentativos (*Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma hominis*) [11].

Los ureaplasmas tienen un requerimiento único entre organismos vivos, la urea. Debido a que estos micoplasmas no son glicolíticos y carecen de la ruta de la arginina dihidrolasa, el ATP es generado a través de un gradiente electroquímico producido por el amonio liberado durante la hidrólisis intracelular de la urea por una ureasa [12].

I.B. MYCOPLASMA GENITALIUM

Mycoplasma genitalium es el agente etiológico de uretritis no-gonococal en hombres y de cervicitis en mujeres, aunque recientemente también se está relacionando con infecciones del tracto genital superior en mujeres [13]. Fue aislado por primera vez en 1980 en 2 de 13 hombres con uretritis no-gonococal [14]. Este organismo es el miembro más pequeño de la clase *Mollicutes*. Su genoma es un cromosoma circular de 580070 pb, cuya secuencia fue publicada por Fraser *et al.* en el año 1995 [9]. El contenido en G+C es de 32% (A, 34%; C, 16%; G, 16%; y T, 34%). El contenido en G+C varía a lo largo del genoma del 27 al 37% (utilizando una ventana de 5000 pb), siendo las regiones de menor contenido en G+C los flancos del presumible origen de replicación. Como en otros organismos, el mayor contenido en G+C se encuentra en el operón de RNA ribosomales (44%) y en los genes de RNA de transferencia (52%), lo que refleja la necesidad de retener pares de bases esenciales para la estructura secundaria de rRNAs y tRNAs. Presenta 140 genes que codifican proteínas de membrana y el 4.5% del genoma está involucrado en evadir la respuesta inmune del huésped [9]. *M. genitalium* es el microorganismo no virus que presenta menos genes de vías metabólicas, faltando la mayoría de los genes de biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos así como del ciclo de Krebs. Otro dato importante es que tan sólo presenta 5 genes dedicados a funciones reguladoras (frente a los 64 que presenta otro organismo simple como *H. influenzae*). Es general en todos los micoplasma que presentan regulación por RNA antisentido [15, 16].

M. genitalium es un parásito obligado, ello hace suponer que su metabolismo está adecuado para trabajar en un ambiente homeostático y es por ello que quizá disponen de tan pocos genes dedicados a la regulación. Por otra parte, *M. genitalium* presenta una membrana simple y típica, de hecho puede fusionarse con la del huésped eucariota e incluso intercambiar proteínas con el mismo, lo cual hace al organismo interesante para aplicaciones como el uso del organismo como liposoma [17].

M. genitalium es un interesante modelo de célula mínima, por este motivo el grupo de C. Venter procedió a simplificar más el genoma de este organismo tratando de definir lo que denomina como "genoma mínimo", o sea, el conjunto mínimo de genes esenciales para el crecimiento celular y la división, inactivando sus genes mediante interrupción por transposones [18]. En su simplificación llega a un número de genes de entre 265 y 350 genes esenciales, estando en el orden de magnitud de los virus más grandes. Si bien se obtienen resultados

interesantes, el concepto mismo de genoma mínimo es discutible dado que éste no es un organismo más primitivo, sino una célula que ya minimizó previamente su genoma. Por otra parte, no ha de existir un único genoma mínimo sino muchos, en función de los diversos ambientes en que puede situarse una célula. Uno de los hallazgos más interesantes del trabajo de Venter, es que entre los genes esenciales, hay 112 ORFs (23 % del proteoma total predicho) cuya función es completamente desconocida, lo que sugiere que probablemente queda mucha bioquímica básica por identificar. Probablemente habrá muchos genes dedicados a funciones tipo crecimiento en condiciones diferentes a las establecidas en el laboratorio o funciones presentes pero no identificadas en el rastreo por similitud de secuencia. Ejemplo de este caso es el hecho que no se encuentran genes homólogos de superóxido dismutasa, oxidoreductasa, catalasa, ni NADH peroxidasa y es de suponer que el microorganismo resuelve el estrés oxidativo. Tampoco se encuentran muchos de los enzimas “universales” como la malato deshidrogenasa, aunque en este caso la función de la malato deshidrogenasa podría ser desempeñada por el enzima lactato deshidrogenasa. Por otra parte, el hecho de encontrarse como dispensables un cierto número de genes de importantes funciones tales como reparación y replicación del DNA, algunas aminoacil tRNA sintetasas, biosíntesis de cofactores, ácidos grasos, metabolismo fosfolipídico, conversión de hexosas, etc., podría ser debido a redundancias funcionales no identificadas o a asignaciones funcionales erróneas. Como ya se ha comentado anteriormente, los micoplasmas requieren muchos metabolitos del medio, lo cual implica la existencia de numerosos sistemas de transporte ABC eficientes e incluso multiuso. Es probable que haya subunidades de unión específica a ligando aún no identificadas en el genoma de los micoplasmas. Por ejemplo, el hecho de que una función probablemente esencial, como el transporte de fosfato, haya aceptado disrupciones sugiere que existe algún sistema de transporte de fosfato aún no definido.

Debido a las carencias que presenta *Mycoplasma genitalium* en lo que a genes relacionados con vías metabólicas se refiere, los medios de cultivo necesarios para el crecimiento de este microorganismo son complejos. Un medio de cultivo con el que se obtiene una mayor biomasa es el medio SP4 [19]. Este medio es un medio rico y complejo que contiene entre otros, suero bovino fetal y extracto de levadura. Existen otros medios de cultivo que permiten el cultivo de este microorganismo, en concreto, el medio de cultivo MM14 [20] es un medio con una composición de cada uno de sus 28 componentes bien establecida.

I.B.1. MEMBRANA PLASMÁTICA DE *Mycoplasma genitalium*

Los micoplasmas son unos microorganismos que carecen de pared celular y membranas intracitoplasmáticas, por lo que sólo presentan un tipo de membrana: la membrana plasmática. La membrana clásica de los micoplasmas consiste en una bicapa lipídica y proteínas integrales de membrana. La facilidad con la que esta membrana puede ser aislada y la habilidad para introducir alteraciones controladas en su composición han hecho de las membranas del género *Mycoplasma* una herramienta muy efectiva en la investigación de biomembranas [5].

Dicha membrana está compuesta por:

1. Lípidos: constituyen 1/3 de la membrana. Un aspecto que diferencia la membrana de micoplasma de la del resto de procariontes, es que este género tiene mayor abundancia de colesterol. El colesterol es un componente necesario en las membranas biológicas debido a que rompe las interacciones de Van der Waals entre las colas de los fosfolípidos. Gracias a esta mayor presencia de colesterol, la membrana de los micoplasmas es más fluida y se asemeja más a las membranas de las células eucariotas.
2. Lipoproteínas: constituyen 2/3 de la membrana. Dichas lipoproteínas constituyen, en gran medida, el sistema de variación antigénica [5], lo que posibilita el escape de estos microorganismos del sistema inmune del huésped. Las proteínas de membrana representan un 30% del proteoma total.

I.B.2. PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE *Mycoplasma genitalium*

Se ha estimado que *Mycoplasma genitalium* presenta 140 genes [9] que codifican proteínas de membrana, lo cual representa aproximadamente un 30% del proteoma total. Estas proteínas pueden ser clasificadas en dos categorías:

1. Proteínas integrales de membrana: pueden atravesar la bicapa lipídica una (unipaso) (imagen 1 de la figura I.4) o varias veces (multipaso) (imagen 2 de la figura I.4). Las regiones intracelular y extracelular de la proteína suelen ser lazos. La hélice α es la forma más común por la que una cadena polipeptídica cruza la bicapa lipídica, aunque algunas la atraviesan en estructura de lámina β , formando un cilindro en forma de barril. Estas proteínas, que atraviesan varias veces la bicapa lipídica (proteínas multipaso), mediante estructuras en hélice α o lámina β , forman poros o canales polares que permiten el paso a través de la membrana de moléculas solubles en agua. En las proteínas integrales de membrana se pueden distinguir tres dominios:

- Dominio transmembrana: zona que atraviesa la membrana con residuos hidrofóbicos, que interactúan con los lípidos de la bicapa lipídica, uniéndose a ella.
- Dominio citosólico: en contacto con el interior celular (citosol). (imagen 3 de la figura I.4)
- Dominio externo: en contacto con el medio externo a la célula (imagen 4 de la figura I.4)

Ambos dominios, citosólico y externo son de naturaleza hidrofílica. Una proteína multipaso puede tener ambos extremos orientados hacia el mismo lado de la membrana (citosólico o extracelular) o cada extremo en un lado diferente.

2. Proteínas periféricas: son proteínas que no presentan zonas hidrofóbicas y por tanto no atraviesan la membrana (imagen 5 y 6 de la figura I.4). Pueden estar unidas tanto a la cara externa de la membrana como a la cara citoplasmática mediante uniones

débiles, no covalentes, de forma que es fácil separarla de la membrana mediante solubilización, al someterla a una disolución con alta concentración de sales o por cambios en el pH.

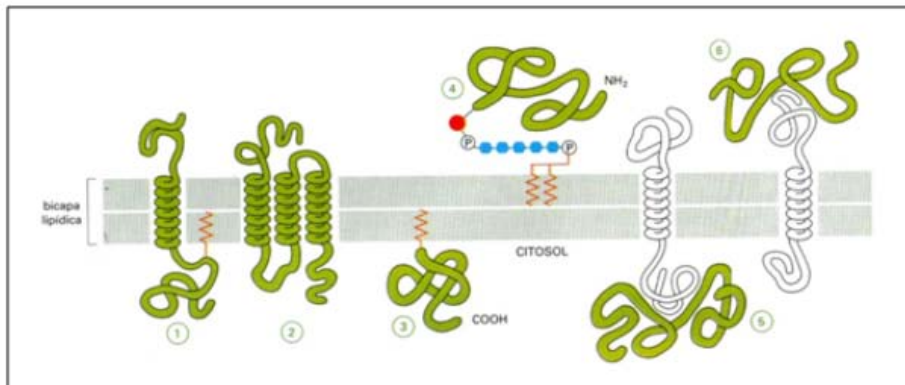


Fig.I.4. Esquema de los diferentes tipos de proteínas de membrana.

Las proteínas integrales de membrana son denominadas proteínas de membrana asociadas a lípidos (LAMPs). Dado que estos microorganismos carecen de la protección de una pared celular y se encuentran en un medio externo en contacto con componentes del sistema inmune del huésped, deberían ser extremadamente sensibles a la inhibición del crecimiento y a la acción de los antibióticos. Por el contrario, las infecciones por micoplasma suelen ser crónicas. Esto es debido tanto a que estos microorganismos son capaces de internalizarse dentro de las células del huésped, como a la existencia de variación de la mayoría de proteínas antigénicas de membrana, escapando así de la respuesta inmune del huésped [1].

La naturaleza de las proteínas de membrana determina su función:

- Canales: proteínas integrales que actúan como poros por los que determinadas sustancias pueden entrar o salir de la célula.
- Transportadoras: son proteínas que sufren cambios conformacionales para dar paso a determinados productos.
- Receptores: son proteínas integrales que reconocen determinadas moléculas a las que se unen o fijan. Estas proteínas pueden identificar un nutriente que sea importante para la función celular.

- Enzimas: pueden ser integrales o periféricas y sirven para catalizar reacciones en la superficie de la membrana.
- Anclajes del citoesqueleto: son proteínas periféricas que se encuentran en la parte del citosol de la membrana y que sirven para fijar los filamentos del citoesqueleto.

Aún y tener una gran importancia para multitud de procesos celulares, quedan muchas proteínas de membrana por identificar. Existen principalmente tres métodos para identificar las proteínas de membrana. El primer método está basado en la predicción de proteínas por análisis de genomas ya secuenciados utilizando programas bioinformáticos como el PSORT [21] o ProtLoc [22]. Dicho método es rápido pero no es completamente fiable y no es cuantitativo. El segundo método emplea la separación de las membranas y de la pared celular en una fracción y la posterior identificación de las proteínas por electroforesis bidimensional o cromatografía líquida acoplada a equipamiento de espectrometría de masas. Este método se ha utilizado en muchas bacterias [23] y es razonablemente cuantitativo. Ninguno de estos dos métodos identifica selectivamente las proteínas que están expuestas en la superficie externa de la membrana. En relación a este asunto Rodríguez-Ortega *et al.* [24] desarrollaron un método que permite la identificación rápida y selectiva de las proteínas expuestas al exterior, el conjunto de proteínas que están entera o parcialmente expuestas al medio externo de la bacteria, denominado Surfoma. Este método utiliza enzimas proteolíticas, como la tripsina o la proteinasa k, para “afeitar” la superficie celular y así los péptidos generados pueden ser identificados por espectrometría de masas. Este método es muy interesante debido a que las proteínas que están expuestas en la membrana son las que interaccionan con el sistema inmune del huésped, por lo que podrían ser dianas para el desarrollo de vacunas y fármacos. A parte, este método no sólo proporciona información acerca de cuáles son las proteínas expuestas en la superficie sino también proporciona información topológica acerca de las proteínas identificadas. Esta técnica no es aconsejable utilizarla en el género *Mycoplasma* ya que la falta de pared celular hace que el tratamiento con el enzima provoque la lisis de algunas células generando un background muy elevado de proteínas citosólicas que imposibilita la identificación de proteínas minoritarias de membrana.

I.C. PROTEÓMICA

La secuenciación del genoma completo de diferentes organismos está llamada a mejorar nuestro conocimiento sobre la biología de los mismos. Sin embargo se desconoce la función de los productos proteicos de muchos de los genes identificados *de novo*. La proteómica es la ciencia que correlaciona las proteínas con sus genes. El proteoma, término acuñado en 1994 por M. Wilkins [25], puede definirse como el conjunto de proteínas expresadas por un genoma y la proteómica como la genómica funcional al nivel de proteínas. Las proteínas son partes vitales de los organismos vivos, pues son quienes realizan las funciones bioquímicas. Por otra parte, del genoma no siempre se puede deducir el proteoma y menos el interactoma. Una mariposa, su crisálida y la oruga comparten el genoma pero no el proteoma.

La proteómica permite identificar, categorizar y clasificar las proteínas con respecto a su función y a las interacciones que establecen entre ellas. De este modo, se pueden caracterizar las redes funcionales que establecen las proteínas y su dinámica durante procesos fisiológicos y patológicos. La proteómica se está aplicando en la identificación de nuevos biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades, la identificación de nuevos fármacos, la determinación de proteínas involucradas en la patogenia de enfermedades y el análisis de procesos de transducción de señales.

La proteómica es considerada el siguiente paso en el estudio de un sistema biológico, después de la genómica. La proteómica es más compleja que la genómica porque mientras que el genoma de un organismo es más o menos estático, el proteoma difiere de una célula a otra y de un momento a otro. Esto se debe a que en los distintos tipos celulares se expresan genes distintos, lo que implica que se debe determinar hasta el conjunto básico de proteínas producido en una célula. La principal fuente de complejidad del proteoma eucariota es el splicing alternativo: se estima que a partir de los 30.000-40.000 genes que codifican para proteínas en el genoma humano, podrían generarse un número de proteínas diferentes que oscilaría entre 500.000-1.000.000 [26]. Además, este elevado número de proteínas pueden interactuar para formar complejos con otras macromoléculas; estas interacciones varían en función del estado fisiológico. Por tanto, el proteoma es una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas por un organismo, célula, o compartimiento subcelular concreto en un momento dado y bajo determinadas condiciones, constituyendo el mapa de expresión proteica de una célula, tejido u organismo dado. Un factor adicional de complejidad son las modificaciones que puede sufrir la estructura o secuencia básica de la proteína (por ejemplo el

procesado proteolítico) y las modificaciones post-traduccionales (fosforilación, metilación, acetilación, etc.) que normalmente sirven para modificar o modular la actividad, función o localización de una proteína en diferentes contextos fisiológicos o metabólicos. Finalmente, otro factor de complejidad es el “moonlighting” o multifuncionalidad, en que una proteína puede tener varias funciones [27].

En el pasado, el análisis de los genes que se expresaban en diferentes tipos de células y tejidos en diferentes contextos fisiológicos era realizado principalmente mediante un análisis de mRNA, pero se encontró que a menudo no existe una correlación directa entre el contenido en mRNA y el contenido proteico. Ahora se sabe que el mRNA no siempre se traduce a proteína, y que la cantidad de proteína producida por una cantidad dada de mRNA depende del estado fisiológico de la célula [28]. La proteómica confirma la presencia de la proteína y provee una medida directa de la cantidad presente.

Existen tres ramas en la proteómica que tratan de caracterizar el proteoma estudiando distintos aspectos del mismo:

- La proteómica de expresión tiene como objetivo la identificación, localización celular y el estudio de la abundancia relativa de las proteínas y de sus modificaciones post-traduccionales, como por ejemplo geles 2D con tinción específica de fosfoproteínas (Pro Q-Diamond).
- La proteómica estructural estudia la caracterización de la estructura tridimensional de las proteínas, como por ejemplo la cristalografía.
- La proteómica funcional estudia la función de las proteínas y las interacciones que se producen entre las proteínas y otras moléculas con el fin de determinar su función, (Interactómica).

Las aplicaciones de la proteómica son múltiples, pero actualmente se destacan las siguientes:

- Identificación de nuevos biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades.
- Identificación de nuevas dianas para el desarrollo de fármacos.
- Determinar las redes de interacciones, fundamentales para establecer las bases de la Biología de Sistemas.

- Determinación de mecanismos moleculares involucrados en la patogenia de enfermedades.

Fundamentalmente requiera la combinación de dos técnicas: una de separación de proteínas y otra de identificación de las mismas. Las técnicas más utilizadas para separar las proteínas son la electroforesis y las cromatografías. La principal técnica para identificar es la espectrometría de masas. Dependiendo del objetivo del estudio podemos agrupar las técnicas en proteómica en los siguientes grupos:

- Técnicas empleadas para analizar globalmente el proteoma y separar sus proteínas. Cabe destacar la electroforesis bidimensional (2D-PAGE), DIGE (Difference In Gel Electrophoresis: electroforesis diferencial en gel), ICAT (Isotope-Coded Affinity Tags: marcaje isotópico diferencial), SILAC (Stable Isotope Labelling of Aminoacids in Cell culture: marcaje isotópico estable por aminoácidos en cultivo celular) y MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology: tecnología multidimensional de identificación de proteínas).
- Técnicas utilizadas para analizar individualmente las proteínas. Con este objetivo se utilizan distintos tipos de espectrometría de masas, como el MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization Time Of Flight: desorción/ionización mediante láser asistida por matriz, "tiempo de vuelo"), SELDI-TOF-MS (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry), ESI MS/MS (Electrospray Tandem Mass Spectrometry: espectrometría de masas en tándem, electrospray). Con estas técnicas se puede obtener la huella peptídica (peptide mass fingerprint), que permite la identificación de una proteína. La huella peptídica es el conjunto de fragmentos peptídicos que se obtienen tras tratar una proteína concreta con una proteasa determinada. La huella peptídica es característica de cada proteína y depende de la enzima con la que se genere. Actualmente hay numerosas bases de datos, como la NCBI nr, MSDB o Swissprot, a partir de las cuales se calculan las huellas peptídicas generadas in silico de multitud de proteínas conocidas. Estas bases de datos se pueden rastrear utilizando motores de búsqueda que permiten la identificación de una proteína a partir de su huella peptídica característica. Además, gracias a la espectrometría de masas se pueden obtener la secuencia de un péptido a partir del análisis de los fragmentos generados por la colisión de éste con un gas inerte.

- Técnicas que se utilizan para estudiar interacciones entre proteínas, como los sistemas “yeast two hybrids” (Y2H) o la técnica “Phage Display”. La técnica “Phage Display” permite averiguar con qué proteínas interacciona una proteína problema o sonda. Esta técnica consiste en la expresión, en la superficie de un fago, de la proteína que se quiere analizar. La proteína problema o sonda se inmoviliza sobre un soporte o membrana de tal modo que los fagos que expresan las proteínas que se unen a la sonda quedan inmovilizados sobre el soporte. Estos fagos se pueden recuperar fácilmente de la membrana y pueden ser empleados para la expresión de la proteína en *Escherichia coli* y su posterior identificación.

El análisis y la interpretación de los datos obtenidos con las técnicas en proteómica descritas anteriormente, especialmente cuando se utilizan a gran escala, necesitan herramientas bioinformáticas. Durante los últimos años la genómica (proyectos de secuenciación de distintos genes), la proteómica y la bioinformática se han desarrollado de forma sinérgica experimentando un auge sorprendente que está aportando grandes avances a la medicina.

Básicamente, la proteómica pone en juego un conjunto de técnicas destinadas a resolver (geles de poliacrilamida, tanto monodimensionales, como bidimensionales de alta resolución, cromatografías), identificar y caracterizar (espectrometría de masas (MS), secuenciación de proteínas por degradación de Edman, western blot, etc.) y cuantificar proteínas (escáner, phosphorimager), así como almacenar los resultados en bancos de datos (bancos de datos de geles 2DE y proteínas), comunicar y entrecruzar información con las secuencias de DNA y proteínas que aportan los proyectos de genoma [29].

La electroforesis bidimensional combinada con la identificación de proteínas por espectrometría de masas es actualmente la herramienta de uso más general en proteómica [30]. Si bien últimamente están emergiendo nuevas técnicas alternativas o complementarias (marcaje con isótopos estables, arrays de proteínas o anticuerpos, etc.) la electroforesis bidimensional es actualmente la única técnica que puede, de forma rutinaria, retratar los niveles de expresión de mezclas complejas de proteínas, tales como lisados celulares totales [31].

La electroforesis bidimensional permite la separación de mezclas complejas de proteínas según su punto isoeléctrico (pI), masa molecular (MW), solubilidad y abundancia relativa. Crea un mapa de proteínas intactas, que refleja cambios en los niveles de expresión, isoformas o modificaciones post-traduccionales. De hecho, uno de los puntos fuertes de la electroforesis

bidimensional es la capacidad de identificar modificaciones post-traduccionales tales como fosforilaciones, glicosilaciones o proteólisis limitada, ya que estas modificaciones hacen que las proteínas aparezcan en distintos puntos, ya sea en el eje vertical (variación de la masa molecular) o en el eje horizontal (variaciones en el punto isoeléctrico) [32]. Los métodos que combinan cromatografía líquida con espectrometría de masas, que realizan el análisis proteico a través de péptidos, pierden la información del punto isoeléctrico y la masa molecular.

Hoy en día la tecnología de electroforesis bidimensional ha superado sus limitaciones iniciales en cuanto a reproducibilidad, resolución, manejo y la capacidad de separación de proteínas muy ácidas o básicas [33]. Finalmente, la electroforesis bidimensional permite hacerse una idea visual global de un proteoma o subproteoma, que representa una gran ayuda para el investigador.

I.C.1. GELES BIDIMENSIONALES

I.C.1.1. Preparación de la muestra

Un método apropiado para la preparación de la muestra es absolutamente esencial para obtener buenos resultados en la electroforesis bidimensional. Debido a la gran diversidad de muestras, sólo pueden darse unas líneas generales para la preparación de la muestra. El procedimiento óptimo debe ser determinado empíricamente para cada muestra. Idealmente el proceso de preparación de la muestra debe resultar en una completa solubilización, disgregación, desnaturalización y reducción de las proteínas en la muestra para romper todas las interacciones moleculares y asegurarse de que cada punto representa a un polipéptido individual [34]. La preparación de la muestra debe ser tan simple como sea posible para incrementar la reproducibilidad, de hecho un solo paso de preparación de muestra sería altamente deseable. La solubilización de la muestra se realiza normalmente con un tampón que contiene agentes caótropos (urea y/o tiourea), detergentes no-iónicos o zwitteriónicos (CHAPS, Tritón X-100, etc.), agentes reductores (DTT, TBP), anfólitos e inhibidores de proteasas, dependiendo de la muestra.

Agentes caótropos:

La urea es eficiente rompiendo puentes de hidrógeno, llevando a la proteína a desplegarse y desnaturalizarse. La tiourea, introducida por Rabilloud [35] es mejor rompiendo interacciones hidrofóbicas, pero su uso viene limitado por su pobre solubilidad en agua, aunque es más soluble en disoluciones de urea concentrada. Actualmente la mejor solución para solubilizar

proteínas hidrofóbicas es una combinación de 5-7 M urea y 2 M tiourea, conjuntamente con los detergentes apropiados [36].

Detergentes:

Los detergentes son utilizados para prevenir las interacciones hidrofóbicas entre dominios hidrofóbicos de proteínas y evitar la pérdida de proteína debido a la agregación y/o precipitación. Además, permiten solubilizar proteínas asociadas a la membrana.

El detergente iónico SDS es uno de los más eficientes solubilizadores de proteínas. La solubilización de proteínas con 1% SDS (hirviendo) es un método recomendado, pero conlleva un grave problema. Al ser un detergente iónico, éste proporciona carga a las proteínas con lo que modifica el punto isoeléctrico de las mismas. Para evitar esto basta con diluir el SDS por debajo de una concentración crítica (0.2%) con otros detergentes no-iónicos [37]. Los detergentes no-iónicos más populares son el NP-40, Tritón X-100 y el dodecil maltósido. Los dos primeros no son demasiado buenos solubilizando proteínas de membrana. Para la solubilización de proteínas de membrana, detergentes zwitteriónicos como el CHAPS y las sulfobetainas (SB 3-10, ASB-14) son mucho más efectivos [38]. De todas formas, se ha observado que en la solubilización de proteínas de membrana, no sólo es importante la naturaleza de la proteína, sino también la presencia y naturaleza de otros componentes, en particular de los lípidos que rodean a la proteína [39, 40]. A pesar de los avances que se llevan a cabo en la solubilización de proteínas integrales de membrana, la mayoría no pueden ser solubilizadas con un solo detergente no-iónico o zwitteriónico y requieren la utilización de procedimientos específicos para membrana.

Agentes reductores:

La reducción y prevención de la re-oxidación de los puentes disulfuro es un paso crítico en la preparación de la muestra. Los agentes reductores son imprescindibles para romper los enlaces disulfuro tanto intra- como intermoleculares y conseguir una completa desnaturalización de las proteínas. Los agentes más comúnmente utilizados son el ditiotreitól (DTT) o el ditioeritritol (DTE), que son aplicados en exceso a concentraciones de hasta 100mM. Desafortunadamente, estos reactivos son ácidos débiles con valores de pK de 8.5 y 9, lo que significa que a pH básicos estarán ionizados, y por lo tanto migrarán hacia el ánodo durante el isoelectroenfoque. Estos agentes reductores, además, no son los más eficientes a la hora de reducir proteínas con un elevado contenido en cisteínas, como las queratinas de la lana.

Herbert *et al.* propusieron el uso de tributilfosfina (TBP) como una alternativa al DTT [41]. El TBP es utilizado a concentraciones muy bajas (2mM), dada su reacción estequiométrica, pero este agente tiene desventajas como son su baja solubilidad en agua, su corta vida media, además de ser volátil, tóxico y tener un olor muy desagradable e irritante. Como alternativa se puede usar el TCEP (tris (2-carboxietil) fosfina. La elección del agente reductor no deja de ser dependiente de la muestra.

Durante el proceso de isoelectroenfoque, a puntos isoeléctricos superiores a 7, ocurre la oxidación inespecífica de los grupos tioles de las proteínas. Como resultado, se obtiene un patrón específico en el que se observan rayas horizontales o spots extras. Para evitar esta oxidación, GE Healthcare comercializa un producto llamado DeStreak Reagent. Este reactivo transforma los grupos tioles en disulfuros estables. De esta manera no solo evitamos el mal isoelectroenfoque en pI superiores a 7, sino que también se simplifica la imagen del proteoma ya que se reduce el número de spots causados por la oxidación de las proteínas. En este trabajo, se ha utilizado el DeStreak Reagent en la rehidratación de las tiras de isoelectroenfoque, mientras que en la muestra se ha utilizado 10mM de DTT como agente reductor, siguiendo las instrucciones del producto DeStreak Reagent.

Las modificaciones en las proteínas deben minimizarse ya que como resultado se obtendrán puntos artefactuales. En particular, hay que inactivar toda proteasa que pueda haber en la muestra para evitar digestiones parciales de las proteínas. Además, se debe evitar el calentamiento, por encima de 30°C, de la muestra que contenga urea, ya que la urea se degrada a cianato amónico; compuesto que carbamila aminoácidos que contengan aminas primarias, generando un cambio en su carga y por lo tanto modificando el punto isoeléctrico [36](Figura I.5).

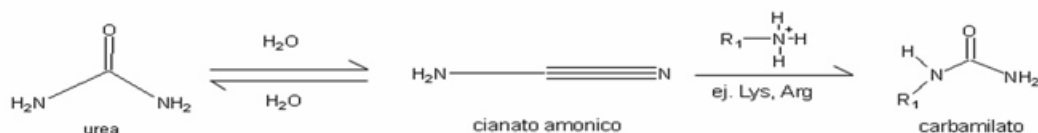


Fig.I.5. Reacción de carbamitación de las aminas primarias de los aminoácidos

I.C.1.2. Primera dimensión: isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque es un método electroforético que separa las proteínas según su punto isoelectrónico (pI). Las proteínas son moléculas anfotéricas; llevan carga positiva, negativa o carga neta cero dependiendo del pH del medio en que se encuentran. La carga neta de una proteína es la suma de todas las cargas negativas y positivas de las cadenas laterales de los aminoácidos que la componen así como los extremos amino y carboxilo terminales. El punto isoelectrónico es aquel pH en el cual una proteína tiene carga neta cero [42]. Las proteínas están cargadas positivamente cuando se encuentran en un medio con un valor de pH inferior a su pI y negativamente en valores de pH superiores a su pI, tal y como se muestra en la figura I.6

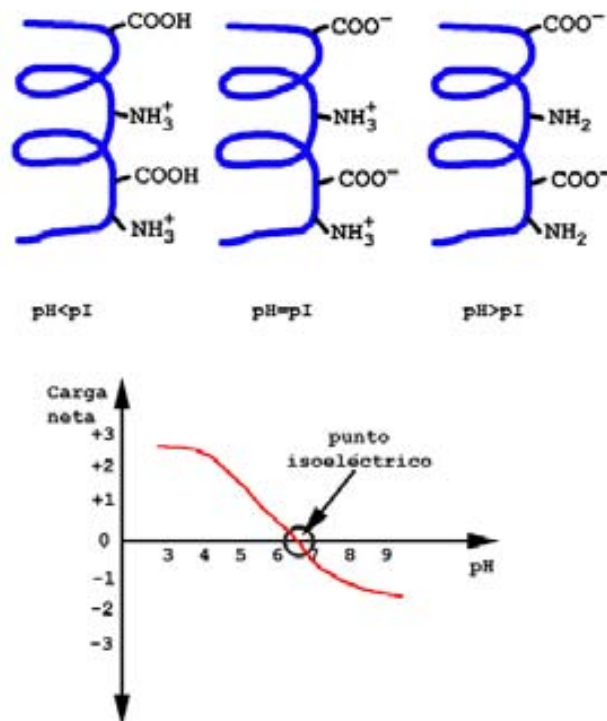


Fig.I.6. Gráfico de la carga neta de una proteína y el pH del medio. El punto de intersección de la curva en el eje de las X representa el pI de la proteína.

La presencia de un gradiente de pH es crítica en la técnica del isoelectroenfoque. En un gradiente de pH, bajo la influencia de un campo eléctrico, una proteína migrará hasta la posición del gradiente donde su carga neta es cero. Una proteína con carga neta positiva migrará hacia el cátodo, volviéndose cada vez menos cargada positivamente a medida que se mueve a través del gradiente de pH hasta que alcanza su punto isoelectrónico. Si una proteína

migra más allá de su punto isoeléctrico, inmediatamente gana carga y migra otra vez hacia su punto isoeléctrico. Este es el efecto “enfoque” de la técnica de isoelectroenfoque, el cual concentra proteínas en su punto isoeléctrico y permite la separación de proteínas aunque la diferencia de sus cargas sea muy pequeña.

Cuando las proteínas han alcanzado su posición final en el gradiente de pH, hay un movimiento iónico muy pequeño en el sistema, generando una corriente eléctrica muy baja (típicamente por debajo de $1\mu\text{A}$). El isoelectroenfoque de una muestra determinada es generalmente conseguido por un número de voltios-hora constante, siendo voltios-hora la integral de los voltios aplicados a lo largo del tiempo. El isoelectroenfoque llevado a cabo bajo condiciones desnaturalizantes, proporciona una mayor resolución y unos resultados más claros. Así es muy importante llevar a cabo una buena preparación de la muestra.

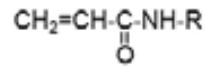
El método original para la primera dimensión (isoelectroenfoque) [33] dependía de un gradiente de pH generado por anfolitos en una pequeña tira de acrilamida. Los anfolitos son moléculas pequeñas, solubles y anfotéricas con una elevada capacidad de tamponar cerca de su punto isoeléctrico. Cuando se aplica un voltaje a través de una mezcla de anfolitos, los anfolitos con mayor pI (por tanto los más negativamente cargados) migran hacia el ánodo y los anfolitos con pI más bajos (por tanto los más positivamente cargados) migran hacia el cátodo. El resto de anfolitos se alinean entre los extremos de acuerdo con su pI , y tamponan sus alrededores de acuerdo con su pH. El resultado es un gradiente continuo de pH.

A pesar de que este método básico ha sido utilizado en cientos de estudios de electroforesis bidimensional, éste tiene ciertas limitaciones:

- 1- Los anfolitos son mezclas de polímeros que no están bien caracterizados y que varían mucho entre lote y lote. Esta variabilidad reduce la reproducibilidad de la separación llevada a cabo en la primera dimensión.
- 2- Los gradientes de pH generados por anfolitos son inestables y tienden a migrar lentamente hacia el cátodo a lo largo del tiempo.
- 3- Las tiras de acrilamida utilizadas en estos casos tienen una resistencia mecánica muy pequeña, lo que hace difícil su manejo.

Como resultado de estas limitaciones y problemas que conlleva el uso de anfolitos, Görg *et al.* desarrollaron los gradientes inmovilizados de pH (IPGs) [43]. Un IPG se forma por la

incorporación covalente de grupos tamponadores ácidos y básicos en la matriz de poliacrilamida mientras éste se prepara. Estos grupos tamponadores son un conjunto de moléculas bien caracterizadas cuya estructura general es:



donde R es un grupo tamponador ácido o básico.

Los gradientes de pH inmovilizados se forman utilizando dos disoluciones, una es una mezcla relativamente ácida de tampones acrilamida y la otra una mezcla relativamente básica. La concentración de varios tampones en las dos disoluciones define el rango de pH de la tira de isoelectroenfoque. Ambas disoluciones contienen monómeros de acrilamida y catalizadores para la polimerización. Durante la polimerización, la porción de acrilamida que contiene los tampones generadores del gradiente de pH co-polimerizan con acrilamida y bisacrilamida para formar un gel de poliacrilamida tal y como se muestra en la figura I.7.

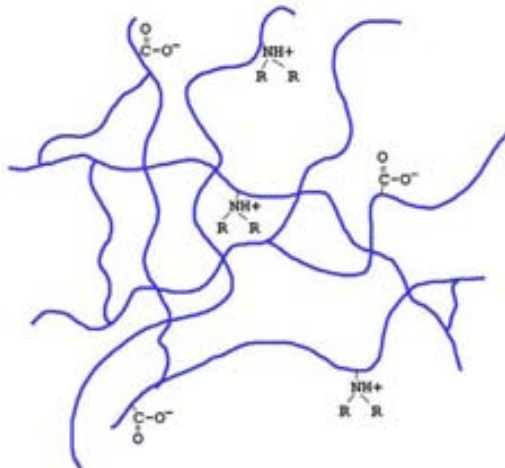


Fig. I.7. Matriz de un gel con IPGs, mostrando los grupos tamponadores.

Para facilitar el manejo, estos geles son polimerizados encima de un soporte plástico de manera que los hace más resistentes.

Una vez polimerizado, el gel es lavado para eliminar los catalizadores y monómeros no polimerizados, que podrían modificar las proteínas y podrían interferir en la separación.

I.C.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La definición de un espectrómetro de masas puede parecer simple: es un instrumento que ioniza una muestra y mide la relación masa/carga de los iones resultantes. La versatilidad de esta función ha permitido que llegue a ser una herramienta vital en un amplio rango de disciplinas, incluida la investigación biológica. La versatilidad aparece como consecuencia de la capacidad de esta metodología de obtener información cualitativa y cuantitativa de muestras tanto inorgánicas como orgánicas; las muestras pueden ser analizadas tanto en forma de gas, líquido o sólido, y las masas que pueden analizarse van de unos pocos átomos (algunos Da) hasta proteínas (sobre 300 KDa).

I.C.2.1. Breve introducción histórica

J.J. Thompson construyó el primer espectrómetro de masas en 1912 [44]. Los primeros aparatos fueron utilizados por los físicos para estudiar el peso atómico de los elementos y la abundancia relativa natural de los isótopos elementales. A pesar de que estos primeros aparatos no eran capaces de analizar biomoléculas, no se tardó demasiado en utilizar isótopos pesados como marcadores en sistemas biológicos. Desarrollos en el rango de masas analizable y en el tipo de muestras que podían ser vaporizadas, hicieron posible el estudio de componentes orgánicos en 1956 [45]. En 1966 se utilizó por primera vez para secuenciar péptidos y oligonucleótidos [46].

La ionización de moléculas más grandes, como proteínas, no fue posible hasta el 1981, cuando la ionización por FAB (Fast Atom Bombardment) y MALDI (matriz-assisted laser desorption ionization) fueron introducidas [47, 48]. El análisis de masa por TOF (Time Of Flight) fue desarrollado y comercializado en 1958, pero la pobre resolución en determinar la masa fue un verdadero problema hasta que se realizaron mejoras a principios de los 70.

La capacidad de ionizar moléculas de mayor envergadura fue mejorada con la incorporación de la ionización por electrospray (ESI) por Fenn *et al.* en 1988 [49]. La fuente de ionización por electrospray fue fácilmente conectada a una cromatografía líquida (LC), cosa que permitió el análisis de mezclas complejas.

Una técnica de ionización para moléculas biológicas que podía ser utilizada con el análisis por TOF, fue introducida en 1991. Esta fuente de iones, matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) fue el resultado del trabajo en Alemania de Hillenkamp y Karas [50], y en Japón de

Tanaka *et al.* [51]. Como el ESI, el MALDI era capaz de ionizar y vaporizar grandes moléculas como las proteínas. La estructura de proteínas fue por primera vez estudiada por espectrometría de masas en 1990 [52, 53] y la técnica de PMF (Peptide Mass Fingerprinting), que permite identificar proteínas vía espectrometría de masas, fue desarrollada en 1993 [54]. Poco después se desarrolló el software que permitía identificar proteínas buscando en bases de datos on-line. El ICAT (Isotope-Coded Affinity Tags), desarrollado en 1999, permite la cuantificación de proteínas individuales en mezclas complejas [55]. Esta misma tecnología permite la comparación simultánea de niveles de expresión de todas las proteínas en células cultivadas en distintas condiciones.

La aplicación de la espectrometría de masas a la biología empezó en la década de 1940, cuando se utilizaron isótopos pesados estables para estudiar la producción de CO₂ en animales. Desde entonces, los avances en la tecnología han incrementado el rango de muestras que pueden ser ionizadas así como el rango de masas que pueden ser analizadas. Las aplicaciones biológicas de la espectrometría de masas son diversas, desde la detección de desordenes metabólicos en neonatos, comparación de los niveles de expresión de una proteína entre células cultivadas en distintas condiciones, determinación de la biodisponibilidad de minerales en la comida y el estudio de la metabolización de los medicamentos *in vivo* [56]. Un ejemplo de la creciente importancia de la espectrometría de masas es el aumento de número de entradas en PubMed (un archivo de citas de revistas de las ciencias de la vida). Una búsqueda reciente en el PubMed para la frase “mass spectrometry” encontró 180100 citas, mientras en el 2002 solo era de 6500 citas. La importancia de la espectrometría de masas se hizo evidente en el 2002 al conceder el premio Nobel en química a John Fenn y Koichi Tanaka “por su desarrollo de métodos suaves de ionización para el análisis de macromoléculas biológicas por espectrometría de masas”.

I.C.2.2. Instrumentación

A grandes rasgos, todos los espectrómetros de masas tienen tres componentes: una fuente de ionización, un analizador de masa y un sistema de colecta/detección de los iones. El aparato debe estar conectado a una computadora para procesar y grabar los datos, y debe tener una bomba de vacío para controlar la presión dentro del espectrómetro de masas (figura I.8).

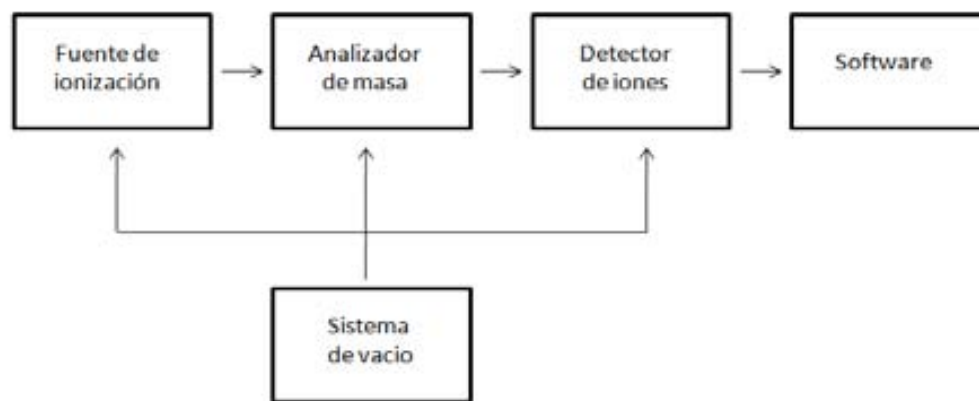


Fig. 1.8. Esquema de los componentes básicos de un espectrómetro de masas.

I.C.2.3. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight (MALDI-TOF)

Para la realización de parte de este trabajo se utilizó un MALDI-TOF. Una propiedad compartida por prácticamente todos los componentes internos es la presión. En este espectrómetro, la presión está muy por debajo de la atmosférica ($10e-6$ a $10e-8$ torr). Esta baja presión es necesaria para limitar al máximo las colisiones con átomos presentes en el aire, que alterarían el camino a recorrer por los iones y además producirían fragmentos del ión parental generando productos no deseados o la pérdida de la carga.

Para analizar una muestra o analito en el espectrómetro de masas MALDI-TOF, la muestra se co-cristaliza con una matriz orgánica como el ácido sinapínico o el ácido α -ciano-4-hidroxicinamínico. La co-cristalización se consigue mezclando la muestra con la matriz; depositando dicha mezcla en una placa de metal y dejándola secar. Los cristales resultantes son irradiados con pulsos de rayos láser de una longitud de onda en la cual la matriz tiene máxima absorción. Este proceso produce la desorción de la mezcla y fotoactiva la matriz. La matriz excitada ioniza el analito vía transferencia de protón. El resultado de todo este proceso genera iones del analito en fase gaseosa, teniendo la mayoría de los iones una sola carga positiva.

Una vez la muestra ha sido ionizada, un haz de iones es enfocado y dirigido hacia el analizador de masa, que separa los iones por su relación m/z . Las medidas de m/z en un analizador del tipo TOF están basadas en la ecuación:

$$KE = 0.5mv^2$$

Donde KE es la energía cinética del ión, m es la masa del ión y v es la velocidad del ión. Los iones son inicialmente acelerados mediante un campo eléctrico con un potencial V , el cual resulta en una energía cinética final de zV , donde z es la carga del ión. Los iones entran en el tubo de vuelo de longitud L , en el final del cual hay un detector de iones. Debido a que el tubo de vuelo carece de cualquier tipo de campo magnético o eléctrico, toda la energía cinética (KE) de los iones es resultado de su aceleración inicial, así, a partir de la ecuación anterior se deriva que:

$$zV = 0.5mv^2 \quad m/z = (2Vt^2)/L^2$$

Donde t es el tiempo que tarda el ión en llegar al detector de iones. Ya que V y L son conocidos, la relación m/z de un ión, puede ser determinada por la cantidad de tiempo que transcurre entre los pulsos de láser hasta que el ión llega al detector de iones. Por este motivo, las moléculas de mayor tamaño tienen un tiempo superior de llegada al detector en comparación con las de menor tamaño.

I.C.2.4. Ionización mediante electrospray

La ionización mediante electrospray es una técnica comúnmente utilizada en espectrometría de masas para producir iones. Es especialmente útil produciendo iones de macromoléculas ya que evita la fragmentación de éstas cuando son ionizadas. El desarrollo de la ionización mediante electrospray fue reconocido al otorgar, el año 2002, el premio Nobel de Química a John Bennett Fenn y Koichi Tanaka, desarrolladores de esta técnica de ionización. El mecanismo de ionización se basa en que el líquido que contiene el analito(s) de interés es dispersado por electrospray en un fino aerosol. Debido a que la formación de iones implica la evaporación extensiva de solventes; los solventes típicos para la ionización contienen agua y solventes orgánicos volátiles (por ejemplo: metanol o acetonitrilo). Para disminuir el tamaño inicial de las gotas que se forman en el spray es común la adición de componentes que aumentan la conductividad (por ejemplo: ácido acético). Los sistemas de electrospray que requieren de grandes flujos de muestra se suelen beneficiar de un sistema de nebulización adicional debido a la incorporación de un gas inerte como el nitrógeno en el proceso de formación de los iones. Una vez generado el spray la muestra es conducida hacia el primer paso de vacío del espectrómetro de masas mediante un capilar, el cual puede ser calentado para ayudar a la evaporación de los solventes de las gotas cargadas del spray. El solvente de las gotas cargadas se va evaporando hasta que estas alcanzan el límite de Rayleigh. En este punto

las gotas se deforman y emiten haces de muestra cargada en fase gas en un proceso que se conoce como fisión de Coulomb. Durante la fisión las gotas pierden un pequeño porcentaje de su masa (1-2.3%) así como parte de su carga (10-18%) [57, 58].

Existen principalmente dos teorías que explican esta producción final de iones en fase gas:

1- El modelo de evaporación de iones (IEM) sugiere que las gotas, al alcanzar un cierto radio, tiene un tensión superficial suficientemente grande para asistir la desorción de iones solvatados [59].

2- El modelo del residuo cargado (CRM) sugiere que las gotas del electrospray sufren ciclos de evaporación y fisión que eventualmente generan pequeñas gotas que contienen en promedio un único ion del analito. Los iones en fase gas se generarían al evaporarse el solvente restante de estas pequeñas gotas dejando al analito con las cargas que la gota llevaba [60].

Aunque no hay pruebas científicas directas, existen evidencias indirectas que sugieren que los iones son liberados a la fase gas mediante el modelo de evaporación de iones.

Los iones observados en el espectrómetro de masas pueden ser iones generados debido a la adición de un protón $[M+H]^+$ u otro catión como el sodio $[M+Na]^+$, o bien la pérdida de un protón $[M-H]^-$. También es frecuente observar iones con múltiples cargas $[M+nH]^{n+}$. Para grandes macromoléculas, también pueden existir muchos estados de ionización, resultando en la obtención de un espectro característico en forma de campana. Todos estos iones son siempre especies con un número par de electrones, ya que a diferencia de otras fuentes de ionización el electrospray ni añade ni elimina electrones.

Los electrosprays que operan a flujos bajos generan gotas iniciales mucho menores en tamaño, lo que mejora la eficiencia durante el proceso de ionización. En 1994, dos grupos de investigación acuñaron el nombre de micro-electrospray (microspray) para electrosprays que trabajan a flujos muy bajos. Emmet y Capriolli demostraron la mejora en el funcionamiento de los análisis mediante la combinación de la cromatografía HPLC y la espectrometría de masas cuando el electrospray funciona a flujos de 300-800 nl/min [61]. Wilm y Mann demostraron que un flujo capilar de 25 nl/min podía sustentar un electrospray [62]. Este último método fue bautizado como nano-electrospray.

Uno de los avances más significativos y más útiles en la proteómica fue el descrito por Shevchenko, A. *et al.* [63]. En este artículo se describe una nueva metodología conocida como GeLCMS, en la que las proteínas de una muestra compleja, como por ejemplo un proteoma completo, son separadas mediante electroforesis SDS-PAGE monodimensional. El carril en el

que la muestra ha sido separada es cortado en bandas iguales y cada una es digerida individualmente mediante tripsina. Cada una de las digestiones tríplicas es posteriormente separada en un nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masas electrospray. De esta manera se identifican las proteínas de la muestra a partir de la secuenciación de los péptidos generados en la digestión.

I.D. PROTEÓMICA DE MEMBRANA

Gracias a la aplicación de la tecnología de los geles bidimensionales se ha avanzado mucho en el conocimiento de los proteomas de diferentes especies. Debido a las limitaciones intrínsecas de dicha técnica las proteínas de membrana han quedado en menor representación en las bases de datos. La baja representación de las proteínas de membrana en los geles bidimensionales puede ser debida a tres factores:

- Son proteínas con un bajo número de copias, generalmente.
- Las proteínas de membrana no solubilizan bien en el medio acuoso utilizado en el isoelectroenfoque, debido a que estas proteínas son solubles en la membrana lipídica, ambiente muy hidrofóbico.
- Un tanto por ciento elevado de estas proteínas precipita cuando alcanzan su punto isoeléctrico (1ª dimensión en los geles bidimensionales), produciendo la precipitación de proteínas solubles en la misma región de pI, lo que es conocido como interferencia cross-protein en 2D.

Debido a la elevada hidrofobicidad de las proteínas de membrana, se necesitan unos requerimientos especiales para poder llevar a cabo una correcta separación de dichas proteínas en los geles 2DE:

- Las proteínas deben ser extraídas de su ambiente lipídico.
- Las proteínas deben ser extraídas en forma soluble.
- El estado soluble de las proteínas debe mantenerse durante la separación electroforética, especialmente en la 1ª D del IEF.

El primer paso en la solubilización de las proteínas de membrana es la extracción de dichas proteínas de su ambiente lipídico. Para lograr la extracción de las proteínas de membrana es necesario el uso de detergentes en disoluciones acuosas. Los detergentes son buenos extrayendo las proteínas de las membranas biológicas ya que emulan, en parte, la estructura de los lípidos que las rodean. Las proteínas de membrana tienen regiones muy hidrofóbicas, las cuales se encuentran en contacto directo con los lípidos de la membrana. Para mantener estas proteínas solubles, es necesaria la unión a detergentes una vez que se les ha retirado los

lípidos. De esta manera se consigue la purificación de las proteínas de membrana manteniéndolas en unas condiciones similares a su estado nativo en la membrana [64]. Estas purificaciones suelen ser tediosas [65] ya que las proteínas son extraídas de su ambiente nativo en la membrana a una disolución detergente que sólo imita en parte las propiedades físicas y químicas de la membrana lipídica.

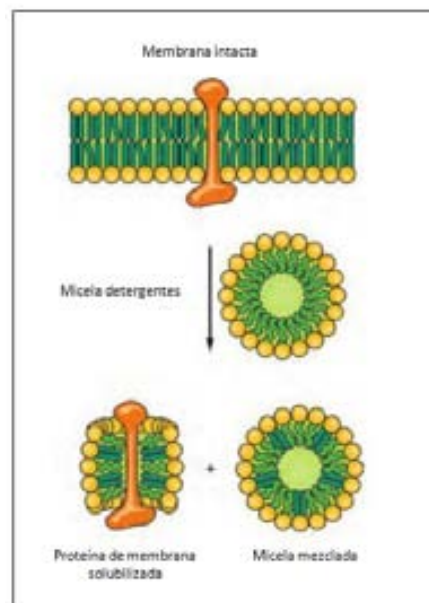


Fig.1.9. Esquema de la solubilización de las proteínas con detergentes (www.cienciastella.com).

Publicaciones recientes [66-69] se han encaminado a la búsqueda de nuevas tecnologías que posibiliten la correcta separación de las proteínas de membrana sin los inconvenientes de los geles 2DE. Un trabajo reciente desarrolló una doble electroforesis SDS-PAGE (dSDS-PAGE), en la que se realiza una primera dimensión con 6M de urea. Posteriormente se escinde el carril donde se ha separado la muestra y se acopla a un segundo SDS-PAGE libre de urea colocando el carril en la parte superior del gel (de la misma forma que se coloca la tira de isoelectroenfoque en los geles 2DE) [66]. Gracias a la combinación de estas dos electroforesis, se separan las proteínas obteniendo una diagonal de spots. La problemática de esta técnica reside en que presenta una resolución mucho menor a la que se obtiene mediante geles 2DE.

Otra técnica electroforética idónea para la separación de proteínas es la combinación de la electroforesis azul nativa con la electroforesis de tricina. En este caso, se obtiene en la primera electroforesis (electroforesis azul nativa) una separación de los complejos de proteínas presentes en la membrana y gracias a la segunda (electroforesis desnaturante de tricina o

SDS-PAGE convencional) se separan las diferentes subunidades de cada complejo por masa molecular [70].

I.D.1. MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA

I.D.1.1. Fraccionamiento de proteínas hidrofóbicas por separación de fases

A la hora de realizar algún tipo de experimento con proteínas hidrofóbicas es conveniente llevar a cabo algún tipo de enriquecimiento de dichas proteínas en la muestra dado a que se encuentran en baja representación. Estas proteínas pueden ser enriquecidas por diversos métodos bioquímicos, de los cuales el más comúnmente utilizado es el fraccionamiento con detergentes [40]. Utilizando este protocolo las proteínas de membrana se separan preferentemente en la fase rica en detergente en un sistema de dos fases [71], mientras que las hidrofílicas quedan en la fase acuosa.

La separación de fases es un método simple, eficiente y barato para purificar y concentrar las proteínas de membrana solubles en detergente. Además de estos beneficios, la separación de fases es fácilmente escalable a grandes volúmenes y es compatible con muchos métodos cromatográficos [72].

Los detergentes son moléculas anfipáticas que constan de una cabeza polar/cargada y de una cadena hidrocarbonada/hidrofóbica. A bajas concentraciones, estas moléculas son solubles en agua como monómeros. Cuando se aumenta la concentración de detergente por encima de la concentración micelar crítica (CMC), las moléculas de detergente forman agregados llamados micelas. Otra característica de los detergentes es el punto de transición. El punto de transición es el punto a partir del cual se produce una microscópica separación del detergente/disolución acuosa, debido a una asociación secundaria de las micelas formando estructuras más grandes. Este punto se puede alcanzar aumentando la concentración de detergente, la temperatura o la concentración de sales. La forma más utilizada y sencilla es aumentando la temperatura por encima de la temperatura de transición característica de cada detergente. A temperaturas inferiores a esta temperatura, el detergente se encuentra disuelto homogéneamente en la disolución. Por el contrario, por encima de la temperatura de transición, el detergente adopta una apariencia turbia produciéndose la separación de fases en fase rica en detergente y una fase acuosa [73].

Los detergentes se clasifican según su estructura, de esta manera se pueden encontrar detergentes de cuatro tipos:

1. Detergentes iónicos: constan de una cabeza polar con carga neta, por lo que pueden ser catiónicos o aniónicos. Además, también contienen una cadena hidrocarbonada hidrofóbica o cadena esteroidal. La CMC en estos detergentes es determinada por el efecto combinado de fuerzas repulsivas de la cabeza polar y las interacciones hidrofóbicas de las colas. Estos detergentes son extremadamente efectivos en la solubilización de proteínas de membrana pero casi siempre provocan la desnaturalización de las mismas. Un detergente iónico muy utilizado es el SDS (dodecilsulfato sódico), el cual presenta una gran capacidad solubilizadora aportando a la proteína cargas positivas.
2. Sales de ácido biliar: son detergentes iónicos que se diferencian de estos en que su cadena esteroidal es rígida. Como resultado, estos detergentes tienen una cara polar y otra apolar, en vez de una cabeza polar bien definida. Por este motivo, no forman micelas esféricas sino con forma "arriñonada". Son considerados detergentes suaves. Un ejemplo de sales de ácido biliar es el ácido glicocólico.
3. Detergentes no iónicos: constan de una cabeza hidrofílica no cargada y son detergentes considerados suaves. Estos detergentes rompen interacciones lípido-lípido y lípido-proteína preferiblemente antes que uniones proteína-proteína. Por este motivo, permiten solubilizar proteínas de membrana sin afectar a su estructura, por lo que mantienen su funcionalidad. Un ejemplo de este tipo de detergentes son los de la serie Tritón.
4. Detergentes zwitteriónicos: combinan las propiedades de los detergentes iónicos y no iónicos. Estos compuestos químicos son eléctricamente neutros pero tienen cargas formales positivas y negativas sobre diferentes átomos. Los detergentes zwitteriones son especies polares y usualmente presentan una elevada solubilidad en agua y bastante baja en muchos disolventes orgánicos de carácter apolar. Los detergentes zwitteriónicos son comúnmente utilizados en la preparación de la muestra en los geles bidimensionales. Algunos ejemplos de estos detergentes son CHAPS, SB3-10 y ASB14.

En la figura I.9 se simplifican los diagramas de fase de dos tipos de detergentes en disolución acuosa. Todos los detergentes, sin excepción, son monoméricos a bajas concentraciones. La línea que separa la disolución detergente monomérico de la micelar es la CMC, la cual puede

variar según la temperatura. La diferencia entre los dos ejemplos de detergentes que se muestran en la figura I.10 reside en la disposición de la fase micelar en el diagrama.

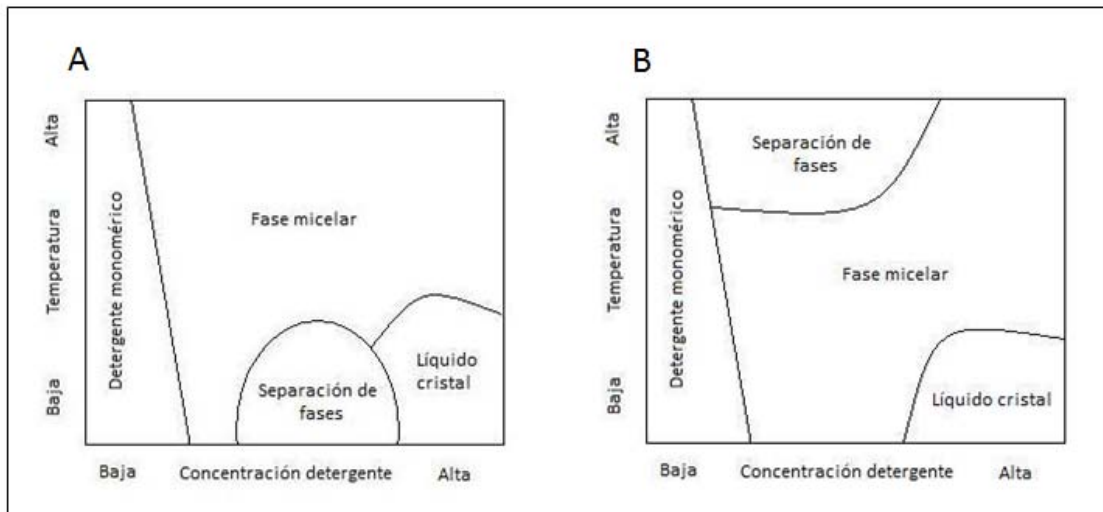


Figura I.10. Diagrama de fases dos tipos de detergentes: **A:** Detergente zwitteriónico. **B:** Detergente no-iónico.

El diagrama A corresponde al diagrama de un detergente de tipo zwitteriónico. En este tipo de detergentes se alcanza el punto de transición disminuyendo la temperatura de la disolución micelar a una concentración media. Este tipo de detergentes no son idóneos para llevar a cabo la separación de fases ya que al aumentar la concentración de detergente para alcanzar la separación de fases, se corre el riesgo de alcanzar la fase cristalina líquida en la que el detergente queda completamente ordenado y pierde la estructura micelar.

El diagrama B, por el contrario, corresponde al diagrama del comportamiento de un detergente no iónico como los de la serie Tritón. En estos detergentes el punto de transición se alcanza aumentando la temperatura de la disolución micelar a una concentración media, esto hace que este tipo de detergentes sean los idóneos para fraccionar proteínas de membrana, ya que la fase líquido cristal solo se conseguiría disminuyendo la temperatura por debajo de la temperatura de fase micelar. La serie Tritón son un conjunto de detergentes que nos permiten este tipo de separaciones, pero cada tipo de detergente presenta una temperatura de transición diferente. El detergente no iónico idóneo para este tipo de separaciones es el TX-114 debido a que su temperatura de transición es de 20°C, temperatura fácil de conseguir en condiciones experimentales. Después de la separación de fases, las

proteínas hidrofílicas se encuentran mayoritariamente en la fase acuosa y las proteínas de membrana con una naturaleza anfipática son secuestradas en la fase rica en detergente.

Las proteínas de membrana se caracterizan por presentar uno o varios dominios hidrofóbicos que interactúan directamente con el núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica. Durante la solubilización de dichas proteínas, los detergentes no iónicos reemplazan las moléculas de lípido en contacto con el dominio hidrofóbico de las proteínas integrales de membrana, lo que provoca la formación de una micela mixta detergente-proteína. El problema de estos fraccionamientos es que no son separadas únicamente las proteínas de membrana, sino que también son arrastradas a la fase detergente proteínas unidas a ellas y proteínas que aún y no estar en la membrana, presentan una naturaleza hidrofóbica. Este caso podría ser el de proteínas pertenecientes a grandes complejos que se encuentran localizadas en el interior de dicho complejo.

I.D.1.2. Marcaje selectivo de las regiones expuestas en la membrana plasmática

En 1997 Unlü *et al.* desarrollaron la técnica de 2D-DIGE (Difference Gel Electrophoresis) [74]. Esta técnica permite la comparación en un mismo gel bidimensional de dos muestras independientes y un estándar interno que es una mezcla al 50% de las dos muestra a comparar. Combinando las propiedades de la fluorescencia, la variedad de muestras y el análisis de imágenes, el sistema DIGE es un sistema integrado que ofrece beneficios significativos en relación con el 2DE clásico.

La tecnología DIGE está basada en las propiedades específicas de los fluoróforos CyDye. Los fluoróforos contienen un grupo NHS éster reactivo que genera una unión covalente con el grupo ϵ -amino de los residuos lisina de la proteína vía unión amida (figura I.11). El fluoróforo está diseñado de tal manera que al unirse a la proteína no altera el pI de esta pero aumenta su masa molecular en 450Da. Esta propiedad no afecta al patrón visible en la segunda dimensión (SDS-PAGE).

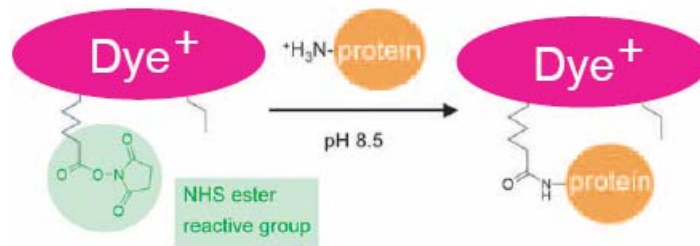


Fig.I.11. Esquema de la unión del fluoróforo a la proteína (DIGE manual, GE, Healthcare).

La ratio utilizada de fluoróforo-proteína asegura que los CyDye se unen aproximadamente al 1-2% de los residuos de lisina, por lo que cada proteína solo tiene unido un fluoróforo siendo suficiente para ser visualizado. Por este motivo, este tipo de marcaje se conoce como “minimal labeling” debido a que sólo una pequeña proporción del total de la muestra está marcada. Esto nos permite una posterior tinción con otros compuestos que también reaccionan con las lisinas.

Gracias a la existencia de diferentes fluoróforos, se puede realizar el marcaje de diferentes muestras y separarlas en un mismo gel 2DE. De esta manera, al separar las muestras en el mismo gel, se puede corroborar que las diferencias observadas entre ambas muestras no se deben a diferencias en la movilidad electroforética ya que han sido separadas bajo las mismas condiciones en el mismo gel. La técnica del DIGE además presenta una gran ventaja. Se puede incorporar una tercera muestra (combinación al 50% de las dos muestras a comparar) la cual es marcada con un tercer fluoróforo (CyDye 2). De esta manera, se puede obtener en el mismo gel, la comparativa de dos muestras (CyDye 3 y 5) y un estándar interno (CyDye 2).

Una vez realizados los dos pasos electroforéticos, los geles deben ser escaneados mediante un escáner de fluorescencia. Cada fluoróforo debe ser escaneado con un filtro determinado, ya que cada fluoróforo al ser excitado emite a una longitud de onda diferente. Al combinar las imágenes obtenidas en el escáner, se obtiene una imagen superpuesta con el resultado de ambas muestras.

I.D.2. INMUNOPROTEÓMICA

La inmunoproteómica es un campo dentro de la proteómica cuya finalidad es identificar las proteínas inmunoreactivas de una bacteria o agente patógeno, que generan una respuesta inmune en el huésped. Estas proteínas inmunoreactivas son posibles biomarcadores de patogenicidad.

La identificación de nuevos biomarcadores se ha desarrollado notablemente en los últimos años, pudiéndose clasificar en tres generaciones:

- Biomarcadores de primera generación: el uso de métodos bioquímicos o inmunológicos relativamente sencillos, de bajo rendimiento y a pequeña escala. Ejemplos de estos métodos serían electroforesis (agarosa o acrilamida) o ELISA.
- Biomarcadores de segunda generación: se emplean tecnologías, o incluso nanotecnologías, de alto rendimiento y a gran escala (donde el objeto de estudio se aborda de un modo global) como son la biología molecular, la genómica y la transcriptómica. Un ejemplo de técnicas de segunda generación en la identificación de nuevos biomarcadores son los microarrays de DNA.
- Biomarcadores de tercera generación: se aborda el estudio de los biomarcadores desde técnicas proteómicas. Entre estas metodologías, la inmunoproteómica clásica o el análisis del proteoma serológico (SERPA) constituye una herramienta global eficaz, para el descubrimiento de biomarcadores en pacientes. En este trabajo se ha aplicado la estrategia SERPA (basada en electroforesis bidimensional seguida de western-blotting y espectrometría de masas) para examinar y comparar los perfiles séricos frente al proteoma total de *Mycoplasma genitalium*. Gracias a esta técnica se puede identificar un número relativamente alto de biomarcadores candidatos para predecir diagnóstico precoz, pronóstico, respuesta a tratamientos antibacterianos y/o seguimiento clínico, así como dianas terapéuticas para el diseño de futuras inmunoterapias o vacunas para estas infecciones crónicas. Aunque estos hallazgos inmunoproteómicos sean alentadores, éstos se deben validar analítica y clínicamente sobre plataformas clínicas adecuadas en futuros estudios antes de su puesta en la práctica en el laboratorio de diagnóstico clínico.

Los avances en estas tecnologías "ómicas" abren hoy en día un amplio abanico de posibilidades y expectativas prometedoras, para identificar biomarcadores. A su vez, están proporcionando indirectamente una oportunidad excepcional para mejorar nuestro entendimiento sobre el comportamiento de los sistemas biológicos [75].

Esta técnica aplicada en *Mycoplasma genitalium* puede ser muy útil y ofrecer muchísima información dado que esta bacteria es un patógeno. Dado que la patogénesis y la primera línea de contacto con la célula huésped se produce en primer lugar a través de las proteínas expuestas en la membrana es de alto interés conocer aquellas proteínas que están expuestas en la superficie del patógeno, pero no sólo interesa conocer dichas proteínas, sino identificar cuáles de estas proteínas son las que generan una respuesta en el sistema inmune del huésped. Estas proteínas tienen un valiosísimo interés dado que son las únicas proteínas de la bacteria reconocidas por la célula huésped.

A día de hoy, aún no hay consenso en el mundo de la Micoplasmaología en cuanto a la naturaleza de esta bacteria, pero parece ser que la tendencia es a definir a este microorganismo como componente de la flora bacteriana humana [4]. Aún y ser tan ubicuo parece ser que estos microorganismo en algunos casos generan infecciones crónicas, las cuales pueden ser causadas por periodos de inmunodepresión [76]. Si se establecieran las proteínas causantes de la patogenicidad, sería posible el diseño de fármacos para tratar estas infecciones y poder acabar con la cronicidad que provocan en el huésped, a la vez que también se podrían abrir vías para el desarrollo de vacunas.

I.E. PROTEÓMICA EN *Mycoplasma genitalium*

Los micoplasmas son buenos modelos celulares para realizar estudios proteómicos debido a la relativa baja complejidad de sus proteomas. El primer proteoma de un micoplasma analizado, utilizando la combinación de electroforesis bidimensional y espectrometría de masas, fue el de *Mycoplasma genitalium* en el año 2000 [77]. El proteoma de dicho mollicute fue analizado en fase exponencial y en fase estacionaria en el gradiente de 2.3-12 utilizando 4 rangos de pH (2.3-5, 4-7, 6-11 y 8.5-12) identificando un total de 158 proteínas, correspondientes a 89 ORF (18.5% del proteoma). En este trabajo se observó una reducción de la síntesis de proteínas del 42% en fase de crecimiento post-exponencial respecto a la fase exponencial.

Además de la falta de identificaciones a nivel total del proteoma, aún falta mucha información a nivel de membrana. No se conocen bien las proteínas que realmente están expuestas en la membrana y que colaboran en el reconocimiento de la célula huésped, las que permiten la internalización o las que generan respuesta inmune. Un caso claro de la falta de información que se tiene en el género *Mycoplasma* más allá del proteoma total es el trabajo publicado por Kühner *et al.* [78]. En este trabajo se ha estudiado la organización del proteoma de *Mycoplasma pneumoniae*, muy cercano a *M. genitalium*, pero en el que se han excluido las proteínas de membrana dada la problemática que genera el trabajar con ellas. Por este motivo, estas proteínas no solo no se han identificado en experimentos globales de estudio de proteoma total, sino que se han excluido en otros trabajos. De esta manera se ha generado una falta de conocimiento de la composición proteica de esta estructura celular tan importante implicada en funciones de tal relevancia para la célula como son la comunicación célula-célula, mecanismos de defensa, transducción de señales, supervivencia celular o patogénesis [79]. Además, el análisis de las proteínas de membrana es muy importante para conocer y entender la patogenia de este microorganismo dado que el 70% de las dianas terapéuticas conocidas son proteínas de membrana [80]. Este dato debe concienciar en el campo de la biomedicina al estudio de estas proteínas, a pesar de sus dificultades, y sobre todo al conocimiento de la patogenia.

Otros proteomas publicados hasta el momento son el proteoma de *Mycoplasma pneumoniae* [81], también publicado en el año 2000. En este análisis se identificaron 224 proteínas distintas utilizando técnicas de fraccionamiento por solubilización diferencial, utilizando Tritón X-114, para obtener varios mapas bidimensionales.

Posteriormente, se publicó el proteoma de *Mycoplasma penetrans* [82] en el 2006 en el que se identificaron 207 proteínas correspondientes a 153 ORF. Además también se identificaron 26 fosfoproteínas mediante técnicas de tinción específica de fosfoproteínas.

Posteriormente a estos trabajos se han utilizado las técnicas que ofrece la proteómica para analizar diferentes aspectos del género *Mycoplasma* [83]. Gracias a estos avances, se han podido desarrollar trabajos como el fosfoproteoma de *Mycoplasma genitalium* [84], en el que se identificaron 24 fosfoproteínas.

II. OBJETIVOS

El presente proyecto tiene como **Objetivo General** poner a punto y aplicar los métodos proteómicos al análisis, desde diferentes puntos de vista, de la biología de *Mycoplasma genitalium*.

Como **Objetivos Específicos** están:

- Identificar experimentalmente el máximo número posible de proteínas en *Mycoplasma genitalium*, tanto las anotadas en el genoma, como aquellas cuyo gen no ha sido descrito a partir del genoma.

- Identificar las proteínas que expresa *M. genitalium* cuando es cultivado en un medio de cultivo mínimo.

- Crear un mapa de referencia del subproteoma soluble en TX-114 de *M. genitalium*.

- Identificar que proteínas forman parte del Surfoma de *Mycoplasma genitalium*.

- Obtener el Inmunoma de *Mycoplasma genitalium* para identificar las proteínas que generan respuesta inmune en el huésped, además de identificar las proteínas diferenciales entre pacientes infectados y controles.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. A. CULTIVO CELULAR

III.A.1. MEDIO DE CULTIVO SP4

El medio de cultivo que permite obtener un buen rendimiento de biomasa es el medio SP4 (Spiroplasma medium 4) [4], además de ser el recomendado por la ATCC .

Para 1 litro de medio SP4 se necesita:

III.A.1.1. Base SP4

3.5 gr Caldo PPLO.

10 gr Triptona.

5.3 gr Peptona.

5 gr Glucosa.

Disolver estos componentes en 615 ml de H₂O milliQ (Millipore) y ajustar el pH a 7.8 con NaOH 2 M.

Autoclavar a 121°C durante 15 min.

Una vez autoclavada la base y atemperada se debe complementar.

III.A.1.2. Complementos

Los complementos se añaden de forma que no se pierda en ningún momento la esterilidad del medio.

100 ml Yeastolate 2% (p/v).

12 ml Rojo de fenol 0.1% pH 7.

35 ml Extracto de levadura.

50 ml Medio CMRL 1066 sin glutamina.

170 ml Suero bovino fetal.

500 µl Ampicilina 200 mg/ml.

3.4 ml Glutamina 29.2 mg/ml (calentar a 37°C para que se disuelva).

4 ml NaOH 2 M.

III.A.1.3. Preparación del extracto de levadura

Resuspender 250 gr de levadura fresca de panadería en 1 litro de agua milliQ y autoclavar a 115°C durante 10 min. Dejar enfriar.

Aclarar por centrifugación a 380 g durante 10 min.

Separar el sobrenadante y autoclavar 115°C durante 10 min.

Dejar enfriar y alicuotar en volúmenes adecuados.

III.A.1.4. Preparación de yeastolate

Disolver yeastolate al 2% (p/v) en agua milliQ y autoclavar a 120°C 20 min. Dejar enfriar.

III.A.2. MEDIO DE CULTIVO MM14

El medio MM14 es un medio mínimo definido, el cual simula una condición de carencia de nutrientes [20]. Para 1 litro de MM14:

III.A.2.1. Base

0.36 gr Na₂HPO₄.

5.84 gr NaCl.

0.37 gr KCl.

III.A.2.2. Fuentes de carbono

10 gr Glucosa.

0.575 ml Glicerol 87%.

III.A.2.3. Vitaminas

20 mg Espermina.

1 mg Ácido nicotínico.

1 mg Tiamina.

1 mg Piridoxamina.

0.2 mg Lipoamida.

1 mg Riboflavina.

1 mg Colina.

1 mg Ácido fólico.

III.A.2.4. Bases nucleicas

20 mg Citidina.

20 mg Guanina (Disolver en 0.1 M NaOH).

20 mg Adenina (Disolver en 0.1 M HCl).

III.A.2.5. Lípidos

2 gr BSA deslipidada (portadora de los lípidos).

20 mg Colesterol.

10 mg Ácido palmítico.

12 mg Ácido oleico.

Disolver los lípidos en 4 ml de etanol y posteriormente añadir a la BSA disuelta en agua.

III.A.2.6. Otros

123 mg MgSO₄.

30 mg CaCl₂.

2.5 gr Peptona.

0.24 gr Cisteína (Añadir HCl para disolver).

1 mg Coenzima A (Disolver en 0.02 M fosfato sódico).

10⁶ Unidades Penicilina.

11.92 gr HEPES.

2 mg Rojo de fenol.

Mezclar todos los componentes, ajustar el pH a 7.8 y filtrarlo. Conservar a 4°C no más de 2 meses.

III.A.3. CEPA UTILIZADA Y CONSERVACIÓN

Mycoplasma genitalium G-37 fue conseguido a través de la ATCC (Colección Americana de Cultivos tipo, número ATCC: 33530).

Mycoplasma genitalium puede ser conservado a -80°C sin necesidad de crioprotectores como el glicerol cuando los glicerizados provienen de cultivos con SP4, ya que componentes del FBS (fetal bovine serum) aportan la capacidad crioprotectora. Cuando dichos glicerizados se van a realizar a partir de cultivos en MM14 si se debe añadir glicerol al 20%.

III.A.4. CONDICIONES DE CULTIVO

Mycoplasma genitalium G-37 se ha cultivado en incubadores de cultivo celular a 37°C en un ambiente con 5% CO₂, sin agitación. Como este microorganismo crece adherido al plástico se han utilizado frascos de 150 cm² con ventilación en el tapón, en los que se ha añadido 40 ml de medio SP4.

El cultivo de este microorganismo en SP4 se puede controlar a simple vista debido a la presencia de rojo de fenol en el medio. EL rojo de fenol es un marcador de pH, cuando se encuentra a pH básico (por encima del 8) es rojo y cuando se encuentra en pH ácido (por debajo de 6.4) es amarillo. Cuando *Mycoplasma* se encuentra en fase exponencial, el fenol vira de rojo a naranja, lo que equivale un pH aproximado de 6.8; pasadas unas 96 horas de cultivo. En la siguiente imagen (Fig. III.1) se muestra la variación colorimétrica del rojo de fenol según el pH.

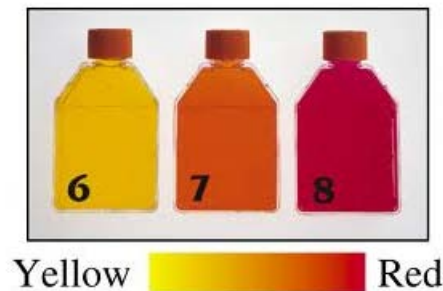


Fig.III.1. Variación del color del rojo de fenol según el pH. (Imagen obtenida en www.Tutorvista.com).

Una vez pasadas las 96 horas se procede a la obtención de la muestra.

El cultivo de este microorganismo en MM14 es muy diferente. En este medio *Mycoplasma genitalium* no se adhiere a la superficie del frasco, pero sí que se observan agregados de células en suspensión. Además, en este medio de cultivo tarda dos semanas en alcanzar una biomasa similar a la obtenida con el medio de cultivo SP4. Al trabajar con el medio MM14, el control del crecimiento se realizó mediante observación con lupa. De esta manera se controla la cantidad y tamaño de agregados de *Mycoplasma genitalium*.

III.B. ANÁLISIS MASIVO DEL PROTEOMA TOTAL DE *MYCOPLASMA GENITALIUM*

III.B.1. Protocolo de obtención de muestra total

La obtención de muestra de proteína total de *Mycoplasma genitalium* se realizó en fase exponencial tal y como se detalla a continuación:

- Lavar los cultivos de *Mycoplasma genitalium* cultivados en SP4 en fase exponencial, 3 veces con 25 ml PBS 1x.
- Escrapear los frascos con 10 ml PBS 1x.
- Centrifugar a 22000 g 20 min a 4°C.
- Resuspender el pellet con 500 µl de PBS.
- Sonicar 5 min, amplitud 30% en ciclos 0.5 seg ON / 0.5 seg OFF.
- Centrifugar 14000 g 15 min 4°C.
- Añadir al sobrenadante tampón de carga.
 - Tampón de carga (10x): 10 ml
 - 0.75 ml Tris-HCl 1 M
 - 3 ml SDS 10%
 - 0.75 gr Ficoll 400
 - 0.21 ml β-mercaptoetanol
 - Azul de bromofenol
- Hervir la muestra 20 min.
- Enfriar a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 14000 g 15 min a 4°C para eliminar cualquier resto insoluble que pueda quedar. El sobrenadante obtenido contiene muestra de proteína total.

Esta muestra no sólo se ha utilizado para el estudio del proteoma total de *Mycoplasma genitalium* cultivados en medio SP4, sino también como control en estudios posteriores de fraccionamiento.

III.B.2. Protocolo de marcaje de muestra total mediante biotina

El objetivo en este apartado es la identificación del mayor número de proteínas de *Mycoplasma genitalium*, por lo que se ha decidido hacer un marcaje masivo de todas las proteínas para evitar los problemas de insolubilidad y para poder obtener una muestra limpia de lípidos.

El compuesto con el que se ha realizado el marcaje de las proteínas ha sido la biotina [85]. Para facilitar todo el proceso de fraccionamiento se ha utilizado Sulfo-NHS-SS-Biotina (Pierce). Esta biotina (estructura mostrada en la figura III.2) contiene un cross-linker que reacciona con los residuos de lisinas (ϵ -amino) produciendo un producto estable. Además, contiene un puente de disulfuro el cual mediante agentes reductores permite la liberación de gran parte de este compuesto para purificar las proteínas unidas.

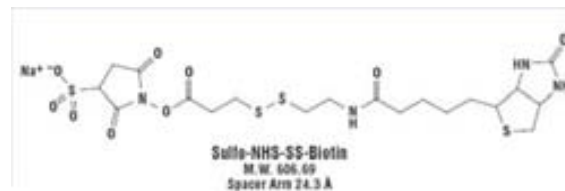


Fig.III.2. Estructura Sulfo-NHS-SS-Biotina (Imagen obtenida en www.piercenet.com).

Una vez las proteínas han sido marcadas, se capturan en una columna de sefarosa con estreptavidina inmovilizada. La biotina y la estreptavidina se unen de manera covalente.

El flujo de trabajo seguido para el marcaje con biotina se muestra en la figura III.3:



Fig.III.3. Esquema del proceso de identificación de proteínas biotiniladas.

III.B.2.1. Protocolo de marcaje con sulfo-NHS-SS-Biotina del proteoma total

El marcaje de proteínas de *Mycoplasma genitalium* con biotina se ha realizado a partir de cultivos en fase exponencial del modo que se detalla a continuación en la figura III.4:



Fig.III.4. Esquema del protocolo de marcaje con biotina (www.takara-bio.com).

- Lavar los cultivos de *Mycoplasma genitalium* cultivados en SP4 en fase exponencial, 3 veces con 25 ml PBS 1x frío.
- Añadir 2.4 mg de Sulfo-NHS-SS-Biotina a cada frasco diluido en 10 ml PBS 1x.
- Incubar 30 min a 4°C en agitación.
- Añadir 500 µl de Tris-HCl 0.5 M pH 8. El Tris contiene aminos y estas compiten con la reacción entre el cross-linker y las lisinas; de esta manera se elimina el sobrante de cross-linker que aún no ha reaccionado.
- Lavar los cultivos dos veces con 25 ml PBS 1x.
- Escrapear las células con 10 ml PBS 1x.
- Centrifugar a 22000 g 20 min 4°C.
- Resuspender el pellet en 400 µl de Tampón de unión.

■ Tampón de unión

- 121 mg Tris.
 - 175 mg NaCl.
 - pH 7.5.
- Sonicar 5 min, amplitud 30% en ciclos 0.5 seg ON / 0.5 seg OFF.
 - Centrifugar 14000 g 15 min 4°C.
 - Utilizar el sobrenadante para la purificación de las proteínas marcadas con la biotina.

III.B.2.2.Purificación de las proteínas marcadas con sulfo-NHS-SS-Biotina

Para realizar la captura de las proteínas marcadas con biotina se han empleado unas columnas de sefarosa con estreptavidina inmovilizada (Streptavidin HP SpinTrap, GE Healthcare). Dichas columnas permiten la captura de las proteínas marcadas de forma rápida y fácil.

Antes de utilizar las columnas hay que realizarles un pretratamiento:

- Secar la sefarosa centrifugando 150 g 1 min.
- Equilibrar la sefarosa con 400 µl de Tampón de unión.
- Centrifugar 150 g 1 min.
- Repetir el equilibrado 3 veces.

Una vez equilibrada la sefarosa ya se puede realizar la purificación:

- Incubar en la columna equilibrada el sobrenadante con las proteínas biotiniladas 1 hora a temperatura ambiente con agitación leve.
- Lavar la sefarosa 5 veces con 400 µl de Tampón de lavado.
 - Tampón de lavado:
 - 0.6 gr Urea.
 - 5 ml Tampón unión.
- Centrifugar a 150 g 1 min.
- Repetir el lavado 5 veces.
- Secar la sefarosa centrifugando 150 g 1 min.
- Añadir 200 µl de SDS 1% + 10 µl DTT 1 M. Al añadir el reductor se rompe el puente disulfuro presente en el cross-linker por lo que las proteínas marcadas quedaran liberadas de la sefarosa.
- Incubar 1 hora a temperatura ambiente con agitación leve.
- Eluir centrifugando 1000 g 1 min.

Debido a que 200 μ l es el volumen mínimo para la elución, si queremos tener la muestra más concentrada se debería precipitar con acetona y resuspender posteriormente con el volumen deseado.

III.B.2.3.Precipitación de proteínas con acetona

Para precipitar la muestra con acetona:

- Añadir 4 volúmenes de acetona fría a -20°C a la muestra.
- Incubar 15 min en hielo.
- Centrifugar a 12000 g 10 min a 4°C
- Eliminar el sobrenadante y secar el pellet al aire.

III.C. ANÁLISIS DEL PROTEOMA TOTAL EN MEDIO MÍNIMO MM14

III.C.1. Preparación del extracto proteico total de células cultivadas en MM14

Debido a que *Mycoplasma genitalium* cultivado en este medio forma agregados, la preparación de la muestra se ha obtenido mediante el protocolo de obtención de muestra total. En esta ocasión, los lavados de los cultivos se han realizado de manera diferente ya que en este medio no se adhiere al frasco.

- Centrifugar los cultivos de *Mycoplasma genitalium* cultivados en MM14 en fase exponencial (aproximadamente 336 horas), a 22000 g 20 min a 4°C.
- Lavar los cultivos 5 veces con 25 ml PBS 1x. Si se realizan menos lavados se observará posteriormente en el SDS-PAGE una banda perteneciente a la BSA del medio.
- Resuspender el ultimo pellet en 1 ml de PBS 1x, pasar a un tubo eppendorf y centrifugar 16000 g 10 min a 4°C.
- Resuspender el pellet con 500 µl de PBS.
- Sonicar 5 min, amplitud 30% en ciclos 0.5 seg ON / 0.5 seg OFF.
- Centrifugar 14000 g 15 min 4°C.
- Añadir al sobrenadante tampón de carga a una concentración final 1x.

■ Tampón de carga (10x): 10 ml

- 0.75 ml Tris - HCl 1 M
 - 3 ml SDS 10%
 - 0.75 gr Ficoll 400
 - 0.21 ml β-mercaptoetanol
 - Azul de bromofenol
- Hervir la muestra 20 min.
 - Enfriar a temperatura ambiente

Centrifugar a 14000 g 15 min a 4°C para eliminar cualquier partícula insoluble que pueda quedar. El sobrenadante ya se puede utilizar como muestra de proteína total de *Mycoplasma genitalium* cultivado en medio MM14.

III.D. FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS HIDROFÓBICAS CON TRITÓN X-114

Para realizar el fraccionamiento de las proteínas hidrofóbicas con Tritón X-114 se ha utilizado el método desarrollado por Bordier *et al.* [71].

Una vez tenemos los cultivos en fase exponencial se realiza el procesamiento de la muestra, pero previamente se deben lavar los frascos 3 veces con 25 ml de PBS 1x.

III.D.1. Preparación de la muestra para el fraccionamiento con TX-114

Para realizar la separación en TX-114 necesitamos preparar una disolución al 1% de TX-114. Se realizaron pruebas para comprobar la concentración del TX-114. Se comprobó que para obtener experimentalmente una concentración del 1% se tuvo que preparar una concentración del 1.2% del stock. Esto es debido a que en el proceso de fabricación y envase del producto, la concentración del mismo se ve modificada levemente. Una vez comprobada la concentración, se prepara una disolución al 1.2% de TX-114 y 10 mM PMSF (inhibidor de proteasas, stock a 0.1 M en etanol 100% a -20°C).

III.D.2. Fraccionamiento con TX-114

- Lavar los cultivos de *Mycoplasma genitalium* cultivados en SP4 en fase exponencial, 3 veces con 25 ml PBS 1x.
- Escrapear los frascos con 10 ml de la disolución TX-114 / PMSF.
- Colocar la muestra con TX-114 en una noria a 25 rpm durante 3 horas a 4°C. Añadir PMSF a mitad del proceso ya que el PMSF es consumido y se degrada con mucha facilidad en una solución acuosa.
- Centrifugar a 22000 g 20 min a 4°C. En este paso se eliminan las células no lisadas por el TX-114 y las partículas no solubles en dicho detergente.
- Repartir el sobrenadante en alícuotas de 1.5 ml en tubos eppendorf de 2 ml.
- Incubar los tubos eppendorf con el sobrenadante 10 min a 37°C. En este paso se observará como la disolución se vuelve turbia. Esto es debido a que a esta

temperatura (por encima del punto de transición) el TX-114 se condensa, formando micelas con las proteínas de membrana ya que reemplaza los lípidos de la membrana en la que están embebidas.

- Centrifugar a 8000 g 3 min a temperatura ambiente (por encima de 20°C, temperatura de condensación). Se observan dos fases, tal y como se muestra en la figura III.5:
 - Superior o acuosa (AQ), transparente. Se encuentran las moléculas no solubles en TX-114.
 - Inferior o detergente (TX), turbia debido a la condensación de las micelas formadas por el detergente y las proteínas hidrofóbicas.

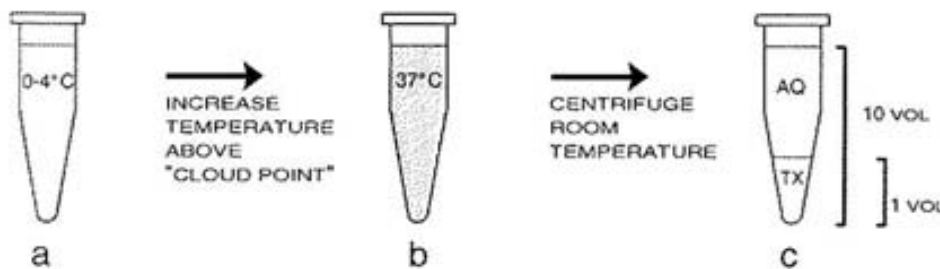


Fig.III.5. Esquema del comportamiento TX-114 con variaciones de temperatura [4].

- Eliminar la fase acuosa (superior).
- Añadir PBS a 4°C con PMSF 1 mM hasta restaurar el volumen inicial de 1.5 ml. Al disminuir la temperatura, se pierde la condensación de las micelas.
- Enfriar en hielo 10 min, para asegurar una descondensación total de las micelas.
- Repetir 3 veces los pasos 4 a 8. Al condensar/descondensar y reemplazar la fase acuosa por PBS nuevo se consigue reducir la presencia de proteínas insolubles en TX-114 que puedan quedar retenidas en el interior de las micelas.
- Después del último lavado, restaurar el volumen inicial (1.5 ml) con PBS a 4°C y centrifugar 14000 g 15 min a 4°C para eliminar cualquier resto celular o partícula insoluble que pudiera permanecer.

- Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo e incubar 10 minutos a 37°C, para condensar las micelas de nuevo.
- Centrifugar a 8000 g 3 min a temperatura ambiente, se forman de nuevo las fases AQ y TX.
- Eliminar la fase acuosa y precipitar las proteínas de la fase TX mediante metanol/cloroformo.

III.D.3. Precipitación de proteínas mediante metanol/cloroformo

Este protocolo se ha utilizado en este caso ya que es el método idóneo para eliminar los detergentes y las sales presentes en la muestra después del fraccionamiento con TX-114.

- Añadir 4 volúmenes de metanol a la fase TX. Vórtex.
- Añadir un volumen de cloroformo. Vórtex.
- Añadir 3 volúmenes de agua. Vórtex.
- Centrifugar a 15000 g 2 min, se obtienen dos fases. En la interfase se encuentran las proteínas.
- Eliminar la fase superior y añadir 4 volúmenes de metanol. Vórtex.
- Centrifugar a 15000 g 5 min.
- Eliminar el máximo de metanol sin perturbar el pellet y secarlo en Speed-Vac, no más de 5 minutos, ya que esto dificultaría su posterior resuspensión.

III.E. IDENTIFICACIÓN DEL SURFOMA

Esta técnica utiliza unos compuestos fluorescentes o fluoróforos llamados CyDye (GE Healthcare) que se une específicamente a los residuos de lisina de las proteínas. Si estos compuestos se añaden a la muestra antes de lisar las células, estos sólo se unirán a los residuos de lisina de las regiones expuestas de las proteínas de superficie de membrana, ya que no son internalizados.

III.E.1. Preparación de los fluoróforos

Los fluoróforos se deben pedir justo antes de utilizarlos ya que tienen una vida media más bien corta. En este trabajo se utilizaron dos fluoróforos: CyDye3 y el CyDye5, uno para el marcaje de las proteínas expuestas y el otro para la muestra de proteína total, como se puede observar en la figura III.6.

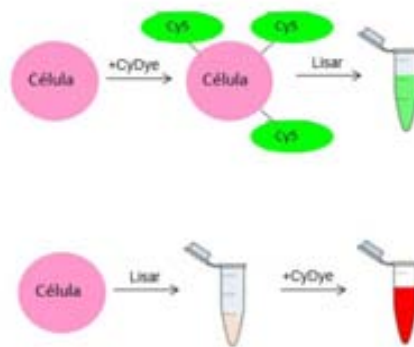


Fig.III.6. Esquema del marcaje de las muestras en DIGE.

Una vez recibido el fluoróforo, se preparó la disolución stock:

- Atemperar el vial del CyDye.
- Añadir 5 µl de dimetilformamida (DMF). De esta manera queda a 1 mM (CyDye disolución de stock).
- Vórtex 30 seg.

- Centrifugar a 12000 g 30 seg.

Se puede utilizar en el momento o guardar a -20°C no más de 2 meses.

Una vez se vaya a utilizar el fluoróforo, coger la alícuota de disolución de stock para preparar la disolución de trabajo. Esta varía según si es el CyDye3 o el CyDye5, ya que el CyDye3 se ha utilizado con extracto proteico total y el CyDye5 para marcar las proteínas expuestas de la membrana.

- Disolución de trabajo con CyDye 3:
 - ❖ Añadir 1 volumen de CyDye de stock a 1.5 volúmenes de DMF, de esta manera el CyDye queda a 400 pmol. Añadir siempre primero la DMF.
 - ❖ Para el marcaje se utiliza un 1.5 µl del CyDye a 400 pmol, por lo que finalmente se añade a la muestra 600 pmol.
- Disolución de trabajo con CyDye 5:
 - ❖ Añadir un volumen de CyDye de stock a 0.667 volúmenes de DMF, de esta manera el CyDye queda a 600 pmol.
 - ❖ Para el marcaje se utiliza 1 µl de CyDye a 600 pmol.

III.E.2. Marcaje de la muestra de proteína total

- Lavar los cultivos de *Mycoplasma genitalium* cultivados en SP4 en fase exponencial, 3 veces con 25 ml PBS 1x.
- Escrapear los frascos con 10 ml PBS 1x.
- Centrifugar a 22000 g 20 min a 4°C.
- Resuspender el pellet con 400 µl de disolución de lisis.
- Sonicar 5 min a amplitud 30% en ciclos 0.5 seg ON / 0.5 seg OFF.
- Centrifugar 14000 g 15 min 4°C para eliminar células no lisadas o posibles restos celulares insolubles.
- Calcular la concentración de la muestra mediante Bradford [86].
- Añadir al 1.5 µl de disolución de trabajo de CyDye, 75 µg de extracto proteico total.

- Vortear y centrifugar para concentrar todo el volumen en el fondo del eppendorf.
- Incubar 30 min a oscuras.
- Añadir 1 μ l de 10 mM lisina para parar la reacción. Al ser una amina primaria compite por el fluoróforo y evita que se continúe uniendo a las lisinas de las proteínas.
- Vortear, spin y dejar a oscuras 10 min en hielo.

Esta muestra puede ser utilizada inmediatamente o guardarla a -80°C hasta 3 meses.

III.E.3. Marcaje selectivo de la región extracelular de las proteínas de membrana

- Lavar los cultivos en fase exponencial con 25 ml de HBSS 1x frío:
 - Hanks Buffered Salt Solution (HBSS): 500 ml; pH 8.5
 - 4 gr NaCl.
 - 200 mg KCl.
 - 22 mg Na_2HPO_4 .
 - 30 mg KH_2PO_4 .
 - 90 mg CaCl_2 .
 - 60 mg MgSO_4 .
 - 176 mg NaHCO_3 .
- Escrapear los cultivos con 10 ml HBSS x1 frío.
- Centrifugar a 22000 g 20 min 4°C .
- Lavar las células con 1ml de HBSS y pasar las células a un tubo de 1.5 ml.
- Centrifugar 14000 g 15 min 4°C .

- Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet de células con 200 μ l de tampón de unión a 4°C:

- Tampón de unión (pH 8.5)

- 3 ml de HBSS.
 - 0.18 gr Urea.

- Añadir 1.5 μ l de la disolución de trabajo CyDye5 (600 pmoles). Vórtex muy suave.
- 30 min en hielo a oscuras.
- Parar la reacción con 20 μ l de lisina 10 mM e incubar 10 min más a oscuras. Al ser una amina primaria compite por el fluoróforo y evita que se continúe uniendo a las lisinas de las proteínas.
- Lavar las células 2 veces con 500 μ l HBSS pH 7.4.
- Centrifugar 14000 g 15 min 4°C.
- Resuspender el pellet con 150 μ l disolución de lisis fría:

- Disolución de lisis (1 ml), pH 8.5:

- 420 mg Urea.
 - 150 mg Tiourea.
 - 40 mg CHAPS.
 - 20 μ l Tris 1.5 M pH 8.5.
 - 50 μ l Acetato de magnesio 0.1 M.

- Incubar 1 hora en hielo, vortear cada 20 min.
- Sonicar 5 min a amplitud 30% en ciclos 0.5 seg ON / 0.5 seg OFF.
- Centrifugar 14000 g 15 min 4°C.

- Añadir disolución de muestra 2x al lisado:
 - Disolución de muestra 2x (1 ml):
 - 420 mg Urea.
 - 150 mg Tiourea.
 - 20 mg CHAPS.
 - 130 μ l DTT 1M.
- Incubar 10 min en hielo.

III.F. MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS

III.F.1. SDS-PAGE MONODIMENSIONAL

El método utilizado para separar las muestras proteicas complejas en los ensayos de identificación del proteoma total, tanto en SP4 como en MM14, ha sido el SDS-PAGE [87] (Gel Electroforesis de PoliAcilamida de Sodio DodecilSulfato).

III.F.1.1. Disoluciones necesarias para el SDS-PAGE

■ Tampón del gel inferior (4x): 500 ml.

- 91 gr Tris.
- 2 gr SDS.
- pH 8.8.

■ Tampón gel superior (4x): 100 ml.

- 6.05 gr Tris-HCl.
- 0.4 gr SDS.
- pH 6.8.

■ Tampón de electrodos (10x): 1 litro.

- 30.29 gr Tris-HCl.
- 10 gr SDS.
- 144.1 gr Glicina.

III.F.1.2. Composición del SDS-PAGE

Los geles de acrilamida utilizados han sido al 10% acrilamida con un grosor de 1.5 mm. Se ha elegido este grosor ya que permite cargar un mayor volumen de muestra.

❖ Gel inferior o separador:

- 3.96 ml H₂O.
- 2 ml Tampón gel inferior.
- 2 ml Acrilamida 40% (37.5:1).
- 20 µl Persulfato amonio 10% (p/v).
- 2 µl Temed.

❖ Gel superior o apilador:

- 1.94 ml H₂O.
- 0.75 ml Tampón gel superior.
- 0.3 ml Acrilamida 40% (37.5:1).
- 20 µl Persulfato amonio 10% (p/v).
- 2 µl Temed.

III.F.1.3. Condiciones utilizadas para correr el SDS-PAGE

Las proteínas, para poder ser separadas en un SDS-PAGE, deben estar previamente desnaturalizadas y con las cargas apantalladas por SDS por dos motivos: para que las proteínas migren hacia el polo negativo y para que migren únicamente en función de su masa y no por diferencias de cargas. Por este motivo, se debe añadir a la muestra tampón de carga y hervir durante 20 min.

■ Tampón de muestra (10x): 10 ml.

- 0.75 ml Tris-HCl 1M.
- 3 ml SDS 10%.
- 0.75 gr Ficoll 400.
- 0.21 ml β-mercaptoetanol.

- Azul de bromofenol.

En todos los SDS-PAGE se han utilizado marcadores de masa molecular de Invitrogen, ya sea el Benchmark o el Benchmark Prestained, cuando el gel se va a transferir a una membrana. Los patrones de los marcadores utilizados se muestran en la figura III.7.

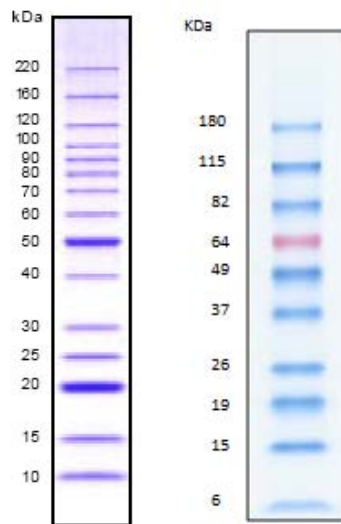


Fig.III.7. Esquema del patrón de los marcadores de masa molecular Benchmark y Benchmark prestained (www.invitrogen.com).

Los geles fueron corridos a amperaje constante y a un voltaje variable. Se comenzó la electroforesis a 10 mA/gel durante 15 min para favorecer una buena entrada de la muestra en el gel. Posteriormente el amperaje fue incrementado a 20 mA/gel hasta que el frente de azul de bromofenol, proveniente del tampón de carga, sale por la parte inferior del gel.

III.F.2. GELES BIDIMENSIONALES

III.F.2.1. Preparación de la muestra proteica para la electroforesis bidimensional

Para poder separar una muestra proteica en un gel bidimensional la muestra debe estar resuspendida en disolución de lisis. En nuestro caso, la concentración de CHAPS se ha aumentado del 2.5% al 4% para aumentar la solubilidad de la muestra, ya que se trabaja con proteínas de membrana, así como también se ha utilizado el detergente ASB-14 que aumenta la presencia de proteínas de membrana en geles 2DE.

■ Disolución de lisis:

- 8 M Urea.
- 2 M Tiourea.
- 4% CHAPS (p/v).
- 2% ASB-14 (p/v).
- 40 mM Tris-HCl pH 8.5.

Preparar un volumen grande de dicha disolución en un vaso de precipitados de plástico, nunca de cristal, ya que éste es un asistente de la precipitación de la urea. Alicuotarlo y guardarlo a -20°C.

Resuspender el pellet de proteínas con el mínimo de volumen posible de disolución de lisis, así tendremos la muestra lo más concentrada posible. Dejar agitando 30 min para una mayor resuspensión.

III.F.2.2. Limpieza de la muestra para el isoelectroenfoque

La muestra debe estar absolutamente limpia de lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos. Existen muchos tipos de precipitación, pero sólo el kit de GE Healthcare 2-D Clean-Up Kit es el que da una buena fiabilidad con una baja pérdida de proteínas para geles 2DE.

1. Añadir 300 µl de precipitante* a 100 µl de muestra. Vórtex.
2. Incubar en hielo 15 min.
3. Añadir 300 µl de coprecipitante*. Vórtex.
4. Centrifugar a 12000 g 5 min.
5. Eliminar el sobrenadante.
6. Centrifugar 1 min para eliminar el sobrenadante remanente en las paredes del eppendorf.
7. Añadir 30 µl de coprecipitante* al pellet.
8. Incubar en hielo 5 min.

9. Centrifugar a 12000 g 5 min.
10. Añadir 25 μ l de agua destilada. Vórtex. El pellet se disgrega.
11. Añadir 1 ml de Tampón de lavado frío y 5 μ l de aditivo de lavado. Es en este paso cuando el pellet se resuspende totalmente.
12. Incubar 30 min a -20°C, vórtex 10 seg cada 10 min.
13. Centrifugar a 12000 g 5 min.
14. Eliminar el sobrenadante y secar el pellet.
15. Resuspender con el tampón adecuado.

*Reactivos suministrados en el kit.

Utilizar un pequeño volumen de la muestra para calcular la concentración de la muestra mediante el ensayo de Bradford [86].

III.F.2.3. Determinación de la concentración proteica de la muestra

Debido a que los componentes de la disolución de lisis interfieren con el método de determinación de la concentración proteica de Bradford, la muestra se debe preparar a una concentración menor a 1/500 para evitar dichas interferencias y obtener una correcta determinación de la concentración.

Para determinar la concentración de la muestra, primero se elaboró una serie de diluciones de BSA en concentraciones conocidas:

| | | | | | | | | | |
|-------------------------|---|---|---|---|----|----|----|----|----|
| BSA (μ g/ μ l) | 0 | 3 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 17 | 20 |
|-------------------------|---|---|---|---|----|----|----|----|----|

Estas diluciones de BSA se han valorado en un espectrofotómetro a una absorbancia de 600 nm, a la vez que las diferentes diluciones de la muestra.

Según los datos obtenidos en el espectrofotómetro se realiza una recta patrón con los datos de concentración y absorbancia observada de las diferentes diluciones de la BSA.

Aplicando la ecuación de la recta patrón a la absorbancia de las diluciones de la muestra, se extrapola la concentración en cada dilución. La concentración final será la media de las concentraciones en cada dilución, teniendo en cuenta el factor de dilución.

En el caso del fraccionamiento con TX-114, a partir de 20 frascos de 150 cm² en fase exponencial se han obtenido un total de 500 µg de proteína de soluble en TX-114. En el caso del marcaje con fluoróforos, el rendimiento es mayor ya que no se ha realizado ningún fraccionamiento. Ya que la repetida congelación/descongelación provoca la degradación de la muestra, una vez cuantificada se hacen alícuotas según las cantidades necesarias para cada gel (200 µg) y se conservan a -20°C.

III.F.2.4. Isoelectroenfoque

III.F.2.4.a. Rehidratación de las tiras de isoelectroenfoque

Las tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG), suministradas por GE Healthcare, son unas tiras que nos permiten la separación de las proteínas según su punto isoeléctrico. Estas tiras son suministradas deshidratadas para facilitar su conservación. La función de la disolución de rehidratación no sólo es la de rehidratar la tira sino también la de mantener las proteínas en disolución durante todo el proceso de isoelectroenfoque. Para rehidratarlas se utilizó la disolución de lisis añadiendo algunos componentes.

■ Disolución de rehidratación

- Disolución de lisis.
- 2 mM DTT*.
- 2% IPG*.
- Azul de bromofenol*.

*Añadir justo antes de su utilización.

El colorante permite seguir el proceso de isoelectroenfoque, ya que una vez acabado, el extremo del cátodo queda con una coloración verdosa, mientras que el del ánodo se mantiene de color azul.

Para la longitud de las tiras que se utilizaron (24 cm) el volumen necesario para la correcta rehidratación es de 450µl. La rehidratación se ha llevado a cabo en los “IPG Strip Holder” de GE Healthcare siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

- Se aplican los 450 µl de disolución de rehidratación distribuidos a lo largo del IPGstrip holder evitando que se formen burbujas.
- Retirar el plástico de protección de la tira de isoelectroenfoque. Manipular las tiras con guantes y con pinzas.
- Colocar la tira en el “IPG Strip Holder” de tal manera que la acrilamida deshidratada quede en contacto con la disolución de rehidratación (hacia abajo).
- Cubrir la tira con 2 ml de aceite mineral, para evitar la evaporación de agua durante el proceso de rehidratación.
- Dejar un mínimo de 12 horas a una temperatura no superior a 30° C en una superficie plana para que la rehidratación sea homogénea. Lo ideal es preparar la rehidratación a media tarde y dejarlo toda la noche.

III.F.2.4.b. Isoelectroenfoque

La primera dimensión, se ha llevado a cabo con el sistema “Ettan™ IPGphor™ Cup Loading Manifold”, GE Healthcare, diseñado para realizar el isoelectroenfoque de proteínas con las tiras IPG de GE Healthcare de 3 mm de ancho y de 7 a 24 cm de largo en la unidad electroforética Ettan IPGphor. En este sistema, el isoelectroenfoque se realiza con el gel cara arriba, y la muestra es aplicada en una pequeña copa. Este método de carga de la muestra en copa es el que proporciona mejores resultados, en particular en rangos de pH básicos. También proporciona una mejor resolución en aquellos casos en que se cargan grandes cantidades de muestra (más de 1 mg de proteína), condiciones en que suele haber transporte de agua (electroendosmosis) en el proceso de enfoque.

Protocolo a seguir:

1. El “manifold” es una bandeja de cerámica con óxido de aluminio que permite una eficiente transferencia de calor. Contiene unos carriles donde colocar las tiras de

isoelectroenfoque. Primero se coloca la bandeja en la unidad electroforética IPGphor como muestra la figura III.8.

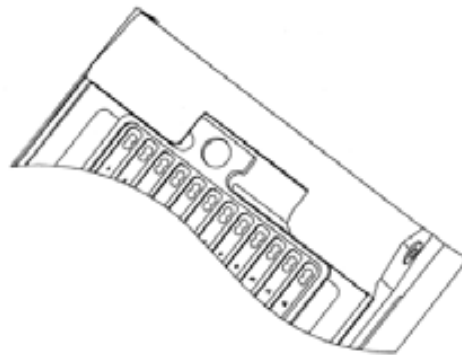


Fig.III.8. Posición de la bandeja en el IPGphor (2DE manual, GE Healthcare).

- Las tiras de isoelectroenfoque, previamente rehidratadas, deben colocarse con el gel cara arriba y con la dirección que muestra la figura. Los carriles donde van colocadas las tiras están enumerados y poseen unas pequeñas guías para que las tiras queden perfectamente alineadas. En los extremos de la bandeja hay unos pequeños pocillos con forma de ocho que permiten manipular las tiras con unas pinzas sin rallar la superficie de la bandeja (Fig.III.9).

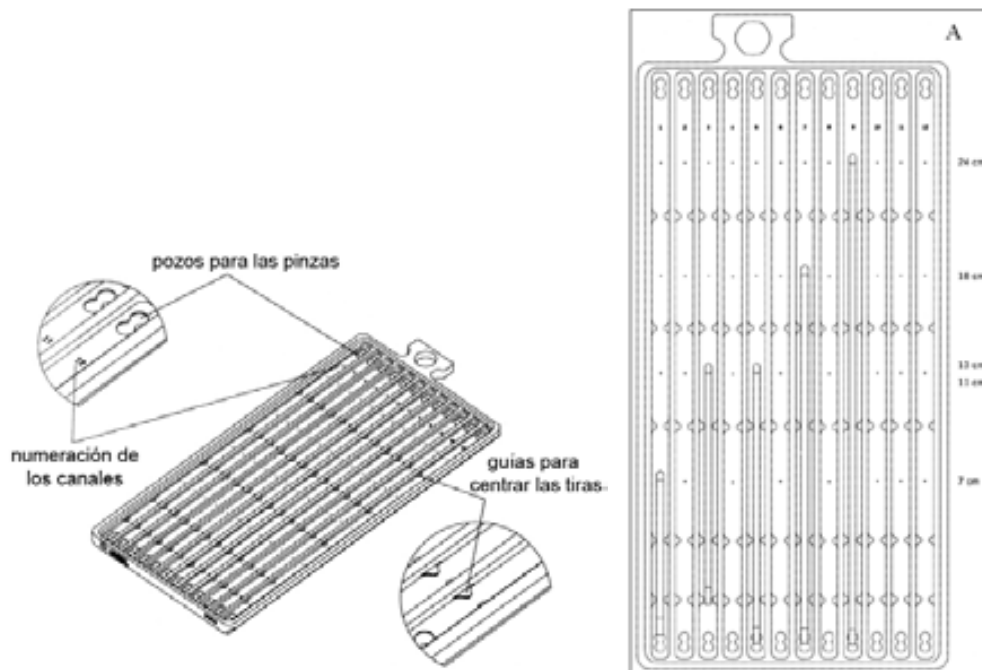


Fig.III.9. Bandeja y posición de las tiras en la misma (2DE manual, GE Healthcare).

- Colocar las copas encima de las tiras tal como muestra la figura III.10. Las copas tienen unos brazos que deben quedar entre las paredes del carril donde se ha colocado la tira. También tienen unos pequeños pies en la base que no deben estar encima de la tira. Las copas no deben colocarse encima de las guías, sino junto a ellas. Es conveniente colocar las copas en los extremos de las tiras, generalmente en el cátodo, donde se realizará la carga de la muestra. La ranura de las copas debe quedar en contacto íntimo con la tira y no debe perder líquido. Para asegurar la correcta colocación de las copas, llenarlas con aceite mineral. Si al cabo de un rato no ha disminuido el nivel de aceite en las copas, es que están bien colocadas.

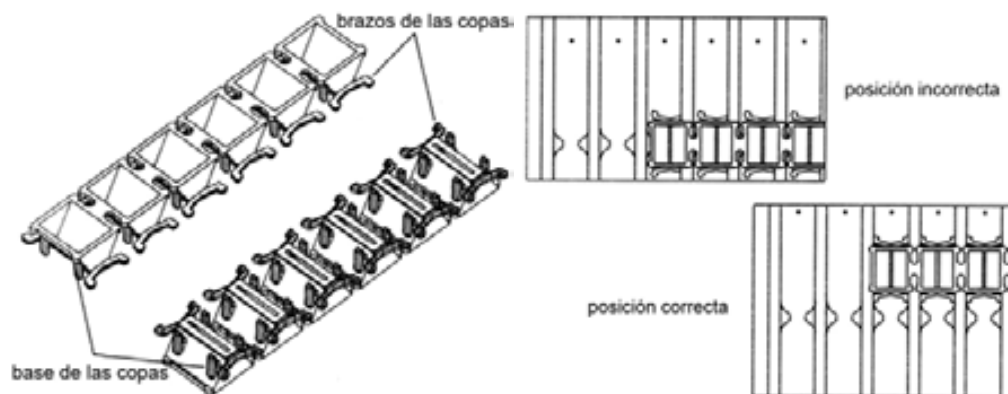


Fig.III.10. Detalle de las copas. Posición de las copas en la bandeja (2DE manual, GE Healthcare).

- Cortar el número apropiado de tiras de papel (Paper Wick, GE Healthcare). Serán necesarias dos tiras de papel para cada tira. Impregnar las tiras de papel con 150 μ l de agua MilliQ para el extremo del cátodo. Para el extremo del ánodo, las tiras se impregnarán con una disolución 7 M urea y 2 M tiourea. Las tiras de papel deben estar impregnadas pero no gotear.
- Colocar las tiras de papel en los extremos de las tiras de tal manera que quede una pequeña zona de contacto papel-acrilamida tal y como muestra la figura III.11. Las tiras de papel deben quedar sumergidas en el aceite, de otra forma se secarán y con el tiempo acabarán por absorber agua de las tiras, secándolas.

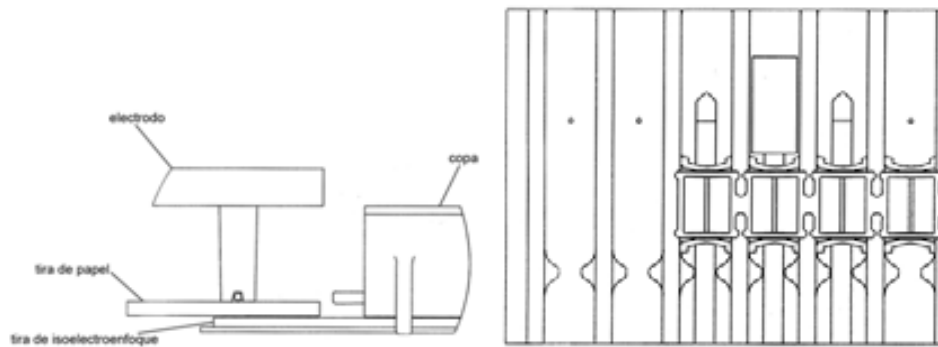


Fig.III.11. Posición de las tiras de papel (2DE manual, GE Healthcare).

6. Una vez colocados todos los componentes, se cubre con aceite mineral la bandeja. La función del aceite es evitar que se evapore agua durante el isoelectroenfoque. La evaporación del agua provocaría que la urea cristalizase y de esta forma el isoelectroenfoque no se realizaría de forma correcta.

7. Colocar los electrodos. Con los cierres en posición abierta, como se indica en la figura III.12, se coloca con mucho cuidado los electrodos sobre las tiras de papel en el punto de contacto con la acrilamida. Una vez colocados se ponen en posición cerrada.

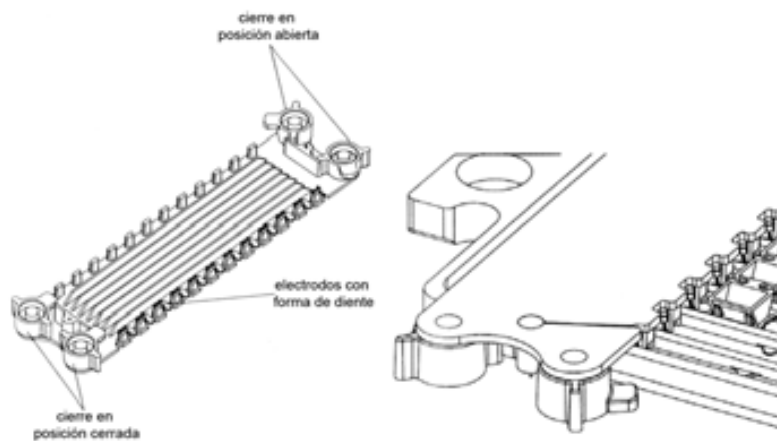


Fig.III.12. Detalles de un electrodo. Posición y detalles de colocación de un electrodo (2DE manual, GE Healthcare).

8. Antes de cargar las muestras hay que complementarlas con los IPG adecuados, con DTT y con azul de bromofenol. Además es preciso centrifugarlas para eliminar cualquier partícula insoluble que podría dificultar la entrada de la muestra en la matriz de acrilamida de las tiras de isoelectroenfoque o obturar la ranura de la copas. Las copas aceptan un máximo de 150 μ l de muestra. La muestra se debe depositar de forma que quede aceite encima de ella para evitar que se evapore. Es importante que la muestra no esté muy concentrada ya que existe el riesgo de que precipiten las proteínas.

9. Las condiciones en que se ha realizado el isoelectroenfoque han sido de 20°C y 50 μ A por tira.

❖ Programa:

- 300 V: 3 horas.
- 1000 V: 6 horas en gradiente.
- 8000 V: 3 horas en gradiente.
- 8000 V hasta 120000 Vhr.

Hay que tener en cuenta que estas condiciones no tienen por qué ser válidas para otras muestras. Con estas condiciones la duración total del isoelectroenfoque es de unas 20 horas.

III.F.2.5. Equilibrado de las tiras

La función de este paso es:

- Reducir y alquilar todo puente disulfuro que pueda quedar oxidado.
- Sustituir los detergentes no-iónicos por SDS para apantallar las cargas y así poder separar las proteínas por masa molecular.

■ Tampón de equilibrado

- 6 M Urea.
- 30% Glicerol (v/v).
- 2% SDS (p/v).
- 50 mM Tris-HCl pH 8.8.
- Azul de bromofenol.

Es recomendable preparar 500 ml de esta disolución, hacer alícuotas de 10 ml y guardar a -20°C hasta su utilización.

Para cada tira de isoelectroenfoque se necesitan dos alícuotas de la disolución de equilibrado. Una se complementa con 100 mg de DTT, el agente reductor, y la otra con 250 mg de iodoacetamida, el agente alquilante.

Las casas comerciales venden unos tubos adecuados para realizar el equilibrado, pero existe la posibilidad de hacer este paso de forma casera. Para la realización de este trabajo se han utilizado puntas de cultivo celular estériles de 25 ml envasadas individualmente.

- Sin sacar la pipeta de su envase, se rompe con un objeto contundente la punta de la pipeta que lleva un trozo de algodón. Si se intenta romper la punta con la pipeta fuera de su envase, suele desmenuzarse toda la pipeta. Ahora disponemos de una pipeta con los dos extremos abiertos.
- Se cierra uno de los extremos (el estrecho) con parafilm.
- Con cuidado se introduce la disolución complementada con DTT en el interior de la pipeta.
- Se introduce la tira de isoelectroenfoque con mucha cautela de no romperla o rasgarla. Hay que asegurarse, de que el lado de la tira que contiene la acrilamida quede en contacto con la disolución y no entre en contacto con las paredes interiores de la pipeta. Por este motivo se introduce deslizando el lado de plástico de la tira por la pared de la pipeta.
- Una vez colocada la tira se cierra el extremo que queda abierto de la pipeta con parafilm, se deposita en un agitador de balanceo y se deja 15 min agitando.

- Después de 15 min, se sustituye la disolución que contiene DTT por la que contiene iodoacetamida. Incubar con agitación 15 min.
- Proceder inmediatamente a acoplar la tira a la segunda dimensión.

Mientras se realiza el equilibrado de las tiras, lo ideal es preparar la unidad de la segunda dimensión, así como los geles de la segunda dimensión para que no pase mucho tiempo entre que se equilibran las tiras de isoelectroenfoque y empieza la segunda dimensión. De esta manera se evita la difusión de las proteínas en la matriz de acrilamida de las tiras de isoelectroenfoque.

III.F.2.6. Segunda dimensión

III.F.2.6.a. Descripción del sistema

La segunda dimensión ha sido realizada en geles al 12.5% de acrilamida polimerizados en el laboratorio. Estos geles son de gran formato (26x20 cm) que permiten realizar la segunda dimensión de las tiras de isoelectroenfoque de 24 cm.

Se debe llevar guantes siempre que se manipulen los geles de poliacrilamida, las tiras de isoelectroenfoque o cualquier equipamiento que tenga que estar en contacto con los geles. Preferiblemente utilizar guantes de nitrilo no empolvados, ya que el polvo generará suciedad visible en cuanto se tiñe el gel y el látex deja marcas en los geles. Lavar los vidrios con etanol antes de preparar los geles. Cualquier suciedad que quede en los cristales se verá en la tinción con plata. Utilizar siempre los reactivos de mayor pureza y los vidrios de los geles que sean de baja fluorescencia para minimizar el background en los geles cuya muestra ha sido marcada con fluoróforos.

III.F.2.6.b. Preparación de los geles de acrilamida

Los geles que se han utilizado para separar las muestras proteicas han sido geles de acrilamida al 12.5%. Dichos geles han sido preparados, mínimo un día antes de su utilización para asegurar una completa polimerización de la acrilamida.

Para preparar 6 geles de una vez se necesitan:

- 188 ml Stock acrilamida*.
- 113 ml Tris-HCl, pH 8.8.
- 140 ml H₂O.
- 4.5 ml SDS 10%.
- 4.5 ml Persulfato de amonio 10%.
- 0.62 µl TEMED 10%.

* Stock de acrilamida: mezclar 60 gr acrilamida y 1.6 gr bisacrilamida y enrasar a 200 ml. Esta mezcla tarda una hora en disolverse, con lo que se puede aprovechar para limpiar los vidrios e ir colocándolos en su montaje, tal y como se muestra en la figura III.13.

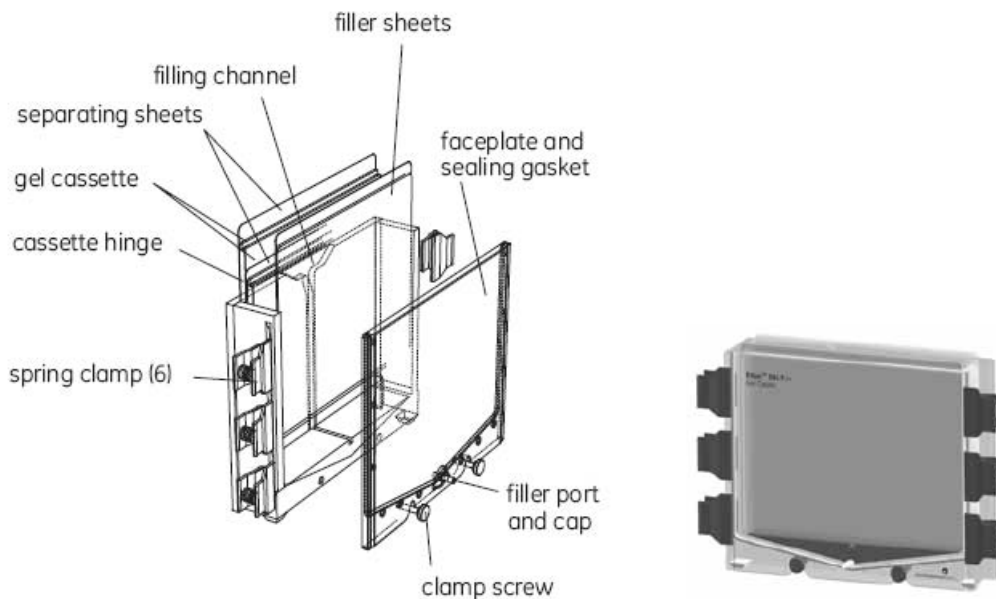


Fig.III.13. Esquema equipamiento para geles manufacturados (EttanDalt six user manual, GE Healthcare).

Se mezclan todos los componentes excepto el TEMED y el persulfato de amonio. Una vez esta bien mezclado y esta todo el montaje a punto, añadir estos dos últimos componentes y verterlo en el montaje. Añadir 1 ml de isopropanol en la parte superior de cada gel para asegurar una correcta polimerización con un frente bien recto, ya que será el lugar donde se colocará la tira de IEF.

III.F.2.6.c. Preparación del sistema

Para poder llevar a cabo la electroforesis necesitamos preparar tampón de electroforesis 10x.

■ Tampón de electroforesis 10x

- 250 mM Tris.
- 1.92 M Glicina.
- 1% SDS.

Tanto el tampón del cátodo como el del ánodo son diluciones de este tampón de electroforesis, siendo el del cátodo 3x y el del ánodo 1x.

III.F.2.6.d. Transferencia de la primera dimensión a la segunda

- Dejar el gel montado en el casete en posición horizontal.
- Una vez extraída la tira de isoelectroenfoque de la segunda disolución de equilibrado, se coge la tira con unas pinzas por el soporte plástico para aclararla con tampón de electroforesis 1x para eliminar el exceso de disolución de equilibrado.
- Introducir la tira de isoelectroenfoque entre los cristales como se indica en la figura III.14.

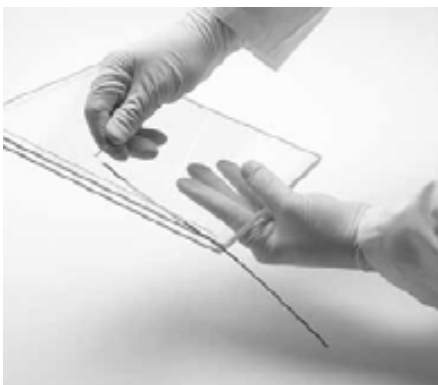


Fig.III.14. Esquema colocación de la tira en el gel (EttanDalt six user manual, GE Healthcare).

- Una vez colocada la tira entre el cristal y el plástico de soporte del gel, con la ayuda de las pinzas se empuja la tira para que entre en contacto íntimo con el gel. Hay que

evitar que queden burbujas entre la tira de isoelectroenfoque y el gel. Así como también es imprescindible evitar el que la tira sufra cualquier tipo de rotura o rasgadura.

- Preparar una pequeña tira de papel Whatman en la que se cargan 15 μ l de Benchmark o prestained, según el experimento. Colocar esta tira al lado del cátodo de la tira de isoelectroenfoque. Debido a que el gel no tiene carriles, el marcador de masa molecular se tiene que aplicar de esta manera.
- Una vez colocada la tira y el marcador de masa molecular se coloca el casete en posición vertical y se sella, tal y como se muestra en la figura III.15, con disolución de sellado que previamente ha sido fundida, pero con cuidado de que no esté muy caliente.

■ Disolución de sellado:

- 0.5% Agarosa.
- Tampón electroforesis 1x.
- Azul de bromofenol.
- Hervir y agitar hasta que no se observan los granos de agarosa.
- Alicuotar.

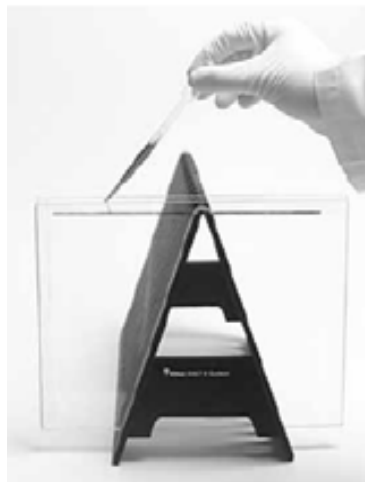


Fig.III.15. Esquema del sellado del gel 2DE (EttanDalt six user manual, GE Healthcare).

- Una vez realizadas estas operaciones para todos los geles que se deseen correr, se llena el tanque con 5 litros de tampón del ánodo (1x). Posteriormente se introducen los casetes en la unidad de electroforesis. Se aconseja mojar con tampón de cátodo, que contiene SDS, los casetes para facilitar la introducción de los casetes en la unidad separadora. Esta unidad, el Ettan DALTsix, tiene capacidad para cargar 6 geles. Los casetes se pondrán empezando por la parte delantera del equipo. Si no se utilizan los seis geles se llenaran los espacios sin geles con “casetes vacíos” que vienen proporcionados con el mismo equipo.
- Cuando los 6 espacios para colocar geles están llenos, se llenará el reservorio superior con 1.5 litros tampón de cátodo diluido (3x) hasta la línea indicada. Jamás se superará esta línea pues el tampón del cátodo entraría en contacto con el tampón del ánodo a través de los surtidores de condensación del reservorio del tampón del ánodo. El proceso de llenado del tanque se muestra en la figura III.16.
- Llenar con la ayuda de un embudo el tanque con tampón del ánodo (1x) hasta el mismo nivel en el que se encuentra llenado el reservorio superior. De esta manera, dificultamos la pérdida de tampón del reservorio superior hacia el tanque.
- Cerrar el equipo y ponerlo en marcha.

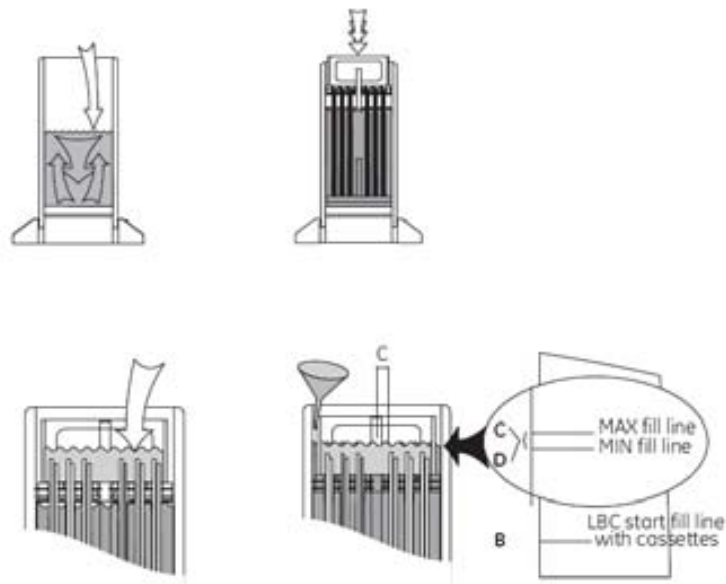


Fig.III.16. Esquema del llenado del tanque EttanDalt six (EttanDalt six user manual, GE Healthcare).

III.F.2.6.e. Condiciones recomendadas para correr la segunda dimensión

El equipamiento necesario para realizar la segunda dimensión se muestra en la figura III.17:



Fig.III.17. Esquema del equipamiento para la 2ª dimensión (EtanDalt six user manual, GE Healthcare).

Para asegurar una buena transferencia entre la primera dimensión y la segunda es necesario empezar con poca potencia. Después de este primer paso, la potencia variará dependiendo si se quiere correr la segunda dimensión durante el día o durante la noche.

Por este motivo los parámetros que se utilizan son diferentes, en la caso de correrlos durante el día:

| Paso | Intensidad (mA/Gel) | Voltaje (V) | Potencia (W/Gel) | Tiempo (h) |
|------|---------------------|-------------|------------------|------------|
| 1 | 10 | 80 | 1 | 1 |
| 2 | 40 | 500 | 13 | 5-6 |

Si en cambio se quiere correr los geles durante la noche:

| Paso | Intensidad (mA/Gel) | Voltaje (V) | Potencia (W/Gel) | Tiempo (h) |
|------|---------------------|-------------|------------------|------------|
| 1 | 10 | 80 | 1 | 1 |
| 2 | 12 | 150 | 2 | 15-17 |

Los geles se detuvieron en cuanto el frente azul salió por el extremo inferior de los geles e inmediatamente se procedió a realizar la fijación, primer paso de tinción, para evitar que las proteínas separadas por electroforesis bidimensional difundan en el gel de la segunda dimensión. En el caso de los geles para inmunoma, el gel no fue fijado y se realizó directamente la transferencia a la membrana de nitrocelulosa.

III.G. WESTERN BLOT

En el estudio del inmunoma, después de la 2ª dimensión, hay que transferir el gel a una membrana de nitrocelulosa en la que se pueda hacer las incubaciones con sueros. Por este motivo y dado el enorme tamaño de los geles, en este experimento la transferencia se realizó con el Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell. Por las dimensiones de la placa de transferencia de este aparato, se puede transferir la mitad de un gel 2DE.

III.G.1. OBTENCIÓN DE SUERO

Los sueros de pacientes diagnosticados con infección por *Mycoplasma genitalium* han sido facilitados por el Dr. Guillermo Ezpeleta del Hospital de Basurto (Bilbao), el cual proporcionó el suero de 14 pacientes.

Para poder realizar una comparativa de estos pacientes, se necesita obtener el suero de personas no infectadas o controles. Este suero se obtuvo de donantes sanos:

- Obtener un volumen aproximado de 5 ml de sangre en un tubo sin anticoagulante.
- Incubar a 37°C 1 h, para que la sangre coagule.
- Refrigerar la muestra a 4°C 12-16 h para permitir que el coagulo sanguíneo se retraiga. Utilizando una pipeta Pasteur, retirar cuidadosamente el coagulo, apoyándolo en la pared del tubo. Es importante no lisar los eritrocitos del coagulo.
- Centrifugar el suero a 4000 rpm 20 min a 4°C.
- Retirar el sobrenadante, etiquetarlo y conservarlo a -20°C.

De ambos grupos de personas (controles y pacientes) se realizó un pool de sueros y estos pools fueron los utilizados para la realización de los experimentos. El hecho de utilizar pools en lugar de los sueros de forma individual nos sirve como referencia poblacional.

III.G.2. TRANSFERENCIA EN SEMI-DRY

Preparar 1 litro de tampón de transferencia por cada 2DE a transferir y enfriar a 4°C.

- Tampón de transferencia: 1 litro.
 - 25 mM Tris.
 - 192 mM Glicina.
 - 20% Etanol.
 - pH 8.3.
- Cortar un trozo de membrana de nitrocelulosa 0.22 µm del tamaño de cada fragmento de gel a transferir.
- Incubar los fragmentos de gel 15 min en tampón de transferencia para eliminar el SDS y las sales del tampón de electroforesis. Es conveniente marcar los extremos del 2DE de manera diferente para no perder nunca la orientación.
- Impregnar los trozos de nitrocelulosa y los papeles Whatman específicos para Semi-Dry en tampón de transferencia.
- Montar la transferencia según la figura III.18 y III.19, vigilando muchísimo que no queden burbujas entre un nivel y el siguiente, ya que impedirían el proceso de transferencia.
- Transferir 90 min a 25 V.

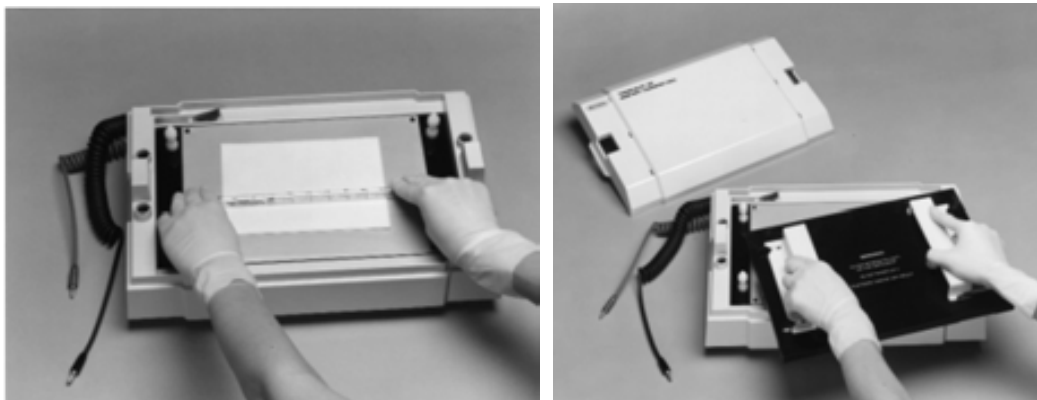


Fig.III.18. Esquema montaje sándwich en el Semi-Dry (Semy-Dry manual, BioRad).

- Papel Whatman (3)
- Gel acrilamida (4)
- Nitrocelulosa (5)
- Papel Whatman (6)

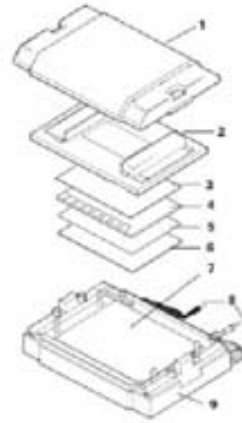


Fig.III.19. Orden de colocación de los elementos en el Trans-Blot SD cell.

Una vez finalizado el proceso de transferencia, marcar los extremos de los trozos de nitrocelulosa de la misma manera que se han marcado los fragmentos de gel. Para confirmar que la transferencia ha sido correcta, teñir la nitrocelulosa con disolución Ponceau.

Tinción Ponceau:

- Cubrir la membrana de nitrocelulosa con disolución de Ponceau.
- Retirla cuando ya se distinguen algunas bandas/spots.
- Lavar con agua destilada la membrana para eliminar el exceso de colorante.
- Una vez valorada la transferencia, eliminar el Ponceau con NaOH 0,1 M.
- Lavar la membrana con agua destilada para eliminar los restos de disolución.

Una vez valorada la transferencia como positiva, ya se puede realizar el ensayo inmunológico.

III.G.3. ENSAYO INMUNOLÓGICO

Realizar en paralelo la transferencia de 2 geles en los ensayos de inmunoma, ya que uno se incubará con sueros de pacientes, otro con sueros control. Además hace falta un tercer gel que se tiñe con plata para identificar las proteínas que dan señal en las membranas.

El protocolo de ensayo inmunológico es el mismo tanto en pacientes como en control. Se han utilizado los mismos tiempos y concentraciones, únicamente ha variado la procedencia de los sueros (anticuerpo primario).

- Bloquear 1 h con PBS 1% Blocking Reagent (BR).
- Lavar 3 veces 10 min con PBS 0.05% Tween 20.
- Incubar con el pool de sueros (controles o pacientes), dilución 1:100, o/n a 4°C.
- Lavar 3 veces 10 min con PBS 0.05% Tween 20.
- Incubar 2 horas con el anticuerpo secundario, dilución 1:10000 (anticuerpo de conejo anti-humano conjugado con peroxidasa).
- Lavar 3 veces 10 min con PBS 0,05% Tween 20.

III.G.4. REVELADO DE LA MEMBRANA

El revelado de la membrana depende del anticuerpo secundario. En este caso, el anticuerpo esta conjugado con peroxidasa, por lo que el revelado se hace por quimioluminiscencia en el VersaDoc (BioRad).

Para realizar el revelado simplemente se mezclan dos sustancias del Luminata Forte kit (Western HPR Substrate, Millipore) en la misma proporción, se cubre la membrana con dicha mezcla y se expone en el VersaDoc a diferentes tiempos. Según la intensidad obtenida, se varía el tiempo de exposición hasta conseguir un buen contraste.

III.H. TINCIONES

III.H.1. TINCIÓN CON PLATA

La tinción con plata es un método ampliamente utilizado en la mayoría de laboratorios debido a que requiere un equipamiento y reactivos relativamente baratos, el protocolo no es demasiado complicado y es uno de los métodos de tinción más sensibles (puede llegar a 1 ng de proteína visualizado en una mancha) [88].

El principio de la tinción con plata es el siguiente: un gel de poliacrilamida es bañado en una disolución que contiene iones solubles de plata (Ag^+). Al ser revelado con el tratamiento de un reductor se promueve la reducción de los iones de plata a plata metálica (Ag^0) que es insoluble y visible. Existen múltiples versiones del proceso de tinción con plata. Además de la impregnación con plata y el revelado, estos incluyen pasos de fijación, incubaciones con sensibilizadores, pasos de parada del revelado, preservación y lavado. Los reactivos utilizados varían pero el reductor de la plata siempre es el mismo, el formaldehído. La alta sensibilidad de la tinción con plata, tiene como contrapartida la susceptibilidad para interferir con una multitud de productos.

Durante la tinción con plata se debe realizar una limpieza exhaustiva de todo el material por donde pasarán los geles. La calidad de los reactivos así como del agua es crítica.

Los métodos tradicionales de tinción con plata tienen el inconveniente de que modifican químicamente las proteínas. Debido a esto, hay que realizar pequeñas modificaciones en el protocolo de tinción para que sea compatible con la espectrometría de masas. Esta modificación química se debe generalmente a que los métodos de tinción con plata incorporan un paso de sensibilización que incluye cantidades relativamente elevadas de glutaraldehído. Este producto produce la modificación de las cadenas laterales de los amino ácidos que componen las proteínas. Esta modificación provoca un cambio en la masa de las cadenas laterales y esto hace que su posterior identificación con métodos de espectrometría de masas sea imposible [89]. Todos estos reactivos no deben utilizarse si el propósito es realizar espectrometría de masas después de la tinción.

Para teñir los geles con plata se ha utilizado el siguiente protocolo:

| Paso | Disolución | Tiempo |
|------------------------|--|----------------------|
| Fijación | 40% Etanol 10% Ácido acético | 2 x 1 h ¹ |
| Lavados | 30% Etanol | 2 x 20 min |
| Lavado | Agua destilada | 20 min |
| Sensibilización | 0.02% Tiosulfato de sodio | 1 min |
| Lavados | Agua destilada | 3 x 1 min |
| Tinción | 0.1% Nitrato de plata (frio) | 20 min |
| Lavados | Agua destilada | 3 x 1 min |
| Revelado | 3% Carbonato sodio 0.05% Formaldehido | 5 min ² |
| Parada | 1.5% EDTA | - |

¹ La primera fijación se puede extender hasta 3 días.

² El formaldehido se debe añadir justo antes de utilizar dicha disolución. El tiempo necesario para revelar es variable. Hay que parar la reacción de revelado cuando se haya alcanzado el contraste deseado en el gel.

III.H.2. TINCIÓN CON COOMASSIE R-250

Los geles monodimensionales fueron teñidos con coomassie R-250, con un protocolo en el que la fijación y la tinción se hacen de forma simultánea.

■ Disolución de tinción con coomassie:

- 50 mg Coomassie R-250.
- 21 ml Metanol.
- 8 ml Ácido acético.
- 21 ml H₂O.

El gel se deja en agitación suave durante 20 min. Pasados estos minutos el gel se observa completamente azul. Desteñir con ácido acético al 10% para poder visualizar las bandas.

III.I.ANÁLISIS DE IMAGEN

La obtención de la imagen del gel DIGE se hizo con el escáner Typhoon (GE Healthcare) y el programa QuantityOne 4.6.3 (BioRad). La imagen se obtuvo con una resolución de 400 dpi y 8 bits de profundidad.

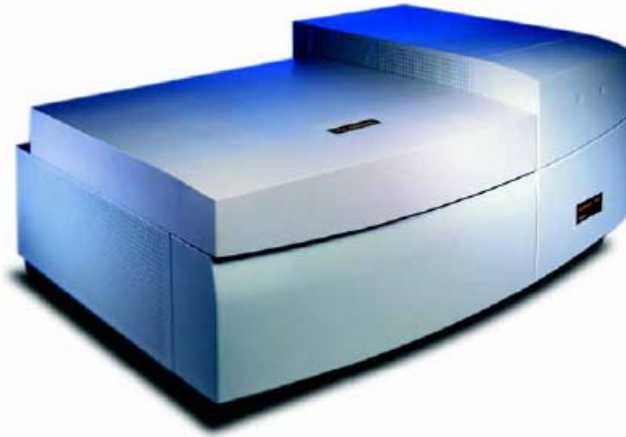


Fig.III.20. Imagen Typhoon (GE Healthcare).

Para obtener la imagen de los geles teñidos con plata o coomassie se utilizó el densitómetro Scanner Umax PowerLook 2100XL de BioRad.

Para capturar la imagen del inmunoma se utilizó un dispositivo de adquisición de imagen VersaDoc de BioRad.

III.J. DIGESTIÓN TRÍPTICA

III.J.1. PROCESAMIENTO DE LOS GELES

Una vez escaneados los geles y elegidos los spots que se quieren identificar por espectrometría de masas, hay que escindirlos del gel. Este proceso se realizó con una punta de pipeta recortada a un diámetro aproximado al de los spots. Existen en el mercado unas placas de 96 pocillos comercializadas por Proxeon que facilitan mucho el trabajo cuando hay que realizar muchas digestiones a la vez. Estas placas están microperforadas en la parte inferior del pocillo, por lo que centrifugando o aplicando el vacío a la placa eluimos el contenido de todos los pocillos a la vez. Cada spot recortado se colocó en un pocillo de la placa, teniendo muy claro y anotando qué spot está en cada posición para evitar confusiones. A continuación se prosiguió con su digestión trípica para obtener la huella peptídica de cada proteína y así poderlas identificar.

Para este protocolo se deben utilizar los reactivos de una pureza mínima HPLC grade.

III.J.2. DESTINCIÓN DE LOS SPOTS TEÑIDOS CON PLATA

1. Añadir en cada pocillo 200 µl de disolución de destinción. Tapanlo y dejar 20 min a oscuras a temperatura ambiente.

- Disolución de destinción:

- Disolución A: Hexacianoferrato (III) de potasio 30 mM
(Mantener a 4° C y proteger de la luz).
- Disolución B: Tiosulfato de sodio 100 mM
(Mantener a 4°C).

Mezclar las disoluciones A y B 1:1 antes de usar. (Esta disolución se degrada con facilidad así que debe prepararse cada vez que se necesite).

2. Centrifugar a 3000 rpm 1 min. Se debe observar que los pedazos de acrilamida han perdido el color de la plata y son de color amarillo.
3. Añadir 200 µl de agua destilada en cada pocillo. Tapar e incubar 15 min a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 3000 rpm 1 min.
5. Repetir los pasos 3 y 4 hasta que todos los pedazos de acrilamida hayan perdido el color amarillo y sean completamente transparentes.

III.J.3. REDUCCIÓN Y ALQUILACIÓN

Para facilitar la identificación de las proteínas mediante huella peptídica es conveniente realizar la reducción y alquilación de las cisteínas. Cuando las digestiones provienen de geles bidimensionales, las proteínas ya están reducidas y alquiladas, ya que en el paso de equilibrado de la tira se realizan estos procesos. Pero cuando las digestiones provienen de geles monodimensionales, antes de realizar la digestión es conveniente realizar los pasos de reducción y alquilación.

1. Añadir 100 µl de 50 mM bicarbonato amónico/ 50% etanol, tapar e incubar 20 min a temperatura ambiente.
2. Centrifugar a 3000 rpm 1 min.
3. Deshidratar los pedazos de gel añadiendo 100 µl de etanol 100%. Tapar e incubar 15 min a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 3000 rpm 1 min.
5. Reducir añadiendo 200 µl de 10 mM DTT/ 50 mM bicarbonato amónico.
6. Incubar 1 hora a 56°C.
7. Centrifugar a 3000 rpm 1 min.
8. Alquilar añadiendo 200 µl de 55 mM iodoacetamida/ 50 mM bicarbonato amónico.
9. Incubar 30 min a temperatura ambiente, protegido de la luz.
10. Centrifugar a 3000 rpm 1 min.
11. Añadir 200 µl de 50 mM bicarbonato de amonio, tapar e incubar 15 min a temperatura ambiente.
12. Centrifugar a 3000 rpm 1 min.
13. Repetir el lavado con el bicarbonato de amonio.

III.J.4. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

Una vez los spots están desteñidos de plata y/o reducidos y alquilados se puede proceder a la digestión triptica de las proteínas. La tripsina es un enzima proteolítico que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas en las posiciones de lisina (K) y arginina (R) C-terminal, siempre y cuando no haya una prolina (P) en el extremo N-terminal de dichos aminoácidos. La tripsina siempre generará el mismo patrón de péptidos de una proteína dada. Este patrón se conoce como huella peptídica o PMF (Peptide mass fingerprint).

1. Añadir 100 µl de tampón 1 en cada pocillo, tapar e incubar 30 min a temperatura ambiente.

■ Tampón 1:

- Bicarbonato amónico 25 mM.
- Acetonitrilo 5%.

2. Centrifugar a 3000 rpm 1 min.

3. Añadir 100 µl de tampón 2 a cada pocillo, tapar e incubar 30 min a temperatura ambiente.

■ Tampón 2:

- Bicarbonato amónico 25 mM.
- Acetonitrilo 50%.

4. Centrifugar a 3000 rpm 1 min.

5. Repetir los pasos 3 y 4.

6. Añadir 200 µl de acetonitrilo 100% en cada pocillo e incubar, tapado, durante 10 min.

7. Centrifugar a 3000 rpm 1 min. Se observará que los trozos de acrilamida están completamente deshidratados.

8. Añadir 15 µl de disolución de Tripsina a cada tubo eppendorf:

■ Disolución de Tripsina:

- a) Añadir 100 µl de HCl 1 mM a un vial de tripsina en polvo.
- b) Mezclar hasta la completa solubilización del enzima.
- c) Preparar doce alícuotas de 8 µl cada una y guardar a -20° C.
- d) Cuando se necesite, se descongela una alícuota de 8 µl y se añaden 400µl de bicarbonato amónico 25 mM.

Con estas cantidades se añaden aproximadamente 60 ng de tripsina en cada pocillo. El protocolo original incorpora 166 ng de tripsina. Siguiendo el protocolo original con manchas teñidas con plata, lo único que se observaba por espectrometría de masas eran picos de autodigestión de la tripsina. Por lo tanto, se recomienda ajustar la cantidad de tripsina a la muestra que se va a digerir. Si las manchas se han teñido con azul de coomassie, se puede aumentar la cantidad de tripsina.

9. Incubar los tubos eppendorf 3 horas a 37° C o toda la noche a 30° C.

Indiferentemente de la condición que se siga, se recomienda pasados 15 min de haber añadido la tripsina, eliminar el sobrante de esta disolución que no ha rehidratado los pedazos de gel.

10. Una vez pasado el tiempo de digestión, añadir 130µl de disolución de extracción/lavado en cada pocillo e incubar 30 min a temperatura ambiente. Es recomendable aplicar un poco de agitación para facilitar la salida de los péptidos de la matriz de acrilamida.

■ Disolución de extracción/lavado:

- Trifluoroacético (TFA) 0.2%.

11. Centrifugar a 3000 rpm 1 min. Pasar el volumen de cada pocillo a tubos eppendorf numerados.

12. Añadir 100 µl de disolución de extracción/lavado en cada pocillo.

13. Centrifugar a 3000 rpm 1 min. Juntar cada volumen con el mismo del paso 11.
14. Repetir pasos 12-13.
15. Al final de las 3 extracciones consecutivas se consigue un volumen aproximado de 330 μ l.
16. Colocar estos tubos eppendorf abiertos en un SpeedVac a 37°C hasta obtener su absoluto secado.
17. Resuspender los péptidos deshidratados con 5 μ l de disolución de elución.

■ Disolución de elución:

- 60% Acetonitrilo.
- 0.2% TFA (MALDI) o 1% ácido fórmico (ESI).

III.J.5. LIMPIEZA Y CONCENTRADO DE LAS MUESTRAS

Las muestras una vez resuspendidas en la disolución de eluido tienen “contaminantes” que han ido incorporando durante todo el proceso de digestión. Este factor dificulta muchísimo la identificación de las proteínas en el espectrómetro de masas ya que se detectan picos con poca resolución e intensidad. Por este motivo todas las digestiones se han pasado por ZipTip Pipette Tips (Millipore). Estas puntas de pipeta tienen en el extremo una resina de fase reversa C18 que captura los péptidos, facilitando los lavados y el posterior eluido con el volumen que se desee.

El protocolo de utilización de los ZipTip Pipette Tips:

1. Pipetear 2 veces 10 μ l de acetonitrilo.
2. Pipetear 2 veces 10 μ l de TFA 0.1%.
3. Pipetear 10 veces en el eppendorf donde están los péptidos para su captura.
4. Pipetear 4 veces 10 μ l de TFA 0.1%, para su lavado.
5. Eluir con 2 μ l de 50% acetonitrilo, 0.1% TFA.

A continuación, se muestra el espectro diferencial obtenido antes y después de realizar el lavado con ZipTip Pipette Tips.

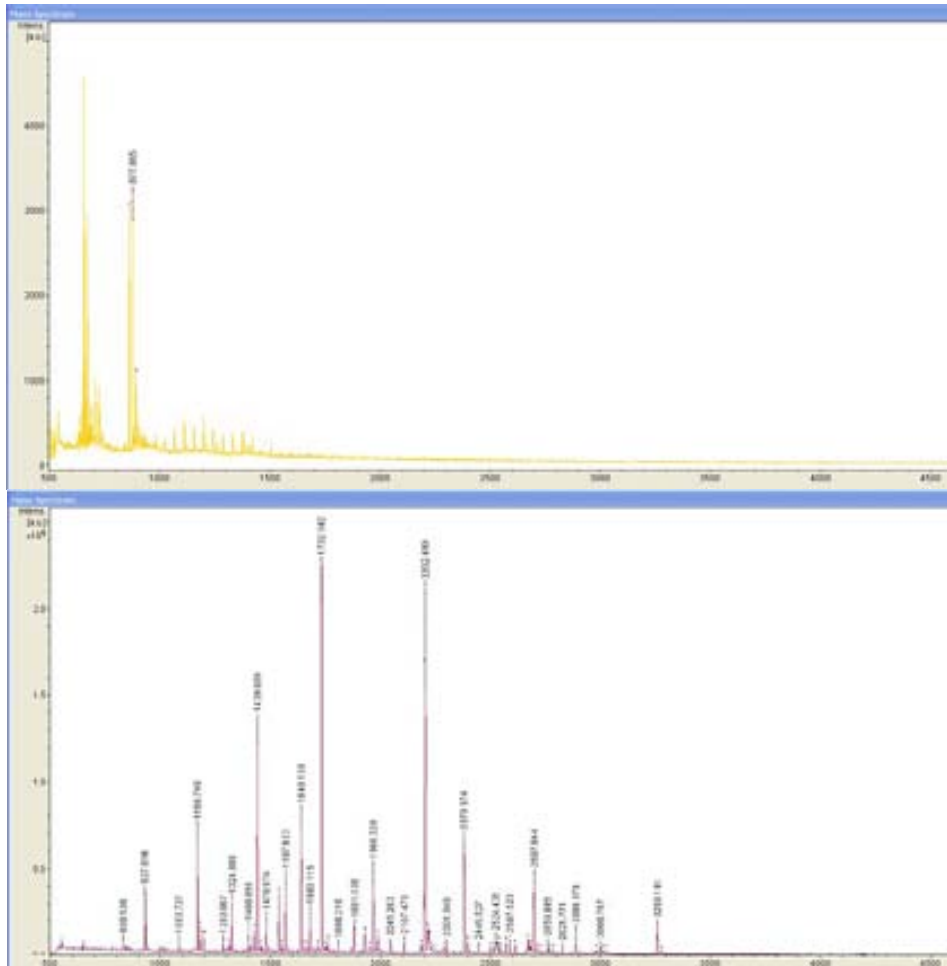


Fig.III.21. Imagen espectro antes (superior) y después (inferior) de aplicar ZipTip (Millipore).

III.K. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

III.K.1. MALDI-TOF

Para realizar las identificaciones por huella peptídica se ha utilizado un espectrómetro de masas MALDI-TOF Ultraflex de Bruker Daltonics.

La ionización de las muestras fue llevada a cabo con un laser de nitrógeno a 337 nm y los espectros fueron obtenidos en el modo reflectivo de iones positivos, usando 25 kV de aceleración.

III.K.1.1. Descripción del sistema

La espectrometría de masas láser de desorción/ionización asistida por matriz (MALDI-TOF) permite conocer exactamente la distribución de las masas moleculares de una muestra.

La tecnología MALDI-TOF permite la detección y caracterización de biomoléculas, como proteínas péptidos y oligosacáridos de masas entre 400 y 350.000 Da. Es un método muy sensible que permite detectar pequeñas cantidades de muestra (10^{-15} a 10^{-18} mols) con una precisión de 0.1-0.01%.

La identificación de proteínas mediante esta técnica tiene la ventaja que utiliza tiempos de análisis muy cortos (pocos minutos) y un consumo mínimo de muestra (menos de 1pmol), además de proporcionar información de microheterogeneidades (ej. Glicosilaciones) y la presencia de productos secundarios.

La precisión en la determinación de la masa molecular mediante este espectrómetro de masas es suficiente como para caracterizar proteínas después de su digestión trípica siempre y cuando el genoma del cual proviene la muestra esté completamente secuenciado y depositado en las bases de datos.

Para poder analizar la muestra en el MALDI-TOF, ésta debe mezclarse con un compuesto que sea capaz de absorber la luz UV. A este compuesto se le conoce como matriz. Una vez están la muestra y la matriz mezcladas, se deposita la mezcla sobre una placa Anchorchip (figura III.22) y se deja secar quedando la matriz y la muestra en forma de cristales. Esta placa es introducida

en la cámara de ionización del MALDI que dispone de una bomba de vacío para poder extraer todo el aire de la cámara.

Estas placas se caracterizan por que en cada posición de la placa hay una superficie hidrofílica rodeada de una zona hidrofóbica, lo que permite que la muestra se concentre en una superficie muy pequeña. Estos AnchorChip™ tienen una superficie variable de 200 a 800 μm . La matriz adecuada para el análisis de péptidos es la HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico).



Fig.III.22. Imagen de la placa AnchorChip™ (www.ms-tectbook.com).

Una vez dentro de la cámara, al hacer incidir en la muestra un haz de luz láser (330-360 nm) con pulsaciones de nanosegundos, la matriz absorbe la energía a la que la exponemos y esta energía es transferida al analito. De esta manera, la matriz ioniza la muestra y los péptidos ionizados quedan dispersos en el vacío de la cámara (desorción/ionización) tal y como se indica en la figura III.23.

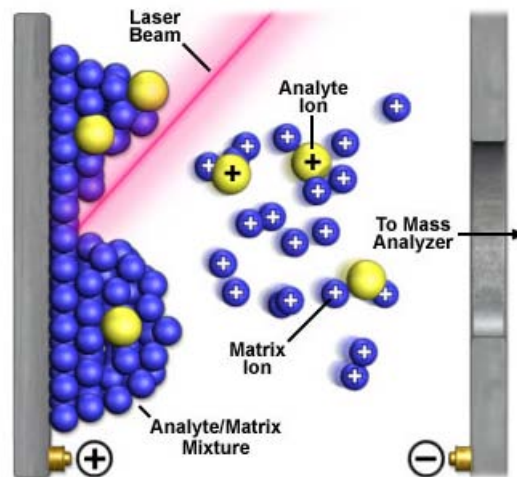


Fig.III.23. Esquema de la ionización de las partículas en el MALDI (kenickbiochem09.wikispaces.com).

La cámara donde se coloca la placa con las muestras se encuentra entre dos electrodos, un cátodo y un ánodo. Al estar la muestra ionizada con cationes, la muestra migrará hacia el ánodo. El detector se encuentra por detrás del ánodo. La resolución de estos equipos depende en gran medida de la longitud del tubo de vuelo. Una forma elegante de alargar el recorrido de los iones sin incrementar la longitud del tubo es colocar un detector, conocido como detector reflector, a mitad de recorrido del tubo de vuelo. Utilizando este detector los iones rebotan en el detector lineal y son detectados por el detector reflector. El esquema general de los componentes del MALDI se muestra en la figura III.24.

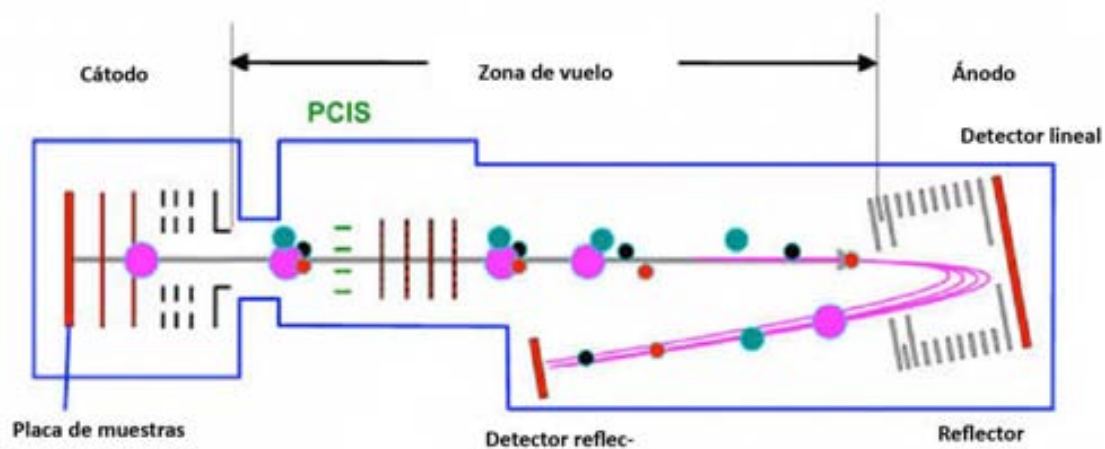


Fig.III.24. Esquema espectrómetro de masas MALDI-TOF (www.giga.ulg.ac.be)

En la mayoría de los casos sólo hay una carga positiva en cada péptido, por lo que si se aplica la misma fuerza eléctrica sobre cada molécula cuando está presente en un campo eléctrico de dos electrodos y siguiendo la ley de Newton:

$$\text{Fuerza (F)} = \text{masa (m)} \times \text{aceleración (a)}; \quad a = F/m$$

Para una fuerza concreta, cuanto más grande es la masa, más pequeña es la aceleración. Es decir, los péptidos de mayor tamaño colisionaran más tarde en el detector que no aquellos péptidos cuyas masas sean menores. Todos los péptidos que colisionan en el detector a la vez (misma masa) generan un pico y su magnitud es proporcional al número de péptidos que colisionan a la vez.

Para la identificación de proteínas mediante la técnica de la huella peptídica es necesario que la calibración del espectrómetro sea lo más precisa posible. Con tal objetivo, las muestras se prepararon alternando una muestra con un marcador de masa molecular. Este marcador está compuesto de:

| Péptido | Masa molecular (Da) |
|-------------------|----------------------------|
| Angiotensina II | 1046.5418 |
| Angiotensina I | 1296.6848 |
| Sustancia P | 1347.7354 |
| Bombesina | 1619.8223 |
| ACTH_clip(18-39) | 2465.1983 |
| Somatostatina(28) | 3147.4710 |

III.K.1.2. Preparación estándar de la muestra con HCCA para placa AnchorChip™

- 1- Disolución de matriz: 0.5 mg HCCA en 1 ml de ACN 33% TFA 0.1%.
- 2- Mezclar 1 µl de analito o muestra con 1 µl de matriz.
- 3- Aplicar 1 µl de la mezcla analito/matriz sobre el AnchorChip™ de 600 µm.
- 4- Dejar que la muestra cristalice a temperatura ambiente.

Todos los programas informáticos utilizados en el análisis de los péptidos son de Bruker Daltonics:

- FlexControl: permite controlar el MALDI-TOF. Los espectros fueron obtenidos en el modo de iones positivos en el espectrómetro de masas.
- FlexAnalysis: permite el procesamiento de los espectros obtenidos por el FlexControl. El método utilizado para la detección de los picos fue PMF.FAMS.

- Biotoools: permite la búsqueda en bases de datos. Utiliza como motor de búsqueda el Mascot de MatrixScience (Londres, Reino Unido). Los parámetros de búsqueda en la base de datos MSDB fueron:
 - ✓ Tolerancia: 50 ppm de error.
 - ✓ Tolerancia de la digestión de la tripsina: 1 fallo.
 - ✓ Modificaciones: oxidación de las metioninas.
 - ✓ Mínimo de 4 coincidencias en las masas de los péptidos.
 - ✓ Restringir la búsqueda en el género Mycoplasma.

Según estos parámetros de búsqueda, la puntuación de la proteína es $-10 \cdot \log(P)$, donde P es la probabilidad que un acierto observado sea un evento aleatorio. Las puntuaciones mayores a 47 son significantes ($p < 0,05$) [90].

Notas

- 1- Utilizar sólo fungibles de material que no se disuelva en presencia de disolventes orgánicos. Sino, sólo se observan polímeros de plástico en el espectro del MALDI como se muestra en la figura III.25. Se ha utilizado un fungible especial, tanto tubos como puntas de pipeta, comercializado por Eppendorf.

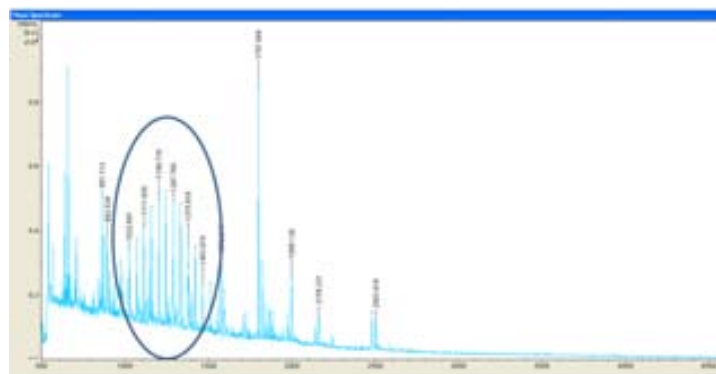


Fig.III.25. Imagen espectro muestra con presencia de polímeros.

- 2- Preparar la matriz diariamente. Es recomendable utilizar siempre el mismo tubo eppendorf.

- 3- La disolución en la que se encuentra el analito o muestra debe tener un 0-70% de disolventes orgánicos. Debido a que en algunos capítulos de esta tesis se ha trabajado con proteínas con péptidos hidrofóbicos, se ha utilizado un 60% de acetonitrilo.

III.K.1.3. Lavado y regeneración de la placa AnchorChip™

Una vez todos los pocillos de la placa AnchorChip™ han sido utilizados, la placa debe lavarse. Con el uso, estas placas pierden sus propiedades ya que quedan trazas de detergentes en su superficie.

- a. Lavar la placa con un paño o papel suave impregnado con acetona.
- b. Sonicar 5-10 min con metanol: agua (1:1).
- c. Aclarar con metanol.
- d. Aclarar con agua milliQ.
- e. Si la placa va a ser guardada, es recomendable repetir los pasos 3 y 4 antes de utilizarla.

Para regenerar la placa se debe incubar la placa con un solvente no-polar, ej. n-hexano.

Para probar la capacidad hidrofóbica de la placa: la superficie de la placa debería repeler el agua. Si se hace correr un volumen de agua (unos 100 µl) por la superficie, no deber observarse ningún rastro de agua, excepto unas pequeñas gotas que quedan en el centro de los pocillos donde se encuentra la superficie hidrofílica.

III.K.2. ELECTROSPRAY

III.K.2.1. Cromatografía líquida – Análisis espectrometría de masas

Los carriles de los geles monodimensionales en los que han sido separadas las diferentes muestras fueron cortados en 10 bandas horizontales y cada una de las bandas digerida trópticamente utilizando tripsina de cerdo modificada (Promega). Las digestiones han sido analizadas en un espectrómetro de masas del tipo trampa iónica Esquire HC-Ultra Ion Trap de Bruker, acoplado a un sistema nano-HPLC (Ultimate, LC Packings). Las mezclas de péptidos fueron primero concentradas en una columna PepMap nanotrapping de 300 mm id, 1 mm y después fueron cargadas en un columna de nanoseparación PepMap nanoseparation de 75 mm id, 15 cm (LC Packings). Los péptidos fueron eluidos con un gradiente de acetonitrilo (0-40% B en 120 min, donde B es 100% ACN, 0.1% ácido fórmico; con un flujo de 300 nl/min) a través de un nano-ESI Sprayer (Bruker) hacia la fuente de ionización nanospray del espectrómetro de masas. La fragmentación MS/MS (3 x 0.3 s, 100–2800 m/z) fue llevada a cabo de los 3 iones más intensos, determinados a partir de un scan MS de 0.8 s en el rango de masas de 310 a 1500 m/z, utilizando un tiempo de exclusión dinámica de 1.2 s para la selección de precursor y excluyendo los iones con una sola carga. Se ha realizado una optimización automática de la amplitud de los MS/MS de fragmentación, empezando en 0.6 V.

III.K.2. 2. Identificación de proteínas y análisis de resultados

El procesamiento de los resultados para la identificación de proteínas se ha realizado utilizando el programa DataAnalysis 4.0 y una plataforma ProteinScope 2.1 (Bruker). Las proteínas han sido identificadas utilizando el Mascot 2.2 (Matrix Science) empleando la base de datos Swiss-Prot 5.9. Las búsquedas fueron restringidas al taxón *Mycoplasma* (36726 secuencias). Los espectros MS/MS fueron buscados con una tolerancia de masa de 1.5 Da en el

precursor, 0.5 Da de tolerancia en el fragmento, especificidad de la tripsina con un máximo de 2 lugares de corte omitidos, las oxidaciones en las metioninas como modificaciones variables y la carbamidometilación como modificación fija.

El criterio para dar como positiva una identificación ha sido para cada fragmento si el score individual es superior al correspondiente score límite de homología. El ratio de falsos positivos de identificación de proteínas en Mascot se ha estimado que se encuentra por debajo de 1.2%.

III.L. BIOINFORMÁTICA

Una vez identificadas las proteínas mediante espectrometría de masas, se realizaron predicciones bioinformáticas para poder obtener más información de dichas proteínas, especialmente de aquellas que estaban anotadas como hipotéticas. Los programas que se han utilizado son:

- ProtLoc: este programa realiza una correlación entre la secuencia de aminoácidos y su localización celular. Los análisis estadísticos diferencian las proteínas en cinco grupos: proteínas extracelulares, integrales de membrana, ancladas a membrana, intracelulares y nucleares [22].

<http://bioinf.uab.es/cgi-bin/trsdb/protloc.cgi>

- PSORT: este programa realiza también la predicción de la localización subcelular utilizando unos parámetros diferentes [21], además también se obtiene información acerca del número de hélices transmembrana presentes en la secuencia dada y de la presencia o ausencia de péptido señal.

<http://www.psort.org/psortb/>

- TransMem: este programa fue desarrollado en el grupo. Este programa realiza la predicción de regiones transmembrana [91].

<http://bioinf.uab.es/cgi-bin/trsdb/transmem.cgi>

- Pfam: predice la presencia de dominios a través de la secuencia de aminoácidos de la proteína [92].

<http://pfam.sanger.ac.uk/>

- ByPass: predice la función proteica de una secuencia de aminoácidos [93]. Este programa ha sido desarrollado en el grupo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mycoplasma genitalium es el agente etiológico causante de la uretritis no-gonococal en hombres y de cervicitis en mujeres, así como también está asociado a otras enfermedades genitales [13]. Este microorganismo también ha sido localizado en líquido sinovial [94], en el recto [13], en el tracto respiratorio [95], habiéndose descrito también como posible causante de conjuntivitis [96]. Este organismo es el miembro más pequeño de la clase mollicutes, con un genoma de 580 Kb de tamaño [9], en el que se ha estimado la capacidad para codificar 475 proteínas. Como organismo auto-replicante representa el ensamblaje molecular más sencillo capaz de subsistir independientemente y de generar sus propios requerimientos energéticos. La limitada capacidad genética de este organismo, así como la falta de algunas rutas metabólicas, están compensadas por su estilo de vida parasitaria. Los micoplasmas dependen de las células huésped para la obtención de nutrientes y componentes esenciales [4]. El contacto íntimo de *Mycoplasma genitalium* con la célula huésped es posible debido a la carencia de pared celular de la bacteria y a la expresión de proteínas de citoadherencia en su membrana plasmática [97]. Por todas estas características, este organismo es un buen modelo de célula mínima. En un análisis previo se estimó que entre 265 y 350 genes son esenciales para *M. genitalium*, y aproximadamente 100 son de función desconocida, sin evidencia experimental de la existencia de algunos de ellos [98]. La anotación de los genomas de micoplasmas secuenciados asigna función a un 50-70% de los ORF, y como se ha comentado anteriormente, los ORF a los cuales no se les ha podido asignar ninguna función, son los más interesantes, ya que son potenciales candidatos a tener nuevas funciones. Sólo la proteómica puede determinar de forma inequívoca si un determinado gen es traducido a proteína.

IV. A. PROTEOMA TOTAL DE *MYCOPLASMA GENITALIUM*

En el momento en que se empezó este trabajo, existían dos trabajos publicados y una tesis doctoral sobre proteómica en *Mycoplasma genitalium*. La electroforesis bidimensional en combinación con la espectrometría de masas MALDI-TOF fue utilizada en los tres trabajos. El primer trabajo publicado fue en el año 2000 por Wasinger *et al.* [77] en el cual el proteoma de *Mycoplasma genitalium* fue estudiado en fase exponencial. En este estudio se identificaron 89 ORFs diferentes correspondientes al 18.7% del proteoma predicho. Posteriormente, Su *et al.* [84] llevó a cabo un trabajo en el que el fosfoproteoma de *Mycoplasma genitalium* fue analizado. Este subproteoma se abordó mediante una tinción específica de fosfoproteínas. Con tal objetivo, extractos proteicos totales de *M. genitalium* fueron separados mediante geles

bidimensionales y posteriormente estos fueron teñidos con el agente de tinción específico de fosfoproteínas ProQ-Diamond, de manera que se visualizaron únicamente las fosfoproteínas. Gracias a este estudio se identificaron 24 fosfoproteínas (4.6% del proteoma predicho), 14 de ellas no identificadas en el estudio de Wasinger *et al.* Además, hay una tesis doctoral (2005), titulada: Análisis de los proteomas de dos micoplasmas: *Mycoplasma penetrans* y *Mycoplasma genitalium* [99], desarrollada por Mario Ferrer Navarro, miembro del grupo y actual codirector de esta tesis. En este trabajo de tesis doctoral se analizó el proteoma de *Mycoplasma genitalium* mediante geles bidimensionales utilizando gradientes estrechos de pH para poder identificar nuevas proteínas así como isoformas. Si bien se encontraron tan sólo 8 proteínas no identificadas en los trabajos previos, si se aportó mucha información sobre las diferentes isoformas proteicas presentes en el proteoma de *M. genitalium*. Combinando las proteínas identificadas en estos tres estudios, en el momento de realizar este trabajo, 111 proteínas (23.4 % del proteoma total) de *Mycoplasma genitalium* habían sido identificadas mediante técnicas proteómicas.

IV.A.1. Identificación del proteoma total en medio SP4

Debido al bajo número de proteínas identificadas mediante la combinación de la electroforesis bidimensional y la espectrometría de masas del tipo MALDI-TOF en *Mycoplasma genitalium* y teniendo en cuenta que sólo el 23.4% del proteoma predicho se había identificado en los trabajos de Wasinger, Su y Ferrer-Navarro, se planteó la posibilidad de abordar la identificación del proteoma mediante otra técnica. Para la identificación de nuevas proteínas se utilizó la técnica descrita por Shevchenko *et al.* [63], conocida como GeLC-MS (Gel electrophoresis, Liquid Chromatography - Mass spectrometry). Se eligió esta metodología para evitar la utilización de los geles 2D, ya que ésta había sido la técnica de elección en los estudios anteriores. Al utilizar otra metodología, se aumentan las posibilidades de incrementar el número de proteínas identificadas. Aún y la gran utilidad demostrada en los últimos años de los geles bidimensionales, cabe remarcar algunos inconvenientes que muestran; como es la tendencia de las proteínas hidrofóbicas a precipitar o el mal enfoque que presentan las proteínas más básicas. Por otra parte, sus grandes ventajas son que se obtiene una imagen global de la muestra así como también se obtiene información acerca de la presencia de isoformas, modificaciones post-traduccionales o también se obtiene información acerca del pI y masa molecular experimental de cada spot. El principal problema observado en el uso de geles bidimensionales en extractos de *Mycoplasma genitalium* es el bajo número de

identificaciones, aún y observarse muestras relativamente complejas en los geles bidimensionales, sólo pudo identificar el 23.4% del proteoma total predicho. Debido a los inconvenientes que tiene la electroforesis bidimensional, se decidió utilizar en este trabajo una técnica alternativa para la identificación de proteínas en extractos de *Mycoplasma genitalium*. Para este objetivo se escogió la técnica GeLCMS la cual permite, con relativa rapidez, una sensibilidad importante en el análisis de los extractos. Esta técnica está basada en la separación de los extractos proteicos mediante un SDS-PAGE monodimensional y posteriormente una digestión triptica en gel. Para no obtener muestras excesivamente complejas, el carril en el que se ha separado la muestra es dividido en 10 bandas y cada una es digerida con tripsina individualmente. Estos digeridos son separados mediante cromatografía de fase reversa C18, en un nanoHPLC y posteriormente la identificación de los péptidos obtenidos se realiza mediante espectrometría de masas, generalmente utilizando la metodología basada en la ionización por electrospray. Esta técnica fue bautizada como GeLCMS y fue desarrollada por Shevchenko [63]. Los principales detalles de dicha técnica se muestran en la figura IV.1. Con esta técnica se obtienen muy buenos resultados en cuanto a identificación de proteínas y cobertura en tanto por cierto de los proteomas, pero también presenta una serie de inconvenientes. A diferencia de los geles bidimensionales, utilizando esta metodología se pierde información acerca de las isoformas que pueda presentar una misma proteína así como también el peso molecular y el punto isoelectrico. Las PTM pueden ser estudiadas mediante la técnica GeLCMS siempre y cuando se quiera obtener esta información, ya que la trampa iónica utilizada permite la obtención de esta información.

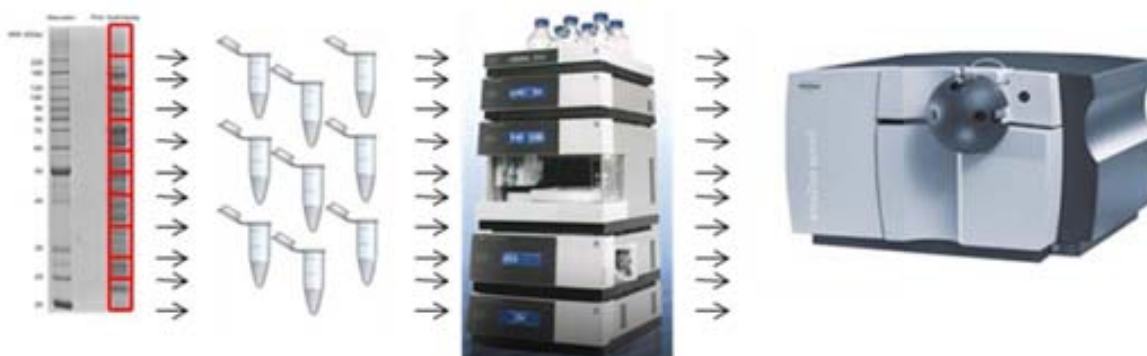


Fig.IV.1. Esquema del proceso global de la técnica GeLCMS.

Después de valorar los pros y los contra, se decidió analizar el proteoma total de *Mycoplasma genitalium* cultivado en medio SP4, medio rico, medio recomendado por la ATCC ya que es en el que se obtiene una mayor biomasa. El objetivo ha sido el análisis de extractos de *Mycoplasma genitalium* obtenidos mediante dos protocolos diferentes: extracción de proteína

total y marcaje de las proteínas mediante biotina para una posterior captura en columnas con estreptavidina inmovilizada [85], a pesar de que este protocolo estaba inicialmente pensado para la identificación de proteínas de superficie. Ambos extractos han sido identificados posteriormente mediante GeLCMS.

IV.A.1.1. Identificación del proteoma total cultivado en medio SP4

Para poder identificar el mayor número de proteínas en *Mycoplasma genitalium* se obtuvo un extracto proteico total. Esta muestra es obtenida al resuspender con tampón de carga el pellet de células de *Mycoplasma genitalium*, previamente lavadas. Esta muestra fue analizada mediante la técnica GeLCMS. Consideramos que esta técnica nos permitiría la identificación de un mayor número de proteínas ya que las células son lisadas mediante ultrasonidos y las proteínas son solubilizadas utilizando una disolución que contiene un detergente y un agente reductor. El detergente utilizado es un detergente iónico que presenta una gran capacidad solubilizadora. Este detergente es el SDS (Sodium Dodecyl Sulphate). Este detergente no es compatible con la electroforesis bidimensional ya que es un detergente iónico que al unirse a las proteínas provocaría una modificación en el punto isoeléctrico, y consecuentemente modificaría la movilidad electroforética en la primera dimensión, la separación por punto isoeléctrico. Este detalle en el procesamiento de la muestra, que puede parecer insignificante hace posible que haya un mayor número de proteínas solubles para su posterior identificación ya que de otra forma proteínas extremadamente hidrofóbicas, como pueden ser las integrales de membrana, quedaría precipitadas con restos de membrana y no sería posible su identificación.

El patrón obtenido de la muestra al ser separada en un SDS-PAGE al 12% se muestra en la figura IV.2.

Utilizando la metodología comentada previamente, se pudo identificar un total de 269 proteínas (Tabla 1, anexo), alcanzando la cifra del 56.6% de identificación del proteoma total predicho. Esta cifra difícilmente podría llegar al 100% de identificaciones ni en el caso de una célula tan simple, ya que como definió Wilkins en 1994 [25]: “ El proteoma es una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas por un organismo, célula, o compartimento subcelular concreto en un momento dado y bajo determinadas condiciones, constituyendo el mapa de expresión proteica de una célula, tejido u organismo dado”. Aún y haber identificado

el 56.6% de las proteínas predichas codificadas en el genoma de esta bacteria, quedan muchas secuencias codificantes para las que validar su producto proteico.

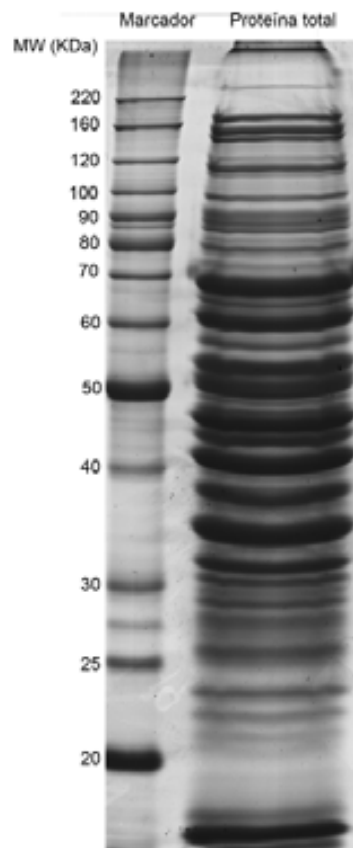


Fig.IV.2. Separación de un extracto proteico total mediante SDS-PAGE de *M. genitalium* cultivado en SP4.

Las proteínas identificadas se agruparon según la clasificación COG [100], Tabla IV.1, que permite una clasificación de las proteínas según su función dentro de la maquinaria celular. Se identificaron proteínas que pertenecían a diecinueve de las veinte categorías COG existentes.

La única categoría en la que no se identificó ninguna proteína fue la categoría COG Q (biosíntesis transporte y metabolismo de metabolitos secundarios) grupo formado por una única proteína predicha, MG287, proteína portadora de grupos acilo. Esta proteína ha sido clasificada en la categoría COG Q (Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo) y en la COG I (Transporte y metabolismo de lípidos).

Tabla. IV. 1. Tabla de la clasificación COG de las proteínas identificadas en el proteoma total de *M. genitalium* cultivado en medio SP4.

| Letra | Categoría | Estimadas | Identificadas | % * |
|-------|--|-----------|---------------|------|
| C | Conversión y producción de energía | 21 | 15 | 5.5 |
| D | Control ciclo celular, división celular y partición cromosoma | 5 | 2 | 0.7 |
| E | Transporte y metabolismo de aminoácidos | 20 | 4 | 1.5 |
| F | Transporte y metabolismo de nucleótidos | 21 | 15 | 5.5 |
| G | Transporte y metabolismo de carbohidratos | 32 | 19 | 7 |
| H | Transporte y metabolismo de coenzimas | 16 | 5 | 1.8 |
| I | Transporte y metabolismo de lípidos | 9 | 5 | 1.8 |
| J | Traducción, biogénesis y estructura ribosomal | 106 | 80 | 29.4 |
| K | Transcripción | 18 | 10 | 3.7 |
| L | Replicación, recombinación y reparación | 43 | 12 | 4.4 |
| M | Pared celular, membrana y biogénesis de envoltorios | 12 | 5 | 1.8 |
| O | Modificaciones post-traduccionales, plegamiento proteínas y chaperonas | 21 | 18 | 6.6 |
| P | Transporte y metabolismo de iones inorgánicos | 23 | 5 | 1.8 |
| Q | Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo | 1 | 0 | 0 |
| R | Predicción función general | 44 | 22 | 8.1 |
| S | Función desconocida | 15 | 8 | 2.9 |
| T | Mecanismos de transducción de señales | 5 | 1 | 0.4 |
| U | Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular | 7 | 1 | 0.4 |
| V | Mecanismos de defensa | 8 | 2 | 0.7 |
| - | No COG | 110 | 43 | 15.8 |

* % de las proteínas identificadas respecto del total identificado.

Una vez clasificadas todas las proteínas por su categoría COG, se realizaron dos tipos de gráficos para poder representar y analizar visualmente los resultados. En primer lugar se calculó la abundancia de cada categoría COG respecto el número total de proteínas identificadas. A continuación se muestra en la figura IV.3 la representación de la abundancia de cada categoría COG respecto el total identificado.

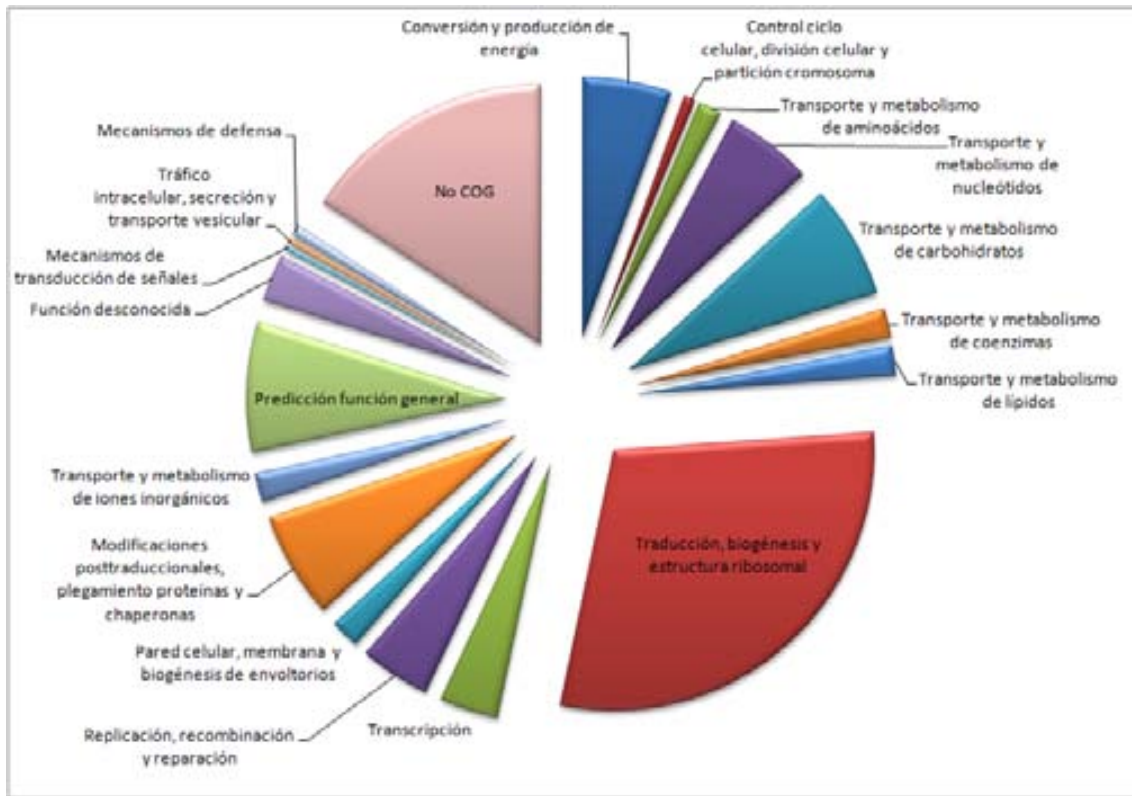


Fig.IV.3. Representación de la abundancia de proteínas identificadas de cada categoría COG del proteoma total de *M. genitalium* cultivado en medio SP4.

En segundo lugar, se calculó el número de proteínas identificadas en cada categoría COG respecto al total que hay predichas en cada una de las categorías, obteniéndose la gráfica mostrada en la figura IV.4. Para poder realizar este gráfico se tuvo que clasificar también el listado total de proteínas predichas. De esta manera se pudo evaluar que categorías estaban más representadas en la muestra proteica total.

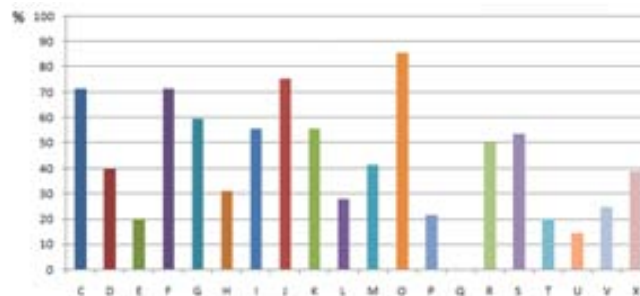


Fig.IV.4. Representación del tanto por ciento de identificaciones de cada categoría COG del proteoma total de *M. genitalium* cultivado en medio SP4.

Las categorías con el mayor número de proteínas identificadas respecto al total estimado son:

- Modificaciones post-traduccionales, plegamiento de proteínas y chaperonas (COG O):85.7%.
- Traducción, biogénesis y estructura ribosomal (COG J): 75.5%.

Por contrapartida, las categorías con menos proteínas identificadas respecto al total estimado son:

- Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular (COG U): 14.3%.
- Transporte y metabolismo de aminoácidos (COG E): 20%.
- Mecanismos de transducción de señales (COG T): 20%.

Un resultado a destacar, es que 73 proteínas de las 269 identificadas (26.8 %) son proteínas sin categoría COG asignada o pertenecientes a la categoría COG R (Predicción función general) o a la categoría COG S (sin función asignada) lo que implica un gran desconocimiento de la bioquímica básica de la maquinaria celular de este microorganismo. Lo más llamativo es que este grupo, sin función asignada, es el segundo más abundante después de la categoría COG J (Traducción, biogénesis y estructura ribosomal) con 80 proteínas identificadas. Este resultado nos hace reflexionar acerca del trabajo que aún queda por realizar en esta bacteria, aún y estar considerada como uno de los microorganismos con la organización molecular más sencilla.

Otro resultado obtenido que merece ser destacado es la identificación de la proteína codificada por el gen MG333, considerado como pseudogen. Hacer realizar el Blast de su secuencia sobre el genoma de *Mycoplasma pneumoniae* se obtiene una gran identidad con el gen que codifica para la proteína fosfodiesterasa portadora de grupos acil. Gracias a esta identificación se corrobora la existencia del producto de este gen, considerado como pseudogen.

Aparte de la demostración de la expresión del producto de un gen anotado como pseudogen, también se ha identificado una nueva proteína no identificada previamente en el genoma. Esta proteína fue identificada como proteína no caracterizada MPN687 del microorganismo *Mycoplasma pneumoniae*, bacteria muy cercana, filogenéticamente hablando, a *Mycoplasma genitalium*. Esta proteína no tiene ninguna función asignada ni se le ha podido predecir ningún dominio mediante el programa Pfam [92], pero sí que se ha predicho un dominio utilizando el programa de predicción ByPass [93]. Dicho programa ha predicho un dominio WD-40 repeat family protein. Este dominio está relacionado con la transducción de señales, control del ciclo

celular mediante regulación de la transcripción, autofagia y apoptosis. Se realizó una búsqueda exhaustiva en el genoma de *Mycoplasma genitalium* y se encontró que esta proteína coincide con la región intergénica entre los genes MG469 y MG470. Dicho gen se encuentra en antisentido y abarca desde de la base 579234 a la base 578581, donde se encuentra el codón UGA de Stop. Dicha secuencia en el genoma esta anotada como MgenG_00050 y la referencia que tiene asignada en el NCBI es ZP_05405437.1.

IV.A.1.2. Identificación del proteoma total cultivado en medio SP4 mediante el marcaje con biotina.

Uno de los protocolos para el marcaje selectivo de las regiones expuestas en la membrana es la utilización de la biotina. En estos protocolos, se añade al cultivo celular biotina, la cual se une exclusivamente a las amidas de las proteínas expuestas en la superficie celular. Posteriormente se realiza el lisado celular y las proteínas biotiniladas de dichos lisados son capturadas en columnas con estreptavidina inmovilizada. Después de realizar unos lavados en las columnas, las proteínas retenidas, es decir, las proteínas biotiniladas son eluidas. La identificación de las proteínas presentes en estos eluidos se puede realizar mediante la técnica GeLCMS. En la figura IV.5 se muestra el esquema de dicho proceso.

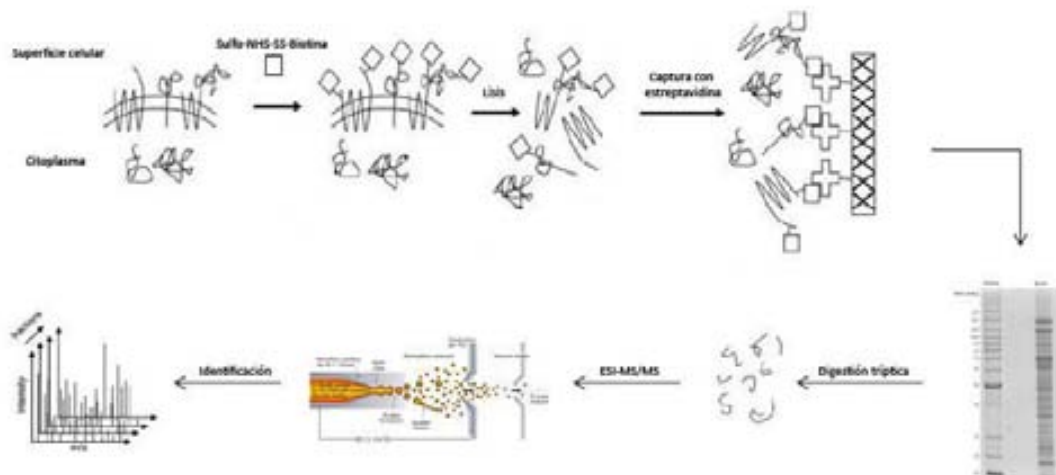


Fig.IV.5. Esquema del proceso de identificación de proteínas marcadas mediante biotina.

En la mayoría de los tipos celulares, este protocolo sirve para el marcaje selectivo de proteínas con regiones expuestas en la membrana [101, 102]. En el caso de la bacteria de estudio en el presente trabajo, *M. genitalium*, no sirve para este propósito, ya que se ha observado que este compuesto es internalizado en la célula resultando en el marcaje de todas las proteínas. Este

fenómeno que ha sido observado, en el caso de *Mycoplasma genitalium*, puede ser debido a la elevada presencia en la membrana plasmática de esta bacteria de canales, poros y transportadores.

La muestra obtenida, tras el marcaje y posterior purificación, fue separada en un SDS-PAGE al 10% y el patrón obtenido es el que se muestra en la figura IV.6.

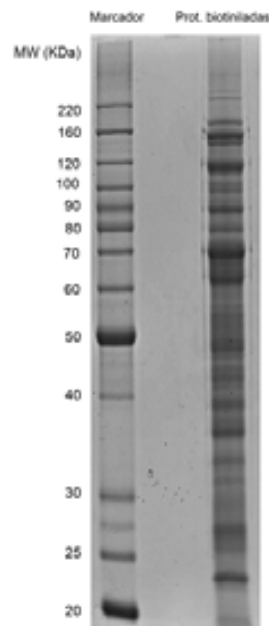


Fig. IV.6. SDS-PAGE de la muestra obtenida tras el marcaje con biotina de *M. genitalium* cultivado en medio SP4.

Los eluidos obtenidos en el marcaje con biotina fueron analizados mediante la técnica GeLCMS identificándose un total de 368 proteínas (Tabla 2, anexo), alcanzando la cifra del 77.5% de identificación del proteoma total. Sorprendentemente, como ya se ha comentado previamente, todas las proteínas fueron marcadas (no únicamente las expuestas en la membrana) lo que sugiere que el compuesto ha sido internalizado debido a la existencia de un elevado número de poros, canales y transportadores. El aumento en el número de identificaciones puede ser debido a una mayor pureza de la muestra, ya que el paso de purificación en columna elimina efectivamente contaminantes que podrían interferir en la posterior identificación por espectrometría de masas.

Las proteínas identificadas se agruparon según la clasificación COG [100], Tabla.IV.2. Se identificaron proteínas de diecinueve de las veinte categorías COG existentes. En este caso tampoco se identificó la única proteína perteneciente a la categoría COG Q.

Tabla. IV. 2. Tabla de la clasificación en categorías COG de las proteínas identificadas en el ensayo de marcaje con biotina de *M. genitalium* cultivado en medio SP4.

| Letra | Categoría | Estimadas | Identificadas | % * |
|-------|--|-----------|---------------|------|
| C | Conversión y producción de energía | 21 | 18 | 4.7 |
| D | Control ciclo celular, división celular y partición cromosoma | 5 | 3 | 0.8 |
| E | Transporte y metabolismo de aminoácidos | 20 | 13 | 3.4 |
| F | Transporte y metabolismo de nucleótidos | 21 | 20 | 5.2 |
| G | Transporte y metabolismo de carbohidratos | 32 | 23 | 6 |
| H | Transporte y metabolismo de coenzimas | 16 | 11 | 2.8 |
| I | Transporte y metabolismo de lípidos | 9 | 5 | 1.3 |
| J | Traducción, biogénesis y estructura ribosomal | 106 | 78 | 20.2 |
| K | Transcripción | 18 | 17 | 4.4 |
| L | Replicación, recombinación y reparación | 43 | 26 | 6.7 |
| M | Pared celular, membrana y biogénesis de envoltorios | 12 | 9 | 2.3 |
| O | Modificaciones post-traduccionales, plegamiento proteínas y chaperonas | 21 | 20 | 5.2 |
| P | Transporte y metabolismo de iones inorgánicos | 23 | 17 | 4.4 |
| Q | Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo | 1 | 0 | 0 |
| R | Predicción función general | 44 | 37 | 9.6 |
| S | Función desconocida | 15 | 8 | 2.1 |
| T | Mecanismos de transducción de señales | 5 | 4 | 1 |
| U | Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular | 7 | 6 | 1.6 |
| V | Mecanismos de defensa | 8 | 6 | 1.6 |
| - | No COG | 110 | 65 | 16.8 |

* % de las proteínas identificadas respecto del total identificado.

Una vez clasificadas todas las proteínas según su categoría COG, se realizaron, como en el caso anterior, los dos gráficos (fig.IV.7 y fig.IV.8) para poder representar y analizar visualmente los resultados.

Las categorías con el mayor número de proteínas identificadas respecto al total estimado son:

- Transporte y metabolismo de nucleótidos (COG F): 95.2%.
- Modificaciones post-traduccionales, plegamiento proteínas y chaperonas (COG O): 95.2%.
- Transcripción (COG K): 94.4%.

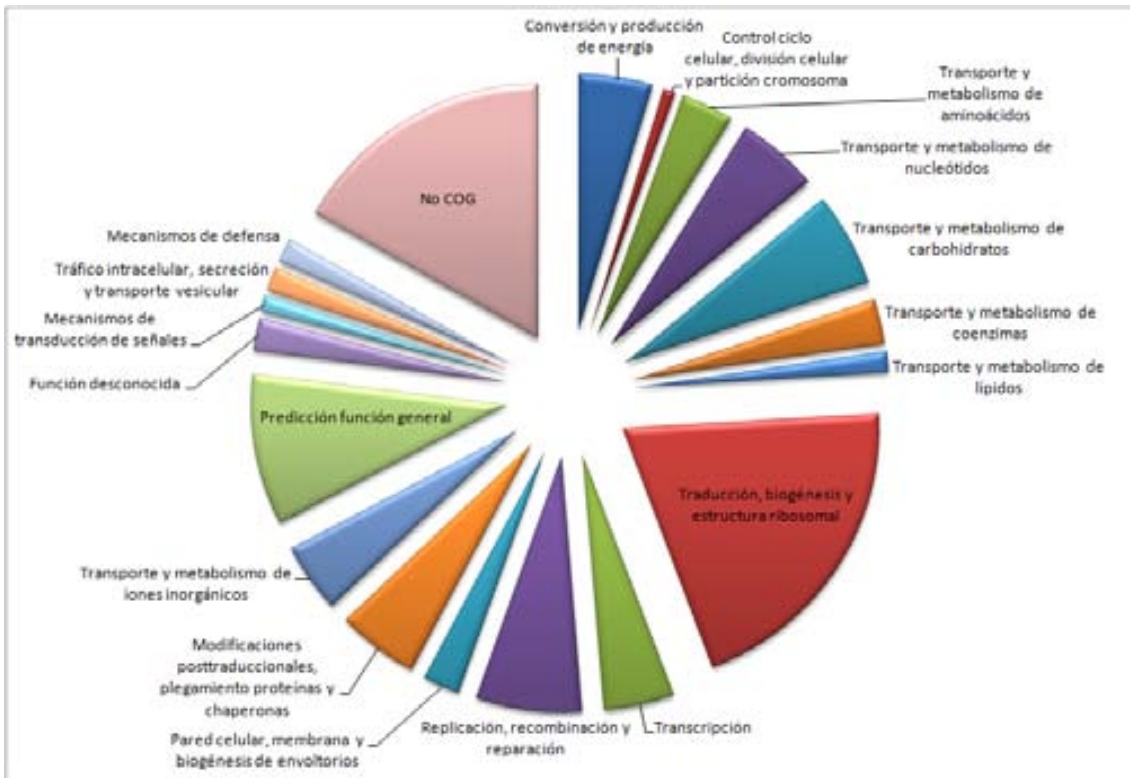


Fig.IV.7. Representación de la abundancia de proteínas identificadas de cada categoría COG respecto al total identificado en el ensayo de marcaje con biotina de *M. genitalium* cultivado en medio SP4.

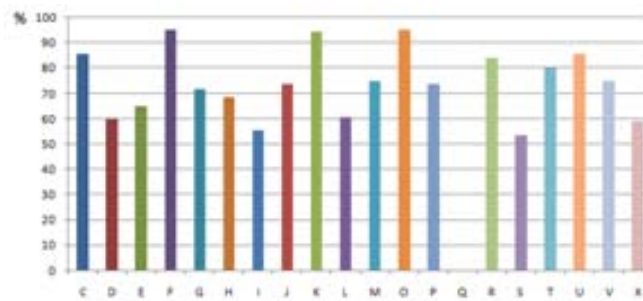


Fig.IV.8. Representación del tanto por ciento de identificaciones del total de cada categoría COG en el ensayo de marcaje con biotina de *M. genitalium* cultivado en medio SP4.

Por contrapartida, las categorías con menos proteínas identificadas respecto al total estimado son:

- Función desconocida (COG S): 53.3%.
- Transporte y metabolismo de lípidos (COG I): 55.6%.

Gracias a esta metodología se pudo confirmar la existencia de la proteína codificada por el gen MG199, anotado como pseudogen. La secuencia fue comparada en el Blast y se encontró gran identidad con el MPN118, ribonucleasa HII de *Mycoplasma pneumoniae*. Además, gracias a la aplicación de esta tecnología se han podido identificar las tres glicosiltransferasas para las que codifica *Mycoplasma genitalium*. Estas tres glicosiltransferasas son el MG025, MG060 y MG335.2, cuyas proteínas no fueron identificadas en el capítulo anterior. La función glicosiltransferasa de la primera de ellas, MG025, ha sido confirmada experimentalmente por el grupo del Dr. Planas [103].

De las 368 proteínas identificadas, 110 (29.9 %) son proteínas sin categoría COG asignada o pertenecientes a la categoría COG R (Predicción función general) o a la categoría COG S (sin función asignada) lo que vuelve a poner de manifiesto la falta de conocimiento sobre maquinaria celular de este microorganismo. Lo más llamativo es que este grupo, sin una función asignada, fue el más abundante, lo que corrobora el resultado obtenido en el experimento anterior, acerca de la información que aún falta por desvelar acerca de este microorganismo.

En paralelo a este experimento se realizó un control, para validar que las proteínas observadas eran producto de la biotinylation por el compuesto añadido y no debido a procesos de biotinylation propios de la célula. La muestra de proteína total sin el marcaje con biotina fue incubada en una columna de estreptavidina. El eluido obtenido se separó en un gel SDS-PAGE al 12% en el que sólo se observó una banda, figura IV.9.

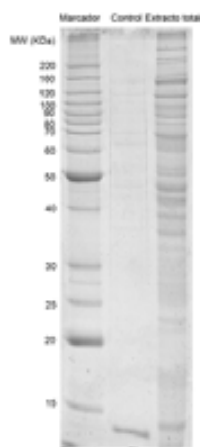


Fig.IV.9. SDS-PAGE del control de marcaje de biotina.

La única banda observada fue recortada, digerida con tripsina e identificada mediante espectrometría de masas como estreptavidina. Gracias a este protocolo no sólo se corrobora que el protocolo utilizado funciona bien, sino que además se demuestra que bajo estas condiciones en *Mycoplasma genitalium* no se producen procesos de biotinización. A pesar de ser un protocolo que ha surgido como consecuencia de un evento no esperado, creemos que esta metodología podría ser muy útil, para otros microorganismos capaces de internalizar la biotina, para ampliar la cobertura de los proteomas de dichos microorganismo, ya que la muestra obtenida resulta muy limpia y se aumenta de forma considerable el número de identificaciones.

Combinando los resultados de los dos experimentos ya explicados, se consiguió la identificación de 381 proteínas distintas del proteoma total, correspondiente al 80.2%. Este dato no es sólo una aproximación experimental del proteoma de *Mycoplasma genitalium* crecido en SP4, sino que también servirá de referencia para futuros experimentos de fraccionamiento o subproteomas.

IV.A.2. Identificación del proteoma total cultivado en medio mínimo MM14

Los resultados obtenidos en el anterior apartado “IV.A.1. Resultados y discusión” han permitido extender el proteoma identificado de *Mycoplasma genitalium* al 80.2%. Debido a que el proteoma identificado es una imagen de las proteínas expresadas en esta bacteria en un momento dado y bajo unas condiciones determinadas, si queremos aumentar el número de identificaciones, debemos modificar las condiciones. Para intentar abordar esta cuestión, se diseñó un experimento en el que se cultivó *Mycoplasma genitalium* en un medio mínimo y definido, el medio MM14. Como se ha indicado en el apartado de materiales y métodos, este medio contiene unos 30 compuestos diferentes, así que el concepto de medio mínimo es discutible, pero tiene la ventaja de que este medio viene definido en cuanto a la presencia y concentración de compuestos. A pesar de ser un medio definido, al tener tantos compuestos que forman parte de su formulación, su preparación es tediosa, ya que se deben pesar y preparar todos los componentes básicos, que una bacteria necesita para su viabilidad por separado, de forma estéril e ir realizando la mezcla siguiendo un orden determinado para evitar procesos de precipitación no deseados. Los componentes de este medio que más problemas generaron fueron los lípidos, ya que deben disolverse en un portador (BSA deslipidada) y posteriormente añadirlos muy lentamente al medio.

Analizar el proteoma presente en estas condiciones puede servir para ampliar el número de identificaciones y también para definir el proteoma expresado por este microorganismo en condiciones metabólicamente restrictivas. Esta nueva condición, restrictividad metabólica, puede servir para validar que proteínas son indispensables para la supervivencia de dicha bacteria. En un trabajo publicado en el año 1999 por Hutchinson *et al.* [98] se estimó que entre 265 y 350 genes son esenciales para dicho microorganismo. Según estos resultados, de los 381 ORFs identificados en el trabajo aquí presentado, ¿cuales son realmente indispensables para la supervivencia del microorganismo? El cultivo de *Mycoplasma genitalium* en el medio restrictivo MM14, quizás pueda darnos unas guías sobre esta cuestión.

Para asegurar que las proteínas identificadas son realmente el resultado del cultivo de esta bacteria en el medio mínimo, se realizaron dos pases consecutivos en MM14. Se realizaron estos dos pases ya que en el primero se realizó el inóculo a partir de un stock de células de *M. genitalium* en medio SP4, por lo que en pase 1 habrá una relativa presencia de componentes del medio SP4, tales como el suero bovino fetal o el extracto de levadura. El segundo pase se realizó a partir de las células obtenidas en el pase 1, lavadas con MM14 y resuspendidas en el

mismo medio, de tal manera que no se incorporan componentes del medio SP4 al segundo pase.

La primera observación que se realizó es que al cultivar esta bacteria en medio mínimo este microorganismo tardó aproximadamente 336 horas (14 días) en alcanzar la fase exponencial, mientras que en medio SP4 se alcanza este punto a las 96 horas (4 días) de realizar el inóculo. Además, también se observaron otros cambios en *M. genitalium* cultivado en MM14 respecto al cultivado en SP4. Curiosamente *M. genitalium* cultivado en MM14 no presentaba adherencia a la superficie del frasco de cultivo pero si se observó la presencia de agregados visibles a simple vista flotando en el medio de cultivo MM14. Este fenotipo sólo se observó en el Pase 2. Estas diferencias podrían ser debidas a que en pase 1 las células estarían adaptándose al medio MM14 mientras que en el pase 2 ya estarían completamente adaptadas.

Aún y haber demostrado en el capítulo anterior que la mejor técnica para la identificación del proteoma total es el marcaje con biotina, en este capítulo no se pudo utilizar esta técnica ya que, como se ha comentado con anterioridad *M. genitalium* en el pase 2 en el medio MM14 forma agregados, por lo que el marcaje no sería óptimo. Por este motivo se procesó la muestra de los dos pases de la misma manera para obtener resultados comparables, por lo que se realizó la solubilización de los pellets mediante la adición tampón de carga tal y como se detalla en la sección correspondiente de materiales y métodos.

IV.A.2.1. Identificación del proteoma total cultivado en medio mínimo: Pase 1

Pasados 14 días de cultivo de *M genitalium* en medio mínimo, la muestra proteica obtenida se separó en un gel de poliacrilamida al 12%. A continuación se muestra en la figura IV.10 la imagen obtenida al teñir el gel con Coomassie Brilliant Blue R-250.

En este caso las proteínas identificadas fueron 305, las cuales se agruparon también según la clasificación COG [100] (Tabla. IV.3). Se identificaron proteínas de diecinueve de las veinte categorías COG existentes. En este caso tampoco se identificó la única proteína de la categoría COG Q.

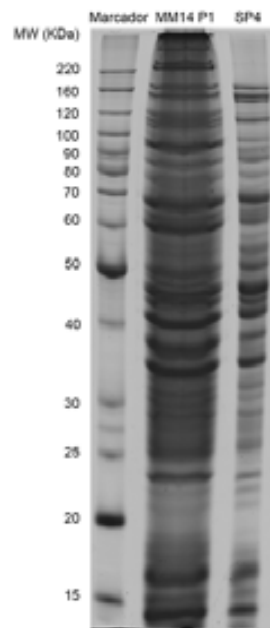


Fig. IV.10. SDS-PAGE del proteoma total de *M. genitalium* cultivado en medio MM14 Pase 1.

Tabla. IV. 3. Tabla de la clasificación en categorías COG de las proteínas identificadas en el ensayo de cultivo de *M. genitalium* en medio MM14 Pase 1.

| Letra | Categoría | Estimadas | Identificadas | % * |
|-------|--|-----------|---------------|------|
| C | Conversión y producción de energía | 21 | 15 | 4.7 |
| D | Control ciclo celular, división celular y partición cromosoma | 5 | 2 | 0.6 |
| E | Transporte y metabolismo de aminoácidos | 20 | 12 | 3.8 |
| F | Transporte y metabolismo de nucleótidos | 21 | 20 | 6.3 |
| G | Transporte y metabolismo de carbohidratos | 32 | 20 | 6.3 |
| H | Transporte y metabolismo de coenzimas | 16 | 8 | 2.5 |
| I | Transporte y metabolismo de lípidos | 9 | 5 | 1.6 |
| J | Traducción, biogénesis y estructura ribosomal | 106 | 74 | 23.2 |
| K | Transcripción | 18 | 13 | 4.1 |
| L | Replicación, recombinación y reparación | 43 | 19 | 6 |
| M | Pared celular, membrana y biogénesis de envoltorios | 12 | 4 | 1.3 |
| O | Modificaciones post-traduccionales, plegamiento proteínas y chaperonas | 21 | 19 | 6 |
| P | Transporte y metabolismo de iones inorgánicos | 23 | 13 | 4.1 |
| Q | Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo | 1 | 0 | 0 |
| R | Predicción función general | 44 | 21 | 6.6 |
| S | Función desconocida | 15 | 7 | 2.2 |
| T | Mecanismos de transducción de señales | 5 | 1 | 0.3 |
| U | Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular | 7 | 3 | 0.9 |
| V | Mecanismos de defensa | 8 | 3 | 0.9 |
| - | No COG | 110 | 60 | 18.8 |

* % de las proteínas identificadas respecto del total identificado.

La representación de los datos obtenidos se ha realizado siguiendo el mismo proceso que en los casos anteriores para poder observar las abundancias de cada categoría COG (fig.IV.11 y fig.IV.12).

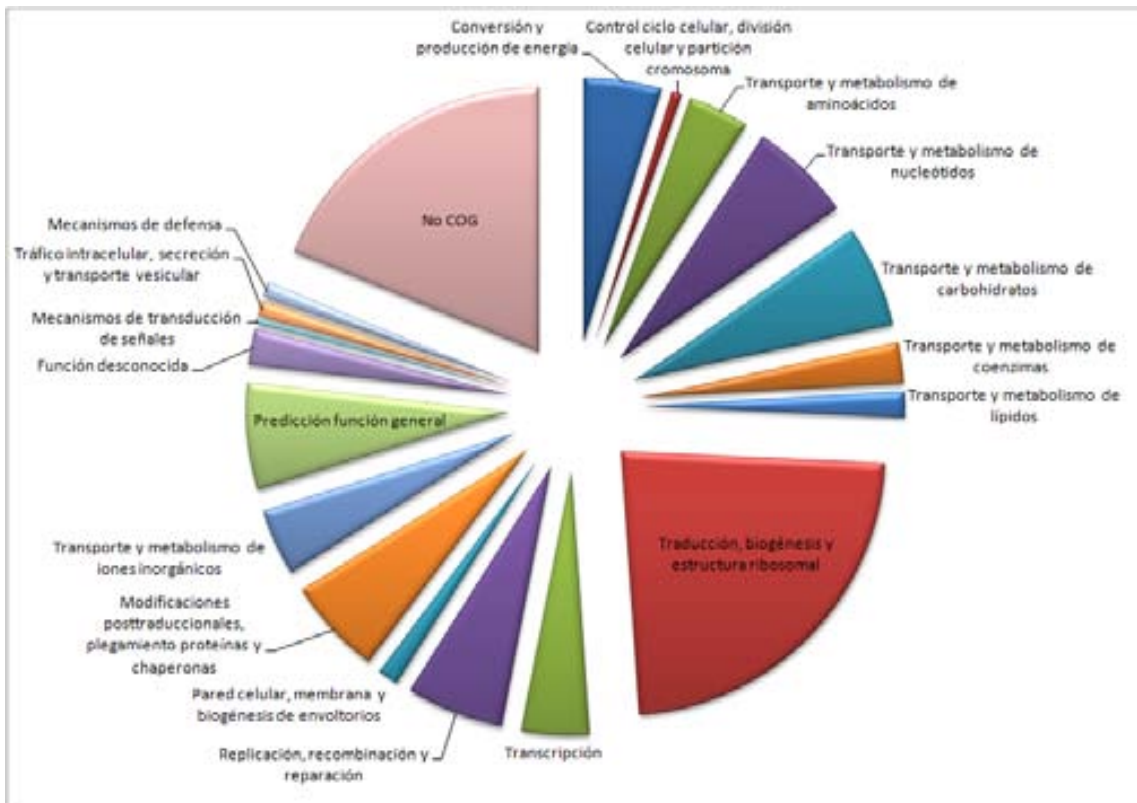


Fig.IV.11. Representación de la abundancia de proteínas identificadas de cada categoría COG respecto el total identificado en el ensayo de cultivo de *M. genitalium* en medio MM14 Pase 1.

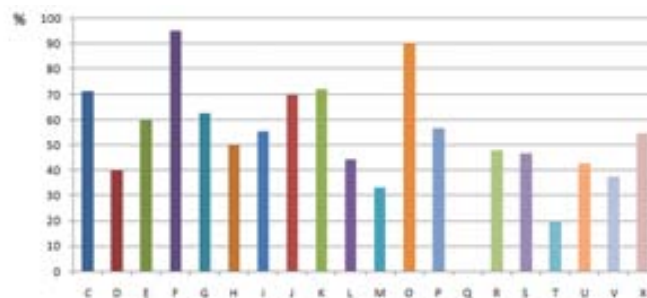


Fig.IV.12. Representación del tanto por ciento de identificaciones de cada categoría COG en el ensayo de cultivo de *M. genitalium* en medio MM14 Pase 1.

De nuevo, un 27.6% (88 proteínas) de las proteínas identificadas no tenían una función asignada (COG R, COG S y sin COG), siendo el grupo formado por estas tres categorías el más abundante.

Las categorías con el mayor número de proteínas identificadas respecto al total estimado para cada categoría son:

- Transporte y metabolismo de nucleótidos (COG F): 95.2%.
- Modificaciones post-traduccionales, plegamiento proteínas y chaperonas (COG O): 90.5%.
- Transcripción (COG K): 72.2%.

Por contrapartida, las categorías con menos proteínas identificadas respecto al total estimado son:

- Mecanismos de transducción de señales (COG T): 20%.
- Pared celular, membrana y biogénesis de envoltorios (COG M): 33.3%.
- Mecanismos de defensa (COG V): 37.5%.

Como se ha comentado anteriormente, aún y haberse identificado el 80.2% del proteoma predicho en células de *M. genitalium* cultivadas en SP4, este tanto por ciento nunca podrá ser del cien por cien. Esto es debido, muy probablemente, a que muchas de las proteínas no identificadas se expresaran bajo unas determinadas condiciones ambientales o en unos estadios concretos del ciclo celular. En este experimento, al crecer las células en unas condiciones diferentes, se observó un patrón proteico diferencial. Se observó que había 6 proteínas que fueron identificadas en el Pase 1 de MM14, mientras que éstas no fueron identificadas en el análisis realizado en medio de cultivo SP4. Estas proteínas son: MG032, MG068, MG098, MG123, MG437 y MG470.

La proteína MG437 es una tRNA (guanina) metiltransferasa. La función del MG470 se ha predicho mediante el programa ByPass y se ha obtenido la predicción de función de unión a nucleótido CobQ/CobB/MinD/ParA. Las proteínas MG032, MG068, MG098 y el MG123 son proteínas no caracterizadas, por lo que se utilizó el programa Pfam [92] para poder predecir algún dominio y así predecir alguna característica de dichas proteínas. Respecto a la proteína MG098 se encontró un dominio tipo subunidad C Glu-tRNAGln amidotransferasa abarcando los aminoácidos de 405 al 477. Para la proteína MG032 se predijo 2 dominios DUF (Domain of unknown function) entre los aminoácidos 211-328 y 468-621. Para la proteína MG068 se

predijo únicamente un dominio también DUF, pero en este caso es un posible dominio peptidasa que comprende un fragmento de la proteína entre el residuo aminoacídico 48 al 383. Por el contrario, en el caso del MG123 no se pudo predecir ningún dominio.

IV.A.2.2. Identificación del proteoma total cultivado en medio mínimo: Pase 2

Mycoplasma genitalium cultivado en MM14 presenta un fenotipo diferente en el Pase 2, por lo que es interesante identificar el proteoma en estas condiciones. Estas diferencias, observables a simple vista, residen básicamente en su capacidad de adherencia ya que este microorganismo pasa a formar agregados no adherentes a la superficie del frasco de cultivo. Estas diferencias entre pase 1 y 2, podrían ser debidas, como ya se ha comentado, a que en el pase 1 se parte de un inóculo crecido en medio SP4 por lo que podría estar adaptándose al nuevo medio de cultivo, el MM14, pero aún con la presencia de componentes complejos como el suero, el extracto de levadura o el CMRL. En el pase 2, en el que ya no hay componentes del medio SP4, ya estaría adaptado al medio. Por este motivo se decidió estudiar el proteoma de este microorganismo en dichas condiciones. La técnica de procesamiento de la muestra y el análisis de los resultados se llevaron a cabo de la misma manera que en el Pase 1.

El SDS-PAGE obtenido al cargar la muestra de *Mycoplasma genitalium* cultivado en MM14 pase 2 se muestra en la figura IV.13.

Para poder identificar las proteínas presentes en la muestra proteica, se escindió el carril y se analizó mediante GeLCMS identificando 192 proteínas (Tabla 4, anexo), correspondientes al 40.4% del proteoma total predicho. Este número fue muy inferior a las 381 proteínas identificadas en el experimento en el que la bacteria fue cultivada en medio SP4 y también a las 305 proteínas identificadas en el pase 1, utilizando en ambos los casos la misma metodología.

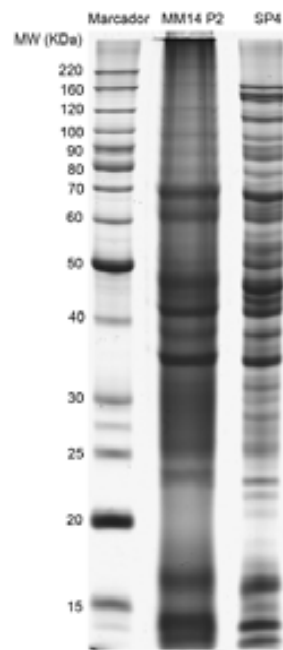


Fig. IV.13. SDS-PAGE del proteoma total de *M. genitalium* cultivado en medio MM14 Pase 2.

Para poder analizar el listado de resultados obtenidos, las proteínas se clasificaron según la clasificación COG, Tabla IV.4. En este caso, no se identificó ninguna proteína perteneciente a dos grupos COG: COG Q (Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo) y COG T (Mecanismos de transducción de señales). De esta última categoría, en pase 1 sólo se identificó una proteína MG085, HPr quinasa/fosforilasa. Esta proteína está implicada en la fosforilación/desfosforilación de la proteína fosfotransportadora (HPr), la cual forma parte del complejo PTS (sistema fosfotransferasa para azúcares) que permite la translocación de azúcares, la regulación de rutas metabólicas y de señalización en las células bacterianas.

En este capítulo, se realizaron también los dos tipos de gráficos utilizados previamente para la visualización de los resultados obtenidos (fig.IV.14 y fig.IV.15).

Tabla. IV. 14. Tabla de la clasificación en categorías COG de las proteínas identificadas en el ensayo de cultivo de *M. genitalium* en medio MM14 Pase 2.

| Letra | Categoría | Estimadas | Identificadas | % * |
|-------|--|-----------|---------------|------|
| C | Conversión y producción de energía | 21 | 15 | 7.6 |
| D | Control ciclo celular, división celular y partición cromosoma | 5 | 2 | 1 |
| E | Transporte y metabolismo de aminoácidos | 20 | 8 | 4.1 |
| F | Transporte y metabolismo de nucleótidos | 21 | 12 | 6.1 |
| G | Transporte y metabolismo de carbohidratos | 32 | 15 | 7.6 |
| H | Transporte y metabolismo de coenzimas | 16 | 3 | 1.5 |
| I | Transporte y metabolismo de lípidos | 9 | 3 | 1.5 |
| J | Traducción, biogénesis y estructura ribosomal | 106 | 45 | 22.8 |
| K | Transcripción | 18 | 8 | 4.1 |
| L | Replicación, recombinación y reparación | 43 | 8 | 4.1 |
| M | Pared celular, membrana y biogénesis de envoltorios | 12 | 3 | 1.5 |
| O | Modificaciones post-traduccionales, plegamiento proteínas y chaperonas | 21 | 15 | 7.6 |
| P | Transporte y metabolismo de iones inorgánicos | 23 | 8 | 4.1 |
| Q | Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo | 1 | 0 | 0 |
| R | Predicción función general | 44 | 15 | 7.6 |
| S | Función desconocida | 15 | 3 | 1.5 |
| T | Mecanismos de transducción de señales | 5 | 0 | 0 |
| U | Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular | 7 | 1 | 0.5 |
| V | Mecanismos de defensa | 8 | 2 | 1 |
| - | No COG | 110 | 31 | 15.7 |

* % de las proteínas identificadas respecto del total identificado.

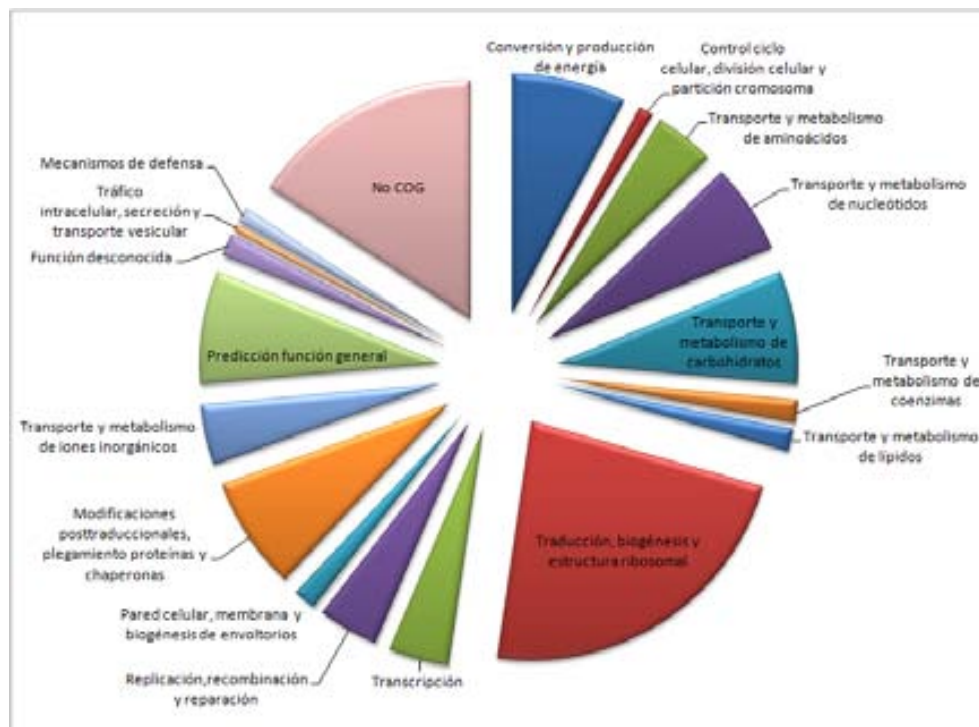


Fig. IV.14. Representación de la abundancia de proteínas identificadas de cada categoría COG respecto el total identificado en el ensayo de cultivo de *M. genitalium* en medio MM14 Pase 2.

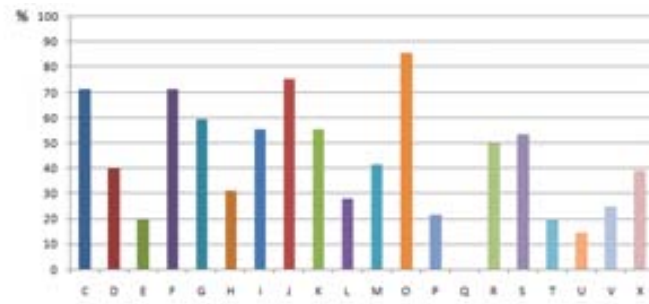


Fig.IV.15. Representación del tanto por ciento de identificaciones de cada categoría COG en el ensayo de cultivo de *M. genitalium* en medio MM14 Pase 2.

En el pase 2, se ha observado una drástica disminución del número de proteínas identificadas. Esta reducción podría explicarse mediante dos hipótesis: debido a la total adaptación del microorganismo al medio MM14 o debido a que la muerte celular origine degradación proteica. Si la disminución en el número de proteínas identificadas fuera como resultado de la muerte celular, las proteínas citoplasmáticas serían liberadas al medio y por lo tanto eliminadas mediante los pasos de lavado. En este protocolo se realizan seis lavados, por lo que sólo permanecería en los pellets la ultraestructura de la organela [104]. Este hecho provocaría una mayor presencia de proteínas de la organela en la muestra y las proteínas de citoplasma quedarían en más baja representación. Para poder discernir que hipótesis es la que provoca esta disminución en el número de proteínas identificadas se utilizó como referencia el trabajo de Maier *et al.* [105] en el que los niveles de cada mRNA fueron medidos. En este trabajo se cuantifica el número de copias de mRNAs que hay por célula de *Mycoplasma pneumoniae*, el organismo filogenéticamente más cercano a *Mycoplasma genitalium*. Para discernir entre las hipótesis propuestas, se seleccionó la proteína MPN046 (Aspartyl-tRNA synthetase) la cual presenta 3 copias por célula en *M. pneumoniae*. Para poder hacer la comparativa con *M. genitalium*, se ha comparado con la proteína homóloga en *M. genitalium*, la MG036, que tiene un 69 % de identidad con la MPN046 de *M. pneumoniae*. Asumiendo que los niveles de mRNAs de *M. genitalium* deben ser parecidos a los de *M. pneumoniae* se observa que aún y presentar este bajo número de copias por célula, esta proteína ha sido identificada en el pase 2 de MM14. Este resultado sugiere que la hipótesis más plausible es que la reducción en el número de proteínas identificadas sea consecuencia de la reducción de la síntesis proteica debido a la adaptación al medio y no debido a muerte celular.

Aún y haber realizado este ensayo en condiciones restrictivas en cuanto a aporte de nutrientes, un 24.8 % (49 proteínas) de las proteínas identificadas no tienen una función asignada, siendo, como en otros casos, el grupo más abundante

Las categorías con el mayor número de proteínas identificadas respecto al total estimado son:

- Conversión y producción de energía (COG C): 71.4%.
- Modificaciones post-traduccionales, plegamiento proteínas y chaperonas (COG O): 71.4%.
- Transporte y metabolismo de nucleótidos (COG F): 57.1%.

Por contrapartida, las categorías con menos proteínas identificadas respecto al total estimado son:

- Mecanismos de defensa (COG V): 14.3%.
- Replicación, recombinación y reparación (COG L): 18.6%.
- Transporte y metabolismo de coenzimas (COG H): 18.8%.

En este experimento, al cultivar las células en unas condiciones diferentes, se observó un patrón proteico diferencial. No sólo se observa que la célula no expresa 191 proteínas de las 381 que expresó cuando es cultivado en SP4. De entre estas proteínas, no identificadas en el pase 2 del medio mínimo MM14, se encuentran enzimas involucradas en la división celular, replicación del DNA, síntesis proteica y otras actividades enzimáticas importantes. Además, se ha identificado una nueva proteína no identificada ni en SP4 ni en el pase 1 en MM14. Esta proteína diferencial que expresa *M. genitalium* cuando crece adaptado al medio mínimo MM14 pase 2 es la MG052, citidina desaminidasa involucrada en el rescate de las pirimidinas. Esta proteína está implicada en la recuperación de las bases y nucleósidos formados en la degradación del RNA y del DNA. Este enzima cataliza la desaminación hidrolítica irreversible de la citidina y desoxicitidina a uridina y desoxiuridina, respectivamente.

Además también se observaron proteínas que se expresaron en el Pase 2, pero que no fueron identificadas en el Pase 1, pero sí en SP4. Estas proteínas son:

- Glicosiltransferasa no caracterizada (MG025).
- UDP-glucosa 4-epimerasa (MG118).

- 2',3'-cíclico-nucleótido 2'-fosfodiesterasa (MG130).
- 30S proteína ribosomal S10 (MG150).
- 50S proteína ribosomal L27 (MG234).
- Proteína del sistema de transporte de alta afinidad p37 (MG289).
- Proteína Era de unión a GTP (MG387).

Uno de los datos a comentar que se observaron al analizar más en profundidad los resultados, fue la identificación de las dos principales adhesinas. La proteína P140 (MG191) y la P110 (MG192) han sido descritas como las principales adhesinas, las cuales se estabilizan mutuamente. Otra proteína involucrada en la adhesión es la P32 (MG318) la cual también ha sido identificada en este ensayo. El hecho de identificar las principales proteínas involucradas en la adhesión descritas en *M. genitalium*, pero observar un fenotipo no adherente, demuestra la existencia de alguna otra proteína o mecanismo de regulación de la adherencia no descrito hasta el momento. Este resultado podría significar que las adhesinas no se unen directamente a las células huésped (in vivo) o a la superficie del frasco de cultivo (in vitro), sino que lo hacen a través de componentes del suero. Esta deducción viene a partir de que los cultivos con medio MM14 no se observó adherencia, ya que dicho medio no estaba complementado con ningún tipo de suero. El hecho que las células de pase 1 sí que mostraran adherencia podría ser debido a los restos de suero provenientes del inoculo.

En el capítulo IV.A. del presente trabajo se ha extendido el proteoma preexistente de *Mycoplasma genitalium* a 388 ORFs distintos identificados, obteniendo una cobertura del 81.7% del proteoma predicho. Esta cobertura está al nivel de otros proteomas publicados como el proteoma de *Mycoplasma pneumoniae* (Catrein *et al.* [106]) en el que se identificó el 88% del proteoma predicho o el proteoma de *Streptococcus pneumoniae* (Sun *et al.* [107]) en el que se identificó el 60% del proteoma predicho. De esta manera se ha identificado el 81.7% del proteoma predicho, quedando por identificar el 18.3%. Este tanto por ciento no identificado puede ser debido a las limitaciones intrínsecas de la técnica o debido a que dichas proteínas son expresadas en condiciones diferentes a las utilizadas en el presente trabajo.

Al aplicar la técnica de GeLCMS a las diferentes muestras proteicas de *Mycoplasma genitalium* no sólo se ha extendido el preexistente proteoma aportando una visión global del proteoma en diferentes condiciones, sino que se han podido identificar también las proteínas correspondientes a dos pseudogenes, MG199 y MG333, por lo que podemos afirmar que

pueden reanotarse dichos MG como genes. Además también se ha identificado una nueva proteína localizada en la región intergénica entre el MG469 y el MG470.

El cultivo de *Mycoplasma genitalium* en fase 2 de MM14 ha proporcionado unos resultados muy interesantes, ya que se han identificado únicamente 192 proteínas. Este dato demuestra que el número de proteínas indispensables para la supervivencia de dicho microorganismo esta cercano al límite inferior propuesto por Hutchison *et al.* [98]. En este trabajo se establecieron entre 265 y 350 genes como los indispensables en este microorganismo.

En este capítulo no sólo se ha presentado el proteoma más extenso de *Mycoplasma genitalium*, sino también uno de los proteomas más extensos publicados hasta el momento.

IV. ANÁLISIS DEL PROTEOMA SOLUBLE EN TX-114 DE *Mycoplasma genitalium*

IV.B.1. Separación de fases de proteínas hidrofóbicas con Tritón X-114: 2DE/MALDI

Uno de los puntos fuertes de la electroforesis bidimensional, además de poder identificar la masa molecular (MW) y el punto isoeléctrico (pI), así como proporcionar una visión global del proteoma; es la capacidad de diferenciar modificaciones post-traduccionales, ya que frecuentemente, aparecen como spots consecutivos, ya sea en el eje vertical, horizontal o una combinación de ambos [28]. Aprovechando estos puntos fuertes de esta técnica, se ha podido obtener toda esta información acerca de la composición proteica de la fracción soluble en TX-114 de *Mycoplasma genitalium*. Inicialmente se utilizó un gradiente de pH de 3 a 10, pero debido a que la mayoría de proteínas se localizaban en el rango de pH ácido-neutro, también se utilizó el rango de pH de 4 a 7 para poder aumentar la capacidad resolutive de los geles 2D en esta región de pH. Con los geles de 3-10 (figura IV.16) se obtuvo la imagen global de la muestra obtenida en la separación de fase con TX-114. Con los geles del rango de pH de 4 a 7 (figura IV.17) se obtuvo una mayor resolución que permitió una mejor separación de isoformas. Posteriormente a la separación de la muestra mediante los geles 2D, la identificación de los spots se realizó obteniendo la huella peptídica mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. El hecho de escoger tales gradientes permitió, aparte de una mayor resolución, evitar la aparición de múltiples proteínas en un mismo spot, facilitar la aplicación de mayores cantidades de proteína para facilitar la detección de componentes minoritarios así como también localizar con mayor facilidad modificaciones post-traduccionales [78].

Utilizando esta técnica se pudieron identificar 49 proteínas distintas (10.3%) (Tabla 5-6, anexo). Estas proteínas también fueron clasificadas según la clasificación COG (Tabla.IV.5) y se les realizó el mismo tratamiento de datos que en casos anteriores.

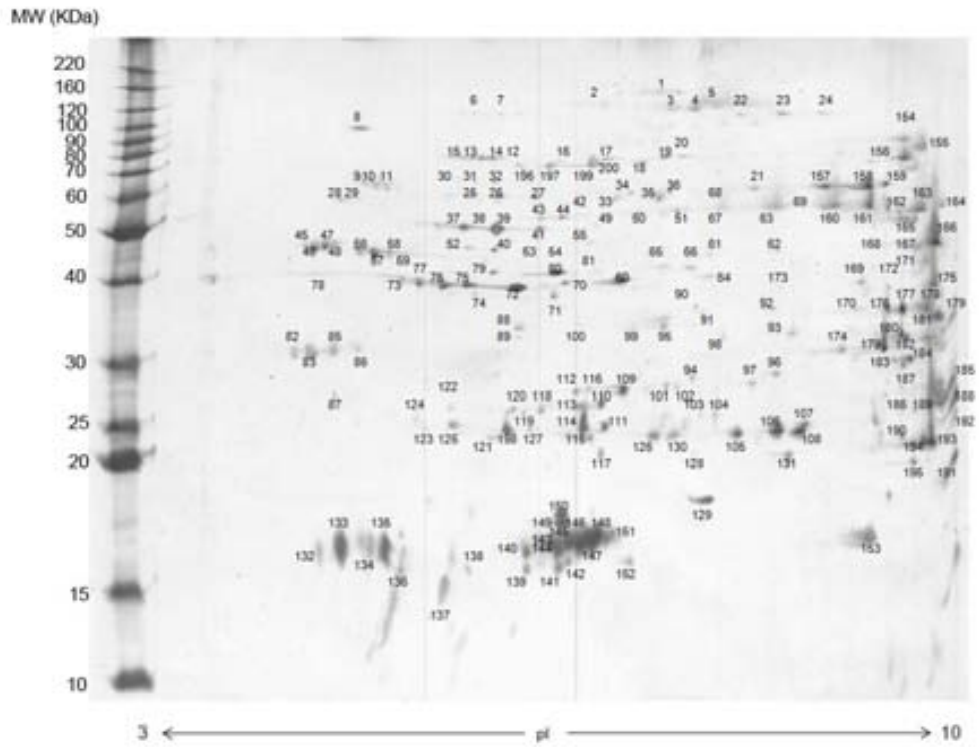


Fig.IV.16. 2DE de la muestra de separación de fases con TX-114 de *M. genitalium* en el rango de pH de 3-10.

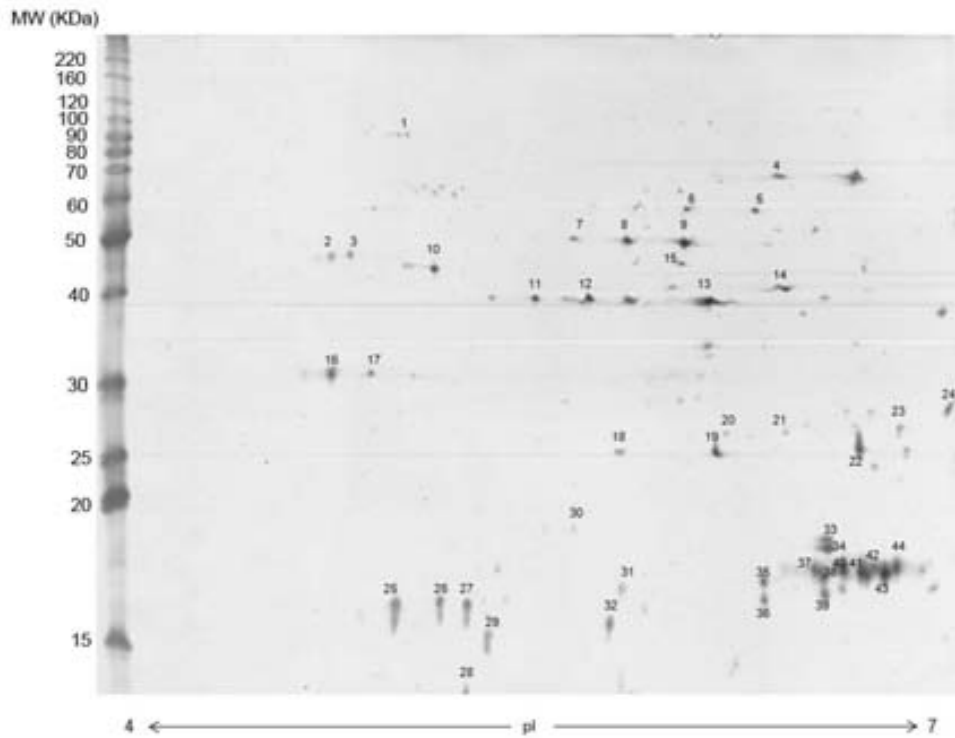


Fig.IV.17. 2DE de la muestra de separación de fases con TX-114 de *M. genitalium* en el rango de pH de 4-7.

En este caso, se identificaron proteínas pertenecientes a quince de las veinte categorías COG. Las categorías en las que no se identificaron ninguna proteína son: Transporte y metabolismo de coenzimas (COG H), Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo (COG Q), Función desconocida (COG S), Mecanismos de transducción de señales (COG T) y Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular (COG U).

Tabla.IV.5. Tabla de la clasificación en categorías COG de las proteínas identificadas en el ensayo de separación de fases con TX-114 2DE/MALDI en *M. genitalium*.

| Letra | Categoría | Estimadas | Identificadas | % * |
|-------|--|-----------|---------------|------|
| C | Conversión y producción de energía | 21 | 7 | 14.3 |
| D | Control ciclo celular, división celular y partición cromosoma | 5 | 2 | 4.1 |
| E | Transporte y metabolismo de aminoácidos | 20 | 1 | 2 |
| F | Transporte y metabolismo de nucleótidos | 21 | 5 | 10.2 |
| G | Transporte y metabolismo de carbohidratos | 32 | 2 | 4.1 |
| H | Transporte y metabolismo de coenzimas | 16 | 0 | 0 |
| I | Transporte y metabolismo de lípidos | 9 | 1 | 2 |
| J | Traducción, biogénesis y estructura ribosomal | 106 | 5 | 10.2 |
| K | Transcripción | 18 | 2 | 4.1 |
| L | Replicación, recombinación y reparación | 43 | 4 | 8.2 |
| M | Pared celular, membrana y biogénesis de envoltorios | 12 | 1 | 2 |
| O | Modificaciones post-traduccionales, plegamiento proteínas y chaperonas | 21 | 3 | 6.1 |
| P | Transporte y metabolismo de iones inorgánicos | 23 | 1 | 2 |
| Q | Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo | 1 | 0 | 0 |
| R | Predicción función general | 44 | 3 | 6.1 |
| S | Función desconocida | 15 | 0 | 0 |
| T | Mecanismos de transducción de señales | 5 | 0 | 0 |
| U | Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular | 7 | 0 | 0 |
| V | Mecanismos de defensa | 8 | 1 | 2 |
| - | No COG | 110 | 11 | 22.4 |

* % de las proteínas identificadas respecto del total estimado.

El hecho de no haber identificado ninguna proteína de algunas de las categorías que contienen proteínas de membrana, ya sean transportadores u otros enzimas (categorías H, Q, S, T y U), quizá se deba al bajo nivel de expresión de éstas, de forma que están por debajo del nivel de detección del método de tinción utilizado, o quizá también se deba a que son proteínas extremadamente hidrofóbicas que precipitan durante el proceso de isoelectroenfoque de la electroforesis bidimensional. En el gradiente de pH de 3 a 10 se identificaron 45 proteínas mientras que al aumentar la resolución de la electroforesis 2D, usando el gradiente de pH de 4 a 7, se pudieron identificar 4 proteínas más: MG045, MG252, MG307 y MG309.

Una vez clasificadas todas las proteínas por su categoría COG, se realizaron también dos tipos de gráficos para poder representar y analizar visualmente los resultados. En primer lugar se calculó la abundancia de cada categoría COG respecto el número total de proteínas identificadas. A continuación se muestra en la figura IV.18 la representación de las abundancias de cada categoría COG respecto el total identificado.

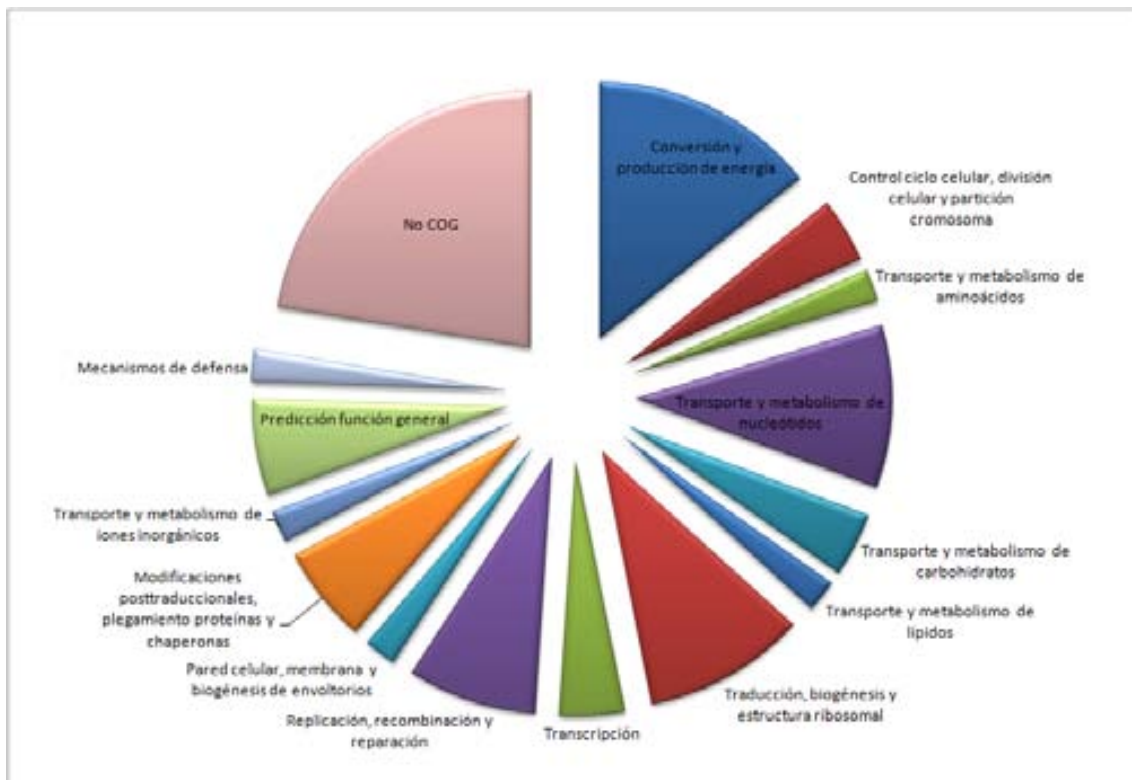


Fig. IV.18. Representación de la abundancia de proteínas identificadas de cada categoría COG respecto el total identificado en el ensayo de separación de fases con TX-114 2DE/MALDI en *M. genitalium*.

El grupo más abundante, igual que en el apartado anterior, fue el de proteínas sin función asignada, el cual estaba formado por el 28.5 % (14 proteínas) de las proteínas identificadas. En este caso, solo formaban parte de este grupo las proteínas que no tienen COG asignado y COG R.

En segundo lugar, se calculó el número de proteínas identificadas en cada categoría respecto al total que hay predichas en cada una para evaluar que categorías estaban más representadas, resultados mostrados en la figura IV.19.

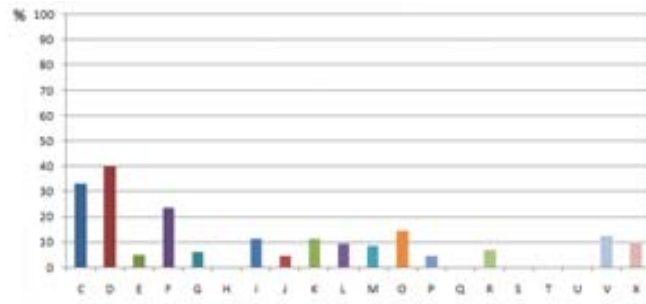


Fig.IV.19. Representación del tanto por ciento de identificaciones de cada categoría COG en el ensayo de separación de fases con TX-114 2DE/MALDI en *M. genitalium*.

Las categorías con el mayor número de proteínas identificadas respecto al total estimado son:

- Control ciclo celular, división celular y partición cromosoma (COG D): 40%.
- Conversión y producción de energía (COG C): 33.3%.
- Transporte y metabolismo de nucleótidos (COG F): 23.8%.

Por contrapartida, las categorías con menos proteínas identificadas respecto al total estimado son:

- Transporte y metabolismo de iones inorgánicos (COG P): 4.3%.
- Traducción, biogénesis y estructura ribosomal (COG J): 4.7%.

Como ya se ha comentado previamente, una de las principales ventajas de los geles 2D es que proporcionan información acerca de abundancias relativas, punto isoeléctrico (pI) y masa molecular (MW) de cada uno de los spots, mientras que esta información no se puede obtener cuando se realiza el ensayo mediante GeLCMS.

Para poder obtener esta información de los geles 2D, una vez escaneados, se analizaron los geles con un programa específico. En este trabajo se utilizó el programa ImageMaster (GE Healthcare). Este programa permite introducir los valores de masa molecular de las bandas del marcador y del pI de los extremos de la tira. El programa genera unos ejes de coordenadas a partir de los datos introducidos, proporcionando valores de pI y MW de cada spot mediante extrapolación. Además, permite seleccionar el diámetro de cada spot, calculando así el tanto por ciento de volumen de cada spot respecto del total. Gracias a este dato se puede identificar las proteínas más abundantes en la muestra.

Las proteínas más abundantes en los extractos obtenidos en la separación de fase con TX-114 son:

- Subunidad E1 β de la piruvato deshidrogenasa (MG273): 2.43% Vol.
- Pirofosfatasa inorgánica (MG351): 2% Vol.
- Lipoproteína no caracterizada (MG338): 1.83% Vol.
- Lipoproteína putativa (MG260): 1.52% Vol

Las proteínas MG273 y MG351, según el programa de predicción de la localización subcelular, P-SORT, son citoplasmáticas, mientras que las proteínas MG338 y MG260 son predichas como proteínas de membrana. En *Mycoplasma pneumoniae*, bacteria filogenéticamente muy cercana a *Mycoplasma genitalium*, se ha demostrado la presencia de subunidad β de la piruvato deshidrogenasa en la superficie celular además de observar que es la responsable de la unión a fibronectina [108, 109]. La fibronectina es una glicoproteína dimérica presente en la matriz extracelular (MEC) de la mayoría de los tejidos celulares animales. Este dato es de gran relevancia ya que una proteína del metabolismo central existiría en dos formas una de ellas catalizaría la reacción de descarboxilación oxidativa del piruvato y otra sería responsable de la unión a la fibronectina de la matriz extracelular de la célula huésped. Es muy corriente que en microorganismos se presenten proteínas de metabolismo con una segunda función (proteínas “moonlighting”), y esta a veces se localiza en la membrana.

La masa molecular (MW) y el punto isoeléctrico (pI) de los spots identificados determinados mediante el programa ImageMaster fueron comparados con los valores teóricos, obtenidos a partir de la secuencia de las proteínas. La mayoría de los valores teóricos /experimentales de pI y MW fueron muy coincidentes en el 75% de los casos. En la Tabla 5-6 del anexo se detallan los valores teóricos y los obtenidos experimentalmente. En el 25% de los casos (12 proteínas) se observaron diferencias significativas ya sea en la masa molecular, en el pI o bien en ambos.

Respecto a variaciones en la MW, ha sido más común que la masa experimental sea menor, siendo en ocasiones un 10% de la estimada. Valores experimentales de MW menores a los estimados podrían ser el resultado de procesos post-traduccionales como la proteólisis. La proteólisis se podría dar por el efecto de proteasas en el extremo N-terminal, C-terminal o en ambos. Las proteínas identificadas con menos MW a la estimada en las que no se han identificado péptidos del extremo C-terminal son: MG040, MG191 (sólo la isoforma detectada en el spot 20), MG260, MG307 y MG309. Por el contrario, las proteínas en las que sólo se ha identificado péptidos en el extremo C-terminal son: MG095, MG321 (sólo el spot 79) y

MG338. También se observó que hay 3 casos en los que la disminución de la masa podría ser debida a proteólisis en ambos extremos ya que no se identificaron péptidos en estas regiones. Estos 3 casos son los MG185, MG421 y MG260 (spots 4-7 y 9). El caso más relevante es el del MG067 ya que se observó una disminución de la masa del 50% (59KDa a 26.5KDa) pero en su secuencia se detectaron péptidos de ambos extremos, como se observa en la figura IV.20.

```

1  MLYRFWKTGL AIFMPGCILL SSCSFRSYIP TPSLRNTVGN HNSYVNNTVP
51  KNNFYEKFYD LTFALNFTNQ KTQEEFGTWL IDWKGDETKD LNTLTIASSS
101 IISSVSNHSL KEKQDDKLFY AYIATNLHLI DGLKNDHDYQ PYNKDGNGLS
151 FPFQKTQSF LLGRFANPKI NSKPEEMNYQ VQTRLKQDAM VFIQTSTLPK
201 TAYAGIDPIN FDYHETSDES GFWTKKQSTA NFPRTRTLKS YADFAVLEVP
251 LFLDNANDAK IYQEWIRPAV QAYKELGDVE NIFAKTPYAE YINNTYYLLG
301 YPVTNNNKYQ FILGQDEKWK FSQQTSLVKH YQKQPLQRT VYVERDDGLP
351 TLTFNEDKLT HVQGTDLINV DQITDTNLGN GLINYAGLSR FTLSYHNVEY
401 KLFYGYTILN NTNFPGGSSG SAVFNKEKQL TSIYFGSLIN VTTGNNRNVN
451 LGLGQILRTY NTNNSKHSAP SSYDLIFGDK NTIKFYAQFA KEKQTHLWNK
501 IQTSVNSSIS FYKDKK

```

Fig.IV.20. Secuencia de la proteína MG067, en la que se muestra en rojo los péptidos identificados por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Si bien los casos de disminución de masa han sido mayoritarios; en algún caso se ha observado que la masa experimental es mayor a la teórica. Este aumento podría ser debido a la unión covalente de diferentes moléculas a la proteína.

Además de observar variaciones en la MW, como hemos comentado anteriormente, en los geles 2D también se pueden identificar variaciones entre el pI teórico y el identificado experimentalmente. Las proteínas con diferencias de pI más notables son: MG040, MG067, MG095, MG252, MG260, MG307, MG309, MG338, MG412, MG453, MG458, MG460, MG469 y MG470. Todas estas proteínas presentaban un pI experimental más ácido que el teórico. El caso del MG040, una lipoproteína no caracterizada, es el más interesante debido a que uno de los spots en los que se identificó sí que presenta el pI estimado (pI 8.48), pero también se identificó en otro spot con un pI notablemente más ácido (pI 4.2).

Al observar detenidamente los geles bidimensionales y el listado de proteínas identificadas se hace evidente la presencia de isoformas de algunas de las proteínas, ya que se identifica la misma proteína en diferentes spots con diferentes valores de pI y/o MW. Algunas de las proteínas que se identificaron en diferentes spots, es decir, que presentaban diferentes isoformas alineadas horizontalmente, presentan variaciones que concuerdan con posibles procesos de fosforilación. Las fosforilaciones son las modificaciones post-traduccionales (PTM) más comunes y son las que generan en los geles 2D un patrón muy característico, ya que se observan como un tren de spots horizontales con la única diferencia de 0.6 puntos de pI hacia el extremo básico [110]. En estos geles se identificaron tres proteínas que presentaban varias

isoformas cuya variación de pI concuerda con la modificación por fosforilaciones. Estas proteínas son:

- Subunidad β del componente E1 de la piruvato deshidrogenasa (MG273): identificada en 6 spots, de los cuales 3 isoformas podrían haber sido generadas por procesos de fosforilación (spots 72, 74 y 75).
- Chaperona DnaK (MG305): identificada en 4 spots, de los cuales 2 concuerdan con procesos de fosforilación (spots 196 y 199).
- Chaperona GroEL 60 KDa (MG392): identificada en 3 spots, de los cuales 2 concuerdan con procesos de fosforilación (spots 25 y 27).

Cabe mencionar que estas tres proteínas que aparecen con el patrón típico de fosforilación, ya fueron identificadas como fosfoproteínas en el trabajo de Su *et al.* [84].

Además de estas proteínas, también se identificaron otras proteínas que también presentaban isoformas dispuestas en trenes de spots pero que no concuerdan con el patrón generado por procesos de fosforilaciones ya que el incremento en pI no es similar a 0.6. Estas proteínas son: MG003, MG045, MG210.1, MG231, MG274, MG298, MG321, MG351, MG399, MG407, MG412 y MG438.

En este experimento, no sólo se observaron isoformas que pudieran explicarse por procesos de fosforilación. En algunos casos se identificaron proteínas en varios spots con pI y MW completamente diferentes a los estimados. Estas proteínas son:

- Lipoproteína putativa MG040 (31KDa pI 4.2; 23.4KDa pI 7.5).
- Lipoproteína putativa MG185 (24.8KDa pI 6.85; 30.2KDa pI 9.63).
- Proteína de adhesión MgPa MG191 (127.6KDa pI 6.85; 79.1KDa pI 7.55).
- Proteína con dominio DnaJ MG200 (99.1KDa pI 4.63^{*}; 77.4KDa pI 5.67).
- Lipoproteína putativa MG321 (114.2KDa^{*} pI 5.68; 41.7KDa pI 5.86).

^{*}Valores similares a los teóricos.

IV.B.2. Separación de fases de proteínas hidrofóbicas con Tritón X-114: GeLCMS

Gracias a la separación de la fracción soluble en TX-114 mediante 2DE se obtuvo mucha información acerca de las 49 proteínas identificadas, aunque lo más probable es que no se hayan identificado muchas otras debido a las incompatibilidades entre las proteínas hidrofóbicas y su separación mediante 2DE, que ya han sido comentadas con anterioridad. Por este motivo, la fracción soluble en TX-114 fue analizada también mediante la técnica GeLCMS. La fracción soluble en TX-114 fue separada en un gel SDS-PAGE al 10 % de acrilamida tal y como se muestra en la figura IV.21.

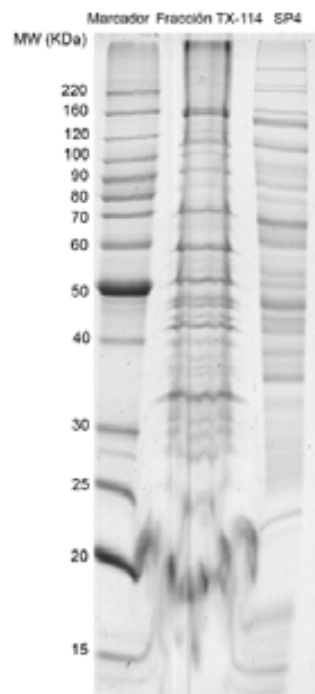


Fig.IV.21. SDS-PAGE de la fracción soluble en TX-114 de *M. genitalium*.

En la imagen (Fig.IV.21) se puede apreciar que en el carril de la muestra de fraccionamiento con TX-114 en la parte inferior hay un patrón borroso de las bandas. Este patrón se observa siempre que en la muestra hay cantidades importantes de tiourea.

Una vez separada la muestra mediante el gel SDS-PAGE se procedió a la separación del carril en 10 partes iguales, su digestión trípica y la posterior identificación mediante GeLC-MS. Gracias a la utilización de este protocolo se pudieron identificar 242 proteínas (50.9% del total de ORFs predichos en el genoma) (Tabla 7, anexo). Cabe destacar que aún y haber identificado 5 veces más proteínas que con el método anterior, 2DE-MALDI, hay 8 proteínas que fueron

identificadas sólo con el método basado en la electroforesis bidimensional. Estas proteínas son MG003, MG034, MG050, MG083, MG252, MG363, MG421 y MG460.

Las proteínas identificadas fueron clasificadas también, según la clasificación COG (Tabla. IV.6) y se les realizó el mismo tratamiento de datos que en casos anteriores.

En este caso, se identificaron proteínas pertenecientes a diecinueve de las veinte categorías COG, la categoría Q (Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo) fue la única categoría en la que no se identificó ninguna proteína, como en casos anteriores.

Tabla.IV.6. Tabla de la clasificación en categorías COG de las proteínas identificadas en el ensayo de separación de fases con TX-114 y GeLCMS en *M. genitalium*.

| Letra | Categoría | Estimadas | Identificadas | %* |
|-------|--|-----------|---------------|------|
| C | Conversión y producción de energía | 21 | 15 | 6 |
| D | Control ciclo celular, división celular y partición cromosoma | 5 | 2 | 0.8 |
| E | Transporte y metabolismo de aminoácidos | 20 | 6 | 2.4 |
| F | Transporte y metabolismo de nucleótidos | 21 | 11 | 4.4 |
| G | Transporte y metabolismo de carbohidratos | 32 | 11 | 4.4 |
| H | Transporte y metabolismo de coenzimas | 16 | 6 | 2.4 |
| I | Transporte y metabolismo de lípidos | 9 | 5 | 2 |
| J | Traducción, biogénesis y estructura ribosomal | 106 | 59 | 23.4 |
| K | Transcripción | 18 | 7 | 2.8 |
| L | Replicación, recombinación y reparación | 43 | 19 | 7.6 |
| M | Pared celular, membrana y biogénesis de envoltorios | 12 | 7 | 2.8 |
| O | Modificaciones post-traduccionales, plegamiento proteínas y chaperonas | 21 | 13 | 5.2 |
| P | Transporte y metabolismo de iones inorgánicos | 23 | 11 | 4.4 |
| Q | Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo | 1 | 0 | 0 |
| R | Predicción función general | 44 | 14 | 5.6 |
| S | Función desconocida | 15 | 3 | 1.2 |
| T | Mecanismos de transducción de señales | 5 | 1 | 0.4 |
| U | Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular | 7 | 5 | 2 |
| V | Mecanismos de defensa | 8 | 3 | 1.2 |
| - | No COG | 110 | 54 | 21.4 |

* % de las proteínas identificadas respecto del total estimado.

Una vez clasificadas todas las proteínas por su categoría COG, se realizaron dos tipos de gráficos para poder representar y analizar visualmente los resultados. En primer lugar se calculó la abundancia de cada categoría COG respecto el número total de proteínas identificadas. A continuación se muestra en la figura IV.22 la representación de las abundancias de cada categoría COG respecto el total identificado.

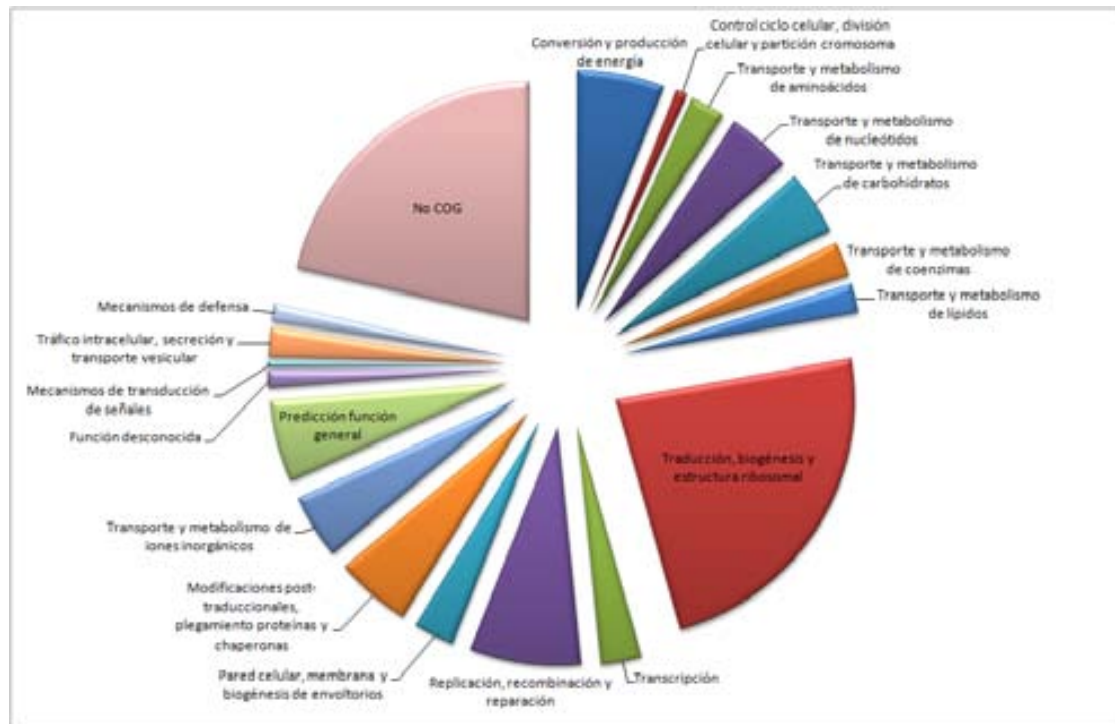


Fig.IV.22. Representación de la abundancia de proteínas identificadas de cada categoría COG respecto al total identificado en el ensayo de separación de fases con TX-114 y GeLCMS en *M. genitalium*.

El grupo más abundante fue el formado por proteínas sin categoría COG asignada o pertenecientes a la categoría COG R (Predicción función general) o a la categoría COG S (sin función asignada) con un 28.2 % (71 proteínas). Ya que muchas de las proteínas identificadas eran proteínas de las cuales no hay ninguna información, ni siquiera la evidencia de que existan, se decidió realizar una predicción de la localización subcelular. Con tal objetivo, se utilizó el programa bioinformático PSORT para predecir la localización subcelular utilizando la secuencia de estas 57 proteínas, obteniéndose los siguientes resultados:

- Membrana, cara citoplasmática: 19 proteínas
- Desconocida: 22 proteínas.
- Citoplasmáticas: 9 proteínas
- Membrana, cara externa: 5 proteínas.
- Extracelular: 2 proteínas.

Aún y aparecer 9 proteínas citoplasmáticas, analizando los resultados obtenidos con el PSORT, a 4 de estas proteínas citoplasmáticas se les predice la presencia de hélices transmembrana.

En segundo lugar, se calculó el número de proteínas identificadas en cada categoría respecto al total que hay predichas en cada una para evaluar que categorías estaban más representadas, resultados mostrados en la figura IV.23.

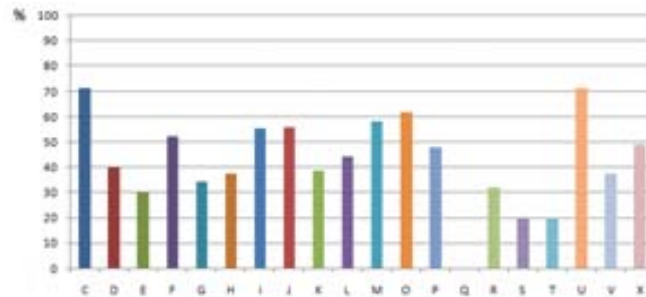


Fig.IV.23. Representación del tanto por ciento de identificaciones de cada categoría COG en el ensayo de separación de fases con TX-114 y GeLCMS en *M. genitalium*.

Las categorías con el mayor número de proteínas identificadas respecto al total estimado son:

- Conversión y producción de energía (COG C): 71.4%.
- Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular (COG U): 71.4%.
- Modificaciones post-traduccionales, plegamiento proteínas y chaperonas (COG O): 61.9%.

Por contrapartida, las categorías con menos proteínas identificadas respecto al total estimado son:

- Función desconocida (COG S): 20%.
- Mecanismos de transducción de señales (COG T): 20%.
- Transporte y metabolismo de aminoácidos (COG E): 30%.

Otro resultado a destacar es la identificación de la proteína perteneciente al MG288, considerada como pseudogen. En este caso, también se ha realizado el Blast de la secuencia y se ha encontrado homología en *Mycoplasma pneumoniae*, con el gel MPN508 que codifica para la familia de proteínas de exportación de membrana. Gracias a esta identificación se corrobora la existencia del producto de este gen, el cual sólo ha sido identificado en este capítulo, ya que no fue identificada mediante ninguna otra aproximación realizada en el trabajo que aquí se presenta. Por lo tanto este gen debería dejar de ser considerado como un pseudogen ya que en este trabajo se ha demostrado experimentalmente la existencia del producto proteico del gen MG288.

Entre las proteínas identificadas hay bastantes proteínas que han sido tradicionalmente localizadas en el citoplasma, como son enzimas degradativos de polisacáridos, oligonucleótidos, o proteasas. Los micoplasmas carecen de muchas rutas biosintéticas y dependen de la internalización del medio externo de nucleótidos, aminoácidos, azúcares y lípidos. Recientemente, se ha descrito que muchos de los enzimas hidrolíticos están localizados en la superficie celular en micoplasmas, y que pueden estar asociados a los transportadores ABC para convertir macromoléculas a componentes más simples o bien que podrían jugar un papel importante en la patogenicidad [111]. Además, proteínas que han sido consideradas tradicionalmente citoplasmáticas y de las cuales hay evidencias experimentales de que su función tiene lugar en el citoplasma, como el factor de elongación Tu o la subunidad β del componente E1 del complejo piruvato deshidrogenasa, tendrían parte de la población de éstas expuesta en la superficie celular en micoplasmas además de haber sido descritas como potentes antígenos en varias especies de micoplasmas [112-114].

De entre las proteínas identificadas cabe destacar que la principal proteína de superficie conocida implicada en la adhesión, MgPa (MG191), ha sido identificada así como también otros componentes implicados en la adhesión [115].

De entre las proteínas identificadas se observa un elevado número de proteínas ribosomales. Este aspecto es realmente interesante ya que de las 242 proteínas que se identificaron, 37 son ribosomales (15.3%). Debido a este elevado tanto por ciento de proteínas ribosomales presentes en las fracciones solubles en TX-114, se buscó en la bibliografía si existían otros trabajos en los que también se hubiera identificado proteínas ribosomales en fracciones solubles en detergentes. En el trabajo publicado por Ramos *et al.* [116] se realizó un estudio de la solubilidad secuencial del proteoma total de *Escherichia coli*. Un extracto de *E. coli* sonificado fue solubilizado secuencialmente con 4 buffers: 40mM Tris (A1); 8M Urea, 4% CHAPS, 100mM DTT (A2); 5M Urea, 2M Tiourea 2% CHAPS, 2% SB3-10, 100mM DTT (A3); 1% SDS, 0.375M Tris (A4). Lo más interesante de este trabajo es la información obtenida respecto a las proteínas ribosomales, ya que la mayoría se identificaron en varias fracciones, algunas proteínas ribosomales fueron identificadas en las cuatro fracciones. De las 37 proteínas ribosomales identificadas en el ensayo de TX-114/GeLCMS realizado en el presente trabajo, 28 proteínas fueron identificadas en el estudio de Ramos *et al.* De estas proteínas ribosomales se observó que 7 estaban presentes en una única fracción en el trabajo de Ramos *et al.* y dicha fracción nunca fue la A1 (sin detergente). Esto quiere decir que dichas proteínas aún y ser citoplasmáticas presentan una considerable hidrofobicidad. Las proteínas ribosomales representan una proporción significativa del proteoma liposoluble de *M. genitalium*. Aún y

parecer poco coherente debido a su tradicional localización citoplasmática, se ha demostrado que los ribosomas interactúan con el complejo de exportación de proteínas de la bacteria [117]. Por otra parte es sabido que las proteínas ribosomales son de las más multifuncionales que existen [118].

En el estudio de TX-114/2DE-MALDI, las proteínas ribosomales representaban el 4,1% de las proteínas identificadas, en comparación con el 15.3% del estudio de TX-114/GeLCMS. Esta notable diferencia puede ser debida a que estas proteínas suelen ser muy básicas debido a la presencia de cargas positivas que son necesarias para interactuar con el DNA, con cargas negativas, y en los geles bidimensionales los extremos, sobretudo el básico, no se resuelven con tanta eficiencia como en los pI intermedios de la tira.

Al comparar los dos estudios realizados mediante el fraccionamiento con TX-114 se observó que la distribución de las proteínas identificadas en cada categoría COG es diferente. En el ensayo TX-114/2DE-MALDI hay una notable abundancia relativa respecto al TX-114/GeLCMS en las categorías: producción y conversión de energía (COG C) y control ciclo celular, división celular y partición cromosómica (COG D). En cambio, en el ensayo de TX-114/GeLCMS no sólo hay dos categorías con mayor abundancia relativa: traducción, estructura ribosomal y biogénesis (COG J) y transporte y metabolismo de iones inorgánicos (COG P), sino que también hay proteínas identificadas en cuatro categorías sin representación en el ensayo de TX-114/2DE-MALDI. Estas cuatro categorías son: transporte y metabolismo de coenzimas (COG H), función desconocida (COG S), mecanismos de transducción de señales (COG T) y tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular (COG U).

Se podría pensar que el elevado número de proteínas identificadas con esta técnica se debe a contaminación de proteínas citoplasmáticas. Por ese motivo, se ha buscado alguna proteína en el estudio en *Mycoplasma pneumoniae* [105] donde se miden el número de copias de cada transcrito. Se ha seleccionado una proteína con un elevado número de copias, la MPN025, fructosa-1,6-bifosfato aldolasa clase II, homologa a MG023 en *Mycoplasma genitalium* que presenta 1198 copias por célula. Aún y presentar este elevado número de copias por célula, no se ha identificado en la fracción soluble en TX-114, por lo que podemos inferir que si se han dado casos de contaminación, estos serian leves.

En los estudios proteómicos, no existe una técnica idónea. La mejor opción para poder identificar el mayor número de proteínas presentes en una muestra y poder hacer una buena cobertura de ésta es la combinación de varias técnicas. Esta premisa se ha confirmado en este apartado ya que en el trabajo con GeLCMS se han identificado 242 proteínas, mientras que

mediante 2DE-MALDI se identificaron 49 proteínas. Aun y ser un número bajo de identificaciones en el ensayo con MALDI, 8 de las 49 proteínas identificadas no lo fueron mediante GeLCMS.

Gracias a la combinación de ambas técnicas, en la fracción soluble en TX-114 se identificaron un total de 250 proteínas distintas correspondiente al 52.6% del proteoma total.

IV.C. IDENTIFICACION DEL SURFOMA DE *MYCOPLASMA GENITALIUM*

Los resultados obtenidos en la separación de fases mediante TX-114, proporcionan información acerca de la hidrofobicidad de las proteínas. Que una proteína sea soluble en TX-114 no es indicativo de su presencia en la membrana, simplemente nos informa que en la célula se encuentra en un ambiente hidrofóbico. Este ambiente hidrofóbico no es exclusivo de la membrana, también se encuentra en estructuras como el citoesqueleto o en el interior de grandes complejos proteicos.

Por este motivo no sólo es interesante saber que proteínas son hidrofóbicas, sino saber cuáles de las proteínas presentes en la membrana presentan regiones expuestas hacia el espacio extracelular. Estas regiones expuestas en la membrana plasmática son la primera línea de contacto con la célula huésped, las que permiten el reconocimiento y la adhesión de la bacteria a la superficie y también, las que pueden generar una respuesta en el sistema inmune del huésped, así como en el caso de micoplasmas, coger sustratos necesarios para su subsistencia. El estudio y análisis de estas proteínas es más complicado que el de las citoplasmáticas debido a su reducida abundancia, su pobre solubilidad y la problemática en su fraccionamiento sin contaminación de proteínas citoplasmáticas. Existen varias aproximaciones para poder identificar y caracterizar estas proteínas; uno de los más utilizados en bacterias patógenas Gram positivas es el “shaving” de la superficie celular. Esta metodología, que consiste en la proteólisis parcial de las proteínas accesibles a la proteasa en la superficie celular, ha sido utilizada con éxito en varios patógenos humanos [24, 119], pero no está muy clara su utilidad en bacterias Gram negativas, ya que estas carecen de pared celular por lo que tienen una tendencia a lisarse con el tratamiento con proteasas. Esta lisis provoca un aumento de falsos positivos de proteínas citoplasmáticas identificadas como si estuvieran localizadas en la superficie celular. *Mycoplasma genitalium* aún y ser una bacteria Gram positiva carece de pared celular por lo que esta técnica no es apropiada para el estudio de las proteínas con regiones expuestas en la superficie celular.

Otro método alternativo es el marcaje de las proteínas de superficie con moléculas para su posterior captura, aplicable a todos los tipos bacterianos ya que no compromete la integridad celular. En primer lugar, y como ya se ha explicado anteriormente, se intentó realizar el marcaje con biotina, pero este método fracasó en *M. genitalium* ya que el compuesto era internalizado y marcaba todas las proteínas presentes en la célula, obteniendo el proteoma total más extenso identificado en *M. genitalium*. Por este motivo, se decidió realizar el marcaje de superficie con compuestos fluorescentes, CyDye, a células intactas. Mediante esta

metodología los fluoróforos (CyDye) se unen específicamente a las lisinas presentes en las regiones expuestas de las proteínas de membrana. En este experimento se obtiene información no sólo acerca de la expresión de las proteínas, sino también sobre si están expuestas en la superficie del microorganismo. El fluoróforo CyDye5 fue utilizado para el marcaje de las regiones expuestas de las proteínas de membrana, emitiendo una fluorescencia de color verde (670 nm) cuando es excitado (633 nm). En cambio, el fluoróforo CyDye3 fue utilizado para el marcaje de las proteínas presentes en los extractos totales, emitiendo una fluorescencia de color rojo (580nm) al ser excitado (532 nm). Debido a que ambas muestras son separadas en el mismo gel, según el filtro que se utilice en el escáner de fluorescencia se obtendrá la imagen de una u otra muestra, o incluso la imagen combinada. En muchos casos, aunque la proteína tenga la señal verde, también estará presente en el extracto total, por lo que el spot presentará una tonalidad anaranjada o amarillenta, siendo proporcional la intensidad del tono verde a su abundancia en la membrana respecto el total. Si por el contrario, una proteína no tiene ninguna región expuesta, no presentará marcaje de color verde, por lo que se observará el spot completamente rojo. Para visualizar las muestras marcadas con fluoróforos es necesario el uso de un scanner especialmente equipado para la poder excitar y colectar la luz emitida por los fluoróforos, ya que estos no son visibles en el rango de longitudes de onda visibles. Así, para realizar el picado de los spots que se desea identificar es necesario realizar una tinción visible, en nuestro caso la tinción de plata. Al teñir el gel posteriormente mediante la tinción de plata, la imagen del proteoma total nos servirá de guía para localizar las proteínas del surfoma y poder identificarlas. Ambos extractos fueron separados en un único 2DE y posteriormente fueron escaneados mediante fluorescencia (figura IV.24) y después el gel fue teñido con plata (figura IV.25).

Una vez obtenidas y analizadas las imágenes de los geles; 59 spots fueron picados, ya que presentaban la señal del fluoróforo de marcaje de regiones expuestas, de los cuales 34 pudieron ser identificados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, correspondiendo al 7.2% del proteoma total (Tabla 8, anexo). Estas 34 proteínas fueron también clasificadas según la clasificación COG donde quedan representadas doce de las veinte categorías COG, Tabla.IV.7.

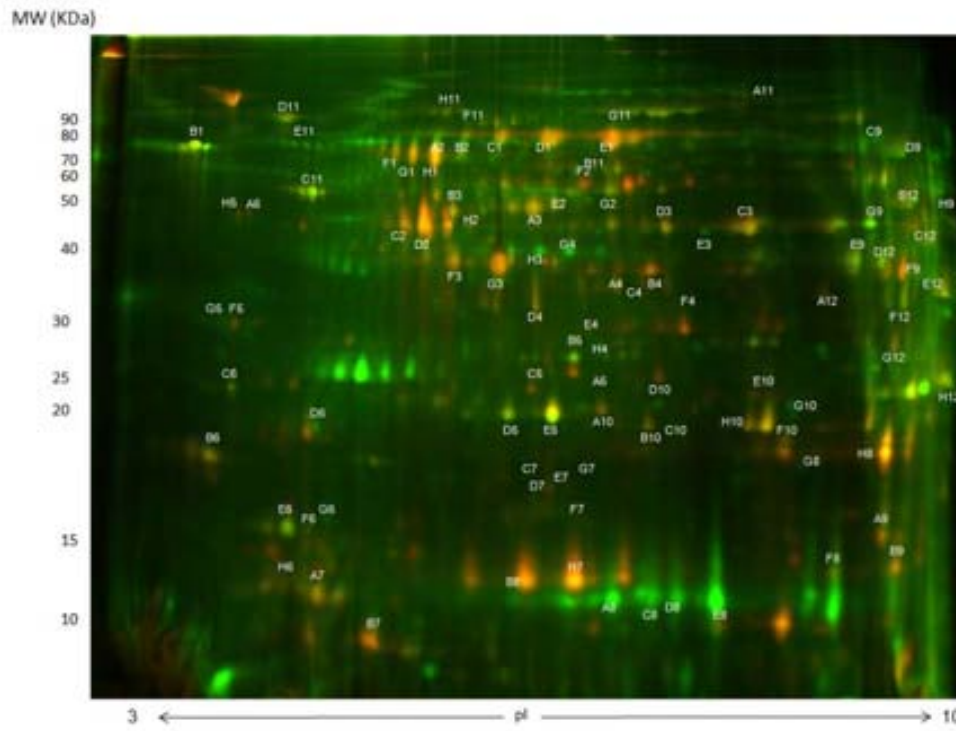


Fig.IV.24. 2DE con CyDye de rango de pH de 3-10 de las proteínas expuestas (verde) / proteoma total (rojo) de *M. genitalium*.

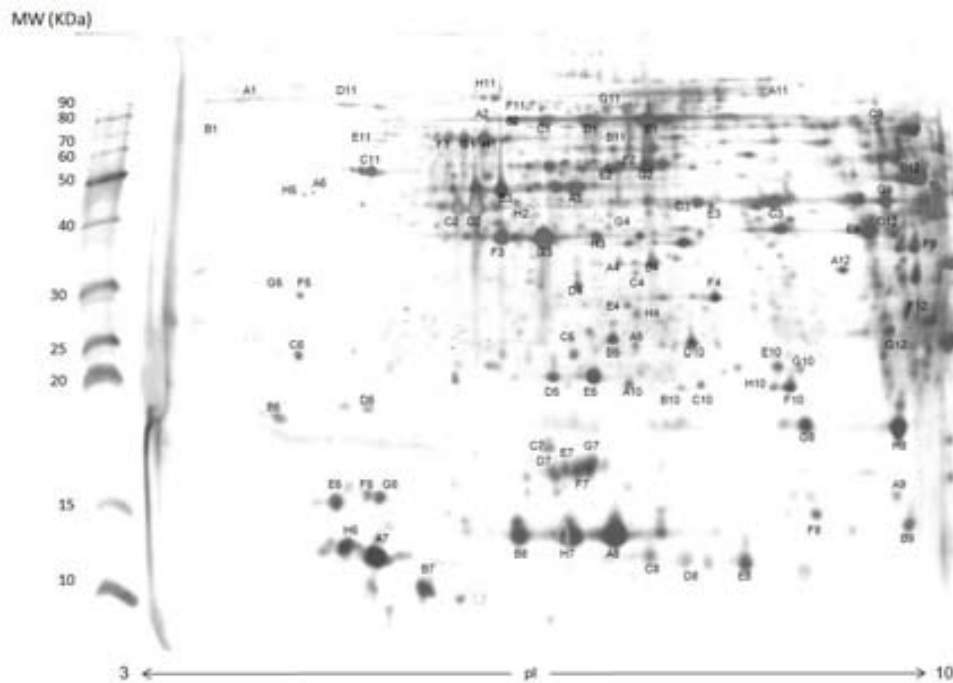


Fig.IV.25. 2DE con CyDye de rango de pI de 3-10 teñido con plata de las proteínas expuestas / proteoma total de *M. genitalium*.

Las categorías COG en las que no se identificaron ninguna proteína con regiones expuestas son: Control ciclo celular, división celular y partición cromosoma (COG D), Transporte y metabolismo de nucleótidos (COG F), Transporte y metabolismo de coenzimas (COG H), Transporte y metabolismo de lípidos (COG I), Transporte y metabolismo de iones inorgánicos (COG P), Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo (COG Q), Función desconocida (COG S), Mecanismos de transducción de señales (COG T) y Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular (COG U).

Tabla.IV.7. Tabla de la clasificación en categorías COG de las proteínas identificadas en el ensayo de marcaje de superficie mediante CyDye en *M. genitalium*.

| Letra | Categoría | Estimadas | Identificadas | %* |
|-------|--|-----------|---------------|------|
| C | Conversión y producción de energía | 21 | 5 | 14.7 |
| D | Control ciclo celular, división celular y partición cromosoma | 5 | 0 | 0 |
| E | Transporte y metabolismo de aminoácidos | 20 | 1 | 2.9 |
| F | Transporte y metabolismo de nucleótidos | 21 | 0 | 0 |
| G | Transporte y metabolismo de carbohidratos | 32 | 2 | 5.9 |
| H | Transporte y metabolismo de coenzimas | 16 | 0 | 0 |
| I | Transporte y metabolismo de lípidos | 9 | 0 | 0 |
| J | Traducción, biogénesis y estructura ribosomal | 106 | 2 | 5.9 |
| K | Transcripción | 18 | 4 | 11.8 |
| L | Replicación, recombinación y reparación | 43 | 1 | 2.9 |
| M | Pared celular, membrana y biogénesis de envoltorios | 12 | 1 | 2.9 |
| O | Modificaciones post-traduccionales, plegamiento proteínas y chaperonas | 21 | 4 | 11.8 |
| P | Transporte y metabolismo de iones inorgánicos | 23 | 0 | 0 |
| Q | Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo | 1 | 0 | 0 |
| R | Predicción función general | 44 | 3 | 8.8 |
| S | Función desconocida | 15 | 0 | 0 |
| T | Mecanismos de transducción de señales | 5 | 0 | 0 |
| U | Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular | 7 | 0 | 0 |
| V | Mecanismos de defensa | 8 | 1 | 2.9 |
| - | No COG | 110 | 10 | 29.4 |

* % de las proteínas identificadas respecto del total identificado.

Una vez clasificadas todas las proteínas por su categoría COG, se realizaron dos tipos de gráficos para poder representar y analizar visualmente los resultados tal y como se ha hecho en el resto de ensayos previamente explicados. A continuación se muestra, en la figura IV.26, la representación de las abundancias de cada categoría COG respecto el total identificado y la representación del tanto por ciento de identificaciones de cada categoría COG (figura IV.27).

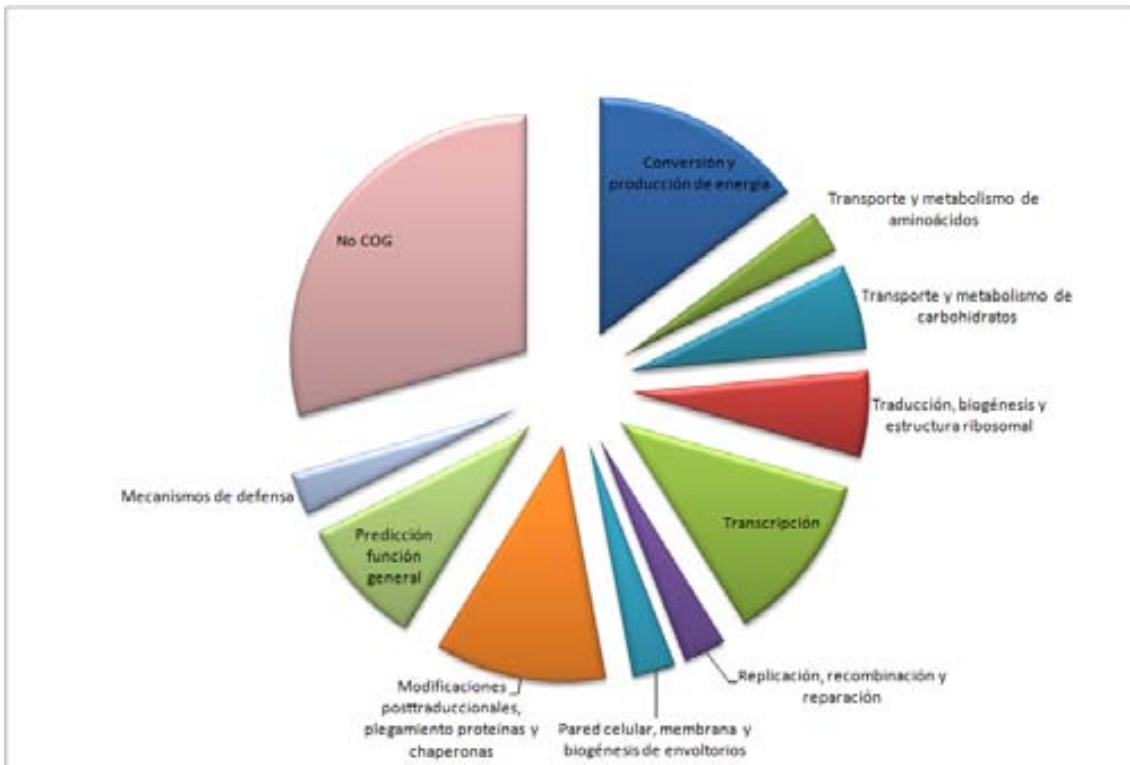


Fig.IV.26. Representación de la abundancia de proteínas identificadas de cada categoría COG respecto al total identificado en el ensayo de marcaje de superficie mediante CyDye en *M. genitalium*.

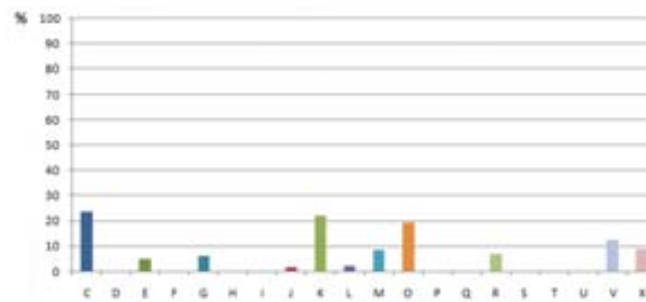


Fig.IV.27. Representación del tanto por ciento de identificaciones de cada categoría COG en el ensayo de marcaje de superficie mediante CyDye en *M. genitalium*.

El grupo más abundante, igual que en el apartado anterior, fue el de proteínas sin función asignada, el cual estaba formado por el 38.2 % (13 proteínas) de las proteínas identificadas. Otra vez, queda patente la carencia de información que existe en referencia a este microorganismo.

Las categorías con el mayor número de proteínas identificadas respecto al total estimado son:

- Conversión y producción de energía (COG C): 23.8%.
- Transcripción (COG K): 22.2%.
- Modificaciones post-traduccionales, plegamiento proteínas y chaperonas (COG O): 19%.

Por contrapartida, los grupos con menos proteínas identificadas respecto al total estimado son:

- Traducción, biogénesis y estructura ribosomal (COG J): 1.8%.
- Replicación, recombinación y reparación (COG L): 2.3%.

Los spots que presentaron una mayor intensidad de señal verde son: proteína de adhesión MgPa (MG191), proteína P65 rica en prolina (MG217), proteína no caracterizada MG218.1, proteína hipotética conservada (MG269), proteína accesoria de citoadherencia HMW3 (MG317), proteína OsmC similar (MG427) y factor de elongación Ts (MG433). El hecho de que estas presenten una coloración exclusivamente verde indica que no han sido marcadas durante la obtención del extracto total. La explicación del porqué estas proteínas no presentan la señal del fluoróforo de extracto total podría ser debido a la baja representación de estas en un extracto total.

Las proteínas que presentaron una señal intensa de marcaje de membrana pero que también presentaba la señal del extracto total, visualizándose como spots amarillo-naranja son: subunidad β DNA girasa (MG003), proteína hipotética MG117, factor de elongación transcripcional NusA (MG141), subunidad α RNA polimerasa directa de DNA (MG177), proteína con dominio (MG200), factor de elongación transcripcional GreA (MG282), proteína chaperona DnaK (MG305), lipoproteína putativa (MG321), proteína hipotética conservada (MG377), fosfopiruvato hidratasa (MG407) y L-lactato deshidrogenasa/malato deshidrogenasa (MG459). En este experimento, el objetivo era la identificación de las proteínas que presentan regiones expuestas en la membrana. Aún y así, para confirmar que las proteínas marcadas con el fluoróforo de color rojo (CyDye3) eran proteínas citoplasmáticas se picaron dos proteínas con señal roja muy intensa. Estas proteínas fueron identificadas como: proteína ribosomal S2 (MG070) y dihidrolipoamida deshidrogenasa (MG271), ambas, en principio proteínas citoplasmáticas.

Un dato realmente a destacar es el hecho de identificar en este experimento proteínas como: DNA girasa subunidad β (MG003), fructosa bifosfato aldolasa (MG023), piruvato deshidrogenasa subunidad β (MG273) y enolasa (MG407). Estas proteínas no es de esperar identificarlas expuestas en la superficie del microorganismo. En el caso de la DNA girasa subunidad β (MG003), se observó que era necesaria para formar el complejo de membrana de preiniciación oriC (OMC) y también para un posterior inicio de la replicación del cromosoma [120]. Además, en *Escherichia coli* se ha observado que la presencia de inhibidores de la DNA girasa hacen a la célula susceptible a niveles bajos de detergentes [121]. La proteína fructosa bifosfato aldolasa (MG023) en *Neisseria meningitidis* fue identificada como proteína moonlighting cuando una nueva función extra fue descrita además de la función enzimática. Esta nueva función es la unión a moléculas del huésped para conseguir una óptima unión a las células humanas [122] por lo que debe estar expuesta en la superficie celular. La proteína piruvato deshidrogenasa subunidad β (MG273) en *Mycoplasma pneumoniae* une a la fibronectina de la célula huésped tal y como se ha comentado previamente. Las interacciones entre las bacterias patogénicas y los componentes de la matriz extracelular son realmente relevantes en la iniciación y establecimiento de la infección [109]. La proteína enolasa en *Lactobacillus jensenii* (homóloga a MG407 de *Mycoplasma genitalium*) inhibe la interacción entre *Neisseria gonorrhoeae* y las células epiteliales a través de interacciones de esta proteína con la fibronectina de la matriz extracelular [123].

Gracias a la separación de las muestras en geles bidimensionales, en este experimento además de la información que proporciona la señal de los fluoróforos también podemos obtener información acerca del pI y MW de los spots. Los trenes de spots se observan como una línea horizontal de 2 o más spots. Si el incremento en pI entre un spot y el siguiente es de 0.6, este dato puede ser indicativo que la PTM que ha generado esa isoforma sea una fosforilación. Se observaron cuatro proteínas que presentaban varias isoformas formando trenes de spots que podrían estar generados por procesos de fosforilación. Estas proteínas son:

- Subunidad β del componente E1 de la piruvato deshidrogenasa (MG273): presentaba 3 isoformas de coloración naranja (F3-H3).
- Fosfotransacetilasa (MG299): de las 3 isoformas que se identificó, 2 concuerdan con procesos de fosforilación (A4 y B4).
- Proteína chaperona DnaK (MG305): se identificó en 5 spots diferentes. De estos, 3 presentaban una coloración naranja dispuestos como tren de spots, con una separación entre ellos que concuerda con la PTM de fosforilación (C1-E1).

- Enolasa/fosfopiruvato hidratasa (MG407): se identificó en los spots E2 y G2.

Todas ellas ya fueron descritas como fosfoproteínas en el trabajo de Su *et al.* [84].

Además de estas proteínas, se identificaron otras que también presentan isoformas dispuestas en trenes de spots, pero que no estaban generados por fosforilaciones ya que la el incremento en pI no es similar a 0.6. Estas proteínas son: MG045, MG141, MG274, MG377, MG392 y MG438.

Además de las isoformas generadas por procesos de fosforilación, también se identificaron isoformas generadas por otras PTMs. Estos spots presentaban variaciones tanto en el pI como en el MW. Estas proteínas son: proteína de adhesión MgPa, MG191 (80 KDa pI 9.31^{*}; 93 KDa pI 7.00; 43.4 KDa pI 7.72); fosfotransacetilasa, MG299 (36.2 KDa^{*} pI 6.99^{*}; 29 KDa pI 3.94); chaperona molecular DnaK, MG305 (81.5 KDa^{*} pI 6.66^{*} color naranja; 27.2 KDa pI 7.06 color verde); proteína accesoria de citoadherencia HMW3, MG317 (108.3 KDa pI 8.18; 39.1 KDa pI 6.81^{*}); y proteína similar OsmC, MG427 (25.1 KDa pI 6.86 color verde; 13 KDa^{*} pI 6.46^{*} color naranja).

*Valores similares a los estimados informáticamente

En este experimento, los geles DIGE revelaron información muy importante respecto dos proteínas. Las proteínas MG305 (chaperona molecular DnaK) y la MG427 (proteína similar a OsmC) fueron identificadas en diferentes spots, pero sólo una de las isoformas presentaba marcaje de superficie y la otra no. Las isoformas de estas proteínas que presentaban el marcaje de superficie son: chaperona molecular DnaK (MG305) 27.2KDa con un pI 7.06 y la proteína similar a OsmC (MG427) 25.1KDa con un pI 6.86. Estas proteínas aún y estar descritas como citoplasmáticas, han sido identificadas en la membrana de *Mycoplasma genitalium* en este trabajo. En trabajos anteriores, ambas proteínas también fueron identificadas en la superficie de la membrana de otras bacterias. En *Mycobacterium tuberculosis* la chaperona molecular DnaK fue identificada en la superficie de la bacteria para facilitar una eficiente asociación del microorganismo a los macrófagos del huésped [124]. En el caso de *Mycoplasma genitalium* esta proteína se identificó en la superficie bacteriana como una isoforma con la mitad de la masa molecular que la citoplasmática (únicamente con señal roja del fluoróforo). Esta reducción en la masa puede estar provocada por procesos de proteólisis en el extremo C-terminal, ya que no se pudo identificar péptidos en el extremo C-terminal (451-595 aminoácidos), tal y como se muestra en la figura IV.28.

```

1 MSADNGLIIG IDLGTINSCV SVMEGGRPVV LENPEGRRTT PSIVSYRKNNE
51 IIVGDAAKRQ MVTNPNTIVS IKRLMGTSNK VRVQNADGTT KELSPEQVSA
101 QILSYLKDFA EKKIGKISR AVITVPAYFN DASRNATKTA GKIAGLNVER
151 IINEPTAAAL AYGIDKASRE MKVLVYDLGG GTFDVSLLDI AEGTFEVLAT
201 AGDNRLGGDD WDNKIIIEYIS AYIAKEHQGL NLSKDKMAMQ RLKEAAERAK
251 IELSAQLETI ISLFFLTVTQ KQFVNVELKL TRAKFEELTK FLLETRNPI
301 SDVIKEAKIK FEINEILLV GGSTRMPAVQ KLVESMVPGK KPNRSINPDE
351 VVAIGAAIQG GVLRGDVKDV LLLDVTPLTL SIETLGGVAT FLIKRNTTIP
401 VSKSQIFSTA QDNQESVDVV VCQGERPMSR DNKSLGRFNL GGIQPAPKPK
451 PQIETTFSLD ANGILNVKAK DLTTQKENSI TISDNQNLSE EETQKMRDA
501 EANKERDNTI RERIELRNEG EGIVNTIKEI LASPOAKNFP KEEKLEKLEL
551 TGNIDAAIKA NDYAKLKVEI ENFKKWREEM AKKYNPTGEQ GPQAK

```

Fig.IV.28. Secuencia de la proteína MG305, en la que se muestra en rojo los péptidos identificados por espectrometría de masas MALDI-TOF.

La proteína similar OsmC (MG427) se identificó en la superficie celular de *Mycoplasma gallisepticum* [125]. La función de esta proteína en la superficie celular de esta bacteria es la unión con heparina que facilita la adhesión y la colonización de la célula huésped. En este caso, la reducción de la masa de la isoforma con marcaje de membrana es de un 50% respecto a la masa de la isoforma citoplasmática (únicamente con señal roja del fluoróforo). En este caso, sorprendentemente, se identificaron péptidos de ambos extremos aún y haberse detectado la proteína con un peso molecular inferior al estimado, tal y como se muestra en la figura IV.29.

```

1 MDKKYDITAV LNDSSINAV SDNFQITLDA RPKEKSKGIN PLSAFLAGLA
51 ACELATANAM AAAMITLTK ALINIKGYRL TNPSDGYFGL RELNIHWEIH
101 SPNEEEIEKE FIDFVSKRCP AHNTLHGTSN FKINISVTLV H

```

Fig.IV.29. Secuencia de la proteína similar OsmC (MG427) en la que se muestran en rojo los péptidos identificados por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Todas las proteínas identificadas como presentes en la superficie celular son potenciales dianas para el diagnóstico clínico, como también para el seguimiento bacteriano. De entre las proteínas identificadas, hay algunas proteínas que ya habían sido detectadas en la superficie celular, como la MgPa (MG191) [115] o la P65 (MG217) [126]. La chaperona GroEL, predicha originalmente como citoplasmática, desarrolla un papel importante en el plegamiento de muchas proteínas, pero además también se le ha descrito su presencia en la superficie celular donde desempeña un papel crucial en la adhesión de bacteriana en otros microorganismos [127, 128].

En esta parte del trabajo se ha presentado la identificación de proteínas de membrana que tienen expuestas regiones al medio extracelular. Algunas de estas proteínas ya habían sido descritas con dicha localización, mientras que otras es la primera vez que se describen en esta localización.

IV.D. INMUNOMA

El objetivo en este apartado es estudiar las proteínas inmunoreactivas de *Mycoplasma genitalium* mediante SERPA (Serological proteome analysis, análisis serológico del proteoma). Esta técnica permite identificar las proteínas de *Mycoplasma genitalium* que generan una respuesta inmune en el huésped.

Mycoplasma genitalium es el agente etiológico de uretritis no-gonococal en hombres y de cervicitis en mujeres, así como también está asociado con otras enfermedades genitales [13]. Debido a que es un microorganismo patógeno, es crucial conocer que proteínas generan en el huésped respuesta inmune. Si una proteína genera respuesta inmune en el huésped, esto es indicativo que esta proteína se encuentra en la primera línea de reconocimiento patógeno-huésped. El mecanismo por el que *Mycoplasma genitalium* infecta las células humanas es hoy en día desconocido y tampoco se conocen todas las proteínas implicadas en este proceso. Gracias a la aplicación de técnicas de inmunoproteómica se han podido identificar las proteínas inmunoreactivas de este micoplasma. La metodología aplicada al análisis del proteoma serológico (SERPA) está basada en la electroforesis bidimensional seguida de la transferencia tipo western y la identificación de las proteínas, mediante espectrometría de masas, para examinar y comparar los perfiles séricos frente al proteoma total de *Mycoplasma genitalium*. Para diseñar este experimento, se utilizó el trabajo de Oleaga *et al.* [129] como guía, donde se explica con gran detalle todo el procedimiento. Esta metodología también ha sido utilizada en otros organismos como *Mycobacterium tuberculosis* [130], *Streptococcus pneumoniae* [131], *Candida albicans* [132] y *Neisseria meningitidis* [133]. Para conseguir el objetivo planteado en este apartado, se han utilizado tanto sueros de pacientes infectados (14 individuos) diagnosticados como infectados por dicho microorganismo, como también sueros de controles (11 individuos). Se decidió formar estos dos subgrupos, donantes sanos y pacientes infectados, ya que recientemente se ha publicado que *Mycoplasma genitalium* tiene una prevalencia muy elevada entre la población femenina [134]. De esta manera, no sólo trataremos de identificar las proteínas contra las que se generan anticuerpos cuando se entra en contacto con esta bacteria, sino también las proteínas que generan respuesta inmune en situación de infección.

Este experimento ha sido posible gracias a la colaboración de compañeros del "Institut de Biotecnologia i de Biomedicina" de la Universidad Autónoma de Barcelona que donaron su sangre para poder disponer de sueros control y también gracias a la colaboración del Doctor

Guillermo Ezepeleta del Hospital de Basurto (Bilbao), que facilitó los sueros de pacientes infectados y diagnosticados con dicho microorganismo.

El primer paso que se realizó fue comprobar la inmunoreactividad de los diferentes sueros, tanto de los controles como de los pacientes, frente a extractos proteicos totales de *Mycoplasma genitalium*. En la figura IV.30, se observa el western obtenido al incubar con cada uno de los sueros control.

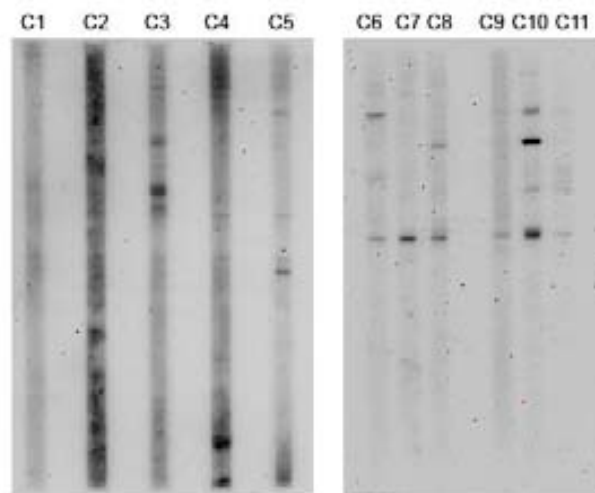


Fig.IV.30. Western-blot de los sueros control.

Sorprendentemente, todos los sueros control dieron positivo, es decir, reaccionaron contra alguna proteína de *Mycoplasma genitalium* aún y ser obtenidos de personas asintomáticas sanas. Quizás esto corrobora la hipótesis de que este microorganismo forma parte de la flora urogenital y por eso se observa reactividad frente algunas proteínas o que un tanto por ciento muy elevado de la población está en contacto con dicho microorganismo. Para validar una de las dos hipótesis habría que realizar el estudio con donantes que no hayan tenido relaciones sexuales. Si en estos donantes se observara señal, sería un indicativo de la existencia de dicho microorganismo en la flora bacteriana [135].

En la figura IV.31 se observa el western obtenido al incubar con los sueros de cada uno de los pacientes.

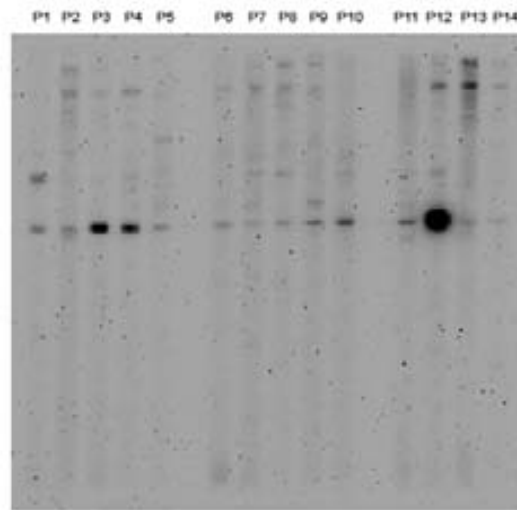


Fig.IV.31. Western-blot de los sueros de pacientes.

Tanto en los westerns de controles como en lo de pacientes, aparece una banda común a todos, que en el caso del paciente P12 es muy intensa, mientras que el resto del patrón obtenido varía entre carriles. El número de proteínas reconocidas es variable en cada suero. Es posible que esto represente las diferencias innatas en cada individuo en la respuesta inmune a los antígenos o a variaciones a la exposición a antígenos en los diferentes pacientes debido a variaciones en los tiempos de tratamiento o a la severidad en la enfermedad.

Una vez evaluada la inmunoreactividad del suero de cada individuo, tanto control como paciente, se separó la muestra proteica total de *Mycoplasma genitalium* en geles 2DE para posteriormente transferirlo a una membrana. Para poder estandarizar ambos grupos, controles y pacientes, se realizó un pool de sueros para poder realizar western-blot que fueran representativos de cada grupo. En el caso de los controles solo se utilizaron los controles 6-11, ya que los controles 1-5 generaban un patrón poco definido.

En la figura IV.32 se muestra el 2DE-western obtenido con el pool de sueros control y en la figura IV.33, el obtenido con el pool de sueros de pacientes infectados.

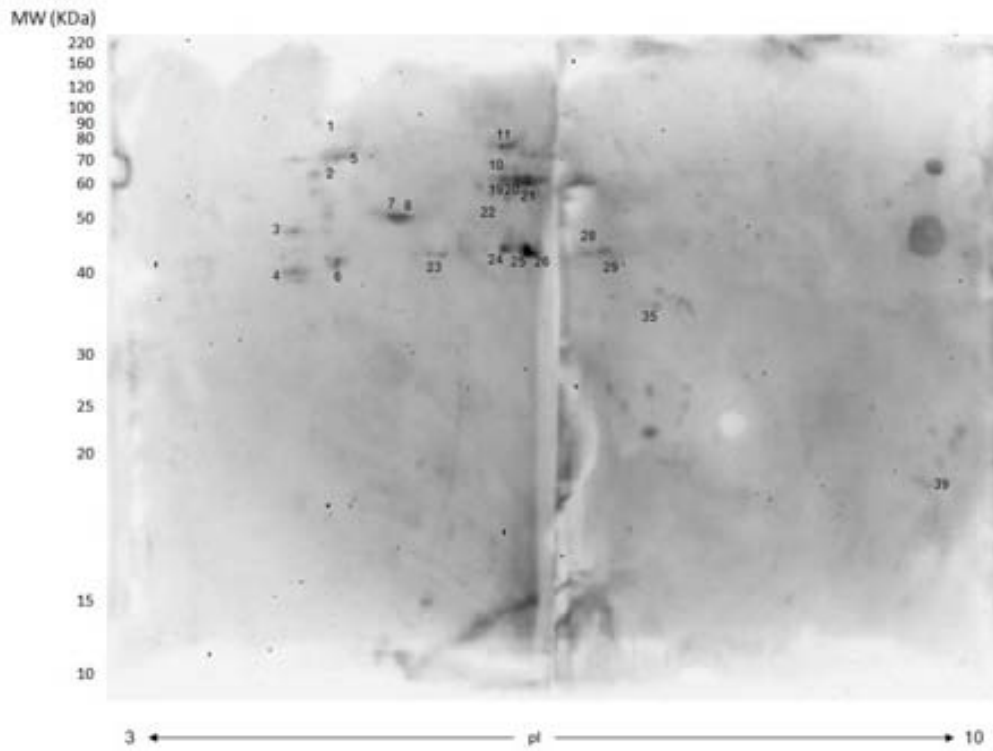


Fig.IV.32. Western-blot del proteoma total en rango de pI de 3-10 de *M. genitalium* incubado con el pool de sueros control.

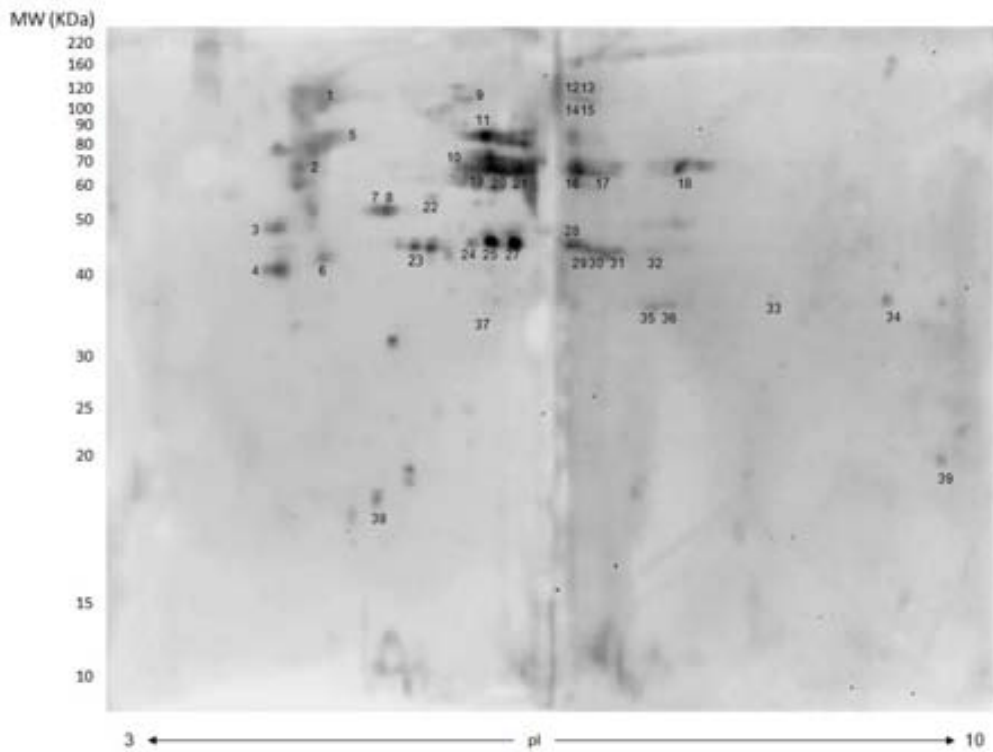


Fig.IV.33. Western-blot del proteoma total en rango de pI de 3-10 de *M. genitalium* incubado con el pool de sueros de pacientes infectados.

En paralelo a los geles 2DE para transferir a membranas para los westerns, se realizó un gel 2DE adicional que fue teñido con plata (figura IV.34) para poder picar los spots que en los westerns dieron señal. De esta manera se identificaron las proteínas antigénicas en el gel teñido en plata.

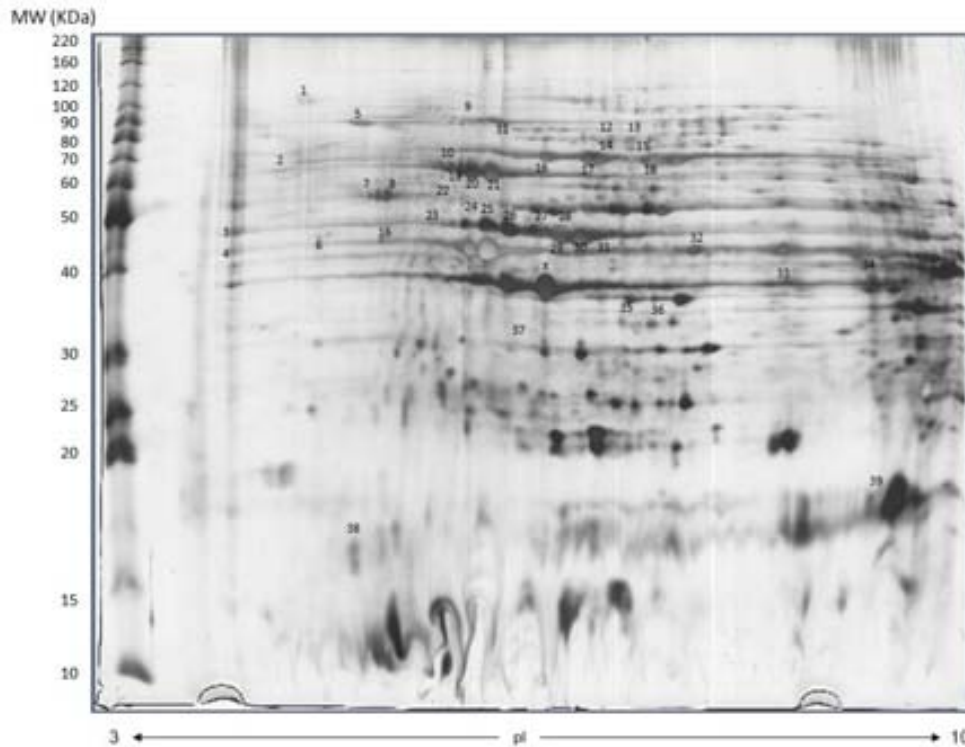


Fig.IV.34. 2DE del proteoma total en rango de pH de 3-10 de *M. genitalium* teñido con plata.

Gracias a esta técnica se pudieron identificar un total de 39 spots correspondientes a 19 proteínas inmunoreactivas (4%) (Tabla 9, anexo). Estas proteínas fueron clasificadas siguiendo las categorías COG, Tabla.IV.8, obteniendo representantes de sólo siete grupos y también proteínas sin COG asignado, grupo con más proteínas identificadas (26.3%).

Tabla.IV.8. Tabla de la clasificación según las categorías COG de las proteínas identificadas mediante inmunoproteómica en *M. genitalium*.

| Letra | Categoría | Estimadas | Identificadas | %* |
|-------|--|-----------|---------------|------|
| C | Conversión y producción de energía | 21 | 4 | 21.1 |
| E | Transporte y metabolismo de aminoácidos | 20 | 1 | 5.3 |
| J | Traducción, biogénesis y estructura ribosomal | 106 | 1 | 5.3 |
| K | Transcripción | 18 | 1 | 5.3 |
| O | Modificaciones post-traduccionales, plegamiento proteínas y chaperonas | 21 | 3 | 15.8 |
| R | Predicción función general | 44 | 3 | 15.8 |
| V | Mecanismos de defensa | 8 | 1 | 5.3 |
| - | No COG | 110 | 5 | 26.3 |

* % de las proteínas identificadas respecto del total identificado.

Para visualizar mejor los resultados y poder apreciar la abundancia de cada categoría se realizó la representación gráfica de los resultados, como se muestra en la figura IV.35.

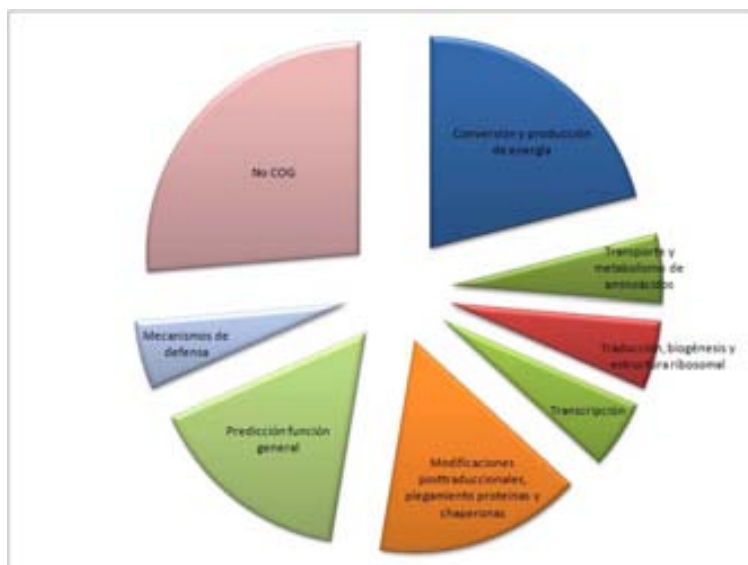


Fig.IV.35. Representación de la abundancia de cada categoría COG de proteínas identificadas en el ensayo mediante inmunoproteómica en *M. genitalium*.

En los sueros control se identificaron 13 proteínas, mientras que en los sueros de pacientes fueron identificadas 19. Muchas de estas proteínas fueron identificadas en más de un spot, a menudo con la misma masa molecular pero con diferentes valores de punto isoeléctrico. El hecho de que las diferentes isoformas de una misma proteína sean reconocidas por los anticuerpos implica que estas retienen su inmunogenicidad o bien que existen diferentes anticuerpos contra la misma proteína.

Al comparar los resultados obtenidos con los ensayos anteriores (fraccionamiento con TX-114 y marcaje de superficie con CyDye), se observó que el 100% de las proteínas identificadas en este capítulo se habían identificado en uno o ambos ensayos anteriores. Más concretamente, el 42% (8 proteínas) se identificaron en ambos métodos, el 11% (2 proteínas) sólo en el ensayo de fraccionamiento con TX-114 y el 47% (9 proteínas) sólo en el ensayo de marcaje de superficie con CyDye. De esta manera se corroboró en el caso de *Mycoplasma genitalium*, que las proteínas inmunoreactivas se encuentran mayoritariamente expuestas en la membrana, ya que 17 de las 19 proteínas identificadas se detectaron mediante el marcaje específico de regiones expuestas en la membrana (CyDye). Las otras dos proteínas se identificaron como hidrofóbicas mediante el fraccionamiento con TX-114. A pesar de haberse identificado estas dos proteínas en la fracción de TX-114, no implica que forzosamente tengan que estar en la

membrana, pero el hecho de que generen respuesta inmune sí que implica que son accesibles de algún modo al sistema inmune del huésped. Estas dos proteínas son la MG020: prolina iminopeptidasa y la MG399: FOF1 ATP sintasa subunidad β .

Observando la señal obtenida en ambos westerns, las proteínas que proporcionan una mayor señal son:

- Proteína hipotética: MG218.1 (spot 25).
- Subunidad E2 α -keto ácido deshidrogenasa: MG272 (spot 9).
- Proteína accesoria de citoadherencia HMW3: MG317 (spot 16).
- Chaperona GroEL: MG392 (spot 20).

En el caso del MG317 cabe destacar que es reconocido por ambos pools de sueros, pero una de las isoformas de esta proteína da señal exclusivamente en el western incubado con el suero de pacientes.

Mediante el diseño de este experimento no sólo se pretendía identificar las proteínas inmunoreactivas de *Mycoplasma genitalium*, sino identificar si existía alguna proteína diferencial entre controles y pacientes. Comparando ambos westerns se pudieron identificar seis proteínas en las membranas incubadas con el pool de sueros de pacientes, que no se observaron en las membranas incubadas con el pool de sueros de controles. Estas proteínas diferenciales fueron identificadas como:

- Proteína adhesión MgPa: MG191 (spot 4).
- Hidrolasa Cof similar (dominio haloácido deshalogenasa hidrolasa): MG265 (spot 8).
- Factor de elongación transcripcional GreA: MG282 (spot 11).
- Fosfotransacetilasa: MG299 (spot 12).
- Chaperona molecular DnaK: MG305 (spot 14).
- Proteína con dominio de restricción/modificación específico de DNA tipo I: MG438 (spot 19).

Estas seis proteínas fueron identificadas en el ensayo de marcaje con CyDye con coloración vercosa, es decir expuestas en la superficie del microorganismo, excepto en los casos MG265 y MG299 que presentan una coloración naranja-amarillo, indicando que coexisten formas expuestas en la superficie del microorganismo y formas citoplasmáticas. Las proteínas MG191, MG305 y MG438 también fueron identificadas en el fraccionamiento con TX-114. De estas 6 proteínas, MG299 y MG305, fueron observadas como trenes de spots que podrían estar

generados por procesos de fosforilación en el ensayo de marcaje de superficie mediante CyDye y de hecho ya fueron descritas como fosfoproteínas en el trabajo de Su *et al.* [84].

Algunas de estas proteínas tienen una función citoplasmática. La explicación más factible para esta respuesta inmune sería que se haya generado durante un periodo de septicemia en el cual las células de *Mycoplasma genitalium* mueren liberando su contenido citoplasmático a la circulación, pero en algún caso se ha demostrado en este trabajo la presencia de alguna isoforma en la superficie celular. Si se tratase de proteínas liberadas como resultado de un periodo de septicemia que genera una liberación del contenido citoplasmático de *M. genitalium* al torrente sanguíneo, estos no serían, desafortunadamente, buenos candidatos para el desarrollo de vacunas o fármacos contra este microorganismo ya que no serían proteínas accesibles al sistema inmune durante el periodo de infección del huésped.

Se han identificado 6 proteínas como causantes de respuesta inmune diferencial entre donantes sanos y pacientes infectados, detectadas exclusivamente en pacientes infectados. Hasta el momento, no se había descrito esta función inmunoreactiva para la mayoría de ellas. Por este motivo, se buscó información bibliográfica sobre estas proteínas y su posible capacidad inmunogénica. La proteína de adhesión MgPa (MG191) ha sido descrita como esencial para la adhesión celular en *M. genitalium* [115]. Esta proteína como se puede ver en los resultados mostrados en el presente trabajo es muy inmunogénica, necesaria para la adhesión del microorganismo y sólo es reconocida por el suero de pacientes infectados.

En *Mycobacterium avium* se ha demostrado que el factor de elongación transcripcional GreA (MG282) genera una respuesta inmune diferencial entre ovejas controles e infectadas [136], generando respuesta sólo en las ovejas infectadas. En el caso de chaperona DnaK (MG305), existe un estudio de las infecciones generadas por *Burkholderia mallei* (causante de la enfermedad llamada muermo, considerada como zoonosis) en el que se detectaron anticuerpos contra dicha proteína en ganglios tanto de humanos como de ratones infectados [137]. En este trabajo de Amemiya *et al.* se observó que la señal obtenida por la chaperona GroEL era más intensa que la obtenida para la DnaK. En *M. genitalium* ambas proteínas han sido detectadas pero la señal obtenida para la DnaK era mayor que la obtenida para la chaperona GroEL.

Un caso diferente es el de la proteína fosfotransacetilasa o fosfoacetiltransferasa (MG299). En muchas bacterias patogénicas se ha detectado que el acetilfosfato sirve como señal global de patogénesis [138]. En el caso de infección por *Borrelia burgdorferi* (causante de la enfermedad de Lyme) en ratón se observó que el aumento de la actividad de este enzima en el huésped

reduce parcialmente la infección. En *Mycoplasma genitalium*, a partir del análisis realizado en este trabajo, se ha detectado que el sistema inmune del huésped genera anticuerpos contra la fosfotransacetilasa bacterial. En cambio en el estudio con *Borrelia*, lo que se detectó es que aumenta la función del enzima en el huésped [139]. Habría que analizar si en la célula huésped infectada por *M. genitalium* también se observa un aumento de la actividad de este enzima. En el caso de la proteína Cof hidrolasa similar (MG265) como de la proteína con dominio de restricción/modificación específico de DNA tipo I (MG438) no se encontró ningún trabajo en el que se la relacionara con la respuesta inmune en el huésped. Con lo que esta es la primera vez que se relaciona a estas proteínas con la respuesta inmune del huésped.

Para evaluar la fiabilidad de esta técnica se realizó la identificación de un spot muy abundante en el gel teñido con plata (spot anotado como X en la figura IV.41) pero que no aparece en las membranas de westerns. Este spot se escindió del gel para ser identificado y correspondía a la subunidad β de la piruvato deshidrogenasa (MG273). Esta proteína fue identificada en el ensayo de fraccionamiento de TX-114 y también mediante el marcaje de superficie con CyDye. Esta observación indica que aún y estar presente en la membrana y en abundancia, no genera respuesta inmune en el huésped por lo que no se dan procesos de identificación inespecífica en este ensayo.

A parte de las proteínas específicas de los sueros de pacientes, también se identificaron seis proteínas en el inmunoma, las cuales dan señal tanto en sueros control como en pacientes infectados y además, estas no fueron identificadas en el surfoma. Estas proteínas son la prolina iminopeptidasa (MG020), hidrolasa Cof similar (MG263), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (MG301), HMW3 proteína accesoria de citoadherencia (MG312), acetato quinasa (MG357) y la subunidad β de la ATP sintasa F0F1 (MG399). Estas proteínas presentaron señal en ambos westerns. La proteína gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (MG301) fue localizada en la superficie celular de *Mycoplasma genitalium* donde se ha demostrado que interacciona con proteínas de la célula huésped y juega un papel clave en la adhesión a las mucinas humanas [140].

En este experimento también se identificaron cinco proteínas que generaban respuesta inmune tanto en los controles como en los pacientes y que también fueron identificadas en el ensayo del surfoma. Estas proteínas son: proteína con dominio similar a DnaJ (MG200), subunidad α del componente E1 de la piruvato deshidrogenasa (MG274), chaperona GroEL (MG392), factor de elongación Tu (MG451) y lactato deshidrogenasa (MG460). La proteína con

dominio similar a DnaJ (MG200) ha sido descrita en *Mycoplasma genitalium* como esencial para la adhesión celular y para el desarrollo de la organela terminal [115]. La subunidad α del componente E1 de la piruvato deshidrogenasa (MG274) y la lactato deshidrogenasa (MG460) han sido descritas como unas de las proteínas de membrana más inmunogénicas en *Mycoplasma genitalium* [141] y en *Neospora caninum* [142] respectivamente. La chaperona GroEL (MG392) en *Mycobacterium tuberculosis* facilita la eficiente asociación de la bacteria con los macrófagos [124]. El factor de elongación Tu (MG451) en *Mycoplasma pneumoniae* presenta la capacidad de unión a fibronectina [143]. Las interacciones entre las bacterias patogénicas y componentes de la matriz extracelular juegan un papel clave para el inicio y el establecimiento de la infección [109].

Aunque hay un trabajo previo publicado en el cual se evaluó la respuesta inmune de conejo frente a la proteína más inmunogénica de *Mycoplasma genitalium*, MgPa [144], los resultados mostrados en el presente trabajo representan el primer análisis de la inducción natural de la respuesta inmune humana contra la infección por *Mycoplasma genitalium* con implicaciones no sólo para el entendimiento de dicha respuesta inmune sino también para la identificación de las proteínas que producen una señal diferencial entre controles y pacientes.

Los antígenos identificados demuestran que los pacientes infectados con *Mycoplasma genitalium* presentan una respuesta inmune variable contra una amplia gama de antígenos de dicho microorganismo. Los sueros testados contienen anticuerpos capaces de reconocer un rango de proteínas de *Mycoplasma genitalium*, algunas de las cuales es la primera vez que se demuestra su accesibilidad en la superficie de las células de *Mycoplasma genitalium* para las IgGs.

IV.E. CONCLUSIONES

- Se ha identificado el 85.3% de los ORFs predichos en el genoma de *Mycoplasma genitalium*, siendo el análisis proteómico más extenso realizado en este microorganismo y una de las coberturas de proteoma más extensa hasta la fecha.
- Se ha desarrollado un nuevo protocolo para la identificación del proteoma total mediante biotina en *Mycoplasma genitalium*.
- Se ha identificado y confirmado la existencia de las proteínas codificadas por los genes MG199, MG288 y MG333 previamente anotados como pseudogenes, así como de una nueva proteína localizada en la región intergénica entre MG469 y MG470.
- Mediante crecimiento en medio mínimo MM14 se ha determinado que el proteoma indispensable se reduce a 192 proteínas.
- Se han determinado las proteínas solubles en TX-114, se han identificado 250 proteínas, presentando varias isoformas con diferencias relevantes en cuanto la masa molecular y el punto isoelectrico. Asimismo, en esta fracción aparecen numerosas proteínas generalmente consideradas citoplasmáticas (p.e. proteínas ribosomales, subunidad β de la piruvato deshidrogenasa, ...).
- Se ha determinado el Surfoma de *Mycoplasma genitalium*. Se han identificado 34 proteínas con regiones expuestas en la membrana mediante el marcaje de los dominios extracelulares con fluoróforos.
- También se ha determinado en las proteínas MG305 y MG427 la existencia de dos isoformas, una en la superficie de la membrana de *Mycoplasma genitalium* y otra no presente en dicha localización.
- Se ha determinado el Inmunoma de *Mycoplasma genitalium*. Se han identificado 19 proteínas inmunoreactivas en *Mycoplasma genitalium*, 13 en controles y 19 en pacientes. Los diferentes sueros humanos muestran que sus anticuerpos corresponden a diferentes proteínas del patógeno. Asimismo, se han identificado 6 proteínas diferenciales en *Mycoplasma genitalium* entre donantes sanos y pacientes infectados; tres de las cuales no se les había asignado la capacidad inmunoreactiva anteriormente. Estas proteínas podrían tener interés para diseñar métodos de diagnóstico y vacunas en *Mycoplasma genitalium*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Maniloff, J.M., R.N.; Finc, L.R.; Baseman J.B., *Mycoplasmas, molecular biology and pathogenesis*. American Society for Microbiology. 1992, Washington.
2. Chalker, V.J., *Canine mycoplasmas*. Res Vet Sci, 2005. **79**(1): p. 1-8.
3. Razin, S., *DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infections*. Mol Cell Probes, 1994. **8**(6): p. 497-511.
4. Razin, S., *Molecular biology and genetics of mycoplasmas (Mollicutes)*. Microbiol Rev, 1985. **49**: p. 419-455.
5. Rottem, S.K., I., *Mycoplasma cell membranes*. Plenum Press. 1993, New York.
6. Seto, S., et al., *Involvement of P1 adhesin in gliding motility of Mycoplasma pneumoniae as revealed by the inhibitory effects of antibody under optimized gliding conditions*. J Bacteriol, 2005. **187**(5): p. 1875-7.
7. Razin, S. and E. Jacobs, *Mycoplasma adhesion*. J Gen Microbiol, 1992. **138**(3): p. 407-22.
8. Feberwee, A., et al., *Comparison of culture, PCR, and different serologic tests for detection of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae infections*. Avian Dis, 2005. **49**(2): p. 260-8.
9. Fraser, C.M., et al., *The minimal gene complement of Mycoplasma genitalium*. Science, 1995. **270**(5235): p. 397-403.
10. Blattner, F.R., et al., *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12*. Science, 1997. **277**(5331): p. 1453-62.
11. Miles, R.J., *Catabolism in mollicutes*. J Gen Microbiol, 1992. **138**(9): p. 1773-83.
12. Neyrolles, O., et al., *Organization of Ureaplasma urealyticum urease gene cluster and expression in a suppressor strain of Escherichia coli*. J Bacteriol, 1996. **178**(9): p. 2725.
13. Jensen, J.S., *Mycoplasma genitalium: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2004. **18**(1): p. 1-11.
14. Tully, J.G., Taylor-Robinson, D., Cole.R.M., Rose, D.L., *A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract*. Lancet, 1981. **13**: p. 1288-1291.
15. Guell, M., et al., *Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium*. Science, 2009. **326**(5957): p. 1268-71.
16. Lluch-Senar, M., et al., *A new promoterless reporter vector reveals antisense transcription in Mycoplasma genitalium*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 8): p. 2743-52.
17. Rasmussen, S., et al., *Evolution. Transitions from nonliving to living matter*. Science, 2004. **303**(5660): p. 963-5.
18. Lo, S.C., et al., *Mycoplasma penetrans sp. nov., from the urogenital tract of patients with AIDS*. Int J Syst Bacteriol, 1992. **42**(3): p. 357-64.
19. Tully, J.G., et al., *Enhanced isolation of Mycoplasma pneumoniae from throat washings with a newly-modified culture medium*. J Infect Dis, 1979. **139**(4): p. 478-82.
20. Yus, E., et al., *Impact of genome reduction on bacterial metabolism and its regulation*. Science, 2009. **326**(5957): p. 1263-8.
21. Gardy, J.L., et al., *PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis*. Bioinformatics, 2005. **21**(5): p. 617-23.
22. Cedano, J., et al., *Relation between amino acid composition and cellular location of proteins*. J Mol Biol, 1997. **266**(3): p. 594-600.
23. Sun, X., et al., *Proteomic analysis of membrane proteins from Streptococcus pneumoniae with multiple separation methods plus high accuracy mass spectrometry*. OMICS, 2011. **15**(10): p. 683-94.

24. Rodríguez-Ortega, M.J., et al., *Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A Streptococcus surface proteome*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(2): p. 191-7.
25. Wilkins MR, W.K., Appel RD, Hochstrasser DF, *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics (Principles and Practice)*. Springer ed. Proteome research. 1997, Berlin.
26. Castellanos, L., González, L.J., Padrón, G., *Combinatoria molecular* 2004. **Capítulo 20**: p. 369.
27. Jeffery, C.J., *Moonlighting proteins--an update*. Mol Biosyst, 2009. **5**(4): p. 345-50.
28. Buckingham, S., *The major world of microRNAs*. <http://www.nature.com/horizon/rna/background/micrnas.html>, 2003.
29. López, J.A.C., L.E.; Beloso, A.; Albar, J.P. *Proteómica: Una nueva estrategia para la identificación de proteínas. Curso práctico de proteómica*. 2001. CNB-CSIC, Madrid.
30. Lahm, H.W. and H. Langen, *Mass spectrometry: a tool for the identification of proteins separated by gels*. Electrophoresis, 2000. **21**(11): p. 2105-14.
31. Pandey, A. and M. Mann, *Proteomics to study genes and genomes*. Nature, 2000. **405**(6788): p. 837-46.
32. Jensen, O.N., *Modification-specific proteomics: Systematic strategies for analysing post-translationally modified proteins*. Proteomics: A Trends Guide, 2000: p. 36-42.
33. O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem, 1975. **250**(10): p. 4007-21.
34. Gorg, A., et al., *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. Electrophoresis, 2000. **21**(6): p. 1037-53.
35. Rabilloud, T., *Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis*. Electrophoresis, 1998. **19**: p. 758-760.
36. McCarthy, J., et al., *Carbamylation of proteins in 2-D electrophoresis--myth or reality?* J Proteome Res, 2003. **2**(3): p. 239-42.
37. Gorg, A., W. Weiss, and M.J. Dunn, *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics*. Proteomics, 2004. **4**(12): p. 3665-85.
38. Henningsen, R., et al., *Application of zwitterionic detergents to the solubilization of integral membrane proteins for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry*. Proteomics, 2002. **2**(11): p. 1479-88.
39. Chevallet, M., et al., *New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis*. Electrophoresis, 1998. **19**(11): p. 1901-9.
40. Santoni, V., et al., *Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels*. Electrophoresis, 1999. **20**(4-5): p. 705-11.
41. Herbert, B.R., et al., *Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent*. Electrophoresis, 1998. **19**(5): p. 845-51.
42. Creighton, T.E., *Proteins: structures and molecular properties*. Freeman and Company, 1993. **Second edition**.
43. Bjellqvist, B., et al., *Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications*. J Biochem Biophys Methods, 1982. **6**(4): p. 317-39.
44. Griffiths, I.W.J.J.T., *The centenary of his discovery of the electron and of his invention of mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom, 1997. **11**: p. 2-16.
45. Beynon, J.H., *The use of the mass spectrometer for the identification of organic compounds*. Mikrochim, Acta. 1956. 437-453.
46. Biemann, K., et al., *Determination of the amino acid sequence in oligopeptides by computer interpretation of their high-resolution mass spectra*. J Am Chem Soc, 1966. **88**(23): p. 5598-606.

47. Barber, M.B., R.S.; Sedgwick, R.D.; Tyler, A.N., *Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spectroscopy*. Nature, 1981. **293**: p. 270-275.
48. Liu, L.K.B., K.L.; Cooks R.G., *Matrix-assisted secondary ion mass spectra of biological compounds*. Analytical Chemistry, 1981. **53**: p. 109.
49. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
50. Karas, M.H., F., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large*. Anal. Chem, 1988. **60**: p. 2299-2301.
51. Tanaka, K.W., H.; Ido, Y.; Akita S., et al., *Protein and polymer analysis up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom., 1988. **2**: p. 151.
52. Chowdhury, S.K.K., V.; Chait, B.T., *Probing conformational changes in proteins by mass spectrometry*. J. American Chem Society, 1990. **112**: p. 9012-9013.
53. Chowdhury, S.K., V. Katta, and B.T. Chait, *Electrospray ionization mass spectrometric peptide mapping: a rapid, sensitive technique for protein structure analysis*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **167**(2): p. 686-92.
54. Henzel, W.J.B., T.M.; Stults, J.T.; Wong S.C.; et al., *Identifying proteins from 2-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases*. Proc. Natl. Acad. Sci, 1993. **90**: p. 5011-5015.
55. Gygi, S.P.R., B.; Gerber, S.A.; Turecek, F.; et al., *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags*. Nature Biotechnology, 1999. **17**: p. 994-999.
56. Hoffmann, E.S., V., *Mass spectrometry: principles and applications*. Second edition, ed. L. John Wiley & Sons. 2002, Chichester.
57. Li, K.Y., H. Tu, and A.K. Ray, *Charge limits on droplets during evaporation*. Langmuir, 2005. **21**(9): p. 3786-94.
58. Kebarle, P. and U.H. Verkerk, *Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now*. Mass Spectrom Rev, 2009. **28**(6): p. 898-917.
59. Iribarne, J.V., *On the evaporation of small ions from charged droplets*. Journal of Chemical Physics, 1976. **64** ((6)): p. 2287-2294.
60. Dole, M.M., L. L.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B. , *Molecular Beams of Macroions*. Journal of Chemical Physics, 1968. **49**(5): p. 2240-2249.
61. Emmett MR, C.R., *Micro-electrospray mass spectrometry: ultra-high-sensitivity analysis of peptides and proteins*. J. Am. Soc. Mass Spectrom, 1994. **5**(7): p. 605-613.
62. Wilm MS, M.M., *Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?* Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc, 1994. **136**(2-3): p. 167-180.
63. Shevchenko, A., et al., *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2856-60.
64. Jones, O.T.E., J.P.; McNamee, M.G., *Solubilization and reconstitution of membrane proteins*, in *Biological Membranes: A Practical Approach*, I.J.B.C.F.a.W.H.E.E.I. Press, Editor. 1987: Washington, DC. p. 139-177.
65. von Heijne, G., *A day in the life of Dr. K. or how I learned to stop worrying and love lysozyme: a tragedy in six acts*. J. Mol. Biol, 1999. **293**: p. 367-379.
66. Rais, I., M. Karas, and H. Schagger, *Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification*. Proteomics, 2004. **4**(9): p. 2567-71.
67. Helling, S.S., E.; Joppich, C.; Schulenberg, T. et al., *2-D differential membrane protein analysis of scarce protein samples*. Proteomics, 2006. **6**: p. 4506-4513.

68. Hartinger, J., et al., *16-BAC/SDS-PAGE: a two-dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins*. Anal Biochem, 1996. **240**(1): p. 126-33.
69. Schagger, H., *Tricine-SDS-PAGE*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 16-22.
70. Schagger, H. and G. von Jagow, *Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form*. Anal Biochem, 1991. **199**(2): p. 223-31.
71. Bordier, C., *Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution*. J Biol Chem, 1981. **256**(4): p. 1604-7.
72. Arnold, T. and D. Linke, *Phase separation in the isolation and purification of membrane proteins*. Biotechniques, 2007. **43**(4): p. 427-30, 432, 434 passim.
73. Seddon, A.M.C., P.; Booth, J.P., *Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera*. Biochimica et Biophysica Acta, 2004. **166**: p. 105-117.
74. Unlu, M., M.E. Morgan, and J.S. Minden, *Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts*. Electrophoresis, 1997. **18**(11): p. 2071-7.
75. Pitarch, A., C. Nombela, and C. Gil, *Proteomic profiling of serologic response to Candida albicans during host-commensal and host-pathogen interactions*. Methods Mol Biol, 2009. **470**: p. 369-411.
76. Wang, R.Y., et al., *Mycoplasma genitalium infection and host antibody immune response in patients infected by HIV, patients attending STD clinics and in healthy blood donors*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1997. **19**(3): p. 237-45.
77. Wasinger, V.C., J.D. Pollack, and I. Humphery-Smith, *The proteome of Mycoplasma genitalium. Chaps-soluble component*. Eur J Biochem, 2000. **267**(6): p. 1571-82.
78. Kuhner, S., et al., *Proteome organization in a genome-reduced bacterium*. Science, 2009. **326**(5957): p. 1235-40.
79. Cordwell, S.J. and T.E. Thingholm, *Technologies for plasma membrane proteomics*. Proteomics. **10**(4): p. 611-27.
80. Hopkins, A.L. and C.R. Groom, *Target analysis: a priori assessment of druggability*. Ernst Schering Res Found Workshop, 2003(42): p. 11-7.
81. Regula, J.T., et al., *Towards a two-dimensional proteome map of Mycoplasma pneumoniae*. Electrophoresis, 2000. **21**(17): p. 3765-80.
82. Ferrer-Navarro, M., et al., *Proteome of the bacterium Mycoplasma penetrans*. J Proteome Res, 2006. **5**(3): p. 688-94.
83. Thomas, A., et al., *Identification by two-dimensional electrophoresis of a new adhesin expressed by a low-passaged strain of Mycoplasma bovis*. Res Microbiol, 2005. **156**(5-6): p. 713-8.
84. Su, H.C., C.A. Hutchison, 3rd, and M.C. Giddings, *Mapping phosphoproteins in Mycoplasma genitalium and Mycoplasma pneumoniae*. BMC Microbiol, 2007. **7**: p. 63.
85. Elia, G., *Biotinylation reagents for the study of cell surface proteins*. Proteomics, 2008. **8**(19): p. 4012-24.
86. 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**: p. 248-54.
87. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
88. Rabilloud, T., *Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis*. Anal Chem, 2000. **72**(1): p. 48A-55A.
89. Yan, J.X., et al., *A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry*. Electrophoresis, 2000. **21**(17): p. 3666-72.

90. Perkins, D.N., et al., *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data*. Electrophoresis, 1999. **20**(18): p. 3551-67.
91. Aloy, P., et al., '*TransMem*': a neural network implemented in Excel spreadsheets for predicting transmembrane domains of proteins. Comput Appl Biosci, 1997. **13**(3): p. 231-4.
92. Sonnhammer, E.L., S.R. Eddy, and R. Durbin, *Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments*. Proteins, 1997. **28**(3): p. 405-20.
93. Gomez, A., et al., *Prediction of protein function improving sequence remote alignment search by a fuzzy logic algorithm*. Protein J, 2008. **27**(2): p. 130-9.
94. Kim, S.J., et al., *The presence of bacteria in the synovial fluid of the temporomandibular joint and clinical significance: preliminary study*. J Oral Maxillofac Surg, 2003. **61**(10): p. 1156-61.
95. Baseman, J.B., et al., *Isolation and characterization of Mycoplasma genitalium strains from the human respiratory tract*. J Clin Microbiol, 1988. **26**(11): p. 2266-9.
96. Bjornelius, E., J.S. Jensen, and P. Lidbrink, *Conjunctivitis associated with Mycoplasma genitalium infection*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(7): p. e67-9.
97. Dhandayuthapani, S., W.G. Rasmussen, and J.B. Baseman, *Stability of cytoadherence-related proteins P140/P110 in Mycoplasma genitalium requires MG218 and unidentified factors*. Arch Med Res, 2002. **33**(1): p. 1-5.
98. Hutchison, C.A., et al., *Global transposon mutagenesis and a minimal Mycoplasma genome*. Science, 1999. **286**(5447): p. 2165-9.
99. Ferrer-Navarro, M., *Analisis de los proteomas de dos micoplasmas: Mycoplasma penetrans y Mycoplasma genitalium*. Tesis doctoral, 2005.
100. Tatusov, R.L., E.V. Koonin, and D.J. Lipman, *A genomic perspective on protein families*. Science, 1997. **278**(5338): p. 631-7.
101. Larkin, S. and C. Aukim-Hastie, *Proteomic evaluation of cancer cells: identification of cell surface proteins*. Methods Mol Biol, 2011. **731**: p. 395-405.
102. Walters, M.S. and H.L. Mobley, *Identification of uropathogenic Escherichia coli surface proteins by shotgun proteomics*. J Microbiol Methods, 2009. **78**(2): p. 131-5.
103. Andres, E., N. Martinez, and A. Planas, *Expression and characterization of a Mycoplasma genitalium glycosyltransferase in membrane glycolipid biosynthesis: potential target against mycoplasma infections*. J Biol Chem, 2011. **286**(41): p. 35367-79.
104. Razin, S., *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*. Academic Press, INC, 1995. **1**.
105. Maier, T., et al., *Quantification of mRNA and protein and integration with protein turnover in a bacterium*. Mol Syst Biol, 2011. **7**: p. 511.
106. Catrein, I. and R. Herrmann, *The proteome of Mycoplasma pneumoniae, a supposedly "simple" cell*. Proteomics, 2011. **11**(18): p. 3614-32.
107. Sun, X., et al., *Bacterial proteome of streptococcus pneumoniae through multidimensional separations coupled with LC-MS/MS*. OMICS, 2011. **15**(7-8): p. 477-82.
108. Berg, C.P.K., T. R.; Klein, R.; Gregor, M.; Baseman, J. B.; Wesselborg, S.; Lauber, K.; Stein, G. M., *Mycoplasma antigens as a possible trigger for the induction of antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis*. Liver International 2009. **29**(6): p. 797-809.
109. Dallo, S.F., et al., *Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in Mycoplasma pneumoniae*. Mol Microbiol, 2002. **46**(4): p. 1041-51.

110. Reinders, J. and A. Sickmann, *State-of-the-art in phosphoproteomics*. Proteomics, 2005. **5**(16): p. 4052-61.
111. Schmidt, J.A., G.F. Browning, and P.F. Markham, *Mycoplasma hyopneumoniae mhp379 is a Ca²⁺-dependent, sugar-nonspecific exonuclease exposed on the cell surface*. J Bacteriol, 2007. **189**(9): p. 3414-24.
112. Alonso, J.M., M. Prieto, and F. Parra, *Genetic and antigenic characterisation of elongation factor Tu from Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC*. Vet Microbiol, 2002. **89**(4): p. 277-89.
113. Bercic, R.L., et al., *Identification of major immunogenic proteins of Mycoplasma synoviae isolates*. Vet Microbiol, 2008. **127**(1-2): p. 147-54.
114. Jores, J., et al., *Analysis of the immunoproteome of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides small colony type reveals immunogenic homologues to other known virulence traits in related Mycoplasma species*. Vet Immunol Immunopathol, 2009. **131**(3-4): p. 238-45.
115. Burgos, R., et al., *Mycoplasma genitalium P140 and P110 cytoadhesins are reciprocally stabilized and required for cell adhesion and terminal-organelle development*. J Bacteriol, 2006. **188**(24): p. 8627-37.
116. Ramos, Y., et al., *Selectivity of bacterial proteome fractionation based on differential solubility: a mass spectrometry evaluation*. Anal Biochem, 2008. **377**(2): p. 134-40.
117. Johnson, A.E., *The structural and functional coupling of two molecular machines, the ribosome and the translocon*. The Journal of Cell Biology, 2009. **185**(5): p. 765-767.
118. Wool, I.G., *Extraribosomal functions of ribosomal proteins*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(5): p. 164-5.
119. Dreisbach, A., et al., *Surface shaving as a versatile tool to profile global interactions between human serum proteins and the Staphylococcus aureus cell surface*. Proteomics, 2011. **11**(14): p. 2921-30.
120. Kataoka, T., et al., *Fully methylated oriC with negative superhelicity forms an oriC-membrane complex before initiation of chromosome replication*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **194**(3): p. 1420-6.
121. Dougherty, T.J. and J.J. Saukkonen, *Membrane permeability changes associated with DNA gyrase inhibitors in Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 1985. **28**(2): p. 200-6.
122. Tunio, S.A., et al., *The moonlighting protein fructose-1, 6-bisphosphate aldolase of Neisseria meningitidis: surface localization and role in host cell adhesion*. Mol Microbiol. **76**(3): p. 605-15.
123. Spurbeck, R.R. and C.G. Arvidson, *Lactobacillus jensenii surface-associated proteins inhibit Neisseria gonorrhoeae adherence to epithelial cells*. Infect Immun. **78**(7): p. 3103-11.
124. Hickey, T.B., et al., *Mycobacterium tuberculosis Cpn60.2 and DnaK are located on the bacterial surface, where Cpn60.2 facilitates efficient bacterial association with macrophages*. Infect Immun, 2009. **77**(8): p. 3389-401.
125. Jenkins, C., et al., *The Mycoplasma gallisepticum OsmC-like protein MG1142 resides on the cell surface and binds heparin*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 5): p. 1455-63.
126. Burgos, R.P., O. Q.; Querol, E.; Piñol, J., *Deletion of the Mycoplasma genitalium MG_217 gene modifies cell gliding behaviour by altering terminal organelle curvature*. Molecular Microbiology 2008. **69**(4): p. 1029-1040.
127. Hennequin, C., et al., *GroEL (Hsp60) of Clostridium difficile is involved in cell adherence*. Microbiology, 2001. **147**(Pt 1): p. 87-96.

128. Khemiri, A., et al., *Outer-membrane proteomic maps and surface-exposed proteins of Legionella pneumophila using cellular fractionation and fluorescent labelling*. Anal Bioanal Chem, 2008. **390**(7): p. 1861-71.
129. Oleaga, A., et al., *Identification of immunoreactive proteins from the dog heartworm (Dirofilaria immitis) differentially recognized by the sera from dogs with patent or occult infections*. Mol Biochem Parasitol, 2009. **166**(2): p. 134-41.
130. Sinha, S., et al., *Proteome analysis of the plasma membrane of Mycobacterium tuberculosis*. Comp Funct Genomics, 2002. **3**(6): p. 470-83.
131. Ling, E., et al., *Glycolytic enzymes associated with the cell surface of Streptococcus pneumoniae are antigenic in humans and elicit protective immune responses in the mouse*. Clin Exp Immunol, 2004. **138**(2): p. 290-8.
132. Fernandez-Arenas, E., et al., *Low virulent strains of Candida albicans: unravelling the antigens for a future vaccine*. Proteomics, 2004. **4**(10): p. 3007-20.
133. Mendum, T.A., et al., *Towards the immunoproteome of Neisseria meningitidis*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5940.
134. McGowin, C.L. and C. Anderson-Smits, *Mycoplasma genitalium: an emerging cause of sexually transmitted disease in women*. PLoS Pathog, 2011. **7**(5): p. e1001324.
135. Manhart, L.K., N., *Mycoplasma genitalium: Is It a Sexually Transmitted Pathogen?* Current Infectious Disease Reports 2010. **12**(4): p. 306-313.
136. Gumber, S., D.L. Taylor, and R.J. Whittington, *Evaluation of the immunogenicity of recombinant stress-associated proteins during Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection: Implications for pathogenesis and diagnosis*. Vet Microbiol, 2009. **137**(3-4): p. 290-6.
137. Amemiya, K., et al., *Detection of the host immune response to Burkholderia mallei heat-shock proteins GroEL and DnaK in a glanders patient and infected mice*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2007. **59**(2): p. 137-47.
138. Xu, H., et al., *Role of acetyl-phosphate in activation of the Rrp2-RpoN-RpoS pathway in Borrelia burgdorferi*. PLoS Pathog, 2010. **6**(9): p. e1001104.
139. Xu, H., et al., *Role of Acetyl-Phosphate in Activation of the Rrp2-RpoN-RpoS Pathway in <italics>Borrelia burgdorferi</italics>*. PLoS Pathog, 2010. **6**(9): p. e1001104.
140. Alvarez, R.A., M.W. Blaylock, and J.B. Baseman, *Surface localized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Mycoplasma genitalium binds mucin*. Mol Microbiol, 2003. **48**(5): p. 1417-25.
141. McGowin, C.L., R.A. Spagnuolo, and R.B. Pyles, *Mycoplasma genitalium rapidly disseminates to the upper reproductive tracts and knees of female mice following vaginal inoculation*. Infect Immun. **78**(2): p. 726-36.
142. Shin, Y.S., et al., *Comparison of proteome and antigenic proteome between two Neospora caninum isolates*. Vet Parasitol, 2005. **134**(1-2): p. 41-52.
143. Balasubramanian, S., T.R. Kannan, and J.B. Baseman, *The surface-exposed carboxyl region of Mycoplasma pneumoniae elongation factor Tu interacts with fibronectin*. Infect Immun, 2008. **76**(7): p. 3116-23.
144. Svenstrup, H.F., et al., *Identification and characterization of immunogenic proteins of mycoplasma genitalium*. Clin Vaccine Immunol, 2006. **13**(8): p. 913-22.

ANNEXO

Agradecimientos

Dicen que la familia no se elige, que te toca. Por suerte, en ese sorteo me tocó la lotería. Por mucho que me dieran a elegir siempre os escogería a vosotros, Papa, Mama y Tata, sois los mejores. Papis muchas gracias por todo lo que me habéis dado: cariño, unos valores sólidos, una educación y sobre todo el apoyo incondicional en mis decisiones. Aunque sé que soy un poco tozuda, sé que estáis orgullosos de mí y eso me hace muy feliz. Tata, eres la bondad personificada, has sido un modelo a seguir para mí, me encanta tenerte como hermana y sabes que me tendrás a tu lado para siempre. Estoy encantada de formar parte de esta familia en la cual entró hace unos años mi súper cuñado al cual quiero muchísimo. Unai: no sé como lo haces peque, pero siempre nos alegras con tus ocurrencias. Por muy mal que estemos, nos sacas una carcajada. También agradecer a mi Abu, que aunque sigas pensando que hago cositas con plantitas, sé que tienes ganas que acabe el doctorado y que este más tranquila.

Quiero mencionar también a mi familia “política”, los cuales me habéis acogido en la familia de una manera encantadora y me habéis animado muchísimo con el doctorado, aún y no entender mucho a lo que me dedicaba. Y también a otra mini familia que hemos formado, Dani y Brenda, me parece una pasada la amistad que tenemos, somos una piña y nos apoyamos muchísimo. Espero que siempre estemos ahí los cuatro y vivamos muchísimas cosas más. Sheila a ti también muchas gracias, eres como la hermana pequeña que nunca he tenido.

Agradecerte Enrique la oportunidad que me diste aquel día de Septiembre de formar parte de tu laboratorio, darme la confianza y la libertad de desarrollar mi proyecto, realmente ha sido una experiencia dura pero muy gratificante a nivel personal. Mario, no sé como agradecerte toda la ayuda que me has dado, no sólo porque te ofrecieras a ser mi codirector ya que no era tu obligación, sino a todo lo que me has enseñado de Proteómica, ya que me has inculcado una manera de trabajar y me has contagiado el amor por este campo tan fascinante. Realmente puedes estar muy orgulloso ya que este trabajo no habría sido posible sin tu ayuda y apoyo en los momentos más duros. Como no agradecer a todos los compañeros de Biología molecular y Bioinformática, por todos estos años en los que hemos compartido el día a día. Gracias por la ayuda que nos hemos dado, por momentos de terapia cuando las cosas no salen y por esos seminarios de nueva generación. Gracias: Lluís, Luis, María C., María Ll., Alicia, Sergi, Raquel, Miquel, Antonio, Isaac, Pau, Juan (que paciencia conmigo, eh?). También agradecer la

ayuda de otros compañeros de otros laboratorios como Silvia y Sebas, me habéis ayudado muchísimo y me habéis transmitido siempre vuestra profesionalidad, habéis sido como mis padrinos. También agradecer la colaboración con el Servicio de Proteómica de Vall Hebrón (Quico, Nuria y Marta) ya que gracias a vuestro trabajo ha quedado una tesis preciosa y encima siempre tan amables y cercanos. Dr. Guillermo Ezpeleta del Hospital de Basurto, muchísimas gracias por facilitarme sueros de pacientes, ya que gracias a su colaboración fue posible llevar a cabo el experimento del Inmunoma.

Ahora voy a la parte más personal, Almu de todo corazón te doy las gracias por la ayuda que me has dado en el laboratorio, ya que ni te imaginas lo importante que es para nosotros el trabajo que haces. Pero realmente eso me parece insignificante comparado con nuestra amistad, eres de las mejores cosas que me llevo de este trabajo (además del título de Doctora, asereje, ;). Es que no sabes lo importante que has sido y el apoyo que me has dado. En momentos críticos, el poder hacer burla y quitarle importancia, eso ha sido vital para seguir con el trabajo experimental. Muchísimas gracias Almu estoy encantada de haberte conocido. Como no, a ti también mi revolución cubana, eres un encanto, una de las personas más buenas que he conocido, ha sido como tener a mi hermana aquí en el trabajo. Recuerdo una frase célebre que me dijiste: el único símbolo de superioridad que conozco es la bondad (Ludwig van Beethoven). Mónica (MA) gracias por esos momentos de terapia que teníamos, ya sabes lo que me alegro de la oportunidad que te han dado, te lo mereces. Quiero dar las gracias también a Judith por esos momentos buenos que hemos tenido, por suerte tu optimismo se contagia.

Finalmente, y para nada menos importante, Alex. Cariño, gracias por TODO. Gracias por apoyarme siempre, por enseñar a tomarme las cosas más tranquila, por hacer de mí una mejor persona y gracias a ti he aprendido a defender mis ideales y a luchar por ellos. Pero por encima de todo esto, gracias por conseguir que no me volviera bipolar durante el doctorado y por soportar los cambios de humor que me generaban los experimentos. Sé que es difícil de entender que un día parecía que se derrumbaba todo el proyecto y que al día siguiente tuviera un súper resultado, por suerte siempre has estado ahí para mantenerme con los pies en el suelo. Gracias de todo corazón y también doy gracias ya que nosotros sí que nos hemos elegido mutuamente para formar una familia, la cual espero que este tan orgullosa de nosotros como lo estamos los dos de las nuestras.