

**Análisis de los proteomas de dos micoplasmas:  
*Mycoplasma penetrans* y *Mycoplasma genitalium***

**Mario Ferrer Navarro**

**Diciembre 2005**

**Análisis de los proteomas de dos micoplasmas:  
*Mycoplasma penetrans* y *Mycoplasma genitalium***

**Memoria presentada por Mario Ferrer Navarro, licenciado en Bioquímica, para optar al  
grado de Doctor en ciencias.**

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

**Mario Ferrer Navarro**

**Dr. Enrique Querol Murillo**

**Veros amicos in adversa fortuna videvamus  
(Proverbio romano)**

**A mis padres**

## Prólogo

La memoria que se presenta está formada por dos trabajos de investigación que todo y estar relacionados entre si, forman cada uno un capítulo independiente.

En la primera parte del trabajo se ha realizado un estudio del proteoma de *Mycoplasma penetrans* mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas. Se ha generado un mapa de referencia del proteoma de este patógeno humano, que comprende el rango de pH de 4 a 11 en tres ventanas, de 4 a 7 de 6 a 9 y de 7 a 11NL (no lineal).

Mediante tinción específica se ha obtenido el fosfoproteoma de este organismo en el rango de pH de 4 a 7, y también se han determinado los sitios específicos de fosforilación de dos proteínas, un transportador ABC y el Factor de elongación Tu.

En la segunda parte del trabajo se ha realizado un análisis del proteoma de *Mycoplasma genitalium*, ampliando la información ya existente sobre el proteoma de este patógeno humano. Se ha analizado el proteoma de este organismo en la fase de crecimiento estacionaria final utilizando gradientes estrechos de pH.

Para este micoplasma también se ha generado una imagen del fosfoproteoma en el rango de pH de 4 a 7, y se ha podido determinar también, el sitio específico de fosforilación de una proteína implicada en la adhesión de este micoplasma, la proteína P110.

Ambos trabajos han sido realizados en el Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, en el grupo dirigido por el Dr. Enrique Querol Murillo

**INDICE**

Abreviaturas	1
<b>I Introducción</b>	
<b>I.A</b> Los micoplasmas	2
<b>I.B</b> <i>Mycoplasma genitalium</i>	6
<b>I.C</b> <i>Mycoplasma penetrans</i>	8
<b>I.D</b> Proteómica	10
<b>I.D.1</b> Preparación de la muestra	11
<b>I.D.1.1</b> Caótopos	12
<b>I.D.1.2</b> Detergentes	12
<b>I.D.1.3</b> Agentes reductores	13
<b>I.D.2</b> Primera dimensión: isoelectroenfoque	14
<b>I.E</b> Espectrometría de masas	17
<b>I.E.1</b> Breve introducción histórica	17
<b>I.E.2</b> Instrumentación	19
<b>I.F</b> Proteómica de micoplasmas	21
<b>II</b> Objetivos	22
<b>III</b> Materiales y métodos	
<b>III.A</b> Cultivo celular	23
<b>III.A.1</b> Medio de cultivo	23
<b>III.A.1.a</b> Base	23
<b>III.A.1.b</b> Complementos	23
<b>III.A.1.c</b> Preparación de extracto de levadura	23
<b>III.A.1.d</b> Preparación del Yeastolate	24
<b>III.A.2</b> Cepas utilizadas	24
<b>III.A.3</b> Conservación de las cepas	24
<b>III.A.4</b> Condiciones de cultivo	24
<b>III.B</b> Preparación de la muestra para el isoelectroenfoque	25
<b>III.B.1</b> Precauciones	25
<b>III.B.2</b> Soluciones utilizadas	25
<b>III.B.2.a</b> Disolución de lisis	25
<b>III.B.2.b</b> SDS caliente	26
<b>III.B.3</b> Preparación de muestras de <i>M. genitalium</i>	26
<b>III.B.4</b> Preparación de muestras de <i>M. penetrans</i>	28
<b>III.C</b> Determinación de la concentración de proteína	29

<b>III.D</b>	Isoelectroenfoque	31
	<b>III.D.1</b> Rehidratación de las tiras de isoelectroenfoque	31
	<b>III.D.2</b> Isoelectroenfoque	32
<b>III.E</b>	Equilibrado de las tiras	36
<b>III.F</b>	Segunda dimensión	37
	<b>III.F.1</b> Descripción del sistema	37
	<b>III.F.2</b> Notas previas	38
	<b>III.F.3</b> Preparando la unidad de electroforesis	
	Ettan DaltTwelve	38
	<b>III.F.4</b> Insertando los “DALT Gel 12.5” en los “Precast Gel Cassette”	39
	<b>III.F.5</b> Aplicando la tira de isoelectroenfoque	41
	<b>III.F.6</b> Condiciones recomendadas para correr la segunda dimensión	43
<b>III.G</b>	Tinciones	
	<b>III.G.1</b> Protocolo de tinción con plata optimizado para los geles Ettan Dalt 12.5	43
	<b>III.G.2</b> Tinción específica de fosfoproteínas	45
	<b>III.G.3</b> Tinción con Coomassie coloidal	47
<b>III.H</b>	Análisis de imagen	48
<b>III.I</b>	Digestión tróptica	48
	<b>III.I.1</b> Descripción del sistema	48
	<b>III.I.2</b> Recorte de manchas y advertencias	50
	<b>III.I.3</b> Destinción de manchas teñidas con nitrato de plata	50
	<b>III.I.4</b> Digestión enzimática	51
	<b>III.I.5</b> Elución de los péptidos por centrifugación	53
<b>III.J</b>	Espectrometría de masas MALDI-TOF	54
	<b>III.J.1</b> Descripción del sistema	54
	<b>III.J.2</b> Preparación previa de la placa AnchorChip™	54
	<b>III.J.3</b> Preparación estándar de AnchorChip™ con HCCA	55
	<b>III.J.3.a</b> Notas	55
	<b>III.J.4</b> Lavado en la placa	55
	<b>III.J.5</b> Recristalización en la placa	56
	<b>III.J.6</b> Lavado y regeneración de la placa AnchorChip™	56

<b>III.J.7</b> Preparación de muestras con la matriz DHB	57
<b>III.K</b> Bioinformática	57
<b>IV</b> Capitulo 1- Resultados y discusión	59
<b>IV.1</b> Identificación de proteínas de <i>Mycoplasma penetrans</i>	59
<b>IV.2</b> Masa molecular y punto isoelectrico de las proteínas identificadas	76
<b>IV.3</b> Multiples spots	77
<b>IV.4</b> Identificación de proteínas fosforiladas	77
<b>V</b> Capítulo 2. Resultados y discusión	82
<b>V.1</b> Identificación de proteínas previamente no encontradas de <i>Mycoplasma genitalium</i>	82
<b>V.2</b> Proteoma en fase estacionaria final	92
<b>V.3</b> Identificación de proteínas fosforiladas	95
<b>VI</b> Discusión general	99
<b>VII</b> Conclusiones	105
<b>VIII</b> Bibliografía	106



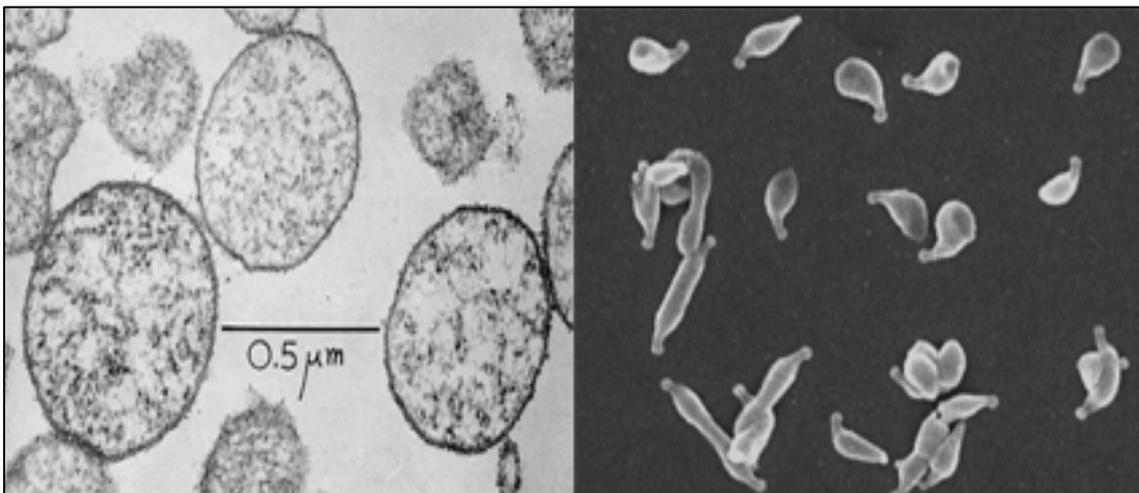
## Abreviaturas

<b>2DE</b>	Electroforesis bidimensional
<b>ASB-14</b>	Amidosulfobetaina 14
<b>ATCC</b>	Colección Americana de cultivos tipo
<b>CHAPS</b>	3-[(3-colamidopropil)- dimetilamonio]propanosulfonato
<b>CMP</b>	Citidina monofosfato
<b>Da/KDa</b>	Dalton/KiloDalton
<b>DHB</b>	Acido 2,5-dihidroxibenzóico
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico
<b>DTE</b>	Ditioeritritol
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ESI</b>	Electrospray ionization (Ionización por electrospray)
<b>FAB</b>	Fast atom bombardment
<b>HCCA</b>	Acido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamínico
<b><i>H. influenzae</i></b>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<b>HIV</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>IPG</b>	Immobilized pH gradient (Gradiente de pH inmovilizado)
<b>LC</b>	Cromatografía líquida
<b>MALDI</b>	matriz assisted laser desorption/ionization (Ionización/desorpción por láser asistida por matriz)
<b><i>M. genitalium</i></b>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<b><i>M. penetrans</i></b>	<i>Mycoplasma penetrans</i>
<b>Mr</b>	Masa molecular
<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>m/z</b>	Masa/carga
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NP-40</b>	Nonidet P-40
<b>ORF</b>	open reading frames (Marcos abiertos de lectura)
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>pI</b>	Punto isoeléctrico
<b>PMF</b>	Peptide mass fingerprinting (Huella peptídica)
<b>SB 3-10</b>	Caprilil sulfobetaina 3-10
<b>SIDA</b>	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>TBP</b>	Tributilfosfina
<b>TCEP</b>	Tris(2-carboxietil)fosfina
<b>TOF</b>	Time of flight (Tiempo de vuelo)
<b>Transportador ABC</b>	ATP-binding cassette transporter (Transportador de membrana dependiente de ATP)
<b>UMP</b>	Uridina monofosfato
<b><i>U. urealyticum</i></b>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>



## I.A- Micoplasmas

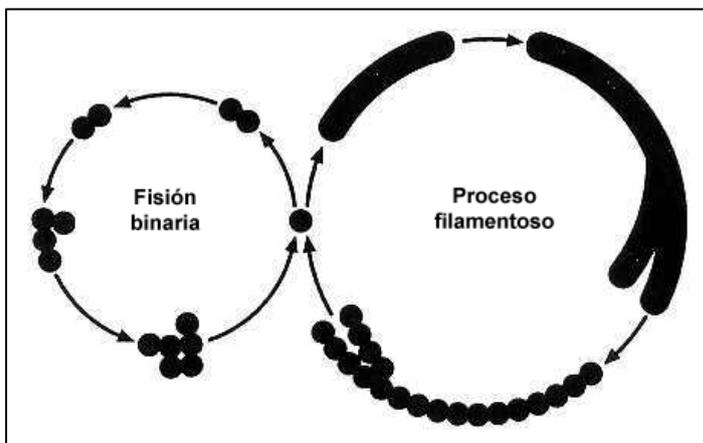
Los micoplasmas forman un gran grupo de microorganismos procariotas con unas 190 especies distintas. Los micoplasmas son unas de las bacterias autoreplicantes más pequeñas y simples. Las células de los micoplasmas contienen un conjunto mínimo de organelos esenciales para el crecimiento y replicación: una membrana plasmática, ribosomas, y un genoma consistente en una molécula circular de DNA doble hebra. A diferencia de todos los otros procariotas, los micoplasmas no tienen pared celular y consecuentemente están clasificados en una clase separada, los *mollicutes* (mollis, suave; cutes, piel) [1]. Estos diversos organismos son parásitos de un amplio rango de huéspedes, incluyendo humanos, animales, insectos, plantas y células en cultivo [2,3]. 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 difíciles de curar [4]. 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



**Fig. I.1.** Izquierda: Micrografía electrónica de una célula de micoplasma. Las células están limitadas por una única membrana. El citoplasma contiene unos finos hilos que serían el cromosoma seccionado, y unos gránulos oscuros representando los ribosomas (foto de RM Cole, Bethesda, <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch037.htm>) Derecha: Micrografía electronica de barrido de células de *Mycoplasma genitalium*. Pueden observarse algunas células en proceso de división, así como también se puede apreciar el organelo terminal que dirige el movimiento e invasión. Foto cedida por O. Quijada Pich.

cultivo, en particular en los sueros, o en la flora de la boca del personal técnico [1].

El “coccus” es la forma básica de todos los micoplasmas en cultivo. El diámetro de los “coccus” más pequeños capaces de reproducirse es de unos 300nm. En la mayoría de cultivos de *mycoplasma*, suelen aparecer formas alargadas o filamentosas (hasta 100  $\mu\text{m}$  de largo y sobre 0.4  $\mu\text{m}$  de ancho). Los filamentos tienden a producir estructuras miceloides ramificadas, y de aquí 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].



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

Algunos micoplasmas poseen organelos de anclaje, los cuales, en *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium* y *Mycoplasma penetrans* aparecen con forma de punta. *Mycoplasma pneumoniae* es un patógeno del tracto respiratorio y se adhiere al epitelio respiratorio a través del organelo de anclaje [6]. Algunos micoplasmas patógenos humanos exhiben movilidad en superficies cubiertas de líquido, pero el organelo de anclaje siempre lidera el movimiento, indicando también su importancia en el anclaje [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, consistentes en una zona central de crecimiento que penetra en el agar y una zona periférica que permanece sobre el agar (Figura I.3).

La falta 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 esta compuesta, al igual que otros procariontes, por 2/3 de proteína y 1/3 de lípidos. Los lípidos de la membrana también son parecidos a otros procariontes excepto por el gran contenido en colesterol en los micoplasmas que requieren esteroides. Las proteínas de membrana expuestas en la superficie celular son los determinantes antigénicos principales en los micoplasmas

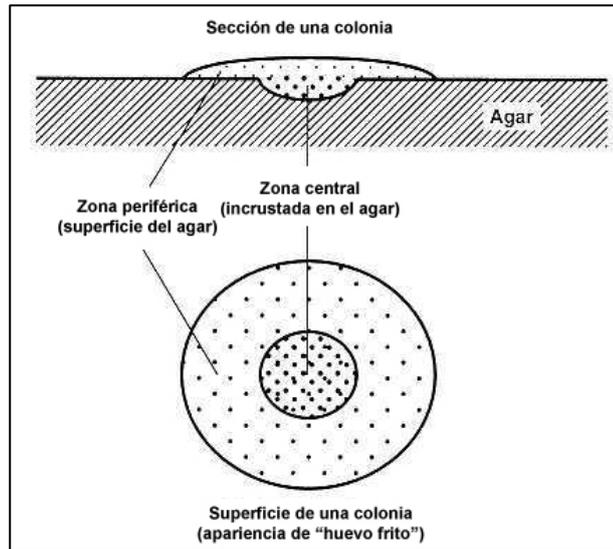


Fig. 1.3. Morfología típica de una colonia de *mycoplasma* con forma de huevo frito

[5]. Antisueros que contengan anticuerpos para alguno de estos componentes inhiben el crecimiento y el metabolismo de los micoplasmas y en la presencia del complemento, provocan lisis celular. Estas propiedades son usadas en varios tests serológicos para diferenciar entre especies y serotipos de micoplasmas, 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. Pero lo más interesante es el uso del codón universal de stop, UGA, como codón para el triptófano en algunos micoplasmas (*M. genitalium* y *M. penetrans* incluidos) [1]. Los genomas de los micoplasmas son los más pequeños conocidos en un procarionte autoreproducible. En esta molécula de DNA hay muy pocos genes, en algunos micoplasmas el número estimado es ligeramente inferior a 500 [9], que es aproximadamente diez veces menos que *Escherichia coli* [10]. Así, los micoplasmas carecen de algunas actividades enzimáticas y rutas metabólicas, y por lo tanto sus requerimientos nutricionales

son complejos, por lo que son dependientes 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.

Existe consenso en que sólo una pequeña fracción de los micoplasmas existentes en la naturaleza han sido cultivados [1]. 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 10<sup>7</sup> células por mililitro de cultivo.

La glucosa y otros carbohidratos metabolizables pueden ser usados 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. Ya 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 la uretritis no-gonococal en hombres y de cervicitis en mujeres, aunque recientemente también se está relacionando este organismo 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% (usando una ventana de 5000 pb), siendo las regiones de menor contenido 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 es utilizado para 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*).

*M. genitalium* es un parásito obligado, ello hace suponer que su metabolismo está adecuado para trabajar en un ambiente homeostático. Quizá por ello disponen de tan pocos genes dedicados a la regulación.

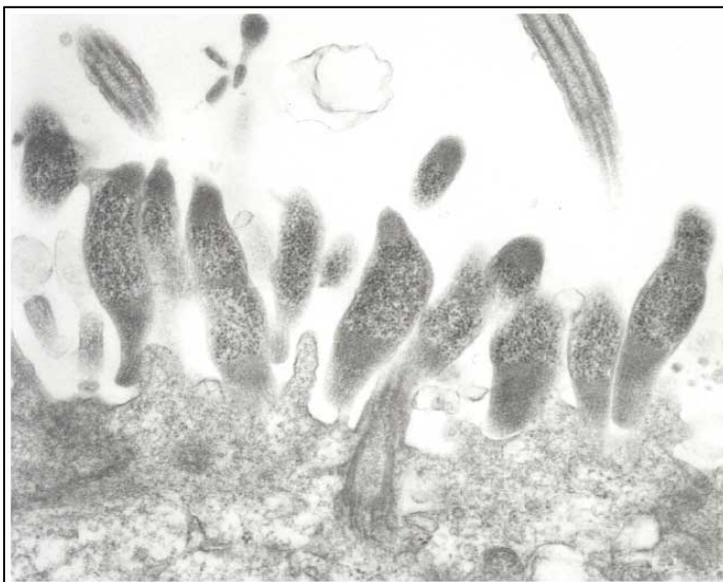
*M. genitalium* presenta una membrana simple y típica, de hecho puede fusionarse con la del huésped eucariota e incluso intercambiar proteínas con el mismo, lo cual hace al organismo interesante para aplicaciones como el uso del organismo como liposoma [15].

*M. genitalium* es un modelo de célula mínima, y en este sentido el grupo de C. Venter procedió a simplificar más el genoma de este organismo tratando de

definir lo que denomina como un “genoma mínimo”, o sea, el conjunto mínimo de genes esenciales para el crecimiento celular y la división, inactivando sus genes mediante disrupción por transposones [17]. 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. De hecho en su simplificación llega a un número de genes de entre 265 y 360 genes esenciales (el orden de magnitud de los virus más grandes!). Uno de los hallazgos más interesantes de este trabajo de Venter es que entre los genes esenciales hay 111 ORFs 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 del laboratorio o funciones presentes pero no identificadas en el rastreo por similitud de secuencia. Ejemplo de esto último es el que no se encuentran genes homólogos de superóxido dismutasa, ni oxidoreductasa, ni 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 la lactato deshidrogenasa. Por otra parte, el hecho de encontrarse como dispensables 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 dicho anteriormente, los micoplasmas requieren muchos metabolitos del medio, lo cual implica la existencia de sistemas de transportadores ABC numerosos, 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.

### **I.C- *Mycoplasma penetrans***

*Mycoplasma penetrans* es un micoplasma con una morfología única. Fue originariamente aislado por el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América de muestras de orina de pacientes infectados por HIV [17,18]. *Mycoplasma penetrans* infecta los tractos urogenital y respiratorio [19]. Está asociado principalmente a la infección por HIV-1, particularmente en la población homosexual. En los Estados Unidos, este organismo raramente infecta otros grupos de riesgo de pacientes infectados por HIV, como drogadictos de aplicación intravenosa o hemofílicos [20]. Una característica típica de este microorganismo, y que le da el nombre, es su capacidad de penetrar en el interior de las células humanas. La internalización de este organismo en el urotelio fue detectada en la autopsia de muestras de



**Fig. I.4.** *Mycoplasma penetrans* invadiendo células humanas. Foto extraída de *M. Penetrans* genome Project ([www.nih.gov/jp/Mypet/](http://www.nih.gov/jp/Mypet/))

un paciente con el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) [18]. Recientemente se ha propuesto que algunas lipoproteínas de *M. penetrans* y *M. fermentans* actúan como cofactor en el avance del SIDA, y se ha demostrado que realza el efecto citopático de la infección por HIV [21].

En el año 2002, Sasaki *et al.* publicaron la secuencia completa del genoma de *M. penetrans* [22]. Este organismo tiene un genoma de 1.358.633 pb, que es el mayor de todos los micoplasmas secuenciados. El contenido en G+C es de

25.7%, que está cerca del 25.5% de *U. urealyticum*, que es el mollicute que tiene un contenido en G+C más bajo de todas las bacterias. Un dato que genera sorpresa es que *M. penetrans* carece de Uridina quinasa, un enzima que según el trabajo de Venter *et al.* sobre el genoma mínimo es esencial. La Uridina quinasa es una fosfotransferasa que fosforila tanto uridina como citidina para producir uridina i citidina monofosfato (UMP/CMP). De todas formas se ha propuesto como vía principal de producción de UMP la reacción llevada a cabo por la uracil fosforibosiltransferasa, aunque también podría producirlo a partir del metabolismo relacionado con el orotato. El metabolismo del orotato está relacionado con la ruta de la arginina dihidrolasa (también llamada arginina deiminasa), que es una ruta de síntesis de ATP a partir de arginina. *M. penetrans* parece ser el único miembro de los *mycoplasmataceae* que posee esta unión entre el metabolismo del orotato y la ruta de la arginina deiminasa para la producción de pirimidinas. Aun así sigue siendo una incógnita como este organismo consigue CMP, ya que no se ha detectado la presencia de una pirimidina-5'-nucleótido nucleosidasa para la conversión de citosina a CMP.

Una de las características remarcables del genoma de *M. penetrans* es el número de familias de genes parálogos procedentes de una duplicación génica. Son definidos como parálogos proteínas que tienen una identidad superior al 30% en al menos el 70% de su longitud. Los resultados de homología muestran que 264 (25,4%) de las 1038 proteínas que codifica el genoma de *M. penetrans* forman 63 familias que van de 2 a 44 proteínas por familia. Bajo las mismas condiciones de búsqueda de homología *M. genitalium* contiene 27 (5.5%) parálogos. El relativamente gran número de parálogos de *M. penetrans* podría ser una de las razones del mayor tamaño del genoma comparado con los otros 9 genomas secuenciados de los *mycoplasmataceae*. Estas familias de parálogos, incluyen homólogos de la lipoproteína P35 (la familia con el mayor número de miembros, 44), proteínas de función desconocida, transportadores ABC, oxidoreductasas, permeasas, y posibles lipoproteínas.

## I.D- 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 protéicos de muchos de los genes identificados *di novo*. La proteómica es la ciencia que correlaciona las proteínas con sus genes. El proteoma, término acuñado en 1994 por M. Wilkins, puede definirse como el conjunto de proteínas expresadas por un genoma y la proteómica como la genómica funcional al nivel de proteínas. Las células expresan varios miles de proteínas diferentes y cada una de ellas puede experimentar numerosas modificaciones post-traduccionales dinámicas en respuesta diferentes estados metabólicos y a microambientes cambiantes, lo cual incrementa de manera significativa el número de proteínas presentes. La proteína también puede interaccionar 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.

La proteómica ha sido posible gracias al desarrollo convergente de diferentes áreas como los proyectos de secuenciación de distintos genomas, la bioinformática y las técnicas instrumentales de análisis masivo.

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 [23].

La electroforesis bidimensional combinada con la identificación de proteínas por espectrometría de masas es actualmente la herramienta de uso más general en proteómica [24]. 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 [25].

La electroforesis bidimensional permite la separación de mezclas complejas de proteínas según su punto isoeléctrico (pI), masa molecular (Mr), 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 estudiar 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) [26]. Los métodos que combinan cromatografía líquida con espectrometría de masas, que realizan análisis de péptidos, suelen perder la información de punto isoeléctrico y 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 [27].

### **I.D.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 [28]. 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 una tampón que contiene agentes caótopos (urea y/o tiourea), detergentes no-iónicos o zwitteriónicos (CHAPS, Triton X-100, etc...), agentes reductores (DTT, TBP), amfolitos y dependiendo de la muestra inhibidores de proteasas.

### I.D.1.1 Caótopos

La urea es eficiente rompiendo puentes de hidrogeno, llevando a la proteína a desplegarse y desnaturalizarse. La tiourea, introducida por Rabilloud [29] es mejor rompiendo interacciones hidrofóbicas, pero su uso viene limitado por su pobre solubilidad en agua, aunque es más soluble en soluciones de urea concentrada. Actualmente la mejor solución para solubilizar proteínas hidrofóbicas es una combinación de 5-7M urea y 2M tiourea en conjunción con los detergentes apropiados [30].

### I.D.1.2 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 precipitación.

El detergente aniónico 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 aniónico, 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 [31]. Los detergentes no-iónicos más populares son el NP-40, Triton 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 [32]. 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 [33, 34]. 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.

### I.D.1.3 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 ditioneitol (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 [35]. El TBP es usado a concentraciones muy bajas (2mM) dado a su reacción estequiométrica, pero este agente tiene otras desventajas, como son su baja solubilidad en agua, su corta vida media, y además el TBP (y su solvente, la dimetilformamida) es volátil, tóxico y tiene 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.

Las modificaciones en las proteínas deben minimizarse ya que resultan en

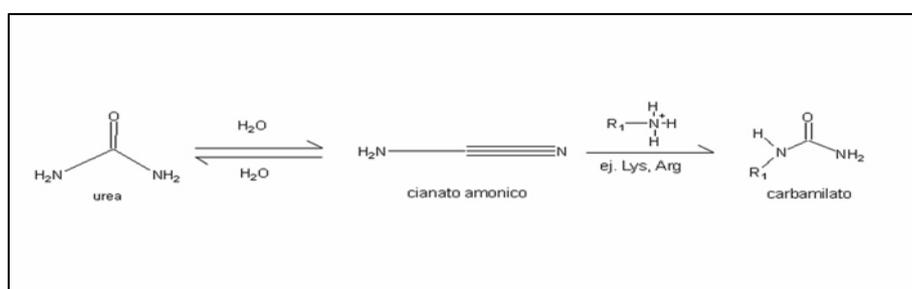


Fig. I.5. Reacción de carbamiloación de las aminas primarias de los aminoácidos

puntos artefactuales. En particular, hay que inactivar toda proteasa que pueda haber en la muestra para evitar digestiones parciales de las proteínas, así como también es imprescindible evitar el calentamiento de toda muestra que contenga urea por encima de 30° C, 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 isoelectrico [30].

### I.D.2- Primera dimensión: Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque es un método electroforético que separa las proteínas según su punto isoelectrico (pI). Las proteínas son moléculas amfotéricas; 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 carboxil terminales.

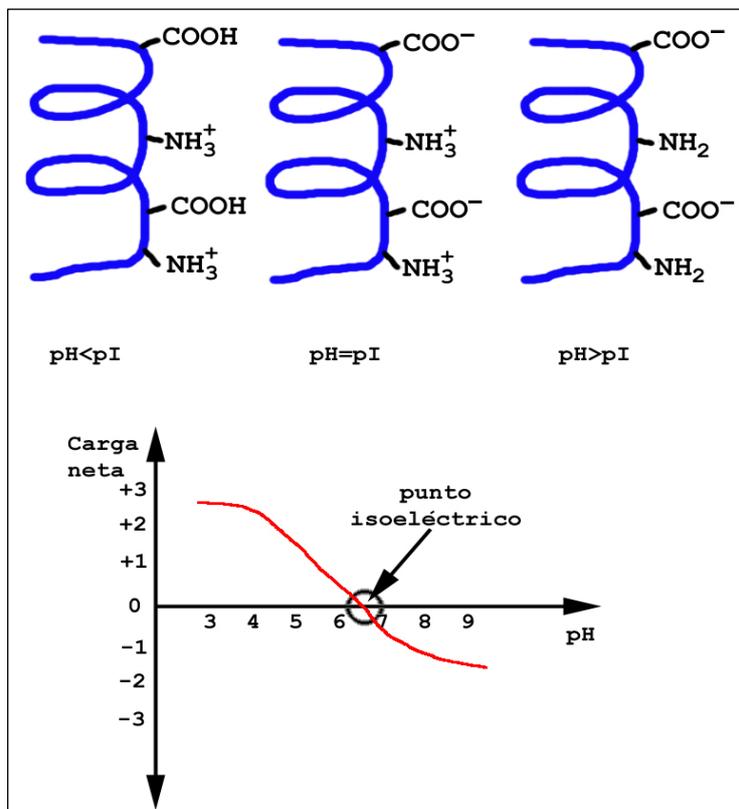


Fig 1.6. Gráfico de la carga neta de una proteína y el pH del medio. El punto de intersección de la curva en el eje de las X representa el punto isoelectrico de la proteína.

El punto isoelectrico es aquel pH en el cual una proteína tiene carga neta cero [36]. Las proteínas están cargadas positivamente en valores de pH inferiores a su pI y negativamente en valores de pH superiores a su pI.

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 en el 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 isoeléctrico. 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.

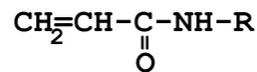
Cuando las proteínas han alcanzado su posición final en el gradiente de pH, hay un movimiento iónico muy pequeño en el sistema, generando una corriente eléctrica muy baja (típicamente por debajo de  $1\mu\text{A}$ ). El isoelectroenfoque de una muestra determinada es generalmente conseguido por un número 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) [27] dependía de un gradiente de pH generado por amfolitos en una pequeña tira de acrilamida. Los amfolitos 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 amfolitos, los amfolitos con mayor pI (por tanto los más negativamente cargados) migran hacia el ánodo y los amfolitos con pI más bajos (por tanto los más positivamente cargados) migran hacia el cátodo. El resto de amfolitos se alinean entre los extremos de acuerdo con su pI, y tamponan sus alrededores de acuerdo con sus 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, este tiene ciertas limitaciones:

- 1- Los amfolitos 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 amfolitos son inestables y tienden a marchar 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 amfolitos, Görg *et al.* desarrollaron los gradientes inmobilizados de pH (IPGs) [37]. Un IPG se forma por la incorporación covalente de grupos tamponadores ácidos y básicos en el gel 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.

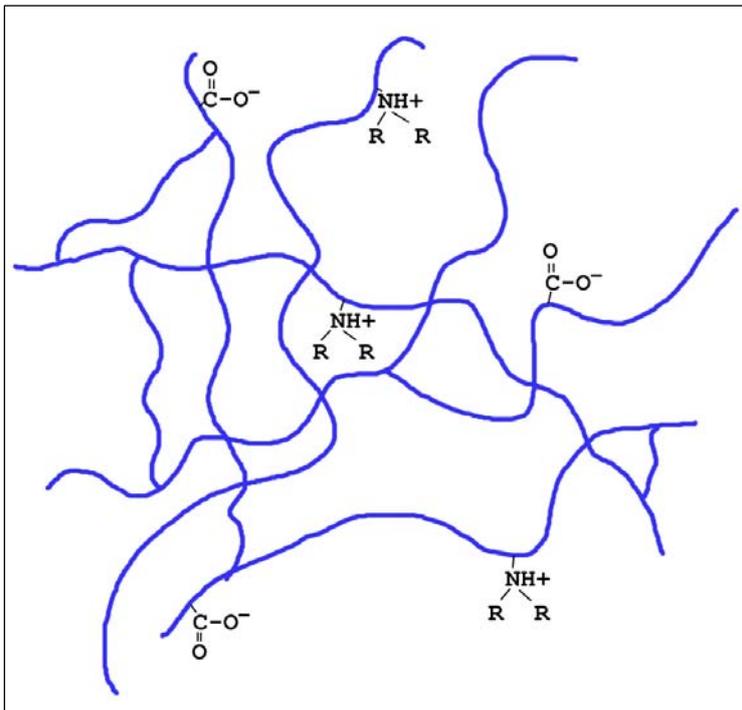


Fig. I.7. Matriz de un gel con IPGs, mostrando los grupos tamponadores.

Los gradientes de pH inmovilizados se forman usando dos soluciones, una es una mezcla relativamente ácida de tampones acrilamida y la otra una mezcla relativamente básica. La concentración de varios tampones en las dos soluciones 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.

Para facilitar el manejo, estos geles son polimerizados encima de un 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.E- Espectrometría de masas**

La definición de un espectrómetro de masas puede parecer simple: es un instrumento que puede ionizar una muestra y medir 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 debido a que la espectrometría de masas es capaz 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.E.1- Breve introducción histórica**

J.J. Thompson construyó el primer espectrómetro de masas en 1912 [38]. Los primeros aparatos fueron usados 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 [39]. En 1966 se utilizó por primera vez para secuenciar péptidos y oligonucleótidos [40].

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 [41, 42]. 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 [43]. La fuente de ionización por electrospray fue fácilmente conectada a una cromatografía líquida (LC), cosa que permitió el análisis de mezclas complejas. 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.

Una técnica de ionización para moléculas biológicas que podía ser usada 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 [44], y en Japón de Tanaka *et al.* [45]. 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 [46, 47] y la técnica de PMF (Peptide Mass Fingerprinting), que permite identificar proteínas vía espectrometría de masas, fue desarrollada en 1993 [48]. Poco después se desarrolló software que permitía identificar proteínas buscando en bases de datos on-line. El ICAT (Isotope-Coded Affinity Tags), desarrollado en 1999, hizo posible la cuantificación de proteínas individuales en mezclas complejas [49]. Esta misma tecnología permite la comparación simultánea de niveles de expresión de todas las proteínas en células crecidas 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 CO<sub>2</sub> 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 tan diversas como la detección de desordenes metabólicos en neonatos, comparar los niveles de expresión de una proteína entre células crecidas en distintas condiciones, determinar la biodisponibilidad de minerales en la comida, estudiar como los medicamentos son metabolizados in vivo [50]. Como ejemplo de la creciente importancia de la espectrometría de masas, una búsqueda reciente en el PubMed (un archivo de citas de revistas de las ciencias de la vida) para la frase “mass spectrometry” encontró 65900 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 Nóbel 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.E.1- 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

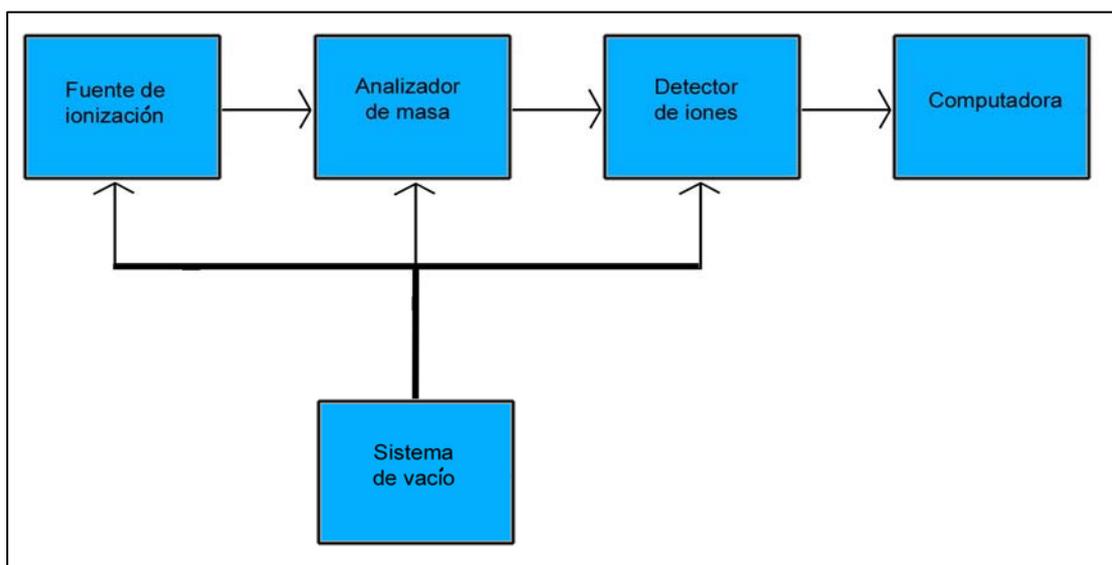


Fig. I.8 Esquema de los componentes básicos de un espectrómetro de masas

vacío para controlar la presión dentro del espectrómetro de masas.

Una propiedad compartida por prácticamente todos los componentes internos es la presión que está muy por debajo de la atmosférica ( $10e-6$  a  $10e-8$  torr). Esta baja presión es necesaria para limitar al máximo las colisiones, 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 la realización de este trabajo se utilizó un MALDI-TOF. En un MALDI, la muestra se co-cristaliza con una matriz orgánica como el ácido sinapínico o el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamínico. La co-cristalización se consigue mezclando la muestra con la matriz; esta mezcla se deposita en una placa de metal y se deja secar. Los cristales resultantes son irradiados con pulsos de rayos láser de una longitud de onda en la cual la matriz tiene el máximo de 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, y la mayoría de los iones tienen una sola carga.

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:

$$zV = 0.5mv^2 \text{ y } m/z = (2Vt^2)/L^2$$

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.

## **I.F- Proteómica de Micoplasmas**

Los micoplasmas son buenos modelos celulares para realizar estudios de proteómica, 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 [51]. En este análisis se pudieron identificar 112 proteínas distintas del microorganismo analizado en fase de crecimiento exponencial. Se observó una reducción de la síntesis de proteínas del 42% en fase de crecimiento post-exponencial.

En el mismo año se publicó el análisis del proteoma de *Mycoplasma pneumoniae* [52]. En este análisis se identificaron 224 proteínas distintas. En este trabajo, además se utilizaron técnicas fraccionamiento por solubilización diferencial, utilizando Triton X-114, para obtener varios mapas bidimensionales. Hasta la fecha no existe ningún otro proteoma de micoplasma analizado. Si se han utilizado las técnicas que ofrece la proteómica para analizar diferentes aspectos de los micoplasmas [53].

**II- OBJETIVOS**

## II- Objetivos

El presente proyecto tiene como Objetivo General poner a punto y aplicar los métodos proteómicos al análisis de la biología de micoplasmas, concretamente de *Mycoplasma penetrans* y *Mycoplasma genitalium*.

Como Objetivos Específicos están:

- Demostrar experimentalmente la existencia del máximo número posible de las proteínas anotadas en el genoma, así como identificar proteínas cuyo gen no ha sido descrito a partir del genoma.
- Identificar las proteínas fosforiladas del proteoma (fosfoproteoma) de *M. penetrans*.
- Crear un mapa de referencia del proteoma de *M. penetrans*
- Demostrar experimentalmente la existencia de proteínas previamente no encontradas en mapas bidimensionales de *Mycoplasma genitalium*.
- Identificar las proteínas fosforiladas del proteoma (fosfoproteoma) de *M. genitalium*.
- Obtener el proteoma de *Mycoplasma genitalium* en fase estacionaria, cercana a la muerte celular y compararlo con el previamente descrito realizado en fase de crecimiento exponencial.



### **III.A- Cultivo celular**

#### **III.A.1 Medio de cultivo**

Como medio de cultivo se utilizó el medio SP4, cuya formulación es:

Para 500 ml de medio de cultivo:

##### **III.A.1.a Base**

1.75 gr. PPLO (Medio base para micoplasmas)

5.00 gr Triptona

2.65 gr Peptona

2.50 gr Glucosa

Disolver en 307.5 ml de agua milliQ

Ajustar el pH a 7.8 con NaOH 1M

Autoclavar a 121° C durante 15min (más tiempo de autoclave conlleva la caramelización de la glucosa)

##### **III.A.1.b Complementos**

Una vez estéril y frío se añade de forma aséptica:

50ml de yeastolate 2% (p/v)

5-10ml de Rojo de Fenol 0.1% (pH 7.0)

17.5ml de extracto de levadura

25ml de CMRL

85ml de Suero bovino fetal (inactivado a 56° C durante 30-60 minutos)

1.71ml de Glutamina 29.2mg/ml (precalentar a 37°C para que se disuelva)

250µl de Ampicilina (200mg/ml)

##### **III.A.1.c Preparación de extracto de levadura**

1- Se resuspenden 250gr de levadura de panadería fresca en 1litro de agua desionizada.

2- Autoclavar a 115° C durante 10 minutos.

- 3- Dejar enfriar
- 4- Aclarar por centrifugación a 380g durante 10 minutos.
- 5- Separar el sobrenadante y colocarlo en un recipiente adecuado para ser autoclavado.
- 6- Autoclavar el extracto de nuevo.
- 7- Dejar enfriar y hacer alícuotas en los volúmenes deseados.

#### **III.A.1.d Preparación del Yeastolate**

- 1- Se disuelve yeastolate al 2% (p/v) en agua desionizada.
- 2- Autoclavar a 120° C durante 20 minutos.
- 3- Dejar enfriar.

#### **III.A.2 Cepas utilizadas**

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

*Mycoplasma penetrans* GTU-54 fue amablemente cedido por J.B. Baseman del Departamento de Microbiología e Inmunología, Centro de Ciencias de la Salud, Universidad de Texas en San Antonio.

#### **III.A.3 Conservación de las cepas**

Tanto *M. genitalium* como *M. penetrans* pueden ser conservados a –80° C sin necesidad de crioprotectores como el glicerol.

#### **III.A.4 Condiciones de cultivo**

*Mycoplasma genitalium* G37: Se cultivó en un incubador de cultivo celular a 37° C y con 5% CO<sub>2</sub>. *Mycoplasma genitalium* crece adherido al plástico cómo cualquier célula eucariota. Así, se ha cultivado *Mycoplasma genitalium* en flascos de cultivo celular con una superficie de 150 cm<sup>2</sup> con ventilación en el tapón y con 30-35ml de medio de cultivo. *M. genitalium* tarda de media unos 5 días en crecer.

*Mycoplasma penetrans* GTU-54: Se cultivó en un incubador con agitación, a 37° C y 120rpm.

Mientras *M. genitalium* crece adherido a plástico, *M. penetrans* lo hace en suspensión. Así pues *M. penetrans* se cultivó, según el volumen de cultivo, en tubos de 50ml o en erlenmeyers de 250ml.

#### III.B- Preparación de la muestra para el isoelectroenfoque

##### III.B.1 Precauciones

- A pesar de que es un paso que puede parecer sencillo, es un paso crucial para la obtención de buenos geles bidimensionales. Hay que tener en cuenta que son muchos los componentes de una célula que interfieren en los pasos electroforéticos. Interfieren las sales, los lípidos, los azúcares, el DNA y el RNA. No existe un método universal de preparación de la muestra. El método aquí descrito puede no funcionar con cualquier otra muestra.
- Evitar, en la medida de lo posible, el calentamiento de la muestra por encima de los 30° C, ya que la urea se degrada generando isocianato, compuesto que carbamila las proteínas, modificando su punto isoeléctrico.
- Llevar siempre guantes y evitar en la medida de lo posible la contaminación por queratinas, ya sean de la piel o de la ropa.
- Usar guantes no empolvados y preferentemente de nitrilo o vinilo
- Usar reactivos de la máxima pureza posible.
- Usar siempre agua bidestilada o de pureza superior

##### III.B.2 Soluciones utilizadas

###### III.B.2.a Disolución de lisis

Urea	8M
Tiourea	2M
CHAPS	2.5% (p/v)
ASB-14	2% (p/v)

Tris-HCl	40mM
Tributilfosfina (TBP)**	6mM
IPG**	2%
Cocktail de inhibidores de proteasas	Según fabricante

\*\*Añadir antes de usar

Preparar la disolución en un vaso de precipitados de plástico nunca cristal. Se puede preparar un volumen grande, hacer alícuotas en volúmenes de trabajo y guardar a  $-20^{\circ}$  C, pero jamás se debe congelar y descongelar varias veces.

### III.B.2.b SDS caliente

SDS\* 1%

\*Es importante tener en cuenta que el SDS es un detergente iónico y que generaría puntos que serían artefactuales. Este detergente iónico es muy difícil de producir con unos niveles de pureza elevados. Generalmente junto con el SDS, se encuentra STS (tetradecilsulfato de sodio) que se une con mayor fuerza a las proteínas, y por lo tanto es más difícil de desplazar por otros detergentes. Así, la pureza del SDS es importante que sea alta. El SDS es tolerado en el isoelectroenfoque hasta una concentración de 0.2%.

### III.B.3 Preparación de muestras de *M. genitalium*

Debido a que este microorganismo crece adherido, el rendimiento por cultivo es muy bajo, con lo que han sido necesarios muchos cultivos para conseguir niveles suficientes de biomasa. Con 12 cultivos de  $150\text{cm}^2$  de superficie se obtenían alrededor de 4mgr de proteína, necesario para un par de geles bidimensionales de rango estrecho de pH. Este organismo tiene una extraordinaria capacidad para agregarse entre sí, así que una vez se han centrifugado las células, es extremadamente difícil desengancharlas, por lo tanto la limpieza de las células es deficiente. Dado este problema de agregación de las células de *M. genitalium* es conveniente trabajar con poco volumen de células ya que así la limpieza es más eficiente, y se eliminan

mejor componentes del medio que podrían interferir en el proceso de isoelectroenfoque.

A los 5 días de inocular, se procedía a la preparación de la muestra:

- 1- Eliminar el medio de cultivo.
- 2- Añadir 25ml de PBS X1 para limpiar las células adheridas al plástico.
- 3- Eliminar el PBS X1
- 4- Repetir los pasos 2 y 3 un par de veces más para limpiar bien las células.
- 5- Una vez limpio el cultivo, se procede a su resuspensión con 0.5ml de PBS X1
- 6- Se transfieren las células resuspendidas a un tubo eppendorf
- 7- Se vuelven a añadir 0.5ml de PBS X1 al cultivo para apurar las células restantes que quedan.
- 8- Se juntan las células a las obtenidas en el paso 6.

De cada cultivo se obtiene 1 ml de PBS X1 con células en suspensión

- 9- Centrifugar 15 minutos a 14000rpm.
- 10- Eliminar el sobrenadante con cuidado de no perder células.
- 11- Una vez limpias realizar un pulso de centrifuga para eliminar el PBS X1 que queda en las paredes del tubo. Es importante realizar este paso, ya que de otra forma se incorporan sales a la muestra, y estas interfieren en el proceso de isoelectroenfoque.

12- A cada tubo con células proveniente de un cultivo se le añaden 50 $\mu$ l de SDS 1% (p/v) caliente

13- Con la ayuda de un pequeño mortero se disgregan las células. Se observa que la muestra se vuelve mas espesa debido a la liberación del ADN de las células.

14- Se hierven las muestras durante 3 minutos

15- Se deja enfriar a temperatura ambiente

Se añaden 150 $\mu$ l de disolución de lisis

16- Agitar vigorosamente durante 30 minutos.

17- Sonicar la muestra durante 5 minutos a 50W con ciclos de 30 segundos.

Es necesario realizar la sonicación con la muestra sumergida en agua-hielo para prevenir el calentamiento de la muestra que generaría la carbamilación de las proteínas.

- 1- Centrifugar la muestra 10 minutos a 14000rpm para eliminar cualquier partícula insoluble que pueda quedar, ya que estas taponarían la matriz de acrilamida e impediría la correcta entrada de la muestra en las tiras de isoelectroenfoque.
- 2- Utilizar la muestra inmediatamente o alicuotarla y guardarla a  $-20^{\circ}$  C. Es conveniente prevenir el congelamiento y descongelamiento repetido de la muestra.

#### III.B.4 Preparación de muestras de *M. penetrans*

Este otro *mycoplasma* es mucho más agradecido que el anterior. Los cultivos se realizaron en erlenmeyers de 250ml con 100ml de medio de cultivo SP4. 36 horas después el medio ya había virado.

- 1- Repartir el cultivo en dos partes iguales
- 2- Centrifugar durante 15 minutos a 18000rpm
- 3- Descartar el sobrenadante
- 4- Resuspender con 1ml de PBS X1
- 5- Transferir a tubos eppendorf
- 6- Centrifugar a 14000rpm en centrífuga de sobremesa durante 15min
- 7- Eliminar el sobrenadante
- 8- Resuspender con 1ml de PBS X1
- 9- Centrifugar a 14000rpm durante 15min
- 10- Eliminar el sobrenadante
- 11- Repetir pasos 8 a 10 tantas veces como sea necesario (generalmente con 2 es suficiente) hasta que las células pierdan completamente el color rojizo del rojo de fenol del medio.
- 12- Una vez limpias realizar un pulso de centrifuga para eliminar el PBS X1 que queda en las paredes del tubo. Es importante realizar este paso, ya que de otra forma se incorporan sales a la muestra, y estas interfieren en el proceso de isoelectroenfoque.
- 13- Añadir 100 $\mu$ l de SDS 1% caliente
- 14- Disgregar las células con un pequeño mortero hasta que no se observen grumos.

- 15-Hervir durante 3 minutos
- 16-Dejar enfriar a temperatura ambiente
- 17-Añadir 300 $\mu$ l de disolución de lisis
- 18-Agitar vigorosamente durante 30 minutos.
- 19-Sonicar la muestra durante 5 minutos a 50W con ciclos de 30 segundos.  
Es necesario realizar la sonicación con la muestra sumergida en agua-hielo para prevenir el calentamiento de la muestra que generaría la carbamización de las proteínas
- 20-Centrifugar la muestra 10 minutos a 14000rpm para eliminar cualquier partícula insoluble que pueda quedar, ya que estas taponarían la matriz de acrilamida e impediría la correcta entrada de la muestra en las tiras de isoelectroenfoque
- 21-Usar la muestra inmediatamente o guardarla a  $-20^{\circ}$  C.

#### **III.C Determinación de la concentración de proteína**

Las soluciones usadas para la solubilización de proteínas son incompatibles con el uso de protocolos tradicionales de cuantificación de proteína. De manera que para realizar la determinación de la concentración de proteína se ha utilizado el kit "RCDC protein assay" de BioRad. Este es un método colorimétrico de determinación de la concentración de proteína en presencia de agentes reductores y detergentes. Es un método basado en el protocolo de Lowry [54]. Este método es compatible con las siguientes condiciones:

CHAPS	2%
DTT	350mM
EDTA	100mM
Imidazol	500mM
$\beta$ -mercaptoetanol	10%
NaOH	2.5M
Tributilfosfina (TBP)	2mM
Tris, pH 8.4	500mM
Triton X-100	2%
Tween 20	2%

Protocolo para volúmenes de 1.5 ml

- 1- Añadir 5 $\mu$ l del reactivo S a cada 250 $\mu$ l de reactivo DC que se van a usar. Esta disolución es referida como reactivo A'. Cada muestra o patrón necesitara 127 $\mu$ l de reactivo A'. (El reactivo S y DC son suministrados por el fabricante. El reactivo A' es estable durante una semana, incluso si se observa un precipitado. En caso de observarse un precipitado, agitar vigorosamente el reactivo hasta su completa solubilización.)
- 2- Preparar de 3 a 5 diluciones de un estándar de proteína (generalmente albúmina de suero bovino) desde 0.2mg/ml hasta 1.5mg/ml. El estándar de proteína debe prepararse en la misma disolución que se tienen las muestras a analizar.
- 3- Dispensar 25 $\mu$ l de los estándares y muestras en tubos eppendorf limpios y secos.
- 4- Añadir 125 $\mu$ l de reactivo RC I en los tubos, vortear, e incubar durante un minuto a temperatura ambiente.
- 5- Añadir 125 $\mu$ l de reactivo RC II en cada tubo, vortear. Centrifugar los tubos a 15000xg durante 3-5 minutos
- 6- Descartar el sobrenadante por inversión en un papel absorbente limpio. Dejar que el líquido sea absorbido completamente.
- 7- Añadir 127 $\mu$ l de reactivo A' en cada tubo, vortear. Incubar los tubos a temperatura ambiente durante 5 minutos, o hasta que el precipitado este completamente disuelto. Vortear antes de proceder al siguiente paso.
- 8- Añadir 1ml de reactivo DC B a cada tubo y vortear inmediatamente. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 9- Leer la absorbancia a 750nm después de los 15 minutos de incubación. La absorbancia es estable al menos durante 1 hora.
- 10- Comparar las muestras con la recta patrón para conocer la concentración de proteína de las muestras.

### III.D Isoelectroenfoque

#### III.D.1 Rehidratación de las tiras de isoelectroenfoque

Las tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG), suministradas por Amersham Biosciences, vienen deshidratadas. La función de la disolución de rehidratación

no sólo es la de rehidratar la tira sino también la de mantener las proteínas en solución durante el proceso de isoelectroenfoque. Para rehidratarlas se usó la siguiente disolución:

Urea	8M
Tiourea	2M
CHAPS	2.5% (p/v)
ASB-14	2% (p/v)
Tris-HCl	40mM
Tributilfosfina (TBP)**	6mM
IPG**	2%
Azul de bromofenol	granos

\*\* Añadir justo antes de usar

Preparar la disolución en un vaso de precipitados de plástico nunca cristal.

Se puede preparar un volumen grande, hacer alícuotas de volúmenes de trabajo y guardar a  $-20^{\circ}$  C, pero jamás se debe congelar y descongelar varias veces.

El colorante permite seguir el proceso de isoelectroenfoque.

Para la longitud de las tiras IPG que se han usado (24cm) el volumen necesario para la correcta rehidratación es de 450 $\mu$ l. Hay que tener en cuenta que la disolución para la rehidratación es un poco viscosa, con lo cual, al pipetear esta disolución, parte de ella se queda adherida a la punta.

La rehidratación se llevó a cabo en los "IPGstrip holder" de Amesham Biosciences.

- 1- Se aplican los 450 $\mu$ l en el centro del IPGstrip holder
- 2- Retirar el plástico de protección de la tira de isoelectroenfoque. Manipular las tiras con guantes y a poder ser con pinzas, para no tocarlas con las manos.
- 3- Colocar la tira en el "IPGStrip holder", con la parte que lleva la acrilamida desecada de cara a bajo, encima del líquido con mucha precaución de que no queden burbujas atrapadas debajo de la tira.

- 4- Cubrir la tira con 2ml de aceite mineral, para evitar la evaporación de agua durante el proceso de rehidratación.
- 5- Dejar un mínimo de 10 horas en un sitio donde la temperatura no sea superior a 30° C y que sea perfectamente plano.

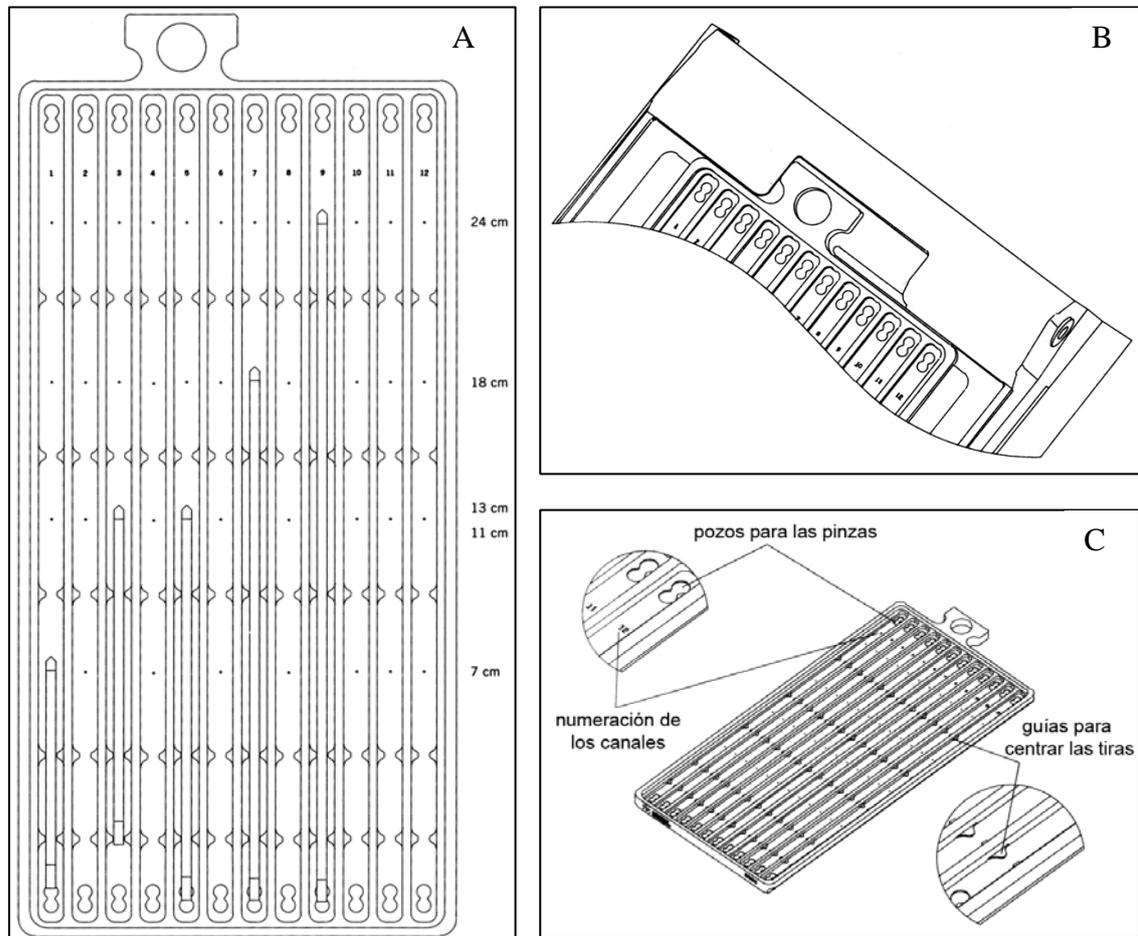
Lo ideal es preparar la rehidratación a media tarde y dejarlo toda la noche.

### **III.D.2 Isoelectroenfoque**

La primera dimensión, se ha llevado a cabo con el sistema “Ettan™ IPGphor™ Cup Loading Manifold”, de Amersham Biosciences, diseñado para realizar el isoelectroenfoque de proteínas con las tiras IPG de Amersham Biosciences de 3mm de ancho y de 7cm a 24cm de largo en la unidad electroforética Ettan IPGphor. En este sistema, el isoelectroenfoque es realizado 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 1mg 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 (Fig



**Fig. II.1 A.** Bandeja y posición de las tiras en la misma. **B:** Posición de la bandeja en el IPGphor. **C:** Detalles de la bandeja

- II.1B). Las tiras de isoelectroenfoque, previamente rehidratadas, deben colocarse con el gel de cara arriba y con la dirección que muestra la figura (Fig 2.1A). Los carriles donde van colocadas las tiras están enumeradas 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. II.1C).
- 2- Una vez colocadas las tiras en la bandeja, se colocan 108ml de aceite mineral en la bandeja. La función del aceite es evitar que se evapore

agua durante el isoelectroenfoco. La evaporación de agua haría que la urea cristalizase y de esta forma el isoelectroenfoco no tendría lugar de forma correcta.

- 3- Colocar las copas encima de las tiras tal como muestra la figura II.2B. Las copas tienen unos brazos que deben quedar entre las paredes del carril donde se ha colocado la tira. También tiene 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, 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 asegurarse se pueden

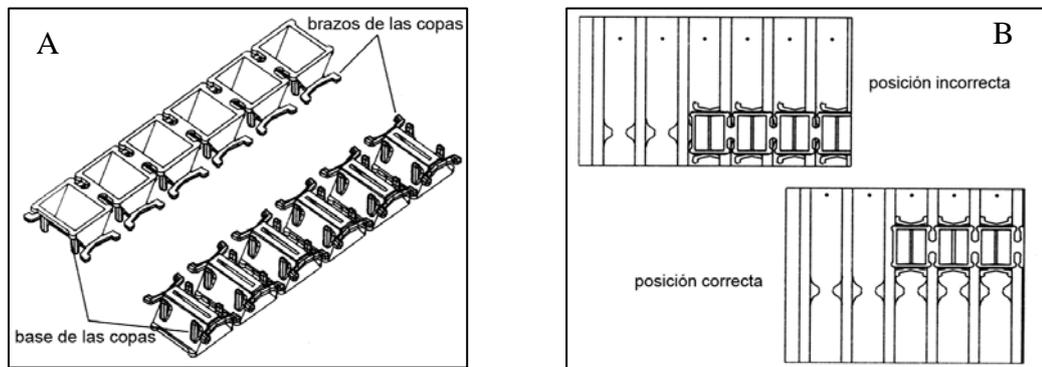


Fig. II.2 A: Detalle de las copas. B. Posición de las copas en la bandeja

llenar las copas con aceite mineral hasta arriba. Si al cabo de un rato no ha disminuido el nivel del nivel de aceite es que están bien colocadas.

- 4- Cortar el número apropiado de tiras de papel. Serán necesarias dos tiras de papel para cada tira. Impregnar las tiras de papel con  $150\mu\text{l}$  de agua destilada. Las tiras de papel deben estar impregnadas pero no gotear.
- 5- Colocar las tiras de papel en los extremos de las tiras como muestra la figura II.3. 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.

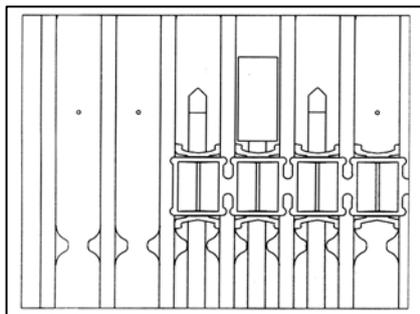
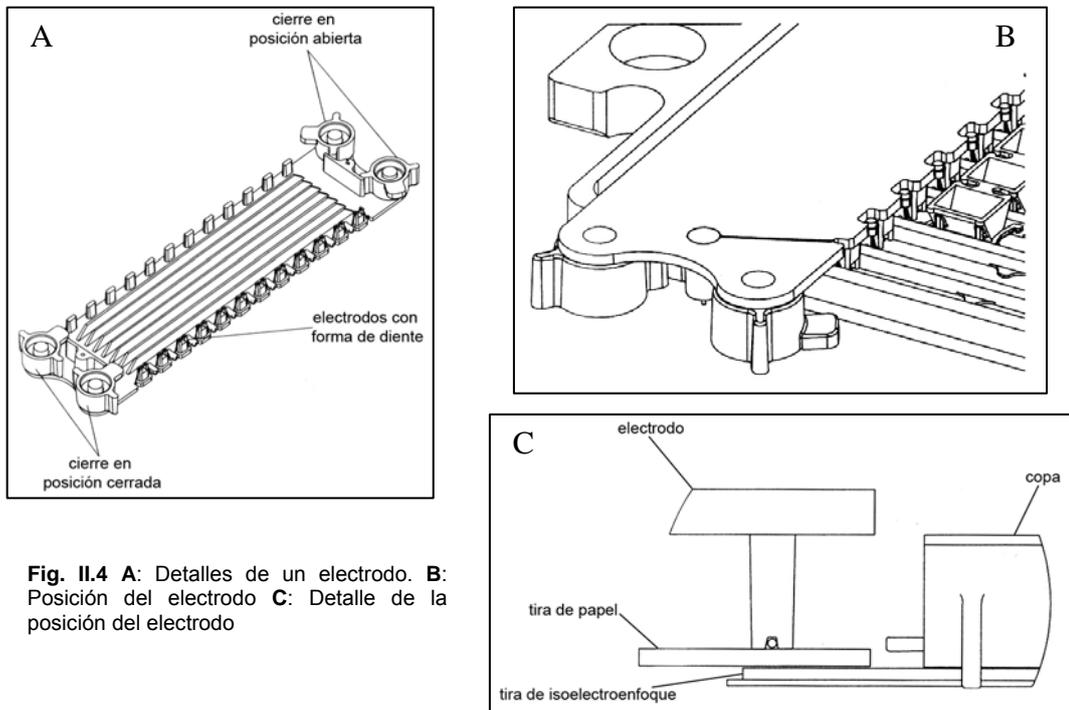


Fig. II.3 Posición de las tiras de papel

- 6- Colocar los electrodos. Con los cierres en posición abierta se coloca con mucho cuidado los electrodos sobre las tiras de papel. Una vez colocados se ponen en posición cerrada los cierres.



- 7- Antes de cargar las muestras 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. Las copas aceptan un máximo de 150 $\mu$ 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.

- 8- Las condiciones en que se han realizado los isoelectroenfoques han sido las siguientes:

Temperatura 20° C

Amperaje 50 $\mu$ A/tira

Programa:

300V            3horas

1000V	6horas en gradiente
8000V	3horas en gradiente
8000V	hasta 120000Vhr

Hay que tener en cuenta que estas condiciones no tienen por que ser válidas para otras muestras. Con estas condiciones la duración total del isoelectroenfoco es de unas 24 horas.

### **III.E- Equilibrado de las tiras**

La función de este paso es:

- 1- Reducir y alquilar todo puente disulfuro que pueda quedar oxidado
- 2- Sustituir los detergentes no-iónicos por SDS para que la segunda dimensión pueda tener lugar.

Esto se realiza de la siguiente manera:

Preparar la siguiente disolución:

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

Se prepara 500ml de esta disolución, se hacen alícuotas de 10ml y se guardan a  $-20^{\circ}$  C hasta su uso.

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

Las casas comerciales venden unos tubos adecuados para realizar este paso, 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 25ml envasadas individualmente.

1. 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.
2. Se cierra uno de los extremos (el estrecho) con parafilm.
3. Con cuidado se introduce la disolución complementada con DTT en el interior de la pipeta.
4. 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 tiene la acrilamida quede en contacto con la disolución y no quede adherida a las paredes interiores de la pipeta.
5. 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 minutos agitando.
6. Después de 15 minutos se sustituye la disolución que contiene DTT por la que contiene iodoacetamida, dejando con esta última disolución otros 15 minutos.
7. Proceder inmediatamente a introducir la tira en 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, y evitar así la difusión de las proteínas en la matriz de acrilamida de las tiras de isoelectroenfoque.

#### **III.F Segunda dimensión**

##### **III.F.1 Descripción del sistema**

La segunda dimensión ha sido realizada en geles pre-hechos de Amersham Biosciences. Estos geles, Ettan DALT gel 12.5, son de gran formato (26x20cm) que permiten realizar la segunda dimensión de tiras de isoelectroenfoque de 24cm. Estos geles están unidos a un soporte plástico que facilita el manejo y evita roturas. Estos geles están pensados para ser usados en la unidad de electroforesis Ettan DALTtwelve de Amersham Biosciences. Los geles son

insertados en un cassette (DALT Precast Gel Cassette) que permite que la separación tenga lugar verticalmente y con tampones líquidos. Estos geles son usados juntamente con Ettan DALT buffer Kit, que incluye tampones concentrados para correr los geles, “Gel buffer” para asentar el gel en el cassette y una disolución de sellado para fijar la tira de isoelectroenfoque en el gel.

El sistema de tampones utilizado en los geles les proporciona una larga durabilidad y menor tiempo para correr en comparación de los sistemas convencionales de Laemmli [55] (Tris-glicina). Las separaciones llevadas a cabo con los geles Ettan DALT Gel 12.5 son similares a las realizadas con un gel Laemmli del 12.5%.

### **III.F.2 Notas previas**

Llevar guantes siempre que se manipulen los geles de poliacrilamida, las tiras de isoelectroenfoque, los cassettes o cualquier equipamiento que tenga que estar en contacto con los geles. Preferiblemente usar 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 cassettes muy bien con etanol antes de introducir los geles. Cualquier suciedad que quede en los cristales se verá en la tinción con plata. Usar siempre los reactivos de mayor pureza así como el agua de mayor pureza disponible.

### **III.F.3 Preparando la unidad de electroforesis Ettan DALTwelve**

Lo ideal es realizar todo el proceso que aquí se describe mientras las tiras de isoelectroenfoque se están equilibrando.

1. En un contenedor apropiado diluir el tampón del cátodo incluido en el “DALT buffer kit” a 1X, añadiendo el contenido de las dos botellas (volumen total 250ml) en 2.25 litros de agua destilada. Reservar.

La composición del tampón del cátodo es: 0.25M Tris, 1.92M glicina, 1% SDS

2. Asegurarse de que la válvula de la unidad de separación esta en posición “circulate”. Añadir el contenido entero (75ml) de la botella del tampón del ánodo en la unidad de separación con cuidado de que el

líquido no toque las gomas del equipo, ya que con el tiempo se estropean. Llenar la unidad hasta la línea marcada que corresponde a 7.5 litros con agua destilada.

La composición del tampón del ánodo es: 5M dietanolamina, 5M ácido acético.

3. Encender el equipo
4. Encender la bomba para mezclar el contenido de la unidad y ajustar la temperatura deseada. 25° C es la temperatura recomendada por defecto.

#### III.F.4 Insertando los “DALT Gel 12.5” en los “Precast Gel Cassette”

1. Abrir el paquete que contiene el gel en uno de los lados, con mucho cuidado de no cortar con las tijeras el gel que contiene. El gel está polimerizado sobre un soporte plástico y no cubre toda la superficie del plástico. El gel está protegido con una pequeña hoja plástica protectora. En esta hoja protectora encontramos dibujados la orientación en que debe ir montado el gel así como la dirección en que debe correr la electroforesis. La base del gel (+ o anódico) coincide con el soporte plástico, mientras que en la parte superior del gel (- o catódico), el plástico es unos 15mm más grande que el gel. En los laterales, el soporte plástico es unos 5mm mayor que el gel.

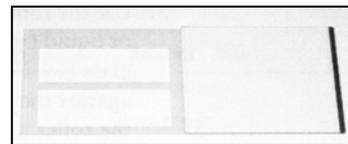


Fig. II.5 DALT Precast Gel Cassette

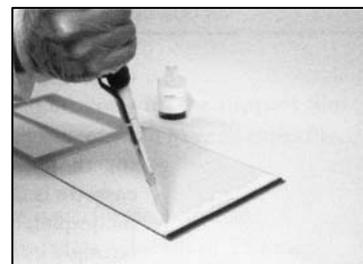


Fig. II.6 Repartir el "tampón del gel"

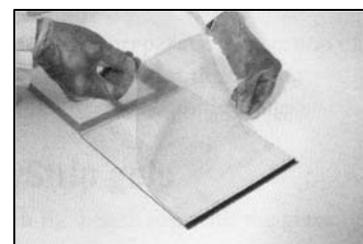


Fig. II.7 Situando el gel

2. Abrir el “DALT Precast Gel Cassette”, situarlo en algún lugar plano, y con la bisagra hacia abajo.

3. Repartir 1ml de “tampón del gel” a lo largo del extremo derecho del cristal (no encima del separador). El “tampón del gel” es un tampón basado en piperidinopropionamida pendiente de patente.
4. Quitar la hoja plástica protectora del gel, manipulando el gel sólo con guantes y por el soporte plástico. Asegurarse de que la orientación del gel es la correcta. Situar el gel cara abajo apoyando poco a poco el extremo derecho del gel sobre el cristal. Alinear el gel respecto al separador derecho, dejando un milímetro de espacio entre el gel y el separador.

Flexionar el gel poco a poco dejando que repose encima del cristal con atención de no atrapar burbujas de aire entre el gel y el cristal. Tener cuidado de dejar que un milímetro del gel sobresalga del cristal por la parte inferior, y que los laterales del soporte plástico se apoyen sobre los separadores, pero el gel debe encajar entre los separadores.

5. Usar un rodillo (o en su defecto un trozo de papel) para presionar el gel contra el cristal para eliminar cualquier burbuja que haya podido quedar. Después de esto el gel debería estar firmemente adherido al cristal y resistir al movimiento.
6. Cerrar el cassette presionando firmemente, asegurándose que la goma de cierre queda

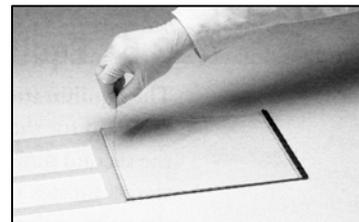


Fig. II.8 Colocando el gel

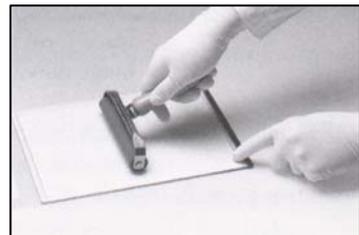


Fig. II.9 Quitando burbujas

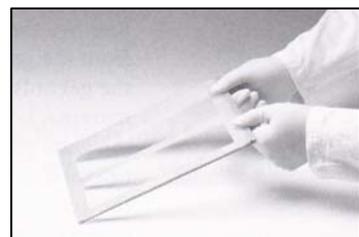


Fig. II.10 Cerrando el cassette

perfectamente insertada en la ranura. Un cassette mal cerrado provoca que el frente del gel se curve distorsionando el gel.

7. Repetir el proceso por cada segunda dimensión que se vaya a correr.
8. Una vez todos los geles están montados hay que sellarlos, es decir ocupar con la disolución de sellado los pequeños espacios que quedan entre el gel y los separadores del cristal. Si esto no se realiza, se comunican los tampones del ánodo y cátodo generando una distorsión en el frente del gel.

Para realizar esta operación se tiene en agua hirviendo la disolución de sellado proporcionada en tubos eppendorf en el “Ettan DALT buffer Kit”, cuya composición es: “tampón del gel” con agarosa 0.5% y azul de bromofenol 0.002%.

Se dejan hirviendo hasta que la disolución de sellado se ha licuado. Una vez líquida se hace caer la disolución por los pequeños canales que quedan entre el gel y los separadores del gel. Hay que asegurarse de que la disolución de sellado ocupa todo el canal sin dejar ningún espacio libre.

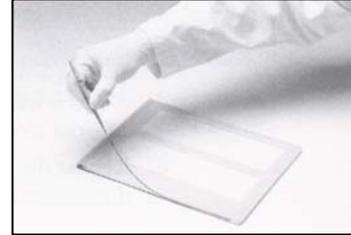


Fig. II.11 Colocando la tira de isoelectroenfoque

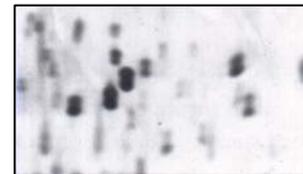


Fig II.12 Efecto “puntos gemelos”

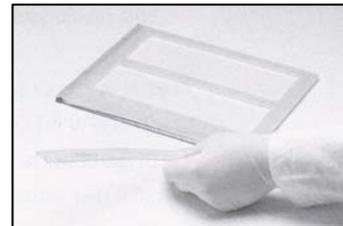


Fig. II.13 Introduciendo la tira de isoelectroenfoque

#### III.F.5 Aplicando la tira de isoelectroenfoque

1. Dejar el gel montado en el cassette en posición horizontal con el cristal en la parte inferior y el plástico protector del gel en la superior.
2. Una vez quitada la tira de isoelectroenfoque de la segunda disolución de equilibrado, dejarla aclarar para eliminar el exceso de disolución de equilibrado.

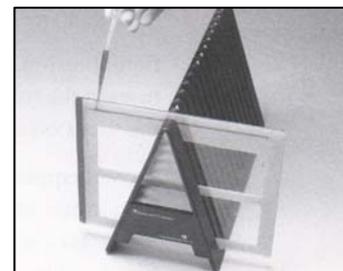
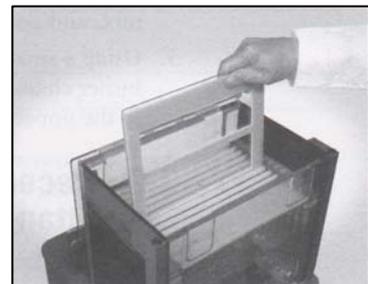


Fig. II.14 Sellando la tira de isoelectroenfoque

Cogiendo la tira con unas pinzas por el soporte plástico, se sumerge la misma en tampón de cátodo diluido 1X.

3. Introducir la tira de isoelectroenfoco entre el cristal y el soporte plástico del gel. Hay que tener en cuenta la posición de la tira. La tira debe colocarse de manera que el soporte plástico de la tira este en contacto con el cristal, si no se genera el efecto llamado “puntos gemelos”.
4. Una vez colocada la tira entre el cristal y el plástico de soporte del gel, con la ayuda de una pequeña regla se empuja la tira para que entre en contacto íntimo con el gel. Hay que evitar en la medida de lo posible el que queden pequeñas burbujas entre la tira de isoelectroenfoco y el gel. Así como también es imprescindible evitar el que la tira sufra cualquier tipo de rotura o rasgadura.
5. Una vez colocada la tira se pone el cassette en posición vertical, y se sella la tira de isoelectroenfoco con disolución de sellado que previamente habremos fundido, pero con cuidado de que no esté muy caliente.
6. Una vez realizadas estas operaciones para todos los geles que se deseen correr, se introducen los cassettes en la unidad de electroforesis, teniendo en cuenta que las cosas húmedas entran mejor, así que antes de colocar los cassetes se mojan con agua o incluso con un poco de tampón de cátodo que contiene SDS y facilitará la introducción de los cassetes en la unidad separadora. Esta unidad, el Ettan DALTtwelve, tiene capacidad para cargar 12



**Fig. II.15** Introduciendo un cassette en la unidad de separación

- geles, los cassetes los pondremos empezando por la parte trasera del equipo, y si no se utilizan los doce geles llenaremos los espacios vacíos con “cassetes vacíos” que vienen proporcionados con el mismo equipo.
7. Cuando los 12 espacios para colocar geles están llenos, se llenará el reservorio superior con tampón de cátodo diluido (1x) 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.

8. Cerrar el equipo y ponerlo en marcha.

#### **III.F.6 Condiciones recomendadas para correr la segunda dimensión**

Para asegurarse de una buena transferencia entre la primera dimensión y la segunda es necesario empezar con poca potencia. Así pues se utilizarán 2W por gel al menos durante la primera media hora. Pasado este tiempo se puede llegar a 100W, pero esto depende de la prisa que se tenga. Para correr la segunda dimensión durante la noche, se correrá a 1-2W por gel y una temperatura de 30 ° C.

Los geles se pararán en cuanto salga el frente azul e inmediatamente se procederá a realizar el primer paso de tinción para evitar que las proteínas separadas por electroforesis bidimensional difundan en el gel de la segunda dimensión.

### **III.G Tinciones**

#### **III.G.1 Protocolo de tinción con plata optimizado para los geles Ettan DALT 12.5**

La tinción con plata es un método ampliamente usado 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 1ng de proteína visualizado en una mancha) [56].

Para la tinción con plata de proteínas, el principio que se sigue es: un gel de poliacrilamida es bañado en una disolución que contiene iones solubles de plata ( $\text{Ag}^+$ ) y después es revelado con el tratamiento de un reductor que promueve la reducción de los iones de plata a plata metálica ( $\text{Ag}^0$ ) 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 usados varían pero el reductor de la plata siempre es 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 hay que practicar una limpieza extrema de todos los lugares por donde pasaran 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, y esto hace que su posterior identificación con métodos de espectrometría de masas sea imposible [57]. Debido a esto hay que realizar pequeñas modificaciones en el protocolo de tinción para que sea compatible con espectrometría de masas. Esta modificación química se debe generalmente a que los métodos de tinción con plata incorporan un paso de sensibilización que incluye gluraldehído y fuertes agentes oxidantes. Todos estos reactivos no deben usarse si el propósito es realizar espectrometría de masas después de la tinción.

El protocolo aquí detallado es indicado para los geles Ettan DALT de Amersham Biosciences. Hay que tener en cuenta que estos geles son muy grandes y que tienen un soporte plástico para facilitar su manipulación, pero esto hace que los líquidos difundan peor en los geles, así que los tiempos de incubación están prolongados.

Preparar 250ml de reactivo para cada gel a teñir, excepto en las soluciones de fijado donde es conveniente preparar el doble de volumen.

Protocolo:

Paso	Soluciones	Cantidad para 1 litro	Tiempo
Fijación	Etanol Ácido acético glacial Agua destilada	400ml 100ml hasta 1 l.	2 x 60 minutos*
Sensibilización	Etanol Tiosulfato de sodio Acetato de sodio Agua destilada	300ml 2gr 68gr hasta 1l.	60 minutos

Lavado	Agua destilada	1l.	5 x 15 minutos
Reacción con plata	Nitrato de plata Agua destilada	2.5gr hasta 1l.	60 minutos
Lavado	Agua destilada	1l.	2 x 1 minuto
Revelado	Carbonato de sodio Formaldehido 37% Agua destilada	25gr 400µl	10 minutos**
Parada	EDTA-Na2 Agua destilada	14.6gr hasta 1l.	60 minutos
Lavado	Agua destilada	1l.	2 x 30 minutos
Preservación	Glicerol (87%) Agua destilada	100ml hasta 1l.	20 minutos***

\* El primer paso de fijación se puede prolongar hasta 3 días, pero una vez empezado el segundo paso de fijación debe continuarse con todo el protocolo.

\*\* El volumen de formaldehido puede variar de 400µl hasta 1ml, dependiendo de la cantidad de proteína y el número de manchas ya que el formaldehido es consumido a lo largo del tiempo. El tiempo de revelado es aproximado. El revelado debe pararse antes de que el fondo se vuelva oscuro.

### III.G.2 Tinción específica de fosfoproteínas

La tinción específica de fosfoproteínas se ha realizado con el agente de tinción Pro-Q® Diamond de Molecular Probes. Este agente permite la detección, directamente en el gel, de grupos fosfato unidos a tirosina, serina y treonina, sin la necesidad de anticuerpos o radioactividad. Esta tinción es compatible con estudios posteriores por espectrometría de masas. La sensibilidad de esta tinción es de 1-16ng por banda, dependiendo del estado de fosforilación de la proteína. Para fosfoproteínas individuales, la intensidad de la señal es correlativa con el número de grupos fosfato, y es lineal durante tres ordenes de magnitud. El máximo de excitación/emisión es de 550/580nm.

Protocolo para geles de gran formato (20x20cm):

1- Fijación:

Disolución de Fijación: 50% metanol, 10% ácido acético.

Incubar el gel con 500ml de disolución de fijación a temperatura ambiente con agitación (50rpm) durante 30-60 minutos. Repetir la fijación toda la noche para asegurarse que todo el SDS es lavado del gel.

## 2- Lavados

Lavar el gel con 500ml de agua destilada con agitación (50rpm) durante 15 minutos. Repetir dos veces más. Es importante que el gel quede bien sumergido ya que residuos de metanol o ácido acético interfieren en la tinción.

## 3- Tinción

Incubar, a oscuras, el gel con 500ml de Pro-Q<sup>®</sup> Diamond con agitación (50rpm) durante 1.5-2 horas. Si se pretenden comparar dos geles, es importante que ambos tengan el mismo tiempo de incubación. No se deben dejar los geles toda la noche tiñendo, ya que aumentaría mucho el fondo.

## 4- Desteñido

Disolución de desteñido: 20% acetonitrilo, 50mM acetato de sodio, pH 4.0.

Incubar el gel con 500ml de disolución de desteñido durante 30 minutos con agitación (50rpm) y a oscuras. Repetir dos veces más. El proceso de desteñido es importante para reducir la señal de fondo y eliminar la señal de tinciones no específicas. El tiempo óptimo de desteñido es de 1.5 horas. Los geles pueden desteñirse durante periodos de tiempo más largos pero esto conlleva la reducción de señal y pérdida de sensibilidad.

## 5- Lavado

Lavar dos veces con agua destilada durante 5 minutos cada lavado.

### Notas:

- Hacer todos los pasos con agitación (en un agitador orbital a 50rpm).

- Usar un contenedor de plástico. Si se reutiliza el contenedor, lavarlo con etanol 70% antes de usarlo.
- Utilizar estrictamente los volúmenes indicados.

#### III.G.3 Tinción con Coomassie coloidal

La tinción con colorantes no covalentes es ampliamente usada debido a su facilidad y bajo coste. La tinción tiene lugar generalmente después de un paso de fijación para eliminar componentes que puedan interferir con la unión del colorante. La tinción es generalmente regresiva, es decir, primero se satura el gel con el colorante y después se destiñe aprovechando la mayor afinidad del colorante por las proteínas que no por el gel de acrilamida. Son muchos los colorantes descritos para la tinción de proteínas, pero los Brilliant Blue G y R (conocidos como Coomassie) son los más populares. Los colorantes Brilliant Blue tiñen las proteínas uniformemente, excepto aquellas proteínas con pl extremos y glicoproteínas. La principal limitación de este tipo de tinciones es la sensibilidad, para los Brilliant Blue, el límite de detección es de 1 $\mu$ gr aproximadamente [56].

Una solución muy elegante para superar las limitaciones de la tinción regresiva, es la propuesta por Neuhoff [58]. Este método realiza una tinción progresiva, es decir las proteínas son teñidas progresivamente mientras el fondo permanece limpio. En este método, también conocido como Coomassie coloidal, el Brilliant Blue G forma microprecipitados, que son excluidos del gel de poliacrilamida en medio ácido que contiene sulfato de amonio. La concentración de colorante libre es muy pequeña, así la tinción del fondo es mínima. Los microprecipitados actúan como un reservorio de moléculas de colorante, así, hay suficiente colorante para ocupar todos los sitios de unión en todas las proteínas. No sólo se obtiene una buena reproducibilidad, sino también una mejora en la sensibilidad. La presencia de sulfato de amonio en la disolución de tinción coloidal incrementa la fuerza de las interacciones hidrofóbicas, resultando en una mejor sensibilidad, 100ng aproximadamente [56].

Existen múltiples variantes de la tinción coloidal, pero el protocolo que se ha utilizado es el siguiente:

Composición de la disolución de tinción:

0.12% colorante (Brilliant Blue G-250)

10% sulfato de amonio

10% ácido fosfórico

20% metanol

El método de preparación es el siguiente:

- 1- En un vaso de precipitado de cristal se pone agua (un 10% del volumen final)
- 2- Se añade el ácido fosfórico
- 3- Se añade el sulfato de amonio
- 4- Cuando el sulfato de amonio esta completamente disuelto, se incorpora el colorante.
- 5- Añadir agua hasta el 80% del volumen final
- 6- Añadir metanol hasta el 20% de concentración final.

Se puede guardar hasta 6 meses a temperatura ambiente y en una botella de cristal marrón.

### **III.H Análisis de imagen**

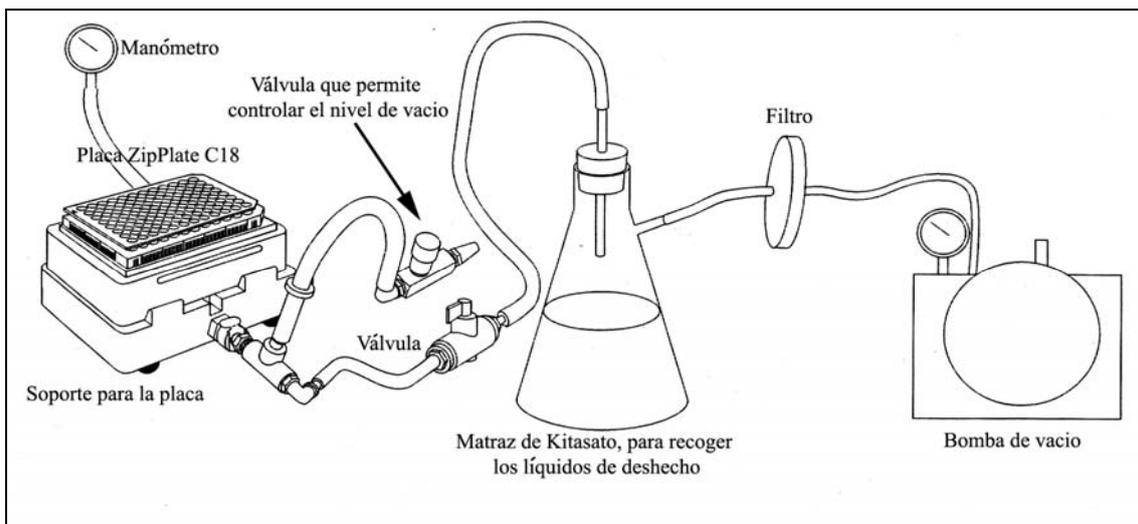
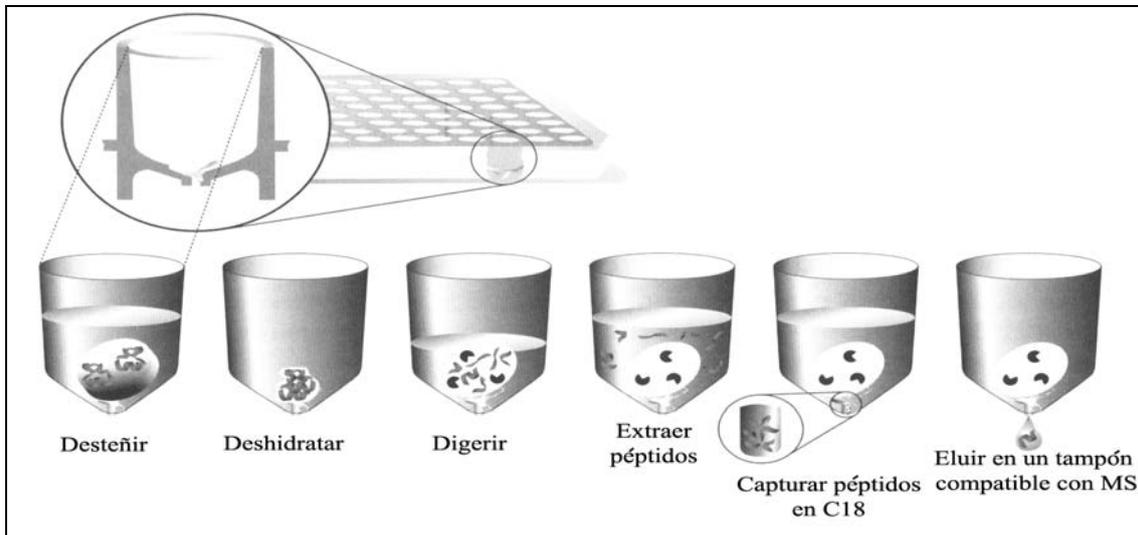
El análisis de imagen se realizó con el software ImageMaster 5.0 de Amersham Biosciences, siguiendo el manual que proporciona el fabricante.

### **III.I Digestión trípica**

#### **III.I.1 Descripción del sistema**

Para realizar la digestión trípica de las proteínas separadas por electroforesis bidimensional se han empleado una placas de 96 pocillos de Millipore, llamadas "ZipPlate C18 plate" Estas placas tienen en el fondo de los pocillos unas ranuras que se abren al aplicar vacío, de manera que permiten eliminar el liquido de su interior sin necesidad de utilizar una pipeta. Además incorpora en el fondo de cada pocillo resina C18 que permite la unión de péptidos digeridos, el lavado de los mismos, y la posterior elución. De forma gráfica el mecanismo es:

Para realizar este procedimiento hace falta disponer de todo un montaje, que evidentemente Millipore proporciona, y que en la siguiente figura se esquematiza:



El protocolo que se describe a continuación ha sido optimizado para realizar digestiones tríplicas de manchas recortadas de geles bidimensionales teñidos con nitrato de plata. Para otras tinciones debería optimizarse o incluso modificar algún paso. De la misma manera este protocolo está pensado para que los péptidos eluidos sean analizados con un espectrómetro de masas MALDI-TOF. Si se desea analizarlos con un ESI también deberían modificarse algunos pasos.

#### III.I.2 Recorte de manchas y advertencias

Se recortan los pedazos de acrilamida que se quieren identificar. Para ello se utilizó, a falta de robot, puntas de pipeta recortadas al diámetro aproximado del

pedazo a recortar. Cada proteína se coloca en un pocillo, y hay que tener en cuenta que se debe tener muy bien identificado qué mancha hay en cada pocillo para evitar confusiones. Los pedazos de acrilamida deben tener 1-2mm de diámetro, con lo cual, si algún pedazo es más grande lo trocearemos con una hoja de bisturí limpia. Deben usarse reactivos de la mayor pureza posible, sobre todo el agua, que a ser posible debe ser agua tridestilada. Evitar al máximo la manipulación con las manos desnudas o con ropa de lana ya que contaminaremos las muestras con queratinas. Lo ideal es trabajar con las muestras lo más lejos del cuerpo posible o incluso en una campana de flujo laminar. Si no se van a usar los 96 pocillos de la placa, deben taparse con cinta adhesiva los pocillos no utilizados. Si se realizan muchas digestiones a la vez es muy recomendable disponer de una pipeta multicanal de 8 canales.

### **III.I.3 Desteñido de manchas teñidas con nitrato de plata**

- 1- Añadir a cada pocillo 200 $\mu$ l de disolución de desteñido. Tapar la placa con la tapa proporcionada y dejar 20 minutos a oscuras a temperatura ambiente.

Disolución de desteñido:

Disolución A: Hexacianoferrato (III) de potasio 30mM en agua  
(mantener a 4° C y proteger de la luz)

Disolución B: Tiosulfato de sodio 100mM en agua  
(mantener a 4° C)

Mezclar las soluciones A y B 1:1 antes de usar

Esta disolución es inestable así que debe prepararse cada vez que se necesite.

- 2- Quitar la tapa de la placa y aplicar vacío completo (15-20" Hg) para eliminar el líquido de los pocillos. Dejar de aplicar vacío en cuanto todos los pocillos se hayan vaciado. Se debe observar que los pocillos han perdido el color de la plata y se han vuelto de color amarillo.

- 3- Añadir 200µl de agua en cada pocillo que contiene un pedazo de acrilamida. Tapar e incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
- 4- Quitar la tapa y aplicar vacío completo (15-20" Hg) para eliminar el líquido. Liberar el vacío en cuanto todos los pocillos se hayan vaciado.
- 5- Repetir los pasos 3 y 4 hasta que todos los pedazos de acrilamida hayan perdido el color amarillo y sean completamente transparentes.

#### III.1.4 Digestión enzimática

- 1- Añadir 100µl de tampón 1 a cada pocillo que contenga un pedazo de acrilamida, tapar e incubar 30 minutos a temperatura ambiente

Tampón 1:

Bicarbonato amónico	25mM
Acetonitrilo	5%

- 2- Quitar la tapa y aplicar vacío completo (15-20" Hg) hasta que se haya eliminado el líquido de todos los pocillos utilizados.

Ocasionalmente se pueden observar gotas que cuelgan de la base de los pocillos. Estas gotas no interfieren en el proceso y no deben ser eliminadas hasta el paso de elución.

- 3- Añadir 100µl de tampón 2 a cada pocillo que contenga un pedazo de acrilamida, tapar e incubar 30 minutos a temperatura ambiente

Tampón 2:

Bicarbonato amónico	25mM
Acetonitrilo	50%

- 4- Quitar la tapa y aplicar vacío completo (15-20" Hg) hasta que se haya eliminado el líquido de todos los pocillos utilizados.

- 5- Repetir los pasos 3 y 4

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

- 7- Quitar la tapa y aplicar vacío completo (15-20" Hg) durante 2 minutos para eliminar completamente todo el acetonitrilo de los pocillos.

Se observará que los trozos de acrilamida están completamente deshidratados.

- 8- Colocar la placa ZipPlate C18 sobre una placa de recogida, que debe encajar perfectamente con el ZipPlate C18 y es conveniente que la base de los pocillos de esta placa de recogida sea cónica y que el material de las placas sea de baja adherencia de proteínas.
- 9- Añadir 5 $\mu$ l de Disolución de Tripsina a cada pocillo.

Disolución de Tripsina.

- 1- Añadir 100 $\mu$ l de HCl 1mM a un vial de tripsina en polvo
- 2- Mezclar hasta la completa solubilización del enzima
- 3- Preparar doce alícuotas de 8 $\mu$ l cada una y guardar a -20° C
- 4- Cuando se necesite, se descongela una alícuota y se añaden 400 $\mu$ l de bicarbonato amónico 25mM

Con estas cantidades se están poniendo unos 20ng de tripsina en cada pocillo. El protocolo original incorpora 166ng de tripsina. Siguiendo el protocolo original con manchas teñidas con plata, lo único que se observa por espectrometría de masas son picos de autodigestión de la tripsina. Así que recomiendo ajustar la cantidad de tripsina a la muestra que se va a digerir. Si las manchas se han teñido con azul de comassie, se puede aumentar la cantidad de tripsina.

- 10- Tapar la placa ZipPlate C18 y poner el montaje de placas dentro de una bolsa de incubación o en un incubador que permita controlar la humedad. También se puede utilizarse un incubador con un plato con agua en el interior.
- 11-Incubar usando estas condiciones:
  - a. 3 horas a 37° C
  - b. toda la noche a 30° CTras la incubación los pedazos de acrilamida no deben estar completamente secos.

- 12-Sacar el montaje de placas del lugar de incubación y poner 8 $\mu$ l de acetonitrilo 100% directamente en la resina, no se debe añadir el acetonitrilo a los pedazos de acrilamida. La adición de acetonitrilo en la resina hace que esta se seque. Si no se hace correctamente este paso los péptidos no se unirán a la resina.

13-Volver a realizar el montaje de placas dentro de la bolsa de incubación o incubador e incubar 15 minutos a 37° C. Este paso no debe prolongarse más de 15 minutos ya que disminuye mucho la eficiencia de unión de los péptidos.

14-Quitar la tapa del ZipPlate C18 y añadir 130µl de Disolución de extracción/lavado a cada pocillo utilizado e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

Disolución de extracción/lavado:

Trifluoroacético 0.2%

15-Aplicar vacío (7-8”Hg). Girar la válvula de control del vacío para conseguir este nivel de vacío.

16-Parar el vacío cuando los pocillos más lentos se hayan vaciado. Si pasados 10 minutos todavía queda algún pocillo con líquido, aplicar vacío completo (15-20”Hg). Secar los péptidos en la resina no afecta el resultado final.

17- Añadir 100µl de Disolución de extracción/lavado en cada pocillo.

18-Aplicar vacío completo (15-20”Hg).

19-Parar el vacío cuando se hayan vaciado todos los pocillos.

20-Repetir los pasos 17 a 19. Mantener el vacío durante 5 minutos adicionales después de que se hayan vaciado los pocillos.

#### III.1.5 Elución de los péptidos por centrifugación

1- Poner la placa ZipPlate C18 encima de la placa recolectora.

2- Dispensar 5µl de Disolución de elución directamente en la resina, no en los pedazos de acrilamida.

Disolución de elución:

Trifluoroacético 0.1%

Acetonitrilo 50%

3- Centrifugar 15 segundos a 1750xg.

Hay que tener en cuenta que el acetonitrilo es un solvente orgánico muy volátil. Por lo tanto es conveniente hacer el proceso de elución lo más rápido posible, y si no se van a usar los péptidos eluidos inmediatamente deben congelarse para evitar al máximo la evaporación del acetonitrilo.

### III.J Espectrometría de masas MALDI-TOF

#### III.J.1 Descripción del sistema

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 conseguida con un laser de nitrógeno a 337nm y los espectros fueron obtenidos en el modo reflectivo de iones positivos, usando 25 kV de aceleración.

Las placas que se han utilizado para el análisis de las muestras son los AnchoChip™ de Bruker. Estas placas tienen la ventaja de 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 800µm. Para la matriz adecuada para el análisis de péptidos, el HCCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico), la superficie recomendada por el fabricante es de 600µm.

Para la identificación de proteínas mediante la técnica de la huella peptídica es necesario que la calibración del espectrómetro de masas esté muy bien hecha. Con tal objetivo, las muestras se preparaban alternando una muestra con un marcador de peso molecular. Este marcador está compuesto de:

Péptido	Masa molecular
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.J.2 Preparación previa de la placa AnchorChip™

Para mejorar la calidad de los espectros obtenidos, antes de depositar las muestras en el AnchoChip™ es conveniente crear una capa fina de matriz sobre el AnchorChip™.

Para ello, se coloca la placa en una superficie plana. Se deposita una gota de matriz HCCA (0.3gr/l en Etanol:Acetona, 2:1) en un extremo del carril que se va a usar, y con cuidado se levanta la placa por el extremo donde hemos depositado la gota; de manera que la gota se va desplazando sobre todos los pocillos que se van a usar. El AnchorChip™ debido a sus propiedades hidrofílicas, retiene una pequeña porción de matriz en la zona hidrofílica.

Una vez realizada esta operación depositamos el marcador de peso molecular, mezclado 1:1 con matriz HCCA (0.3gr/l en Etanol:Acetona, 2:1), sobre los pocillos destinados a marcador.

#### **III.J.3 Preparación estándar de AnchorChip™ con HCCA**

- 1- Disolución de matriz: HCCA (0.3gr/l en Etanol:Acetona, 2:1) Se prepara a partir de un stock 3gr/l
- 2- Mezclar 1μl de analito con 1μl de matriz
- 3- Aplicar 1-2μl de la mezcla analito/matriz sobre el AnchorChip™ de 600μm
- 4- Dejar que la muestra cristalice a temperatura ambiente.

##### **III.J.3.a Notas**

- 1- Utilizar sólo plásticos de los que se esté seguro que no se disuelven en presencia de disolventes orgánicos. Si no sólo veremos polímeros de plástico.
- 2- Preparar la matriz diariamente, y es recomendable utilizar siempre el mismo tubo eppendorf.
- 3- La disolución en la que se tiene el analito debe tener un 0-70% de disolventes orgánicos.

En caso de que la preparación no sea correcta, es decir que la muestra no quede concentrada en la zona hidrofílica, se puede realizar un lavado y/o recristalización en la placa.

#### **III.J.4 Lavado en la placa**

Es un simple procedimiento para eliminar los contaminantes que son solubles en agua. Los cristales de matriz con analito incorporado no se disolverán.

Protocolo:

- 1- Aplicar 1-5 $\mu$ l de ácido trifluoroacético 0.1-1% encima de la muestra.
- 2- Tras unos segundos, eliminar el líquido con la punta de una pipeta. Hay que tener cuidado de no tocar los cristales con la punta de la pipeta.
- 3- Dejar que el líquido residual se evapore.

### **III.J.5 Recristalización en la placa**

Este método redisuelve los cristales de matriz y los lleva sobre la zona hidrofílica independientemente de la composición inicial de la muestra.

Protocolo:

- 1- Aplicar 0.5-1 $\mu$ l de Etanol:Acetona:Trifluoroacético 0.1% (6:3:1)
- 2- Dejar secar la muestra.
- 3- Aplicar 1-2 $\mu$ l de la mezcla analito/matriz sobre una placa de metal pulido del espectrómetro de masas.
- 4- Dejar que la muestra cristalice a temperatura ambiente.

Los espectros obtenidos con la matriz HCCA fueron analizados y editados con el software FlexAnalysis 2.0 y la búsqueda en la base de datos se hizo con el BioTools 2.1, ambos de Bruker Daltonics.

### **III.J.6 Lavado y regeneración de la placa AnchorChip™**

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

Protocolo:

- 1- Lavar la placa con un paño o papel suave impregnado de acetona
- 2- Sonicar 5-10 minutos con metanol:agua (1:1)
- 3- Aclarar con metanol
- 4- Aclarar con agua milliQ
- 5- Si la placa va ser guardada, es recomendable repetir los pasos 3 y 4 antes de usarla.

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 $\mu$ l) por la superficie, no debería observarse ningún rastro de agua, excepto unas pequeñas gotas que quedan en el centro de los pocillos donde hay la superficie hidrofílica.

#### **III.J.7 Preparación de muestras con la matriz DHB**

La matriz DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzóico) ha sido usada para mejorar la presencia de fosfopéptidos en los espectros de espectrometría de masas.

- 1- Disolución de matriz: Disolución saturada de DHB en 50% acetonitrilo, 1% ácido fosfórico.
- 2- Mezclar 1 $\mu$ l de analito con 1 $\mu$ l de matriz.

Los espectros obtenidos con la matriz DHB fueron analizados y editados de la misma manera que con la matriz HCCA.

#### **III.K Bioinformática**

Algunos de los spots identificados por electroforesis bidimensional corresponden a proteínas previamente anotadas como hipotéticas en los análisis originales de las secuencias de los genomas de *Mycoplasma penetrans* y *Mycoplasma genitalium*. Estas secuencias han sido analizadas en

detalle y sus funciones han sido predichas gracias a la combinación de algunos programas propios o usando los siguientes servidores web:

PSI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>); **[60]**

BYPASS (<http://bioinf.uab.es/cgi-bin/bypass/bypass.pl?home=1>);

MODFUN (<http://salilab.org/~marcius/ModFun/>); **[61]**

InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>); **[62]**

PROTLOC (<http://bioinf.uab.es/cgi-bin/trsdb/protloc.cgi>); **[63]**

TRANSMEM (<http://bioinf.uab.es/cgi-bin/trsdb/transmem.cgi>) **[64]**.

**IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN – CAPITULO 1**

## Capítulo 1

### Resultados y discusión

#### IV.1 Identificación de proteínas de *Mycoplasma penetrans*

*Mycoplasma penetrans* fue aislado por primera vez de muestras de orina de pacientes infectados por el HIV [17], y también a partir de un paciente que padecía el Síndrome Antifosfolipídico primario, también conocido como Síndrome de Hughes [65] (enfermedad caracterizada por un estado de hipercoagulabilidad). Este hecho sugiere que *M. penetrans* puede ser patogénico sin la presencia del HIV. Se ha demostrado la actividad hemolítica y hemoxidativa de este microorganismo [66].

El genoma de *Mycoplasma penetrans* HF-2 fue secuenciado por Sasaki *et al.* [22]. Este genoma consiste en un único cromosoma circular de 1,358,633 pares de bases que contiene 1038 secuencias codificantes predichas (CDSs). Este microorganismo tiene el genoma más grande dentro de todos los micoplasmas que se han secuenciado hasta el momento. Entre las 1038 secuencias codificantes, 264 proteínas predichas son comunes a otros siete *Mycoplasmataceae* secuenciados mientras que 463 son específicas de *M. penetrans*. El “proteoma esencial” de un organismo se define como las familias de proteínas funcionalmente distintas en el proteoma teórico codificado por un genoma. Para *M. penetrans* el proteoma esencial está formado por 847 familias. Esto es significativamente mayor a otras especies de *Mycoplasmataceae*, por ejemplo: 469 en *M. genitalium*, 590 en *M. pneumoniae*, 721 en *M. pulmonis* o 580 en *U. urealyticum* [22].

La anotación de los genomas de micoplasmas secuenciados asigna una función sólo al 50-70% de los ORF propuestos. Esta asignación está basada en similitud de secuencia entre proteínas. Los ORF sin una función asignada son los más interesantes, ya que son candidatos potenciales a nuevas funciones. La proteómica puede ayudar a identificar proteínas expresadas en condiciones celulares distintas ayudando así a realizar una anotación funcional de las proteínas hipotéticas.

El término “proteoma” viene definido con el conjunto total de proteínas codificado por un genoma [51]. Hoy en día existen distintas aproximaciones en

proteómica para estudiar los proteomas, pero la electroforesis bidimensional es la herramienta más utilizada, ya que proporciona un mapa de proteínas intactas, reflejando cambios en los niveles de expresión de las proteínas, isoformas o modificaciones post-traduccionales. El principal objetivo de este estudio era catalogar los productos génicos expresados por *M. penetrans*, ya que la anotaciones de un gen en la secuencia de DNA no es por si misma suficiente para estar seguro de que aquel realmente se expresa.

El proteoma analizado pertenece a *M. penetrans* GTU-54, mientras que el genoma secuenciado pertenece a *M. penetrans* HF-2. En un trabajo previo, se compararon los patrones protéicos generados por electroforesis para poder identificar diferencias entre las dos cepas de *M. penetrans*. Se observó la presencia de una proteína de 46KDa que sólo estaba presente en la cepa HF-2 [67].

Todos los spots analizados provienen de geles bidimensionales generados por gradientes de pH de 4 a 7, de 6 a 9 y de 7 a 11 NL (no linear). Todos estos geles han sido teñidos con nitrato de plata. Uno de los problemas de la tinción con nitrato de plata es el hecho de que cuanto mayor tiempo se deje el gel teñido, peor es la identificación por espectrometría de masas. Para asegurarse un tanto por ciento elevado de éxito en las identificaciones por espectrometría de masas, los spots teñidos con nitrato de plata fueron inmediatamente desteñidos para evitar la modificación de las proteínas en la matriz de acrilamida. De esta forma se conseguía de un 65 a 80% de éxito en las identificaciones.

En el rango de pH de 4 a 7 y con la tinción de nitrato de plata se pudieron resolver unos 470 spots. Usando el gradiente de 6 a 9 fue posible visualizar 108 spots adicionales y con el rango de 7 a 11 NL, 84 spots. Se pudieron identificar por espectrometría de masas 207 spots, que fueron asignados a 153 genes de *Mycoplasma penetrans*. De las proteínas anotadas en el mapa que aquí se presenta, 27 proteínas estaban clasificadas en la base de datos Swiss-Prot como hipotéticas [22]. En este trabajo se demuestra la existencia de estas proteínas la cual no estaba previamente demostrada y se predice una función para ellas. Los 153 ORF encontrados fueron clasificados en 20 categorías funcionales distintas. Estas categorías fueron obtenidas a partir del trabajo de Riley [68], con algunas modificaciones.

**Tabla IV.1 Clasificación funcional de las proteínas identificadas.**

Biosíntesis de aminoácidos	3/5
Biosíntesis de cofactores, grupos prostéticos y transportadores	0/16
Recubrimiento celular	16/137
Procesos celulares	10/21
Metabolismo intermediario central	5/17
Metabolismo de DNA	7/53
Metabolismo energético	38/78
Metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos	2/18
Proteínas hipotéticas	0/1
Proteínas hipotéticas-conservadas	4/268
Mobile and extrachromosomal elements functions	0/28
Destino protéico	13/38
Síntesis de proteínas	25/102
Purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos	9/35
Funciones reguladoras	1/22
Transducción de señal	1/5
Transcripción	10/16
Transporte y proteínas de unión	9/74
Sin clasificar	0/46
Función desconocida	0/58

Clasificación funcional adaptada de Riley, M. [68]

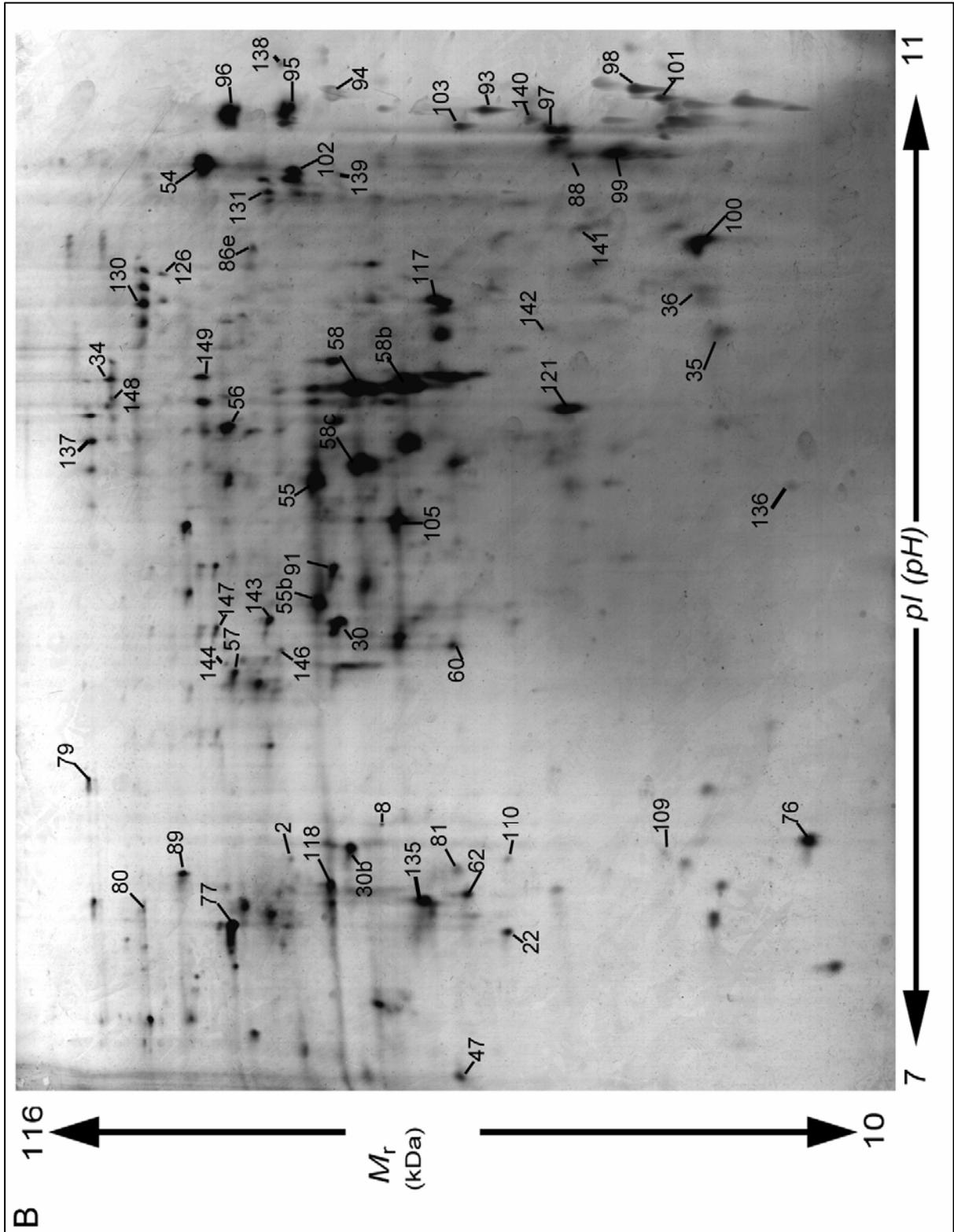
Los números indican el número de proteínas identificadas en este trabajo/proteínas anotadas en el genoma para cada categoría.

Para la categoría de Biosíntesis de cofactores y elementos móviles y extracromosomales, no se pudo detectar ninguna de las proteínas listadas por los autores de la secuencia genómica [22]. En otros micoplasmas cuyos proteomas han sido analizados se han encontrado algunos miembros pertenecientes a esta categoría, Para *M. pneumoniae* se identificaron 5 proteínas [52], mientras que en *M. genitalium* se encontraron 2 proteínas [51].

Seguramente la expresión las proteínas pertenecientes a esta categoría se muy baja, o bien las condiciones en que se han realizado estos mapas no sean las adecuadas para visualizarlas.

Entre los spots más prominentes se encuentran: Las proteínas más abundantes en la membrana de *M. penetrans*, los dos antígenos principales, las proteínas P35 (spot 4) y P38 (spot 5), un transportador ABC (spot 128), las chaperonas GroEl (spot 75) y DnaK (spot 78), el Factor de elongación Tu (spot 86), y dos subunidades de la Piruvato deshidrogenada (subunidades  $\alpha$ , spot 45 y dihidrolipoamida, spot 46). La abundancia de estas proteínas es indicativa de una expresión constitutiva in presencia de ninguna inducción específica. La presencia continuada de estas proteínas está de acuerdo con lo observado en los proteomas de otros microorganismos analizados [69]. Todas estas proteínas aparecen como una fila de spots. Además la proteína P35 ha sido encontrada en otros tres spots de menos peso molecular, seguramente representado fragmentos truncados de P35 estables. La P35 forma la familia más numerosa de parálogos en este *Mollicute*, con un total de 44 miembros de p35 y homólogos de p35 [22]. En el análisis del proteoma aquí presentando se han podido identificar tres miembros de está familia de parálogos. Otras proteínas fuertemente expresadas son los componentes del citoesqueleto. En el genoma de *M. penetrans* hay 4 proteínas predichas como componentes del citoesqueleto, en este análisis se han podido detectar 3 de estas 4 proteínas de citoesqueleto (spots 13, 14 y 15). De estas proteínas, el producto del gen MYPE1570 (spots 13) aparece en dos formas. Esta proteína es similar a la proteína de citoesqueleto HMW2 de *Mycoplasma genitalium* y parece ser importante en la biogénesis de un organelo funcional de acoplamiento, que permitiría la unión a las células huésped [70]. Una de estas formas aparece con el peso molecular y punto isoeléctrico predicho, pero otra forma aparece como 3 isoformas de peso molecular aproximadamente la mitad de la proteína entera (spots 13b, 13c, 13d). En el análisis de espectrometría de masas no se han encontrado ningún péptido de la mitad N-terminal de la proteína, indicando que esta proteína sufre un claro evento de proteólisis limitada.





**Fig. IV.2** Mapa bidimensional de las proteínas de *Mycoplasma penetrans* GTU-54. Extracto total de proteínas separadas en una tira IPG de 24 cm con un gradiente de pH de 7-11NL, seguido de una electroforesis vertical SDS-PAGE de 12,5% de poliacrilamida (25x20 cm) y teñida posteriormente con nitrato de plata.

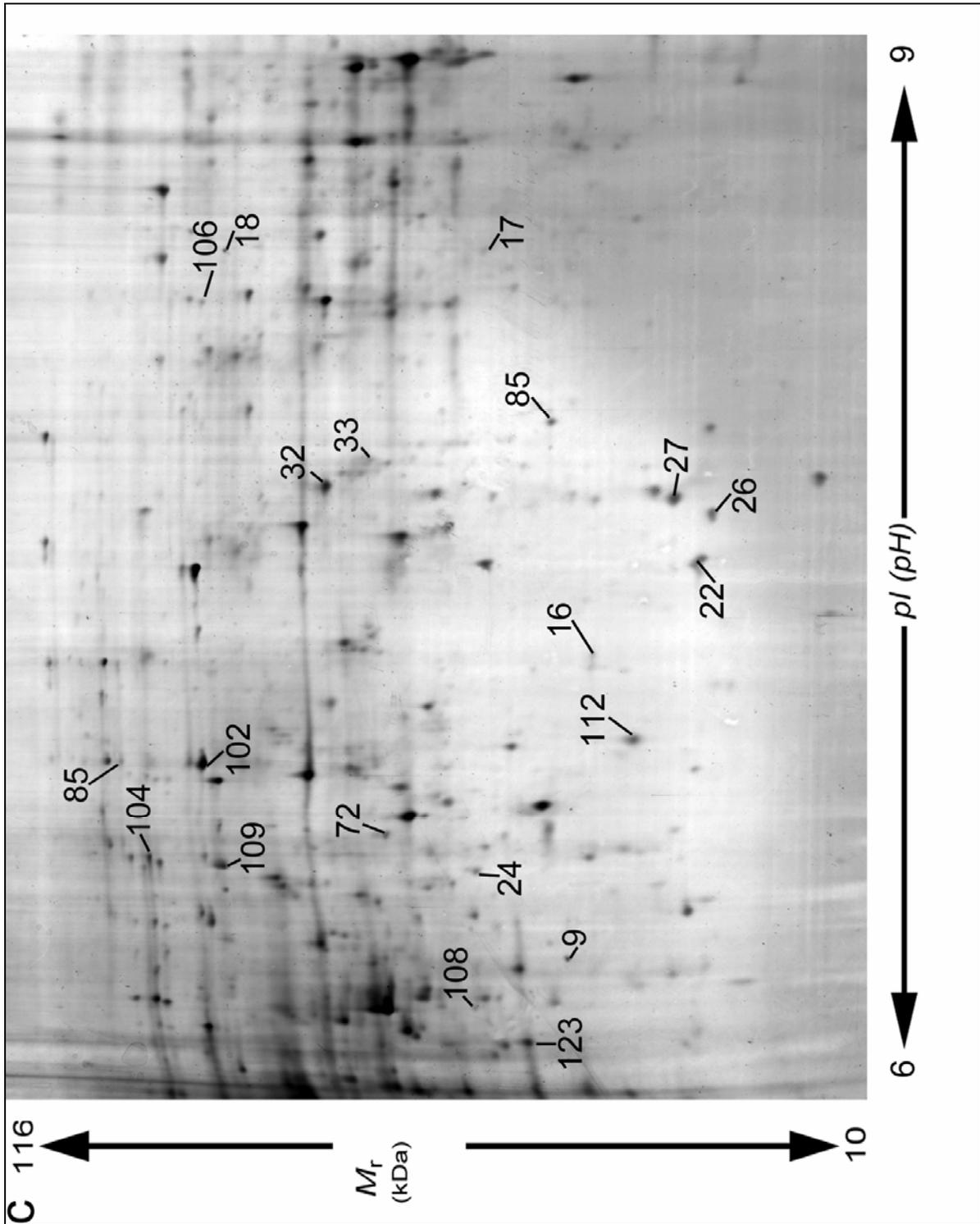


Fig. IV.3 Mapa bidimensional de las proteínas de *Mycoplasma penetrans* GTU-54. Extracto total de proteínas separadas en una tira IPG de 24 cm con un gradiente de pH de 6-9, seguido de una electroforesis vertical SDS-PAGE de 12,5% de poliacrilamida (25x20 cm) y teñida posteriormente con nitrato de plata.

Tabla IV.2 Proteínas identificadas

Spot	Proteína	Número MYPE	Código de acceso (Uniprot)	Clasificación GOA	funcional	Teor. Mr (Da)	Teor. pI (pH)	Exp. Mr (Da)	Exp. pI (pH)
1+	Ornitina carbamoiltransferasa	MYPE6090	Q8EVF5	Metabolismo de aminoácidos / actividad	de ornitina carbamoiltransferasa	38011	6.16	40008	6.13
1b								42859	6.84
2	Serina hidroximetiltransferasa	MYPE2730	Q8EWD1	Metabolismo de componentes de carbono/transferasa	de un actividad	45711	8.05	47777	NP
3	Aspartato--amonio ligasa	MYPE1480	Q8EWQ5	Biosíntesis de /Actividad ligasa	Asparagina	37656	6.34	38340	6.76
3b								44214	6.85
3c								25207	7.82
4+	Lipoproteína p35 precursor	MYPE6810	Q50367	Membrana		38347	4.95	40274	5.26
4b								30980	4.51
4c								14584	4.38
4d								18852	4.57
4e								14277	4.24
4f								35158	4.29
5	P38 (P35 lipoproteína homologa a P35)	MYPE6780	Q8EV88	Membrana		40177	4.69	43985	4.08
6	Lipoproteína homologa a P35	MYPE6570	Q50367	Membrana		39040	4.82	39239	4.17
7*	Proteína de quimotaxis. histidina kinasa	MYPE3100	Q8EW94	Actividad de transmembrana kinasa	receptor histidina	44778	4.66	50298	4.62
8*	Proteína de adhesión/transportador	MYPE2580	Q8EWE7	Membrana		126056	5.84	36520	7.71
9*	Proteína de quimotaxis. histidina kinasa	MYPE4900	Q8EVR9	Actividad de transmembrana kinasa	receptor histidina	21646	6.17	23614	6.36
10*	Receptor membrana	MYPE280	Q8EX22	Membrana		18034	6.21	19447	6.96
11	Lipoproteína	MYPE7950	Q8EUX3	Membrana		27907	5.22	29860	4.40
12*	Proteína de unión a fibronectina	MYPE920	Q8EWW7	Unión a fibronectina		27852	4.99	34046	4.98
13+	Proteína de citosqueleto homologa a HMW2	MYPE1570	Q8EWP6	Citosqueleto, organización y biogenesis		93381	4.69	92062	4.55

## IV Resultados y discusión

13b							53502	6.10
13c							53112	6.35
13d							53328	5.91
14	Proteína de citoesqueleto	MYPE1530	Q8EWQ0	Citoesqueleto, organización y biogénesis	122350	4.64	123826	4.46
15	Proteína de citoesqueleto	MYPE1560	Q8EWP7	Citoesqueleto, organización y biogénesis	98955	4.67	86382	4.49
16	glicosiltransferasa	MYPE8830	Q8EUN8	Actividad Transferasa	39393	9.44	22312	7.16
17*	Proteína sensora rprX	MYPE8040	Q8EUW4	Actividad de receptor transmembrana histidina quinasa	26916	9.32	27435	8.34
18*	Proteína anclada a superficie	MYPE5780	Q8EVI6	Membrana	37894	9.25	46716	8.33
19+	Proteína de división celular FtsZ	MYPE8370	Q8EUT3	Ciclo celular y división celular /Unión a nucleótido	52496	4.92	87090	5.12
20+	Tiol peroxidasa	MYPE3980	Q8EW09	Actividad Peroxidasa	19151	5.46	22339	5.19
20b							22426	5.99
21	NADH oxidasa	MYPE1690	Q8EWN4	Oxidación de NADH	49954	5.44	46942	5.62
22	Acetiltransferasa	MYPE7460	Q8EV21	Actividad Transferasa	27172	7.66	28456	7.40
23	Proteína de segregación y condensación	MYPE390	Q8EX11	Ciclo celular, división celular y segregación de cromosoma	22427	4.89	22941	5.01
24	Acetiltransferasa	MYPE1700	Q8EWN3	Actividad Transferasa	21462	6.65	21545	6.65
25	proteína CinA, inducible por daño	MYPE6400	Q8EVC6	Unión a DNA / metabolismo DNA	18536	7.66	17235	7.41
26	Proteína tipo septolisina	MYPE6760	Q8EV90	Ciclo celular, división celular	17206	7.85	16341	7.55
27	Peroxiredoxina	MYPE140	Q8EX36	Actividad Oxidoreductasa y peroxidasa	18324	7.85	18911	7.60
28	Pirofosfatasa inorgánica	MYPE4400	Q8EVW9	Actividad Hydrolasa, Unión a ion magnesio	21020	5.66	25376	6.10
29	Oxidoreductasa	MYPE9500	Q8EUH6	Actividad Oxidoreductasa	33063	6.46	28280	6.48
30	Oxidoreductasa	MYPE5130	Q8EVP7	Actividad Oxidoreductasa	38894	8.13	40089	8.15
30b							40170	7.60
31	fosfoacetilasa	MYPE5030	Q8EVQ7	Catabolismo de Acetato, catabolismo de aminoácido, catabolismo de carbohidrato y catabolismo piruvato	35736	5.71	37688	5.61

## IV Resultados y discusión

32	Fosfotriesterasa	MYPE72 40	BAC44518	Actividad Arildialkilfosfatasa	25525	6.71	40170	7.60
33*	Fosfotriesterasa	MYPE72 30	Q8EV44	Actividad Arildialkilfosfatasa	6841	9.60	36520	7.71
34	DNA Topoisomerasa I	MYPE41 40	Q8EVZ3	Actividad Isomerasa	81182	8.83	88160	NP
35	Proteína HU- alfa de unión a DNA, tipo histona	MYPE24 90	Q8EWF7	Unión a DNA	14063	9.10	14842	8.80
36	Proteína iniciadora de la replicación cromosomal	MYPE10	Q8EX49	Unión a DNA, DNA unión al origen de replicación, unión a ATP	52944	6.95	17176	8.83
37+*	ATPasa implicada en reparación de DNA	MYPE36 60	Q8EW39	Unión a DNA dañado, unión a ATP, actividad ATPasa DNA-dependiente	17760	6.16	19897	6.59
38+*	ATPasa implicada en reparación de DNA	MYPE39 50	Q8EW12	Unión a DNA dañado, unión a ATP, actividad ATPasa DNA-dependiente	32931	5.40	37106	5.34
39	Proteína de unión a DNA monohebra	MYPE11 50	Q8EWT6	Reparación de DNA, replicación, respuesta a estimulo por DNA dañado / Unión a DNA	21408	4.74	27917	4.95
40	Triosa fosfato isomerasa	MYPE21 0	Q8EX29	Actividad Isomerasa	35152	5.14	43576	5.30
41+	Triosa fosfato isomerasa	MYPE37 30	Q8EW34	Biosíntesis de ácidos grasos, gluconeogénesis, glicólisis / Actividad isomerasa	27902	6.22	28061	6.61
41b							28095	6.12
42+	Piruvato kinasa	MYPE78 0	Q8EWX2	Actividad kinasa	55821	6.10	58211	6.50
43	Mannosa-6- fosfato isomerasa	MYPE77 00	Q8EU27	Actividad manosa-6-fosfato isomerasa	35444	5.87	38678	6.33
44+	Piruvato deshidrogenasa componente E1 subunidad beta	MYPE50 90	Q8EVQ1	Biosíntesis de acetil-CoA a partir de piruvato, piruvato deshidrogenasa bypass/ Actividad piruvato deshidrogenasa / Complejo piruvato deshidrogenasa	36208	6.42	39162	6.48
45+	Piruvato deshidrogenasa componente E1 subunidad alfa	MYPE50 80	Q8EVQ2	Biosíntesis de acetil-CoA a partir de piruvato, piruvato deshidrogenasa bypass/ Actividad piruvato deshidrogenasa / Complejo piruvato deshidrogenasa	40454	5.22	45293	5.34
45b							45812	5.99
46+	Dihidrolipoamid a acetiltransferasa de piruvato deshidrogenasa	MYPE51 00	Q8EVQ0	Unión a ácido lipóico y actividad transferase a, Actividad dihidrolipoil-lisina- residuo acetiltransferasa	51175	5.21	56686	5.17

## IV Resultados y discusión

componente E2								
47	L-ribulosa-5-fosfato 4-epimerasa	MYPE71 60	Q8EV51	Actividad L-ribulosa-fosfato 4-epimerasa	27350	7.11	30614	7.01
47b							30614	6.66
48	Ribosa 5-fosfato y galactosa-6-fosfato isomerasa	MYPE71 60	Q8EWY2	Actividad isomerasa	17729	6.53	18365	6.81
49	Carbamato kinasa	MYPE61 00	Q8EVF4	Actividad kinasa y actividad transferasa	32728	6.90	32999	6.75
49b							38718	6.91
49c							31178	6.24
49d							31688	6.48
50	Arginina deiminasa	MYPE60 80	Q8EVF6	Ruta de la arginina deiminasa / Actividad arginina deiminasa	51013	8.63	48374	6.87
50b							44727	6.59
50c							44276	6.57
51+	2,3-bisfosfoglicerato -independiente fosfoglicerato mutasa	MYPE37 40	Q8EW33	Glicólisis/ Actividad isomerasa, unión a ión manganeso	55912	5.66	56754	6.04
52+	Fructosa-bis fosfato aldolasa	MYPE10 340	Q8EU97	Glicolisis/ Actividad liasa	31880	5.61	33730	6.09
53	6-fosfogluconato deshidrogenasa	MYPE42 60	Q8EVY3	Actividad fosfogluconato deshidrogenasa (descarboxilante)	35522	5.51	34472	5.55
54	Fosfoglicerato kinasa	MYPE81 60	Q8EUV2	Glicolisis/Actividad kinasa y transferasa	50695	9.53	57819	NP
55	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	MYPE81 70	Q8EUV1	Actividad oxidoreductasa	36578	8.67	42954	8.81
55b							42006	8.63
56	Glicerol Kinasa	MYPE63 60	Q8EVD0	Metabolismo de glicerol / unión a nucleótido, Actividad kinasa y transferasa	56379	8.75	48852	8.61
57	Enolasa (2-fosfoglicerato deshidratasa)	MYPE37 50	Q8EW32	Glicolisis/ Actividad liasa, Unión a ión magnesio	48414	8.00	52606	NP
58	L-Lactato deshidrogenasa	MYPE96 40	Q8EUG3	Glicolisis / Actividad oxidoreductasa	34380	8.83	34087	8.84
58b							30367	8.82
58c							34785	8.61
59+	NADP-dependiente gliceraldehido-3-fosfato	MYPE47 10	Q8EVT9	Actividad gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (NADP+) (fosforilante)	52279	6.23	55333	6.28

## IV Resultados y discusión

	deshidrogenasa							
59b						54733	6.54	
59c						56005	5.95	
59d						29082	6.57	
60	Tioredoxina reductasa	MYPE9330	Q8EUJ3	Asimilación de azufre, Reducción de fosfoadenilil sulfato por fosfoadenilil-reductasa (tioredoxina)/ Actividad tioredoxina-disulfuro reductasa	34984	8.17	30000	8.14
61	Tioredoxina	MYPE1710	Q8EWN2	Asimilación de azufre, Reducción de fosfoadenilil sulfato por fosfoadenilil-sulfato reductasa (tioredoxina), Actividad transportadora de electrones, Actividad tioredoxina-disulfuro reductasa	11734	4.36	9257	4.36
62	3-hidroxiisobutyrateo deshidrogenasa	MYPE3160	Q8EW87	Actividad 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa	32294	7.68	30614	7.50
62b							30306	6.79
63*	Amidinotransferasa	MYPE1510	Q8EWQ2	Actividad amidinotransferasa, Actividad glicina amidinotransferasa	29281	5.10	31271	5.15
64+*	Piruvato-flavodixina oxidoreductasa	MYPE1380	Q8EWR5	Actividad piruvato sintasa	55131	5.64	51875	4.95
65*	Glucosidasa	MYPE4390	Q8EVX0	Actividad glucosidasa	12761	4.83	8216	4.78
66	Dihidroxiacetone kinasa	MYPE3330	Q8EW70	Actividad kinasa	22659	5.11	24308	5.10
66b							43712	6.41
66c							24289	5.47
67	Acetato kinasa	MYPE5700	Q8EVJ4	Actividad kinasa y transferasa	44466	6.04	47595	6.48
68	ATP sintasa subunidad alfa	MYPE600	Q8EWZ0	Biosíntesis de ATP/ Unión a ATP, actividad hidrolasa y unión a iones metal / Transporte de protones, Complejo ATP sintasa, núcleo catalítico F(1)	56758	6.01	55668	6.33
69	ATP sintasa subunidad beta	MYPE620	Q8EWY8	Biosíntesis de ATP/ Unión a ATP, actividad hidrolasa y unión a iones metal / Transporte de protones, Complejo ATP sintasa, núcleo catalítico F(1)	87757	5.01	108474	5.07
70	NADPH-dependiente reductasa	MYPE2950	Q8EWA9	Actividad flavin reductasa	20371	6.32	21181	6.62

## IV Resultados y discusión

71+*	Carboximuconolactona decarboxilasa	MYPE1860	Q8EWL7	Actividad carboximuconolactona decarboxilasa	4-	27634	6.18	32696	6.62
71b								29172	6.00
72	1-Fosfofructokinasa	MYPE7750	Q8EUZ3	Actividad kinasa y transferasa		34115	6.77	34295	6.69
73*	Triacilglicerol lipasa	MYPE90	Q8EX41	Actividad triacilglicerol lipasa		32090	4.96	51122	4.90
73b								52383	5.04
74+	Fosfodiesterasa transportadora de grupo acil	MYPE1890	Q8EWL4	Biosíntesis de proteína acil-carrier, Biosíntesis de holo-[acil-carrier proteína] / Actividad [acil-carrier proteína] fosfodiesterasa /Complejo ácido graso sintasa		23940	6.43	27376	6.58
74b						25842		27372	6.32
74c								25842	6.94
75+	60 kDa chaperonina (groEL).	MYPE990	Q8CXQ7	Plegamiento de proteínas/ Unión a ATP y proteínas desplegadas		58618	5.46	59778	5.62
75b								36119	5.04
76	10 kDa chaperonina (groES)	MYPE980	Q8CXQ8	Plegamiento de proteínas/ Unión a proteínas desplegadas		10131	7.90	11166	NP
77	Factor disparador	MYPE6920	Q8EV76	Ciclo celular, división celular y plegamiento de proteínas / Actividad isomerasa y unión a proteínas desplegadas		50766	7.56	49931	7.34
77b								48751	6.49
78+	Chaperona dnaK	MYPE9490	Q8EUH7	Plegamiento de proteínas y respuesta a proteínas desplegadas / Unión a ATP ATP y proteínas desplegadas		68483	5.45	66000	5.14
79	Proteasa La ATP-dependiente	MYPE6910	Q8EV77	Unión a ATP, actividad hidrolasa, actividad peptidasa, actividad endopeptidasa tipo serina		88334	7.96	80000	7.72
80	End peptidasa	MYPE8700	Q8EUQ0	Actividad hidrolasa, actividad metalopeptidasa, unión a ión zinc		73595	7.16	61963	7.14
81*	Serin proteasa tipo subtilisina	MYPE2660	Q8EWD9	Actividad endopeptidasa tipo serina		127138	5.14	31115	7.61
82*	Amidasa	MYPE3760	Q8EW31	Actividad amidasa		22622	5.43	24943	5.57
83	Citosol aminopeptidasa	MYPE8950	Q8EUM6	Actividad citosol alanil aminopeptidasa		50812	5.82	50791	6.08
83b								50791	6.30
84	Chaperona clpB	MYPE37	Q8EW28	Plegamiento de proteínas y respuesta a proteínas		80907	7.08	59828	6.89

## IV Resultados y discusión

		90		deplegadas / Unión a ATP y proteínas desplegadas				
85	Proteína GrpE	MYPE8960	Q8EUM5	Plegamiento de proteínas y respuesta a proteínas desplegadas / Unión a proteínas desplegadas	27089	7.79	25207	7.82
86+	Factor de elongación Tu	MYPE320	Q8EX18	Biosíntesis de proteínas/ unión a nucleótidos y actividad de factor de elongación de la traducción	43047	6.05	43344	6.02
86b							33175	5.03
86c							49447	6.70
86d							47905	6.19
86e							51178	NP
86f							27671	6.23
86g							44186	6.00
87	Factor de elongación P	MYPE1580	Q8EWP5	Biosíntesis de proteínas/ actividad de factor de elongación de la traducción	21214	5.64	25456	5.64
88	Factor iniciador de la traducción IF3	MYPE9160	Q8EUK6	Actividad de factor iniciador de la traducción	19620	9.66	24080	NP
89	Treonil-tRNA sintetasa	MYPE2740	Q8EWD0	Actividad tRNA ligasa	66319	7.62	62782	NP
90	Factor de elongación G	MYPE310	Q8EX19	Biosíntesis de proteínas/ unión a nucleótidos y actividad de factor de elongación de la traducción	75948	5.46	87232	5.66
90b							30061	6.21
91	Fenilalanil-tRNA Cadena alfa	MYPE9270	Q8EUJ8	Biosíntesis de proteínas / unión a nucleótidos y iones de metal, actividad tRNA ligasa	39969	8.38	40580	8.33
92+	Factor reciclador de ribosoma	MYPE9560	Q8EUH0	Biosíntesis de proteínas	21618	5.93	24633	6.24
92b							24487	6.04
93	Proteína Ribosomal S4	MYPE7550	Q8EV12	Unión a RNA / complejo ribonucleoproteína	23204	10.00	28933	NP
94	Proteína Ribosomal L29	MYPE10100	Q8EUC0	Componente estructural del ribosoma/ complejo ribonucleoproteína	26033	10.36	42876	NP
95	Proteína Ribosomal S2	MYPE9660	Q8EUG1	Componente estructural del ribosoma/ complejo ribonucleoproteína	41059	9.88	48009	NP
96	Proteína Ribosomal S3	MYPE10090	Q8EUC1	Unión a RNA/ complejo ribonucleoproteína	47582	9.78	53335	NP
97	Proteína Ribosomal L5	MYPE10050	Q8EUC5	Unión a RNA/ complejo ribonucleoproteína	21190	9.78	25293	NP
98	Proteína Ribosomal S7	MYPE300	Q8EX20	Unión a RNA/ complejo ribonucleoproteína	17628	10.26	21618	NP

## IV Resultados y discusión

99	Proteína Ribosomal L13	MYPE810	Q8EWW9	Componente estructural del ribosoma/ complejo ribonucleoproteína	16546	9.64	22164	NP
100	Proteína Ribosomal L10	MYPE5740	Q8EVJ0	Componente estructural del ribosoma/ complejo ribonucleoproteína	17938	9.15	17701	NP
101	Proteína Ribosomal L16	MYPE10110	Q8EUB9	Componente estructural de la síntesis del ribosoma	15553	10.32	20004	NP
102	Proteína Ribosomal L3	MYPE10180	Q8EUB3	Unión a RNA/ complejo ribonucleoproteína	34151	9.58	46820	NP
103	Proteína Ribosomal L4	MYPE10170	Q8EUB4	Unión a RNA/ complejo ribonucleoproteína	24073	9.88	30599	NP
104	Proteína Ribosomal L7/L12	MYPE5730	Q8EVJ1	Componente estructural del ribosoma	12443	4.89	8406	4.90
105	Factor Ts de elongación de la traducción	MYPE9580	Q8EUG8	Biosíntesis de proteínas/ Actividad de factor de elongación de la traducción	32333	8.50	34785	8.61
106	Lisil-tRNA sintetasa	MYPE8420	Q8EUS8	Biosíntesis de proteínas / Actividad tRNA ligas	57257	8.58	50035	8.32
107	Pseudouridina sintasa	MYPE1310	Q8EWS1	Actividad tRNA-pseudouridina sintasa	34819	10.03	42129	NP
108	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa	MYPE10260	Q8EUA5	Actividad transferasa, Transferencia de grupos glicosil	20167	6.09	25696	6.62
109	Deoxyuridine 5'trifosfato nucleotidohidrolasa dUTPasa	MYPE1000	Q8EWW1	Actividad hidrolasa	18563	7.82	20749	7.63
110	Orotidina 5'-fosfato decarboxilasa	MYPE7850	Q8EUY3	Biosíntesis de nucleótidos de pirimidina / Actividad carboxi-liase	26152	7.74	28039	7.58
111	Purina nucleósido fosforilasa	MYPE1040	Q8EWU7	Biosíntesis de nucleósidos de purina, catabolismo de nucleósidos de purina / Actividad purina-nucleósido fosforilasa	27477	5.67	29696	6.24
112	Uracil fosforibosiltransferasa	MYPE10300	Q8EUA1	Actividad transferasa, transferencia de grupos glicosil	23157	6.85	25543	6.79
112b							24247	6.21
113	CTP sintetasa	MYPE520	Q8EWZ8	biosíntesis de CTP , metabolismo de CTP, Actividad CTP sintetasa	60396	6.67	48599	6.85
114+	Uridilato kinasa	MYPE9570	Q8EUG9	Biosíntesis de nucleótidos de pirimidina / Actividad kinasa y transferasa	35684	6.12	36953	6.14
115	Regulador de dos componentes	MYPE3960	Q8EW11	Actividad de respuesta al regulador de dos-componentes	66810	6.56	53868	6.63
116+	Proteína Fosfocarrier HPr	MYPE2800	Q8EWC4	Sistema fosfotransferasa de azúcar fosfoenolpiruvato-dependiente / actividad	9183	5.74	13071	6.20

## IV Resultados y discusión

				postadora de azucar				
117	Ribonucleasa III	MYPE36 50	Q8EW40	Procesamiento de RNA/ unión a RNA, actividad ribonucleasa III	28674	9.26	32470	NP
118	RNA polimerase DNA-dirigida cadena alfa	MYPE99 20	Q8EUD7	Transcripción/ unión a DNA , actividad polimerasa de RNA DNA-dirigida	37308	7.71	43124	7.47
119*	RNA polimerase DNA-dirigida subunidad rpo 147	MYPE41 50	Q8EVZ2	Transcripción/ unión a DNA , actividad polimerasa de RNA DNA-dirigida	30137	6.55	28280	6.21
120	RNA polimerasa factor sigma	MYPE83 60	Q8EUT4	Regulación de la transcripción, DNA- dependiente/ Actividad de factor sigma.	49114	6.61	47847	6.58
120b							47229	6.28
120c							47107	6.02
120d							36483	7.25
121*	Proteína de procesado de rRNA RimM	MYPE92 50	Q8EUK0	Procesamiento de rRNA/ unión a ribosoma / ribosoma	22192	8.81	24398	8.81
122*	RNA helicasa	MYPE15 0	Q8EX35	unión a RNA, actividad RNA helicasa	61181	8.62	46185	6.21
123	Factor de elongación de la transcripción GreA	MYPE36 70	Q8EW38	Actividad de factor de elongación de la traducción	18112	6.85	21781	6.96
124	Represor del operón Pirimidina	MYPE79 00	Q8EUX8	Regulación de la transcripción, DNA- dependiente/ Actividad transferasa, transferencia de grupos glicosil	19779	5.97	23467	6.46
125	Factor antiterminación de la transcription	MYPE88 40	Q8EUN7	Regulación de la transcripción, DNA- dependiente / Actividad reguladora de la elongación transcripcional	39640	4.53	47944	4.37
126*	Factor de transcripción	MYPE43 40	Q8EVX5	Regulación de la transcripción, DNA- dependiente / Actividad de factor de transcripción	54441	9.21	66580	NP
127	Transportador ABC. Proteína de unión a ATP	MYPE74 50	Q8EV22	Transporte/ unión a ATP / membrana	28067	5.26	30884	5.21
128 +*	Transportador ABC	MYPE59 00	Q8EVH4	Transporte/ unión a ATP / membrana	63660	5.59	63040	5.01
129	Transportador de cobalto. Proteína de unión a ATP	MYPE97 70	Q8EUF1	Transporte de cobalto/ unión a ATP / membrana	32329	6.16	36838	6.31
130	Transportador ABC de azúcar. Proteína de unión a ATP	MYPE58 90	Q8EVH5	Transporte/ unión a ATP / membrana	71330	9.28	74270	NP
131	Transportador de glutamina.	MYPE55	Q8EVK6	Transporte/ unión a ATP /	51221	9.59	49428	NP

## IV Resultados y discusión

	Proteína de unión a ATP	70			membrana				
132*	Transportador ABC regulado por hierro	MYPE74 10	Q8EV26		Transporte/ unión a ATP y iones metal / membrana	52591	6.08	56412	6.53
133	Sistema enzima I PTS	MYPE54 50	Q8EVL8		Transporte, sistema de fosfotransferasa de azúcar fosfoenolpiruvato-dependiente / Actividad portadora de azúcar	64476	5.77	64503	6.10
134	Proteína hipotética	MYPE20 40	Q8EWJ9		Sin anotación	24746	5.84	25882	6.08
134b								26908	6.69
135	6-fosfofructokinasa	MYPE59 20	Q8EVH2		Glicolisis / actividad kinasa	35960	7.59	39792	7.54
136	Proteína hipotética	MYPE19 70	Q8EWK6		Sin anotación	11078	8.71	13218	8.72
137	DNA girasa subunidad A	MYPE40	Q8EX46		Cambio topológico de DNA, Desenrollamiento del DNA durante la replicación/, Actividad DNA topoisomerasa	93375	8.90	96154	NP
138	Proteína Ribosomal L1	MYPE26 0	Q8EX24		Unión a RNA / complejo ribonucleoproteína	36869	10.23	46878	NP
139	Transportador ABC. Proteína de unión a ATP	MYPE10 280	Q8EUA3		Transporte/ Unión a ATP / membrana	32330	9.72	36530	NP
140	Proteína Ribosomal L6	MYPE10 020	Q8EUC8		Unión a RNA / complejo ribonucleoproteína	19431	9.94	25696	NP
141	Proteasa intracelular	MYPE70 0	Q8EWY0		Actividad peptidasa	21561	9.14	22637	NP
142	Oxidoreductasa-aldo/ceto reductasa	MYPE47 20	Q8EVT8		Actividad oxidoreductasa	34138	7.16	24731	NP
143	Timidina fosforilasa	MYPE10 50	Q8EWU6		Metabolismo de bases de pirimidina	48927	8.52	51313	8.27
144	ATPasa	MYPE58 00	Q8EVI4		Transporte/ Unión a ATP	37900	9.14	54908	8.08
145	Proteína hipotética	MYPE28 0	Q8EX22		Sin anotación	18034	6.21	18248	6.22
146	Alcohol deshidrogenada dependiente de NADP	MYPE52 30	Q8EVN7		Unión a zinc, actividad oxidoreductasa	40167	8.16	47474	8.13
147	arginil tRNA sintetasa	MYPE61 20	Q8EVF2		Biosíntesis de proteínas / unión a ATP, actividad ligasa, actividad tRNA ligasa	64975	8.38	61657	8.37
148	transcetolasa	MYPE77 0	Q8EWX3		Actividad transketolasa	74212	8.78	80000	8.91
149	aminopeptidasa	MYPE99	Q8EUD9		Actividad aminopeptidasa	60364	9.16	57181	8.92

C	00								
150	Proteína de división celular FtsH	MYPE10250	Q8EUA6	División celular	90338	9.26	51013	8.85	
151	oxidoreductasa	MYPE4810	Q8EVS8	Actividad oxidoreductasa	33565	8.46	36707	8.64	
152	Timidilato sintasa	MYPE6870	Q8EV81	Biosíntesis de nucleótidos / Actividad metiltransferasa	33869	8.50	34918	8.57	
153	Proteína hipotética	MYPE2440	Q8EWG2	Sin anotación	38872	6.14	39447	5.02	

NP : No predicho;

\* Función predicha;

+ proteína fosforilada

## IV.2 Masa molecular y punto isoeléctrico de las proteínas identificadas

Los pesos moleculares y puntos isoeléctricos fueron determinados experimentalmente y comparados con los valores teóricos deducidos a partir de la secuencia génica. La mayoría de valores experimentales encajan bastante bien con los teóricos. Los valores más bajos de peso molecular podrían deberse a procesamiento post-traducciona l o bien a proteólisis, mientras que los valores más altos de los teóricos podrían ser el resultado de la unión covalente de grupos químicos. Hay casos donde la diferencia observada es muy elevada. En el caso de la Proteína de división celular FtsZ (spot 19), observamos una masa de 87KDa, mientras que la teórica es de 52KDa. La ATP sintasa subunidad  $\beta$  (spots 69) experimenta un aumento de 20KDa en su peso molecular. Otras proteínas que sufren una importante modificación de su peso molecular son la Serin proteasa, tipo subtilisina (spot 81), que tiene una masa teórica de 127KDa, mientras que la observada es de 31KDa. La Proteína de autotransporte/adhesión (spot 8) tiene una masa teórica de 126KDa mientras que la observada es de 36KDa. La misma modificación es observada en la Iniciador de replicación cromosomal (spot 36) que pierde 35KDa de su peso molecular. Estos fragmentos de estas proteínas podrían ser fragmentos estables debidos a proteólisis limitada, pero no ha sido posible encontrar las formas de estas proteínas con los pesos moleculares teóricos.

### **IV.3 Múltiples spots**

Se han encontrado 26 proteínas que aparecen como múltiples especies electroforéticas, como se muestra en la Tabla IV.2.

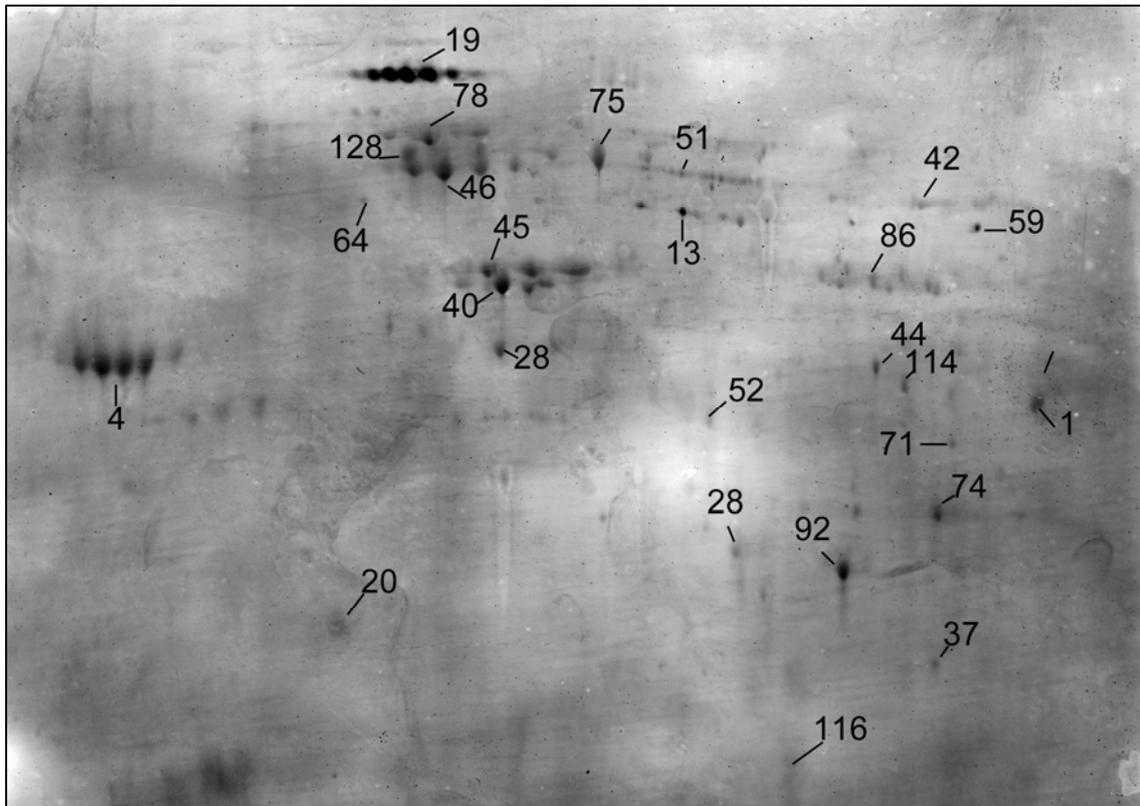
La mayoría de esta heterogeneidad es debida principalmente a modificaciones en el punto isoeléctrico, pero también se observan variaciones en la masa, como se ha comentado anteriormente, o modificaciones que son combinaciones de punto isoeléctrico y masa. Este grupo de proteínas no se están incluyendo las proteínas que aparecen como una fila de spots como la GroEL o la DnaK. En el caso de la GroEL, aparte de aparecer como una fila de spots, también se encuentra una forma de 36KDa. Se ha descrito en otros proteomas la presencia de pequeños homólogos de la groEL [51]. La Lipoproteína P35, el Factor de elongación Tu, la Carbamato quinasa (spot 49), la RNA polimerasa factor sigma (spot 120) y la Carboximuconolactona decarboxilasa (spot 71) aparecen con más de cuatro isoformas. Estas formas probablemente representen fragmentos estables o son el resultado de diferentes modificaciones post-traduccionales, pero no es posible explicar la existencia de estas formas a partir del análisis de espectrometría de masas. La Dihidroxiacetona quinasa (spot 66) es un enzima implicado en la utilización del glicerol. Este enzima actúa como un homodímero y en este análisis se detecta una forma con el doble del peso molecular, esto sugiere que este spot corresponde al homodímero.

### **IV.4 Identificación de proteínas fosforiladas**

Se ha usado la nueva tecnología de tinción específica de fosfoproteínas con Pro-Q<sup>TM</sup> Diamond para la detección específica de fosfoproteínas directamente en los geles bidimensionales. Usando esta tecnología se han podido detectar 26 proteínas diferentes que estarían fosforiladas (Tabla IV.2, proteínas marcadas con el símbolo +). Esto representa el 20% del total de proteínas identificadas en este análisis. Todas estas proteínas provienen de geles bidimensionales realizados con el gradiente de pH de 4 a 7.

La aparición de líneas de spots del mismo peso molecular puede ser indicativa de modificaciones post-traduccionales. Se ha descrito que las proteínas DnaK y Factor de elongación Tu están fosforiladas [71] en *E. coli* y en nuestro análisis estas dos proteínas están fosforiladas y aparecen como una línea de spots en el proteoma de *M. penetrans*.

Recientemente se ha descrito que la unión de lípidos a las proteínas podría



**Fig. IV.4** Mapa bidimensional de las proteínas de *Mycoplasma penetrans*. Extracto total de proteínas separadas en una tira IPG de 24 cm con un gradiente de pH de 4-7, seguido de una electroforesis vertical SDS-PAGE de 12,5% de poliacrilamida (25x20 cm) y teñida posteriormente con Pro-Q™ Diamond

cambiar su punto isoeléctrico, como por ejemplo en la proteína groEL de *E. coli* [72]. En nuestro análisis de proteínas fosforiladas, encontramos que la groEL aparece como una línea de spots, pero solo dos spots de la línea aparecen fosforilados. Por lo tanto los spots adicionales de la línea de spots podrían deber su presencia a la unión de lípidos.

Se observa, como se ha indicado anteriormente, un claro evento de proteólisis limitada en la proteína de citoesqueleto homologa a HMW2. Sólo las tres formas proteolizadas aparecen fosforiladas, mientras que la proteína intacta no

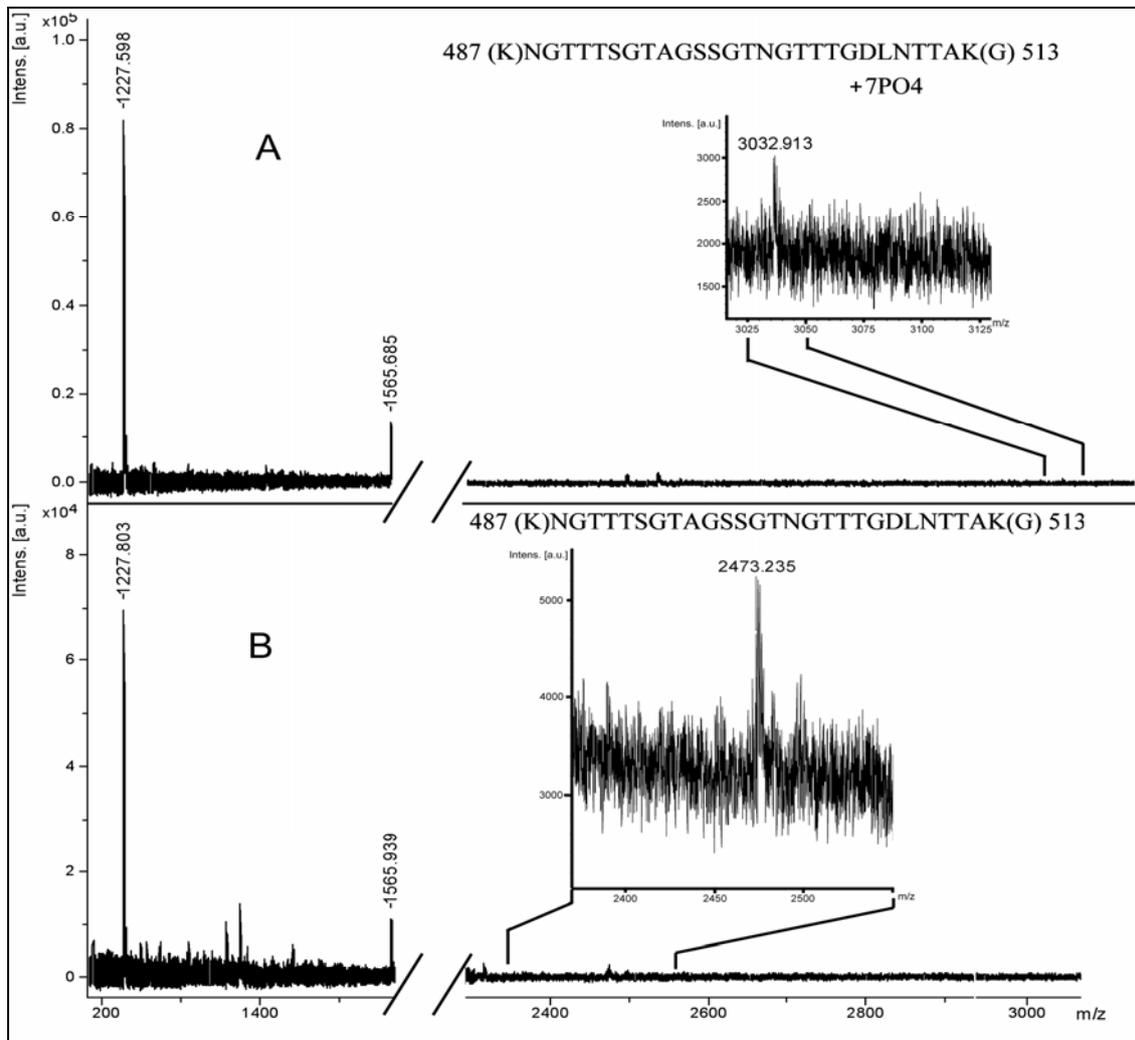
está fosforilada. Esta fosforilación podría ser la señal indicadora de que tenga lugar la proteólisis.

Este organismo, como los mollicutes, en general, tiene un número muy pequeño de proteínas reguladoras [9]. En este análisis se ha identificado la proteína clave en la regulación del metabolismo del carbono, la proteína HPr (spot 116). Esta proteína es un componente del sistema dependiente de fosfoenolpiruvato de transporte de azúcares (PTS). La actividad de la proteína HPr viene regulada por fosforilación. En ausencia de glucosa, la HPr es presente, ya sea no fosforilada o fosforilada en la histidina 15. Si la glucosa deja de estar disponible, la HPr es fosforilada en la serina 46 o incluso doblemente fosforilada en la serina 46 y en la histidina 15 [73]. En este análisis esta proteína aparece fosforilada, lo cual está de acuerdo con la regulación del metabolismo del carbono en otros micoplasmas. Algunas proteínas detectadas como fosforiladas pertenecen al metabolismo energético, incluyendo las tres subunidades de la Piruvato deshidrogenada. En un organismo con muy pocas proteínas reguladoras, esto sugiere que las rutas metabólicas de este organismo están altamente reguladas.

Para caracterizar el sitio específico de fosforilación en una proteína identificada con la tecnología de tinción específica de fosfoproteínas con Pro-Q™ Diamond, se llevó a cabo la defosforilación con Fosfatasa alcalina, combinada con el mapeado diferencial de la huella peptídica por MALDI-TOF.

El uso de la matriz 2,5-DHB con ácido fosfórico como aditivo ha sido demostrado que realza la abundancia relativa de los péptidos fosforilados en presencia de péptidos no-fosforilados en espectrometría de masas MALDI-TOF [59]. Para determinar el sitio específico de fosforilación de una proteína, se recortó un spot teñido con la tinción específica de fosfoproteínas. De este spot se pudo determinar que estaba compuesto por una mezcla de dos proteínas, un transportador ABC (MYPE5900) y la chaperona DnaK (spots 128 y 78 respectivamente). La figura IV.5 muestra los espectros obtenidos por espectrometría de masas MALDI-TOF antes y después del tratamiento con fosfatasa alcalina. El péptido heptafosforilado del transportador ABC, 487(K)NGTTTSGTAGSSGTNGTTTGDNLNTTAK(G)513 (m/z 3032.9) desaparece del espectro de masas después del tratamiento con Fosfatasa

alcalina. El espectro obtenido después del tratamiento de defosforilación muestra un nuevo pico, no presente en el espectro control, que corresponde a la pérdida de siete ( $m/z$  2473.2) grupos fosfato. Algunos nuevos péptidos, correspondientes a péptidos no fosforilados del transportador ABC, aparecen en el espectro de masas después de tratamiento con Fosfatasa alcalina, lo que sugiere la presencia de más fosfopéptidos en la muestra.

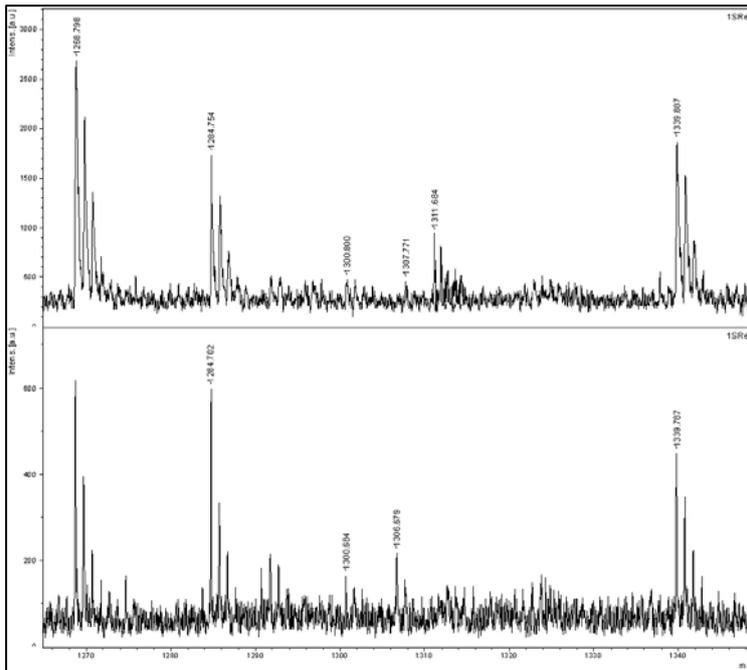


**Fig. IV.5** Detalle del espectro de masas obtenido de un spot teñido con Pro-Q® Diamond. Este spot fue identificado como una mezcla de un transportador ABC (MYPE5900) y la chaperona dnaK. (A) Espectro obtenido con 2,5-DHB como matriz antes del tratamiento con fosfatasa alcalina. (B) Espectro de la misma muestra después del tratamiento con fosfatasa alcalina. La señal que corresponde al péptido fosforilado del transportador ABC en (A) (3032.913 Da) disminuye en 559.72 Da después de la defosforilación, y aparece el péptido defosforilado (2473.235 Da) (B).

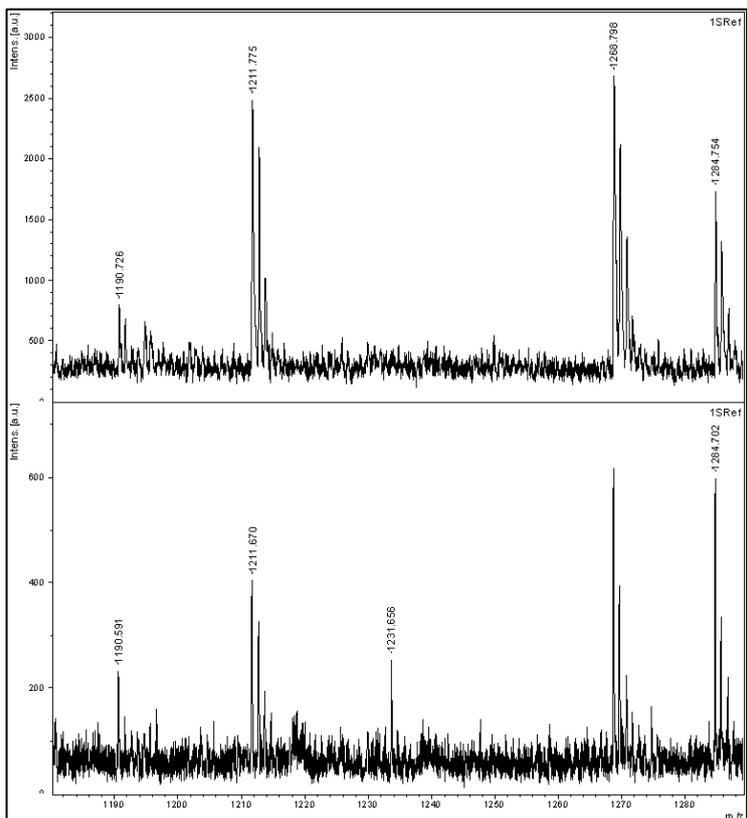
Para el Factor de elongación Tu se realizó el mismo procedimiento para determinar el sitio específico de fosforilación. En *Escherichia coli* y *Thermus thermophilus* se determinó que el sitio de fosforilación era la treonina 382 [71]. Esta modificación impide la capacidad de unión a aa-tRNA de esta proteína.

## IV Resultados y discusión

Antes del tratamiento de defosforilación, se detectó un péptido del Factor de elongación Tu fosforilado de masa 1311.61 (378(R)EGGRTVGAGTVTK(V)392). Después del tratamiento con Fosfatasa alcalina el péptido de masa 1311.61 desaparece mientras que aparece un péptido de 1231.65 Da correspondiente al péptido 378(R)EGGRTVGAGTVTK(V)392 con la pérdida de un grupo fosfato.



**Fig IV.6** Detalle del espectro obtenido del Factor de elongación Tu antes (superior) y después (inferior) del tratamiento con Fosfatasa alcalina. En el espectro inferior se observa la desaparición del péptido fosforilado con masa 1311.68 Da



**Fig IV.7** Detalle del espectro obtenido del Factor de elongación Tu antes (superior) y después (inferior) del tratamiento con Fosfatasa alcalina. En el espectro inferior se observa la aparición del péptido defosforilado con masa 1231.68 Da



## Capítulo 2

### Resultados y discusión

#### V.1 Identificación de proteínas previamente no encontradas de *Mycoplasma genitalium*

*Mycoplasma genitalium* es el agente etiológico de la uretritis no-gonococcal en hombres y de cervicitis en mujeres, así como también está asociado a otras enfermedades genitales [13]. Aparte, también ha sido localizado en líquido sinovial [74], en el recto [13], tracto respiratorio [75], y también ha sido descrito como posible causante de conjuntivitis [76]. Este organismo es el miembro más pequeño de la clase *mollicutes*, con un genoma de 580 Kb de tamaño [9]. Se ha estimado que *M. genitalium* tiene la capacidad de codificar aproximadamente 485 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 [1]. El contacto íntimo con la célula huésped se consigue gracias a la expresión de proteínas de citoadherencia y de la falta de una pared celular [77]. Así pues 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 y no hay evidencia experimental de la existencia de algunos de ellos [16]. La anotación de los genomas de micoplasmas secuenciados asigna una función a un 50 o 70% de los ORF, y como se ha comentado anteriormente, los ORF a los cuales no se les pueden asignar ninguna función, son los más interesantes, ya que son potenciales candidatos a tener nuevas funciones. La electroforesis bidimensional en combinación con la espectrometría de masas (MALDI-TOF) ha sido usada para analizar este micoplasma en fase crecimiento estacionaria final, cercana a la muerte del cultivo, ya que el proteoma previamente publicado es un análisis del proteoma de este microorganismo en fase de crecimiento exponencial [51].

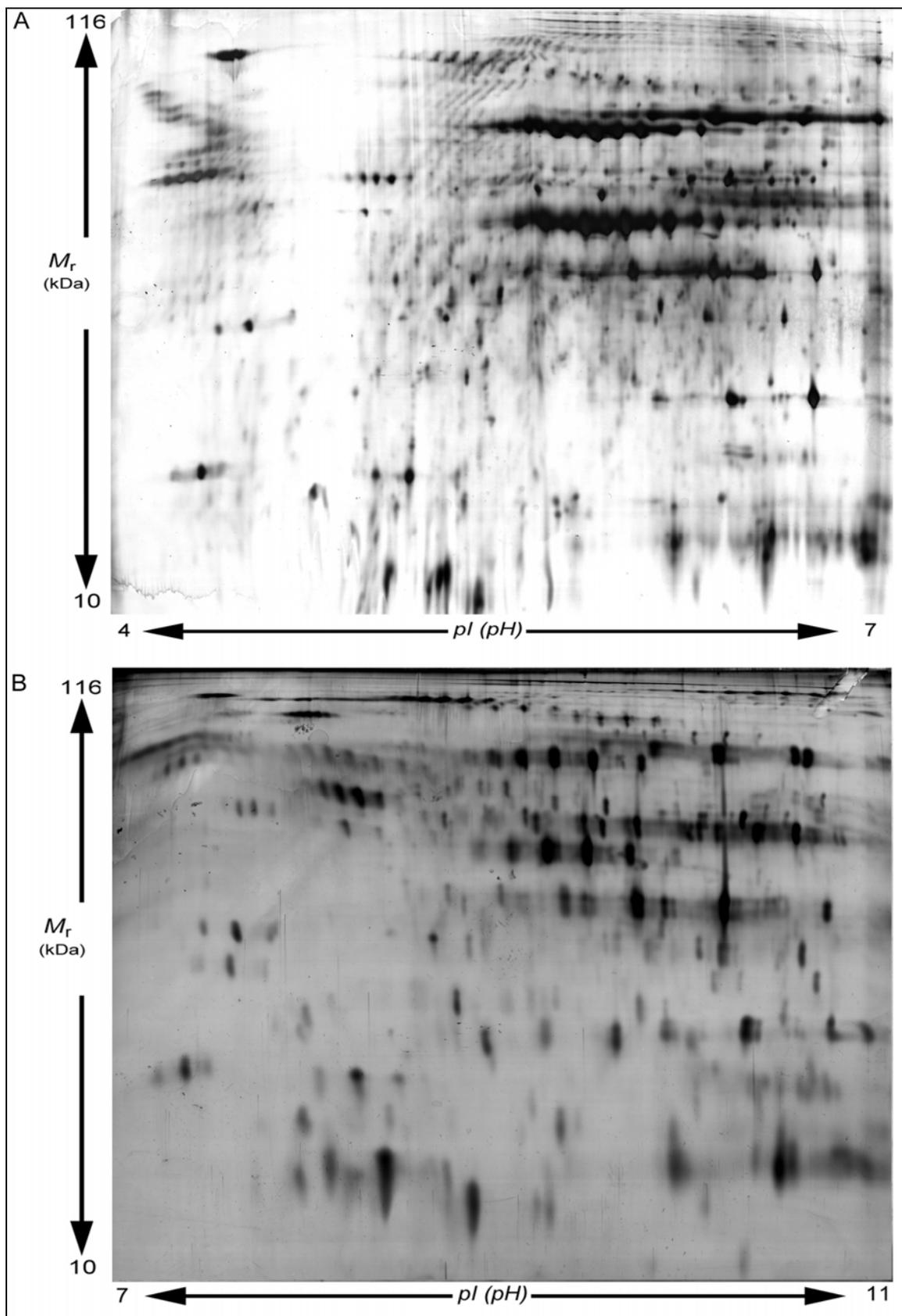


Fig. V.1 A. Mapa bidimensional de las proteínas de *Mycoplasma genitalium* en fase de crecimiento estacionaria final. B. Mapa bidimensional de las proteínas de *Mycoplasma genitalium* en fase de crecimiento exponencial. Ambos mapas so del extracto total de proteínas separadas en una tira IPG de 24 cm con un gradiente de pH de 4-7.

La electroforesis bidimensional proporciona una imagen del proteoma en unas condiciones muy determinadas [37]. Al cambiar las condiciones el proteoma varía. Debido a las diferencias observadas entre los dos estados de crecimiento (Figura V.1), no sólo de presencia o ausencia de proteínas, si no también de aparición de isoformas, se decidió que para obtener una imagen lo más resolutive posible del proteoma, en comparación de los gradientes anchos de pH, se debían usar gradientes estrechos de pH (3.5-4.5, 4-5, 4.5-5.5, 5.5-6.7, 6.2-7.5) de la mayor longitud posible disponible en el mercado (24cm). El hecho de escoger tales gradientes permite, 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 localizar con mayor facilidad modificaciones post-traduccionales [78]. Una de los puntos fuertes de la electroforesis bidimensional es la capacidad de localizar modificaciones post-traduccionales, ya que frecuentemente, aparecen como distintas columnas de spots, ya sea en el eje vertical, horizontal o una combinación de ambos [28]. El análisis anterior del proteoma de este micoplasma se realizó con un gradiente de pH de 2.3 a 12 en cuatro ventanas (2.3-5.0, 4-7, 6-11 y 8.5-12), permitiendo la identificación de 112 proteínas distintas [51].

El hecho de utilizar gradientes de pH estrechos y de realizar este análisis en otro punto del crecimiento de este organismo permitió identificar 91 proteínas distintas de las cuales 57 no habían sido localizadas previamente mediante la tecnología de electroforesis bidimensional (Tabla V.1). Como contrapunto, es necesario decir también que el hecho de realizar el análisis en este punto del crecimiento ha hecho que se dejaran de ver otras proteínas que se hubieran localizado si el análisis se hubiera hecho en la fase exponencial del crecimiento. El uso de gradientes de pH estrechos comporta una dificultad añadida. Si bien la técnica de electroforesis bidimensional es muy sensible a pequeñas variaciones en su realización, esto es doblemente válido con los rangos estrechos de pH. Los geles obtenidos con rangos de pH estrecho son de muy difícil repetitividad, y se suelen obtener imágenes difíciles de interpretar, por lo que en la mayoría de casos ha sido necesario realizar muchas réplicas para asegurar la presencia de los spots.

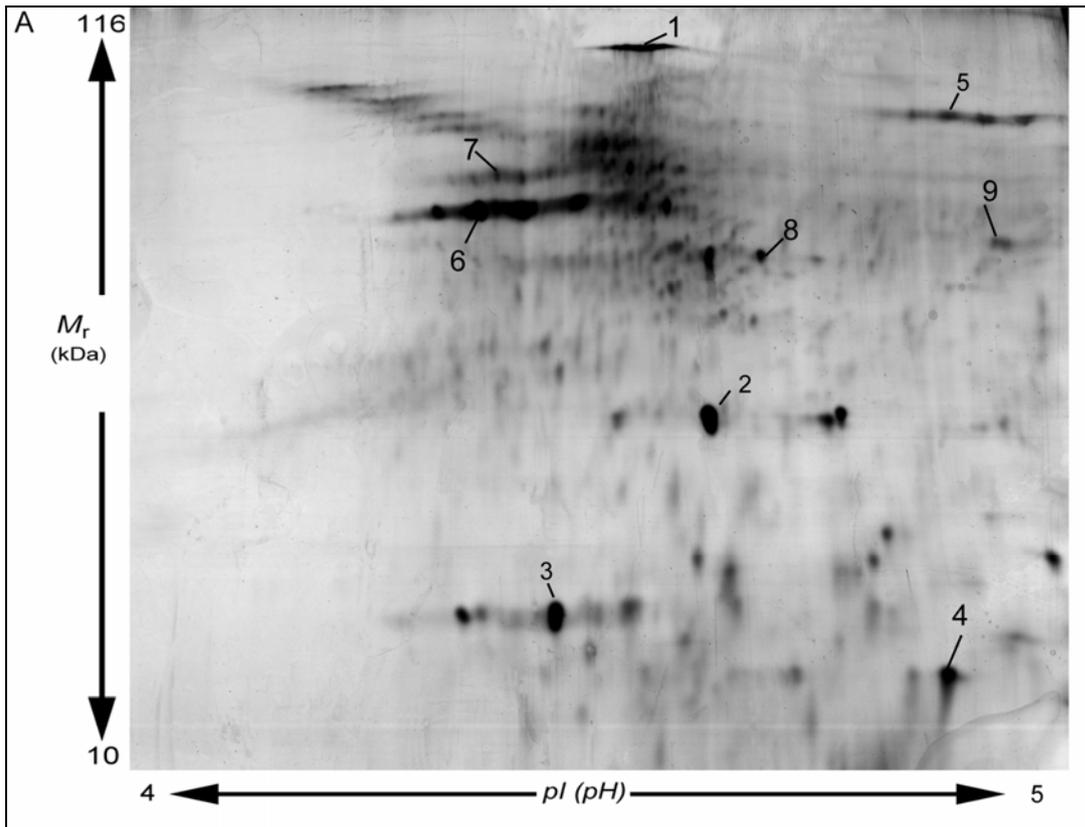


Fig. V.2 Mapa bidimensional de las proteínas de *Mycoplasma genitalium* en fase de crecimiento estacionaria final, en un rango de pH de 4 a 5.

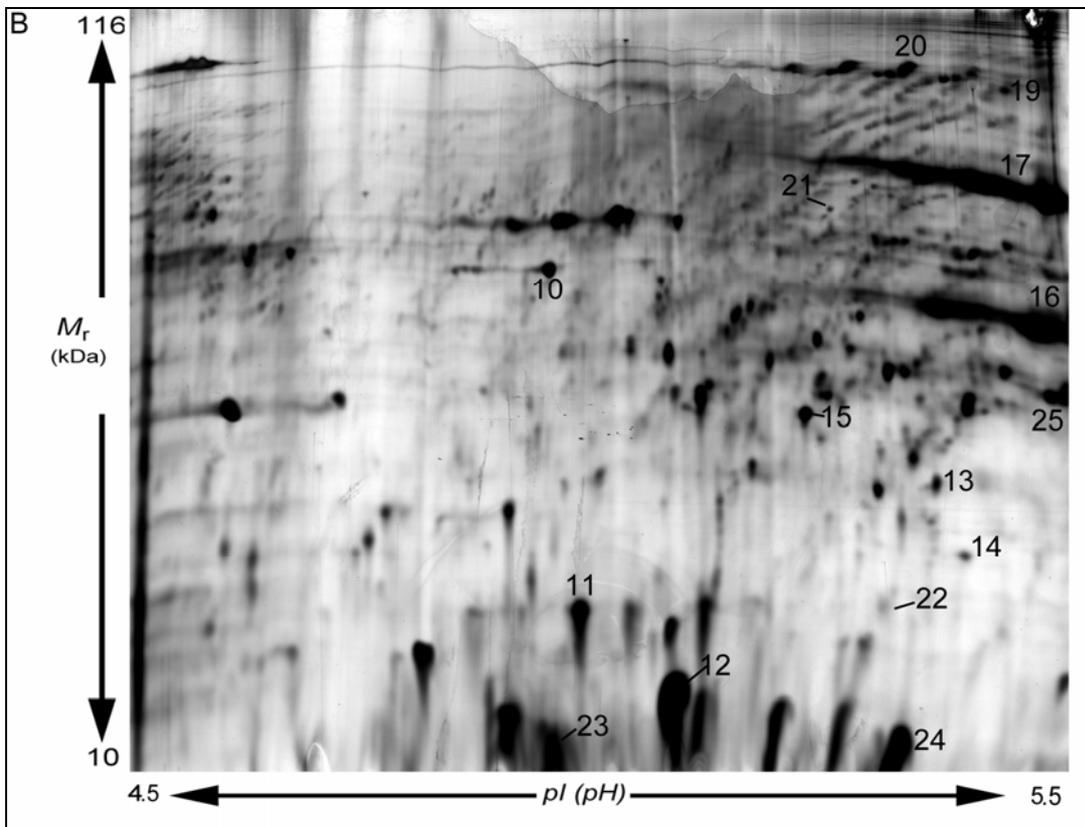


Fig. V.3 Mapa bidimensional de las proteínas de *Mycoplasma genitalium* en fase de crecimiento estacionaria final, en un rango de pH de 4.5 a 5.5

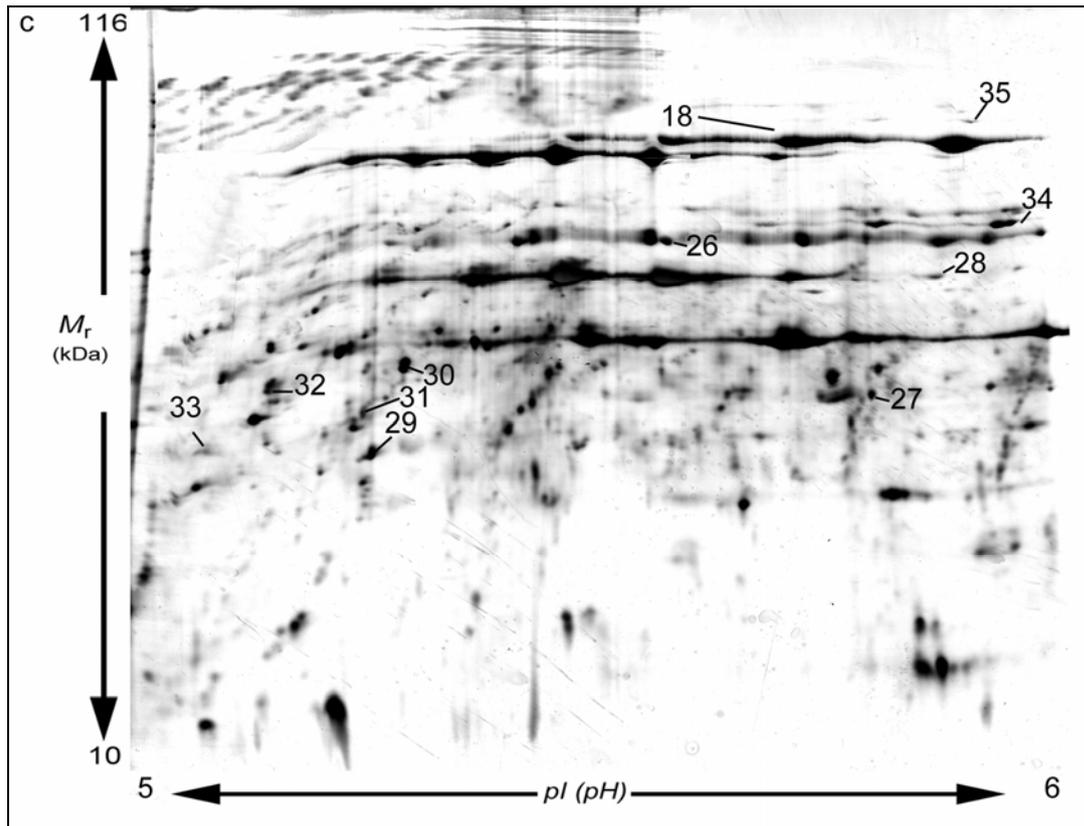


Fig. V.4 Mapa bidimensional de las proteínas de *Mycoplasma genitalium* en fase de crecimiento estacionaria final, en un rango de pH de 5 a 6.

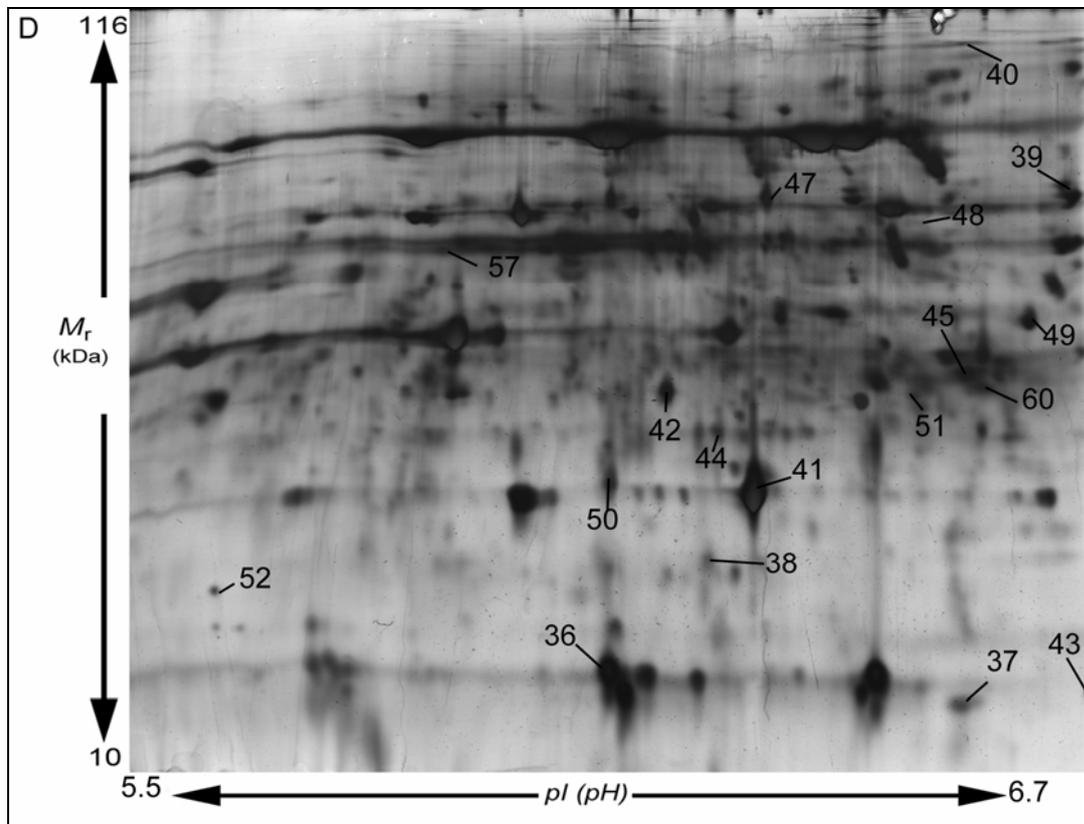


Fig. V.5 Mapa bidimensional de las proteínas de *Mycoplasma genitalium* en fase de crecimiento estacionaria final, en un rango de pH de 5.5 a 6.7.

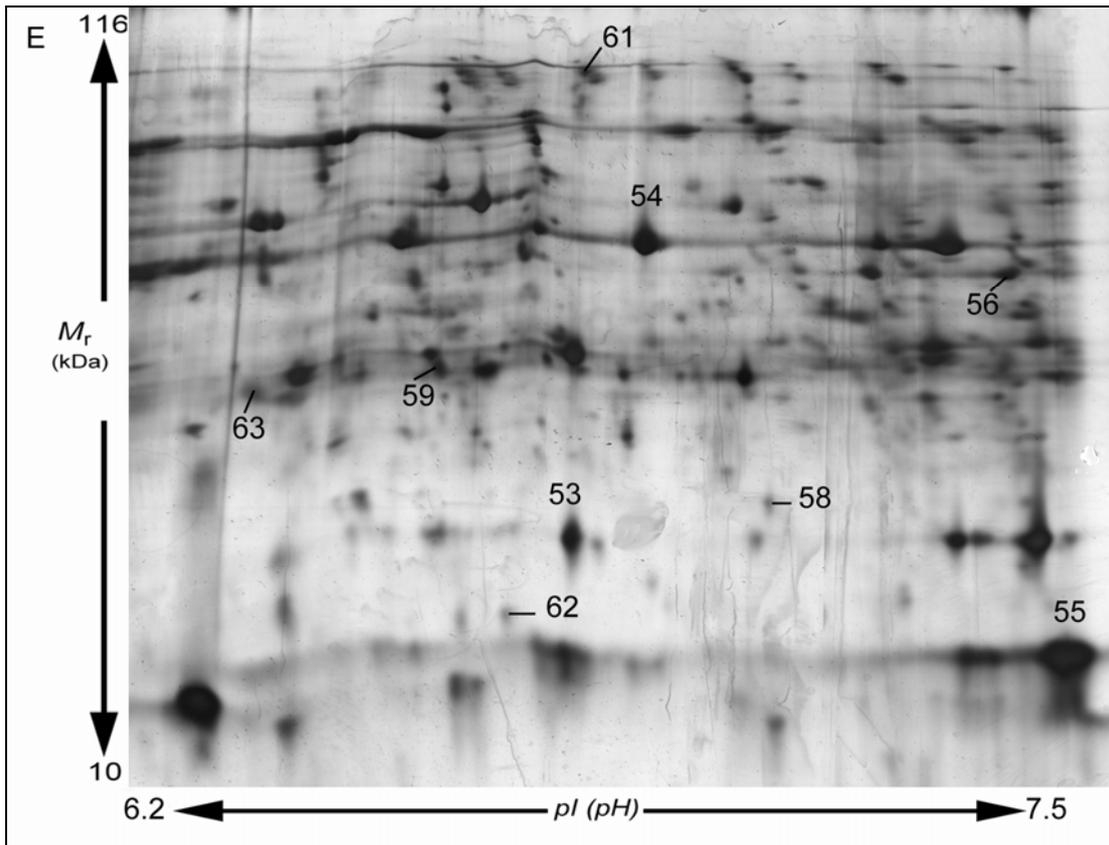


Fig. V.6 Mapa bidimensional de las proteínas de *Mycoplasma genitalium* en fase de crecimiento estacionaria final, en un rango de pH de 6.2 a 7.5

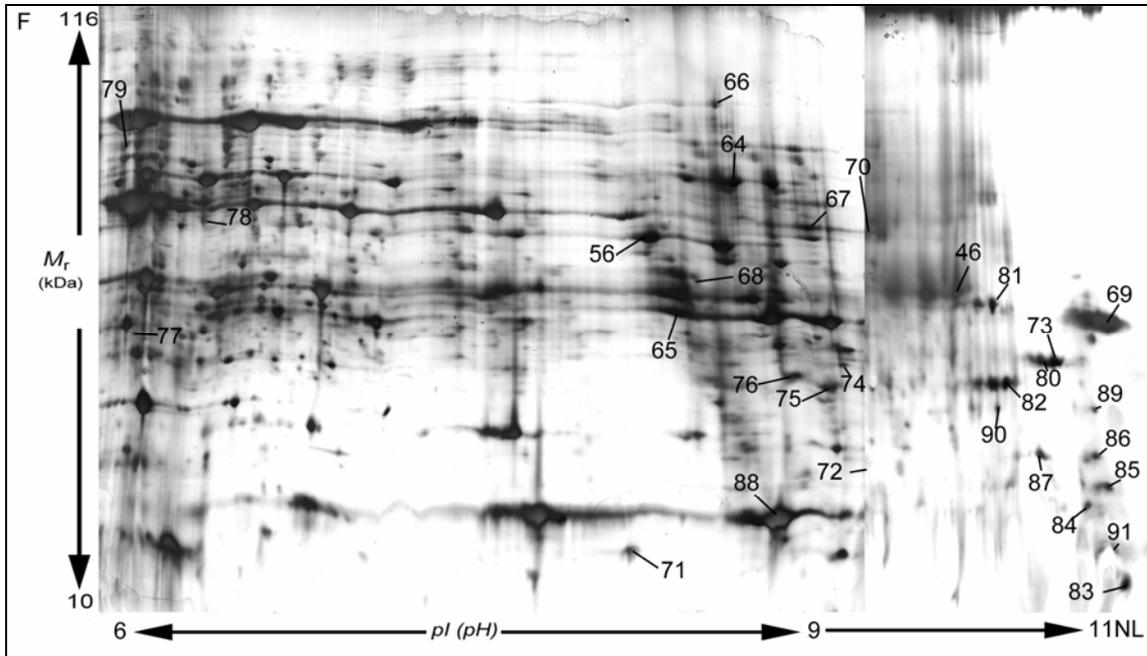


Fig. V.7 Montaje de dos mapas bidimensionales de las proteínas de *Mycoplasma genitalium* en fase de crecimiento estacionaria final, en un rango de pH de 6.a 9 y de 7 a 11NL

**Tabla V.1 Proteínas identificadas**

Spot	Proteína	Número MG	Número de acceso	Clasificación funcional**	Mr teórica (Da)	pl teórico (pH)	pl Experi. m. (Da)	Mr Experi. (pH)
1*	Proteína V	MG328	Q49419	Recubrimiento celular	88354	4.61	4.41	117070
2*	Lipoproteína de membrana homóloga a tmpC	MG040	D64204	Recubrimiento celular	63980	8.48	4.49	31361
3	RNA polimerasa dirigida por DNA cadena delta	MG022	Q49195	Transcripción	17046	4.48	4.31	21894
4*#	Holo-(acil-carrier proteína) sintasa	MG211	C64223	Biosíntesis de cofactores	17460	4.91	4.75	20574
5	Chaperona dnaJ	MG200	A64222	Destino protéico	68495	4.86	5.12	88248
6*	Endo-1,4-beta-xilanasas bifuncional/ Proteína P65 rica en prolina	MG217	P47459	Recubrimiento celular	44637	4.59	4.34	53453
7*	Proteína accesoria de citoadherencia (hmw1)	MG312	Q49413	Recubrimiento celular	130452	4.07	4.22	55473
8*	Transportador ABC	MG045	I64204	Transporte y unión de proteínas	54842	4.91	4.58	48557
9*	Proteína hipotética conservada	MG218.1	AAC71439	Proteínas conservadas	39550	4.96	5.01	53048
10*	Lipoproteína MG338	MG338	D64237	Recubrimiento celular	142406	7.13	4.95	47370
11*	Factor de elongación de la transcripción greA	MG282	B64231	Transcripción	18151	4.99	4.99	21770
12	Proteína ribosomal L7/L12 (Tipo 'A')	MG362	A64240	Síntesis de proteínas	13052	5.02	5.05	12007
13	Piruvato deshidrogenasa cadena E1-beta	MG273	B64230	Metabolismo energético	36003	6.04	5.45	28352
14*	ATP sintasa F0 cadena B	MG403	F64244	Metabolismo energético	24587	6.78	5.57	26048
15*	Factor de elongación de la traducción EF-P	MG026	H64202	Síntesis de proteínas	21900	5.15	5.29	32342
16	Piruvato deshidrogenasa cadena E1-alfa	MG274	C64230	Metabolismo energético	40625	5.55	5.69	45387
17	Chaperona groEL	MG392	D64243	Destino protéico	58318	5.82	5.61	65118
18	Chaperona dnaK	MG305	G64233	Destino protéico	65010	6.79	6.27	69437
19	Proteína accesoria de citoadherencia (hmw2)	MG218	A64224	Recubrimiento celular	216122	8.62	5.61	96482
20*	Proteína de adhesión P110	MG192	C64221	Recubrimiento celular	114291	7.60	5.41	120341
21*#	Transportador tipo RND	MG281	A64231	Transporte y unión de proteínas	62125	6.59	5.33	55950
22*	Proteína mraZ	MG221	NP_072887	Procesos celulares	16296	5.47	5.33	17287
23*#	Glutamato deshidrogenasa	MG202	C64222	Biosíntesis de aminoácidos	13505	5.18	4.94	10068
24	Tioredoxina	MG124	G64213	Metabolismo energético	11491	5.32	5.71	9585
25	ATPasa F1	MG399	B64244	Metabolismo	42095	5.59	5.75	38190

26*	cadena beta Lipoproteína MG260	MG260	G64228	energético Recubrimiento celular	84321	8.64	5.91	50201
27	Factor de elongación de la traducción EF-Tu	MG451	P13927	Síntesis de proteínas	42963	6.18	6.51	35014
28*	Lipoproteína MG309	MG309	B64234	Recubrimiento celular	138292	8.85	6.53	45172
29*#	Iniciador de la replicación cromosomal	MG349	F64238	Procesos celulares	47744	6.00	5.66	30837
30*	Lipoproteína MG321	MG321	E64235	Recubrimiento celular	102937	6.48	5.73	34940
31	Proteína de segregación y condensación B	MG214	F64223	Procesos celulares	23329	9.05	5.64	31967
32*	Proteína de unión a ATP	MG140	Q49204	Metabolismo de DNA	11807	5.16	5.51	36030
33	Transportador ABC de fosfato	MG410	NP_0730 83	Transporte y proteínas de unión	23832	8.48	5.45	33956
34	Fosfopiruvato hidratasa	MG407	A64245	Metabolismo energético	49988	6.63	6.56	55000
35	DNA girasa cadena B	MG003	C64200	Metabolismo de DNA	73560	5.93	6.66	81295
36*	Proteína tipo OmsC	MG427	B64247	Procesos celulares	15593	6.19	6.58	15351
37	Chaperona groES	MG393	E64243	Destino protéico	12021	7.88	7.00	13220
38*	Peptido metionina sulfoxido reductasa	MG408	B64245	Funciones reguladoras	18403	6.18	6.68	23646
39	ATPasa F1 cadena alfa	MG401	D64244	Metabolismo energético	57180	6.70	6.97	50296
40*	Proteína de adhesión P140	MG191	A30588	Recubrimiento celular	159553	8.99	6.58	145271
41*#	Proteína de división celular fstH	MG377	G64241	Procesos celulares	22635	6.24	6.76	26085
42*	Hidrolasa tipo Cof	MG265	C64229	Purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos	31844	6.23	6.64	32410
43*	Galactosido O- acetiltransferasa	MG396	H64243	Metabolismo energético	16883	6.90	6.99	13945
44	Triosa-fosfato isomerasa	MG431	F64247	Metabolismo energético	27327	6.32	6.71	29330
45*	Purina nucleosido fosforilasa	MG049	P47295	Purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos	26492	6.97	6.93	37628
46*	Gliceraldehido-3- fosfato deshidrogenasa	MG301	C64233	Metabolismo energético	37075	9.05	NP	NP
47	Fosfoglicerato mutasa	MG430	E64247	Metabolismo energético	56831	6.35	NP	NP
48	DNA helicasa	MG094	D64210	Metabolismo de DNA	51256	6.32	NP	NP
49*	Proteína de división celular ftsH	MG457	E64250	Procesos celulares	76683	9.21	NP	NP
50*	Lipoproteína MG095	MG095	E64210	Recubrimiento celular	44904	8.80	6.58	27176
51	Tioredoxina reductasa	MG102	P47348	Metabolismo energético	34652	6.96	NP	NP
52	Difosfatasa inorgánica	MG351	H64238	Metabolismo central intermediario	21632	5.62	5.93	23496
53*	Fosfodiesterasa	MG333	P47575	Metabolismo central intermediario	22062	7.85	NP	NP
54*	Subunidad hsd S	MG438	D64248	Procesos celulares	44083	7.58	NP	NP
55*	FMN reductasa NADPH	MG342	H64237	Metabolismo central	19116	8.37	NP	NP

## V Resultados y discusión

56*	dependiente Precursor de antígeno de superficie	MG269	G64229	intermediario Recubrimiento celular	39638	8.57	8.10	40487
57	Dihidrolipoamida acetiltransferasa	MG272	P47514	Metabolismo energético	41427	5.88	NP	NP
58*	D-ribulosa-5- fosfato 3 epimerasa	MG112	P47358	Metabolismo energético	24085	6.97	NP	NP
59*	Profil aminopeptidasa	MG020	P47266	Destino protéico	35267	6.75	NP	NP
60*	Fosfato acetiltransferasa	MG299	P47541	Metabolismo central	35447	6.97	NP	NP
61	Proteína accessoria de citoadherencia (hmw3)	MG317	Q57081	intermediario Recubrimiento celular	68679	7.01	NP	NP
62	Factor de elongación de la traducción EF-Ts	MG433	H64247	Síntesis de proteínas	34243	8.56	NP	NP
63	Fructosa- bisfosfato aldolasa	MG023	E64202	Metabolismo energético	31291	7.04	NP	NP
64	Factor disparador	MG238	C64226	Procesos celulares	50899	8.71	8.43	49106
65*	L-lactato deshidrogenasa	MG460	P47698	Metabolismo energético	33945	8.76	8.22	30522
66*	Proteinasa clpB dependiente de ATP	MG355	C64239	Destino protéico	80989	8.66	8.35	67839
67	Aminopeptidasa	MG391	C64243	Destino protéico	49076	8.84	8.71	41999
68*	Lipoato-proteína ligasa A	MG270	H64229	Biosíntesis de cofactores	38919	8.71	8.29	34515
69	Proteína ribosomal S3	MG157	NP_0728 20	Síntesis de proteínas	29836	10.2	NP	NP
70	Fosfoglicerato quinasa	MG300	P47542	Metabolismo energético	22082	7.85	8.97	41281
71*	Proteína osmoticamente inducible osmC	MG454	B64250	Procesos celulares	17365	8.91	8.03	11563
72	Peptidil-tRNA hidrolasa	MG083	B64209	Síntesis de proteínas	21819	9.20	NP	NP
73	Proteína ribosomal L1	MG082	A64209	Síntesis de proteínas	24670	9.75	NP	NP
74*	Regulador SpoOJ	MG470	I64251	Procesos celulares	29949	8.78	8.84	26511
75*	Polifosfato/ATP- NAD quinasa	MG128	B64214	Metabolismo energético	29181	8.66	8.80	25118
76*	Proteína hipotética MG210.1	MG210.1	T09720	Proteínas hipotéticas	25954	8.5	8.66	25860
77	Ribonucleasa III	MG367	F64240	Transcripción	30319	6.48	6.13	28871
78	S-adenosil- metiltransferasa	MG222	E64224	Procesos celulares	35123	9.69	6.31	42181
79*	RNA polimerasa factor sigma	MG249	E64227	Transcripción	57626	7.23	6.10	55146
80*	Proteína ribosomal S6	MG090	I64209	Síntesis de proteínas	24255	9.73	NP	NP
81*	Proteína ribosomal S2	MG070	G64207	Síntesis de proteínas	32726	9.37	NP	NP
82*	Chaperona grpE	MG201	B64222	Destino protéico	24998	9.46	NP	NP
83*	Proteína ribosomal S10	MG150	F64216	Síntesis de proteínas	11954	9.95	NP	NP
84*	Proteína ribosomal L9	MG093	C64210	Síntesis de proteínas	17370	9.87	NP	NP
85	Proteína ribosomal L10	MG361	NP_0730 32	Síntesis de proteínas	30008	10.2	NP	NP
86*	Proteína ribosomal L5	MG163	A64218	Síntesis de proteínas	20437	9.86	NP	NP
87*#	Colina quinasa	MG105	F64211	Metabolismo de ácidos grasos y	22654	9.66	NP	NP

88*	Proteína ribosomal L3	MG151	G64216	fosfolípidos Síntesis de proteínas	28470	9.92	8.59	14325
89*	Factor iniciador de la traducción IF-3	MG196	P47438	Destino protéico	21263	9.94	NP	NP
90*	uracil fosforibosiltransferasa	MG030	C64203	Purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos	22959	9.47	NP	NP
91*	Proteína ribosomal L6	MG166	D64218	Síntesis de proteínas	20510	10.1	NP	NP

NP: No predicho;

\*Proteína previamente no encontrada por electroforesis bidimensional;

# Proteínas cuya función ha sido predicha

\*\* Clasificación funcional adaptada de Riley, M. [68]

De las proteínas encontradas en este análisis es remarcable mencionar que 17 proteínas son de membrana. La elevada presencia de proteínas de membrana en los mapas bidimensionales se debe al uso del detergente ASB-14 en la solución de preparación de la muestra. Este detergente ha sido descrito como un detergente no-iónico muy indicado para la extracción de proteínas de membrana [79].

Un 20% de las proteínas encontradas, pertenecen a la clasificación funcional de metabolismo energético y 6 de ellas no fueron previamente identificadas por 2DE. La elevada presencia de proteínas de metabolismo energético es común en la mayoría de proteomas de microorganismos analizados [51, 52, 80, 81].

Es destacable, también, el elevado número de proteínas pertenecientes a la clasificación funcional de destino protéico. Se han localizado 9 proteínas, entre proteasas y chaperonas.

Entre las proteínas más abundantes se encuentran las chaperonas GroEl (spot 17) y DnaK (spot 18), y una de las subunidades de la Piruvato deshidrogenasa, la cadena E1-alfa (spot 16). Las proteínas de adhesión P110 (spot 20) y P140 (spot 40) también se encuentran altamente expresadas.

Una de las proteínas también abundante, que no fue localizada previamente, es el producto del gen MG438, posible subunidad de un sistema de restricción tipo I. Esta proteína fue expresada, purificada y cristalizada por nuestro grupo en colaboración con el grupo del Dr. I. Fita del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. [82].

1	MKPPDKKPSL	QPIYDIGPDD	GYLQSEYEKN	RSKTDVVKIE	NQLLKEIKSL
51	EDELKKNLGL	KNQAEDNPEL	DKK <b>INHLEVD</b>	<b>LNRLVNEYKN</b>	<b>FQFQK</b> NHMVD
101	KVSELDNLTR	<b>FYKNELTR</b> LQ	QENADFLNSK	<b>YANLANFQAN</b>	<b>YHNK</b> LNDPFR
151	<b>LLENQNOTIN</b>	<b>RLN</b> QKINGNQ	NLIDNNVALL	QNPNTVEKK	NYLLNVLDQL
201	YNELDQLENG	<b>KRLLS</b> TEYEN	<b>TYR</b> ELVSADN	ELQNVYENID	QNQIQPK <b>HQY</b>
251	<b>QTYRDELSQL</b>	<b>ERKI</b> QLTK <b>QE</b>	<b>LVDKESALRV</b>	<b>KIDDADFYIN</b>	<b>ARLAE</b> LDDVA
301	KLQSFQDGT	KQNAQHVEDK	LVALNKEKDR	LNTQ <b>KEAFFN</b>	<b>LRQ</b> SALDIN
351	<b>KLQQNNEIFA</b>	<b>KHLEHQNEF</b>	<b>EQKQ</b> SDSLK	LETEYKALQH	KINEFKNES
401	<b>TKSE</b> LLNQE	RELFEKRR <b>ET</b>	<b>DTLLTQASLE</b>	<b>YEHQ</b> RESSQL	LKDKQNEV <b>KQ</b>
451	<b>HFQN</b> LEYAKK	ELDKERNLLD	QQK <b>KVDSEAI</b>	<b>FOLK</b> EKVAQE	RKELEELYLV
501	KRQKQDQKEN	ELLFFEKQLK	QHQA <b>DFENEL</b>	EAKQ <b>QELFEA</b>	KHALERSFK
551	LEDK <b>EKDLNT</b>	<b>KAQ</b> IANEFS	<b>QLK</b> TDKSKSA	DFELMLQNEY	ENLQ <b>QEKRL</b>
601	<b>FOERT</b> YFERN	AAVLSNRLQQ	KRELLQ <b>QKE</b>	TLDQLTKSFE	QERLINQREH
651	KELVASVEKQ	KEILGKKLQD	FSQTSLNASK	NLAEREMAIK	FKEKELEATE
701	KQLLNDVNNA	EVIQADLAQL	NQSLNQERSE	LQNAKQRIAD	FHNDSLKKLIN
751	EYELSLQKRL	QELQ <b>LEANQ</b>	KQHSYQOQAY	FEGELDKLNR	EKQAFNLNRK
801	KQTM <b>EVDAIK</b>	QRLSDKHQAL	NMQQAELDRK	THELNNAFLN	HDADQKSLQD
851	QLATVK <b>ETQK</b>	LIDLERSALL	EKQREFAENV	AGFKRHWSNK	TSQLQIYEL
901	TKKQ <b>ESQTO</b>	KETELKIAFS	DLQKDYQVFE	LQKQ <b>QEFRQI</b>	EAKQ <b>RELDKL</b>
951	AEKNNQV <b>KLE</b>	LDNRFQALQN	QKQDTVQ <b>QAL</b>	ELER <b>EQHQLN</b>	LEQTAPNQAN
1001	ESLLKQ <b>REQL</b>	TKKI <b>QAFHYE</b>	LKKRNQFLAL	KGKRLFAKEQ	DQQRKQ <b>QEIN</b>
1051	WR <b>FQ</b> FEKEY	TDFDEAKKRE	L <b>ELEK</b> IRRS	LSQSN <b>VELER</b>	KREK <b>LATDFT</b>
1101	<b>NLNK</b> VQHNTQ	INRDQLNSQI	RQFLERKNF	QRF <b>SNEANAK</b>	KAFILKRLRS
1151	FASNLK <b>LQKE</b>	ALAIQKLEPD	KRDEQ <b>QKEL</b>	QOATLQ <b>LEQF</b>	KFEKQ <b>NFDIE</b>
1201	KQRQLV <b>AIKT</b>	QCEKLSDEKK	ALNQKLV <b>ELK</b>	NLSQTYLANK	NKAEYSQ <b>QQL</b>
1251	QKQYTNLLD <b>L</b>	KENLER <b>TKQD</b>	LDK <b>KHRSIFA</b>	RLTKF <b>PANDLR</b>	FEK <b>QLLKAQ</b>
1301	<b>RI</b> VDDKNRLL	KENERNLHFL	SNETERKRAV	LEDQISY <b>FEK</b>	QRKQATD <b>AIL</b>
1351	ASHKEV <b>KKKE</b>	GELQKLL <b>VEL</b>	ETRKT <b>KLNN</b>	FAKFSRQ <b>REE</b>	FENORL <b>KLLE</b>
1401	LQKTLQ <b>TQTN</b>	SNNFK <b>TKAIQ</b>	EIENSYK <b>RG</b> M	EELNFQ <b>KKEF</b>	DNKKSRL <b>Y</b> EY
1451	FRKMRD <b>IER</b>	KESQV <b>KLV</b> LK	ETQ <b>RKANLLE</b>	AQANKLN <b>IEK</b>	NTIDF <b>KEKEL</b>
1501	KAFKDKV <b>DQD</b>	IDS <b>TNKQ</b> RKE	LNELLN <b>ENKL</b>	LQOSL <b>IERER</b>	AIN <b>SKDSL</b> LN
1551	KKI <b>ETIKRQ</b> L	HDKEMR <b>VRL</b> L	VDRMKL <b>AEQK</b>	YQTEIN <b>RLRT</b>	QTFDSEK <b>QDI</b>
1601	KNFP <b>PPLFKI</b>	NGNDMA <b>F</b> PYL	YPWLY <b>PQKQ</b>	DDNTLQ <b>IRQL</b>	FEQQLQ <b>F</b> MQ
1651	RYENEL <b>NELR</b>	RQRNL <b>LEK</b> KL	DQIQLES <b>QLN</b>	NKQSE <b>FSKVE</b>	SMMEK <b>LLEKT</b>
1701	ESRLND <b>PDQK</b>	INYLTK <b>V</b> QNG	HNTYQ <b>SSYQ</b>	PTPSYQ <b>SDSK</b>	QQLLF <b>RIQEL</b>
1751	EKQNL <b>FQQQF</b>	QPAPAV <b>VQ</b> QP	TSFAAP <b>NITK</b>	QQQIA <b>LNAE</b>	INN <b>IKR</b> LIAQ
1801	KAASK				

Fig. V.8 Secuencia de la proteína HMW2 de *Mycoplasma genitalium*. Subrayados, los péptidos identificados.

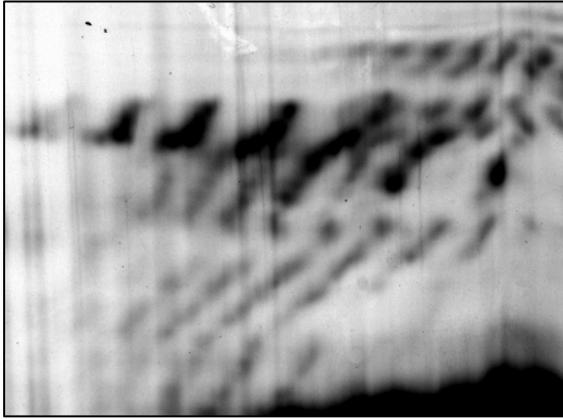
Una proteína que aparece claramente proteolizada es uno de los componentes del citoesqueleto, la HMW2 (spot 19). En *Mycoplasma penetrans* se ha encontrado que la proteína homóloga a HMW2 aparece como dos formas; una con el peso molecular que le corresponde y tres isoformas de la mitad del peso molecular. En el análisis de las isoformas de la mitad del peso molecular no se pudieron encontrar péptidos de la mitad N-terminal de la proteína. En el caso de

*Mycoplasma genitalium*, en fase de crecimiento exponencial se identificó la proteína con el peso molecular predicho, pero en este análisis sólo se ha localizado un spot que corresponde a aproximadamente la mitad del peso molecular. En este caso parece ser que esta forma es más bien una forma truncada de la proteína ya que se localizan péptidos de los dos extremos de la proteína.

## V.2. Proteoma en fase estacionaria final

En el estudio del proteoma ya publicado, se realizó una comparativa del estado de crecimiento exponencial y post-exponencial, observando únicamente una reducción en la síntesis de proteínas del 42% [51]. El haber cogido el cultivo en fase estacionaria final, proporciona una imagen del proteoma de una célula que sufre estrés, de alguna manera se podría decir que el proteoma que aquí se presenta corresponde a una célula moribunda. Se han realizado multitud de análisis, desde diferentes aproximaciones, sobre la muerte celular, básicamente de células eucariotas [83-88]. Existe consenso en que una célula tiene dos formas de morir, por apoptosis y por autofagia [85]. El proteoma que

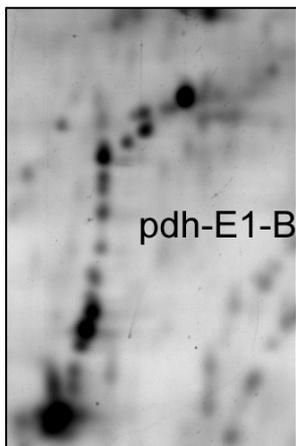
se ha obtenido muestra que *Mycoplasma genitalium*, modelo de célula mínima, degrada selectivamente determinadas proteínas en cuanto se aproxima a su



**Fig. V.9** Fragmentos de degradación de la proteína de adhesión P110

fin. De hecho, entre las proteínas identificadas, se han localizado 3 proteasas (spots 59, 66 y 67), dos de la cuales parecen ser específicas de este estado de crecimiento (spots 59 y 66), ya que no son localizables en estado exponencial de crecimiento. Dos proteínas directamente relacionadas con adhesión [70] se han encontrado fragmentadas. De las proteínas de adhesión P110 (spot 20) y P140 (spot 40) se han podido localizar al menos unos 40 fragmentos derivados de proteólisis. Esta degradación de estas proteínas aparece en los geles bidimensionales como columnas de spots que aparecen en diagonal (Figura V.9). Este hecho no sorprende, ya que seguramente la célula, al verse mermada de nutrientes, decide desengancharse de la superficie a la que está adherida, para intentar sobrevivir en otro lugar y aparte obtiene sustratos.

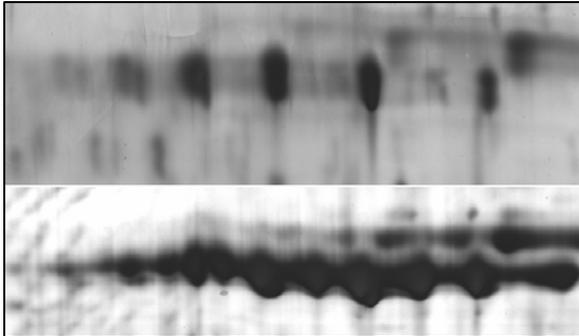
Otras dos proteínas relacionadas con adhesión y que también aparecen degradadas son la Piruvato deshidrogenasa y la chaperona DnaK [89]. La Piruvato deshidrogenasa está compuesta de tres subunidades, y la única que



**Fig. V.10** Degradación de la Piruvato deshidrogenasa E1-beta

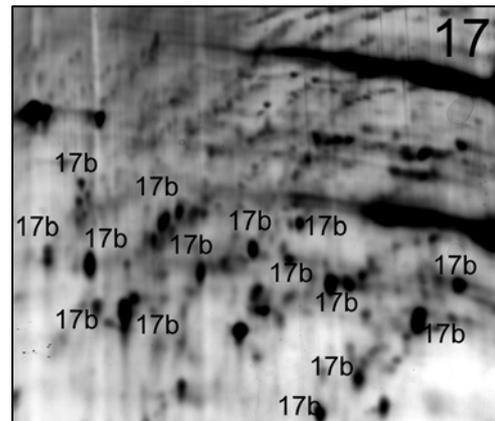
aparece degradada es la Piruvato deshidrogenasa cadena E1-beta (spot 13). En este caso, la degradación provoca la aparición de una columna de spots de aproximadamente el mismo punto isoeléctrico, pero una diferencia de masa entre el spot de mayor masa y el de menos de 13KDa (Figura V.10). Una de las proteínas que experimenta un cambio importante es la chaperona GroEL (spot 17). En fase de crecimiento exponencial se puede observar la presencia de seis isoformas, mientras que en fase de crecimiento estacionario se observan 12 isoformas (Figura V.11), pero no se puede explicar este

aumento de isoformas con los datos obtenidos por espectrometría de masas. Aparte del aumento de isoformas también se observa la presencia de multitud de fragmentos de esta chaperona (Figura V.12).



**Fig. V.12** Degradación de la chaperona GroEL. El spot 17 corresponde a la proteína entera, mientras que los spots marcados como 17b corresponden a fragmentos de la misma

**Fig V.11 Superior:** GroEL en fase de crecimiento exponencial  
**Inferior :** GroEL en fase de crecimiento estacionaria.



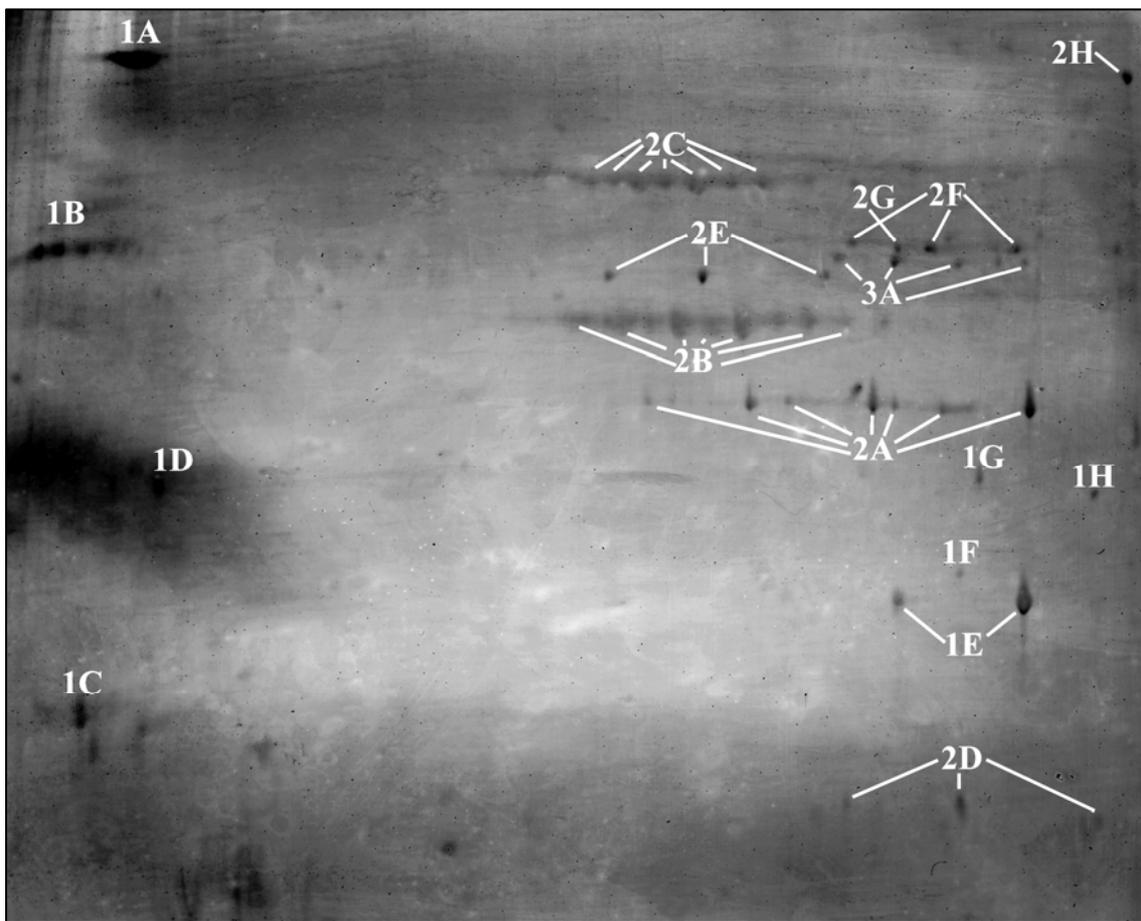
Otras proteínas de las cuales se han encontrado múltiples fragmentos son los Factores de elongación Tu y Ts.

Todos los organismos responden al estrés incrementando la síntesis de un grupo de proteínas específicas llamadas Hsps (heat shock proteins) o proteínas de estrés [90]. La mayoría de Hsps son chaperonas y proteasas. Las chaperonas procuran un correcto plegamiento de polipéptidos, protegen otras proteínas de la inactivación, y reactivan proteínas agregadas. Las proteasas eliminan proteínas irreversiblemente dañadas por el estrés. En el análisis del proteoma de *M. genitalium* se ha localizado todos los componentes de un sistema que procura la disgregación y reactivación de proteínas [91]. Este sistema está compuesto de las proteínas DnaK (spot 18), DnaJ (spot 5), GrpE (spot 82) y ClpB (spot 66).

La presencia de estas proteínas indica que la célula intenta recuperar una situación de estrés, generada, en este caso, por la falta de nutrientes en el medio y un pH del medio de cultivo que es pernicioso para la célula.

### V.3. Identificación de proteínas fosforiladas

Al igual que con *Mycoplasma penetrans*, con este micoplasma, también se ha usado la tecnología de la tinción específica de fosfoproteínas con Pro-Q™ Diamond, para la detección fluorescente de fosfoproteínas directamente sobre los gels bidimensionales. La tinción específica revela la presencia de 55 spots correspondientes a 17 proteínas fosforiladas, lo que representa un 10% del total de proteínas identificadas en este organismo. Todos los spots analizados provienen de un gel bidimensional con un gradiente de pH de 4 a 7.



**Fig. V.13** Mapa bidimensional de las proteínas de *Mycoplasma genitalium*. Extracto total de proteínas separadas en una tira IPG de 24 cm con un gradiente de pH de 4-7, seguido de una electroforesis vertical SDS-PAGE de 12,5% de poliacrilamida (25x20 cm) y teñida posteriormente con Pro-Q™ Diamond

La Tabla V.2.2 muestra la lista de proteínas fosforiladas.

**Tabla V.2. Proteínas fosforiladas.**

Proteína	Posición en el gel
Proteína V	1A
bifuncional endo-1,4-beta-xylanasa /Proteína homologa a P65	1B
DNA-dirigida RNA polimerasa cadena delta	1C
Lipoproteína de membrana homologa a TmpC	1D
*Proteína de división celular FstH	1E
* Lipoproteína MG095	1F
*Hidrolasa tipo Cof MG265	1G
* Lipoproteína MG338	1H
Piruvato deshidrogenasa (Lipoamida) E1-cadena beta pdhB	2A
Piruvato deshidrogenasa (lipoamida) E1-cadena alfa pdhA	2B
Chaperona GroEL	2C
*Proteína tipo OsmC MG427	2D
*Lipoproteína MG260	2E
fosfopiruvato hidratasa	2F
Proteína de citoadherencia P110	2G
Proteína accesoria de citoadherencia (HMW3)	2H
ATP sintasa F1, subunidad beta (atpD)	3A

De las proteínas identificadas como fosforiladas es de esperar encontrar proteínas relacionadas con metabolismo, como son las subunidades de la piruvato deshidrogenasa, proteínas relacionadas con el metabolismo de ácidos nucleicos, o la chaperona GroEL, pero lo que sorprende es que de las 17 proteínas fosforiladas 6 fueron anotadas inicialmente como proteínas hipotéticas (proteínas marcadas con \* en la tabla V.2). En comparación con las proteínas fosforiladas de *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma genitalium* tiene muchas menos proteínas de metabolismo fosforiladas. Lo que sugiere que el poco metabolismo de *Mycoplasma genitalium* está o poco regulado o tiene algún otro mecanismo de regulación.

Si bien se ha comentado anteriormente el aumento del número isoformas de la chaperona GroEL en fase estacionaria; al realizar la tinción específica de fosfoproteínas, todas ellas aparecen fosforiladas, quizá sea precisamente la fosforilación, o el aumento del número de fosforilaciones lo que provoca el

aumento de isoformas. Sin embargo, no se han detectado como fosforilados los fragmentos, que se han encontrado, de esta chaperona.

En este análisis, al igual que en *Mycoplasma penetrans*, también se caracterizó el sitio específico de fosforilación en una proteína identificada con la tecnología de tinción específica de fosfoproteínas con Pro-Q™ Diamond. Para ello se recortó un spot identificado como la proteína de adhesión P110. La figura V.14 muestra los espectros obtenidos por espectrometría de masas MALDI-TOF con la matriz HCCA y también antes y después del tratamiento con Fosfatasa alcalina. La figura V.15 muestra el detalle de los péptidos. El péptido difosforilado de esta proteína de adhesión, 996(K)KIITQTGVVKK(A)1008 (m/z 1373.71) desaparece del espectro de masas después del tratamiento con fosfatasa alcalina. El espectro obtenido después del tratamiento de defosforilación muestra un nuevo pico, no presente en el espectro control, que corresponde a la pérdida de dos (m/z 1213.72) grupos fosfato. Algunos nuevos péptidos, correspondientes a péptidos no fosforilados de la proteína de adhesión, aparecen en el espectro de masas después de tratamiento con fosfatasa alcalina, lo que sugiere la presencia de más fosfopéptidos en la muestra.

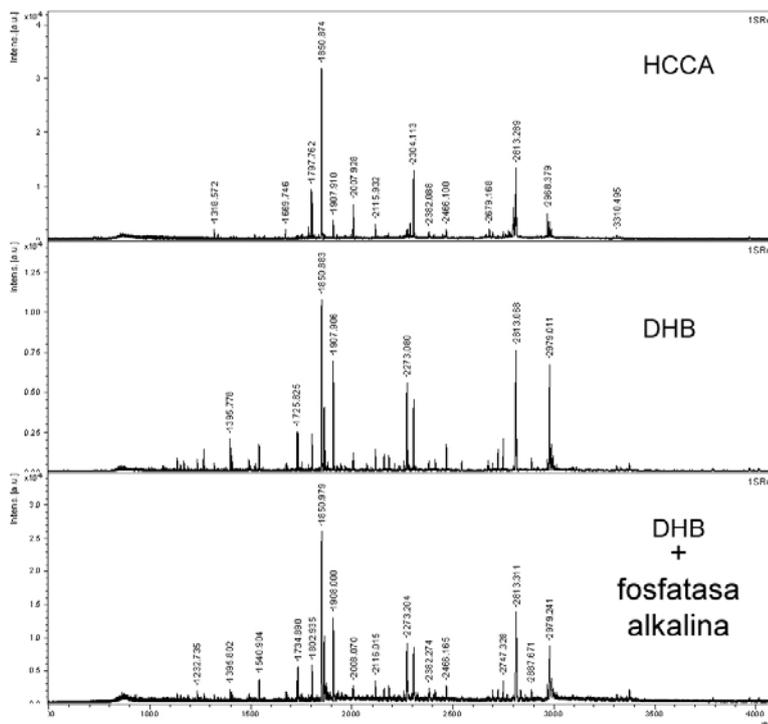
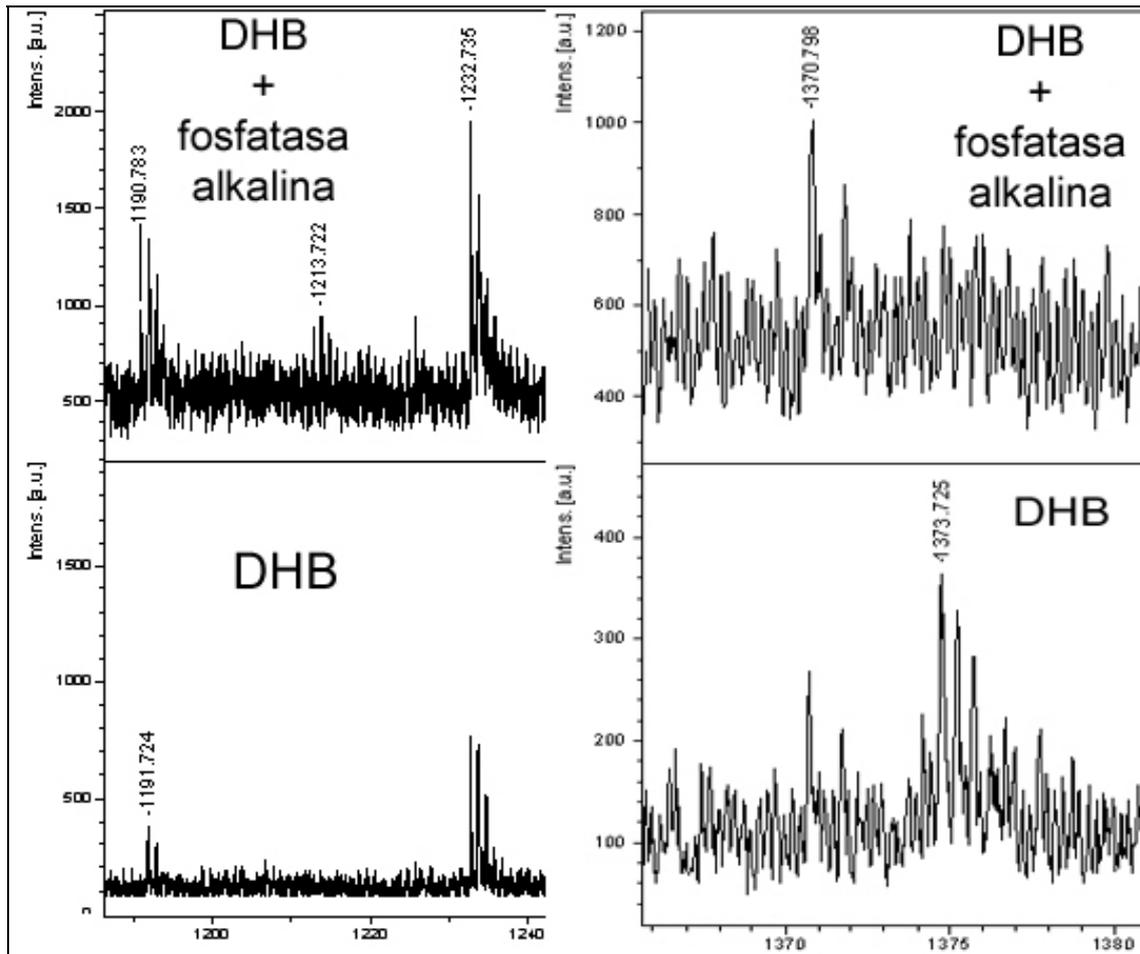


Fig. V.14 Espectros obtenidos de la proteína de adhesión P110. El superior con la matriz HCCA. El espectro del medio, es la misma muestra obtenida con la matriz DHB, y el espectro inferior corresponde a la muestra defosforilada.



**Fig. V.15** Detalle de los espectros de la figura V.14. Los espectros de la derecha muestran como en la muestra defosforilada desaparece un pico de 1373.72 Da, en su lugar (detalle izquierdo) aparece un pico correspondiente al péptido defosforilado de 1213.72 Da.



## VI Discusión general

Hoy en día, la mejor manera de analizar un proteoma es a través de los mapas generados por electroforesis bidimensional. Esta técnica ha mejorado mucho con el tiempo debido a la introducción de los gradientes inmovilizados de pH [28], la disponibilidad de diferentes gradientes de pH, o la introducción de nuevos detergentes para mejorar la solubilización de proteínas, principalmente las de membrana [32-34]. Aun así los resultados de todos los proteomas, incluidos los que en esta tesis se presentan, muestran como incluso el análisis de una célula simple, como son los micoplasmas, por electroforesis bidimensional, no es suficiente para visualizar el proteoma completo de una sola vez [51, 52, 80, 81].

Los factores limitantes son la solubilización de proteínas de membrana, la pobre resolución de las proteínas básicas, la dificultad de obtener mapas de gran resolución con los gradientes estrechos de pH, la identificación de proteínas de bajo número de copias y la dificultad de analizar proteínas por debajo de 10 KDa y por encima de 150 KDa.

El análisis de proteínas de bajo número de copias es un problema general de difícil solución, ya que la concentración de diferentes proteínas puede variar en varios órdenes de magnitud. Este problema no puede ser solucionado simplemente incrementando la cantidad de proteína que se carga en el gel, ya que esto produce geles de muy baja calidad, con spots que se superponen formando rayas horizontales. La mejor solución parece ser el enriquecimiento de las proteínas de bajo número de copias con procedimientos de fraccionamiento, o alternativamente la eliminación de las proteínas más abundantes.

El principal objetivo de este estudio era catalogar los productos génicos expresados por *M. penetrans* y *M. genitalium*, ya que la anotación del genoma es por sí sola insuficiente para asegurar que los genes se expresan. De hecho en el *Mycoplasma pneumoniae* se ha realizado el análisis del proteoma por electroforesis bidimensional [52] y el análisis del transcriptoma aplicando la tecnología de los microarrays [92]. En este último trabajo se observa que algunos genes no son expresados (transcritos) mientras que en el análisis del

proteoma se detectan las proteínas de estos genes. Esto indica que no existe una correlación directa entre cantidad de mRNA y cantidad de proteína.

Utilizando la combinación de la electroforesis bidimensional y la espectrometría de masas se ha generado un mapa de referencia del proteoma de *M. penetrans* en tres rangos solapados de pH, de 4 a 7, de 6 a 9 y de 7 a 11NL. En total se han resuelto 662 spots, de los cuales 207 se han identificado por espectrometría de masas, asignándolos a 153 genes de *Mycoplasma penetrans*. En el análisis del proteoma de *Mycoplasma genitalium*, utilizando rangos estrechos de pH, se han resuelto más de 1000 spots, de los cuales 380 se han identificado por MS, y han sido asignados a 91 genes de *Mycoplasma genitalium*. Esta gran diferencia entre spots resueltos entre *M. penetrans* y *M. genitalium* se debe al diferente abordaje que se ha realizado en los dos casos. Para *M. penetrans* se han utilizado gradientes de pH de rango intermedio, mientras que para *M. genitalium* el uso de rangos de pH estrecho ha permitido la separación de isoformas que con el uso de rangos intermedios quedan solapados en un mismo spot. El hecho de haber identificado 380 spots en el proteoma de *M. genitalium* y que sólo haya sido posible asignarlos a 91 proteínas se debe al elevado número de isoformas identificadas y al hecho de que el análisis del proteoma de *M. genitalium* se ha realizado en una fase de crecimiento donde se ha observado un evidente proceso de degradación selectiva de proteínas que generan multitud de spots procedentes de la fragmentación por proteasas expresadas por el propio organismo.

Las proteínas más abundantes en los proteomas analizados son las mismas que las encontradas en otros microorganismos cuyos proteomas han sido analizados [51, 52, 80, 81]. En *Mycoplasma penetrans* están las chaperonas dnaK, groEL, dos subunidades de la piruvato deshidrogenasa, y el antígeno principal de este microorganismo, la lipoproteína P35, que forma la familia más numerosa de parálogos, con 44 miembros [22]. En el caso de *Mycoplasma genitalium* las proteínas que se hayan fuertemente expresadas son también las chaperonas groEL y dnaK, dos subunidades de la piruvato deshidrogenada, y las proteínas implicadas en la adhesión de este microorganismo, la P110 y la P140. Todas las proteínas que se encuentran fuertemente expresadas

aparecen como un “tren de spots” consistiendo en varios spots que pueden ser identificados independientemente.

Las masas moleculares y puntos isoeléctricos de las proteínas identificadas se ajustan bastante a los valores teóricos en los dos proteomas analizados. Los casos en que no se ajustan, seguramente es debido a modificaciones post-traduccionales, proteólisis limitada, o como ha sido descrito, la unión de lípidos a las proteínas modifica su punto isoeléctrico y masa molecular [72]. La detección de las modificaciones post-traduccionales debería analizarse con algún método de espectrometría de masas más indicado para el análisis de este tipo de modificaciones.

De entre las proteínas identificadas en ambos proteomas, algunas estaban previamente anotadas como proteínas hipotéticas [9, 22]. Con el uso de programas de predicción de función, algunos desarrollados por nuestro grupo, se han reanotado asignando una función [60-64]. Con esta re-anotación se predicen funciones que si bien no habían sido descritas en las anotaciones originales son esperables dado lo que se conoce del metabolismo y biología de estos microorganismos. En *Mycoplasma penetrans* algunas proteínas de las reanotadas tendrían funciones relacionadas con quimotaxis o transportadores, como es el caso de MYPE3100 (spot 7) y de MYPE4900 (spot 9), reanotadas como proteína de quimotaxis, o bien el MYPE8040 (spot 17) que actuaría como receptor. Una proteína que podría ser importante para la infección de este patógeno es la proteína MYPE6760 (spot 26), que ha sido reanotada como una proteína del tipo septicolisina. Este tipo de proteínas parecen estar implicadas en la generación de poros en la pared de las células huésped [93]. Dos proteínas (MYPE3660 y MYPE3950, spots 37 y 38 respectivamente) han sido reanotadas como ATPasas implicadas en la reparación de DNA.

En el caso de *Mycoplasma genitalium* el número de proteínas reanotadas es menor, ya que es un organismo ampliamente analizado y poco a poco se van asignando funciones a proteínas que en la anotación original constaban como hipotéticas.

Aún así, las proteínas reanotadas muestran también la presencia de funciones previamente no descritas en este micoplasma. La proteína MG124 (spot 24) ha sido reanotada como glutamato deshidrogenasa. La presencia de este enzima implicaría que este organismo es capaz de sintetizar glutamato. En el genoma

de este patógeno no hay anotado ningún enzima de síntesis de aminoácidos [9]. Esta función podría ser importante para este micoplasma, ya que en modo oxidativo este enzima produce 2-oxoglutarato que acabaría por generar piruvato con producción de ATP. En modo reductivo, la reacción genera glutamato y produce la reoxidación de pirimidinas reducidas. Reacciones por las que pirimidinas reducidas son reoxidadas son probablemente esenciales para el crecimiento de los micoplasmas [94].

El análisis que se ha realizado del proteoma de *Mycoplasma genitalium* es un complemento del análisis que se publicó en el año 1999 [51]. En este primer análisis del proteoma de este micoplasma se realizó en fase de crecimiento exponencial y se pudieron identificar 112 proteínas distintas. Debido a que el proteoma de un organismo es una entidad dinámica y cambiante según las condiciones en que se encuentra el organismo, se realizó un análisis del proteoma de este microorganismo en unas condiciones distintas a las previamente analizadas y se utilizó la tecnología de los gradientes estrechos de pH en electroforesis bidimensional. En este estudio, el proteoma de *Mycoplasma genitalium* ha sido analizado en fase de crecimiento estacionaria final, pocas horas después el cultivo empieza a morir. En estas condiciones, se pudieron identificar 91 proteínas, de las cuales 57 no habían sido identificadas previamente por electroforesis bidimensional. Esta gran diferencia entre las proteínas identificadas en los proteomas de un mismo organismo analizado en dos momentos diferentes de crecimiento demuestra lo dinámico y cambiante que es el proteoma.

En las condiciones en que se ha analizado el proteoma de *Mycoplasma genitalium* se ha observado un claro proceso de degradación selectiva de proteínas. Las principales proteínas implicadas en adhesión del microorganismo se han encontrado muy degradadas por el efecto de proteasas que sólo ha sido posible identificar en este estado de crecimiento. La degradación de las proteínas implicadas en adhesión se puede entender como un mecanismo de supervivencia, desenganchándose de la superficie a la que está adherido para ir a conseguir nutrientes en otro lugar. La degradación de los factores de elongación Tu y Ts podría parar la síntesis proteica y no gastar energía. En *Escherichia coli* se ha observado que la chaperona GroEL

es una proteína imprescindible para el crecimiento. Determinadas proteínas imprescindibles para el microorganismo dependen exclusivamente de esta chaperona para su correcto plegamiento [95]. El proceso de plegamiento llevado a cabo por la chaperona GroEl requiere un elevado consumo energético. El hecho de degradar esta chaperona podría interpretarse también como una manera de ahorrar energía.

Del mismo modo que al realizar el análisis del proteoma de *Mycoplasma genitalium* en un estado de crecimiento distinto al previamente publicado ha permitido la detección de proteínas que no eran observadas, también se han dejado de ver proteínas que en fase de crecimiento exponencial podían ser identificadas. Entre las proteínas cuya detección no ha sido posible están todas las aminoácido-tRNA-sintetasas, multitud de proteínas ribosomales y de transcripción. También dejan de observarse muchas proteínas de metabolismo de DNA, y de metabolismo de pirimidinas, purinas, nucleósidos y nucleótidos. La desaparición de estas proteínas de los mapas bidimensionales puede entenderse como una disminución de la síntesis de proteínas, así como de la división celular. El grupo de proteínas de cual se han identificado más miembros que en el análisis previo es el de metabolismo energético y proteínas de estrés.

En el proteoma de *Mycoplasma penetrans*, que ha sido analizado en fase de crecimiento exponencial, se observan muchas proteínas de síntesis de proteínas, metabolismo energético, transcripción y metabolismo de DNA.

El uso de la tinción específica de fosfoproteínas con ProQ<sup>TM</sup> Diamond, ha permitido obtener los mapas de los fosfoproteomas de *M. penetrans* y de *M. genitalium* en el gradiente de pH de 4 a 7 donde han sido identificadas 26 proteínas para *M. penetrans* y 17 para *M. genitalium*. En el fosfoproteoma de *M. penetrans* muchas de las proteínas fosforiladas son de metabolismo energético, lo que sugiere una elevada regulación de las rutas metabólicas en este micoplasma, al contrario de lo observado en *M. genitalium*, donde se han identificado pocas fosfoproteínas de metabolismo energético y muchas proteínas asociadas a membrana, lo que sugiere o bien poca regulación del metabolismo energético, u otro mecanismo de regulación.

En ambos casos encontramos fosforiladas proteínas implicadas en adhesión. En el caso de *M. penetrans*, la P35; y en el caso de *M. genitalium* la proteína de adhesión P110. Esto sugiere que la adhesión del patógeno es un mecanismo con un alto nivel de regulación.

Para identificar el sitio específico de fosforilación de una de las proteínas fosforiladas se realizó el tratamiento con fosfatasa alcalina combinado con el mapeado diferencial de la huella peptídica por MALDI-TOF. Así se pudo localizar un heptafosfopéptido en un transportador ABC en *Mycoplasma penetrans*. Este elevado grado de fosforilación sugiere una fuerte regulación de los transportadores. El hecho de que estos microorganismos dependan tanto del medio para la obtención de nutrientes ya sugiere que deben tener un elevado nivel de regulación de los transportadores, hecho que se ve reflejado en el caso del transportador analizado. Para *Mycoplasma penetrans* también se localizó el sitio específico de fosforilación en el Factor de elongación Tu, siendo el mismo que en otros microorganismos.

También se ha identificado el sitio específico de fosforilación de una de las proteínas implicadas en adhesión de *M. genitalium*, la P110. Se pudo identificar un difosfopéptido en el péptido que comprende los residuos 996 a 1008. También se observó la presencia de más péptidos defosforilados en el espectro de masas después del tratamiento con fosfatasa alcalina, sugiriendo la presencia de más fosfopéptidos en la muestra. Sería necesario el uso de otras metodologías para identificar los otros sitios de fosforilación.

**VII- CONCLUSIONES**

## VII Conclusiones

- 1- Se ha generado un mapa de referencia del proteoma de *Mycoplasma penetrans*, en los rangos de pH de 4 a7, de 6 a 9 y de 7 a 11NL, identificando 153 proteínas distintas.
- 2- Se ha generado un mapa del fosfoproteoma de *Mycoplasma penetrans* en el rango de pH de 4 a7, identificando 26 proteínas, de las que 8 pertenecen a metabolismo energético, esto sugiere que las rutas metabólicas de este organismo están altamente reguladas.
- 3- Se ha obtenido un mapa del proteoma de *Mycoplasma genitalium*, en fase de crecimiento estacionaria final, identificado 91 proteínas, 57 de las cuales no habían sido identificadas previamente por 2DE. Estos mapas se han generado realizando el isoelectroenfoco con rango de pH estrecho.
- 4- La comparación del proteoma de *Mycoplasma genitalium* en fase exponencial y en fase estacionaria corrobora que el proteoma es una entidad dinámica, que cambia según las condiciones en que se encuentra la célula. El hecho de resolver el proteoma de *Mycoplasma genitalium* en fase de crecimiento estacionaria final, nos da una idea de cómo responde este microorganismo, modelo de célula mínima, a una situación de estrés que le llevará a la muerte.
- 5- Se ha generado un mapa del fosfoproteoma de *Mycoplasma genitalium* en el rango de pH de 4 a7, identificando 17 proteínas. Al contrario de lo que ocurre en *M. penetrans* pocas proteínas de las identificadas como fosforiladas pertenecen a metabolismo energético, lo que sugiere que el poco metabolismo de *M. genitalium* está o poco regulado o tiene algún otro mecanismo de regulación.
- 6- Se ha caracterizado el sitio específico de fosforilación de una proteína identificada como un Transportador ABC de *M. penetrans*, localizando un heptafosfopéptido; lo que sugiere que la actividad de este transportador está también muy regulada. También se ha caracterizado el sitio específico de fosforilación de una proteína de *M. genitalium* implicada en adhesión, la P110, localizando un difosfopéptido. Esto sugiere que la adhesión del patógeno es un mecanismo con un alto nivel de regulación.



VIII Bibliografía

- 1- Razin, S. Molecular biology and genetics of mycoplasmas (Mollicutes). *Microbiol Rev*, **1985**, *49*, 419-455.
- 2- Maniloff, J.; McElhaney, R.N.; Finc, L.R.; Baseman J.B. (eds) Mycoplasmas, molecular biology and pathogenesis. *American Society for Microbiology*, Washington, **1992**.
- 3- Chalker, V.J. Canine mycoplasmas. *Res Vet Sci*. 2005, *79*, 1-8.
- 4- Razin, S. DNA probes and PCR in diagnosis of *mycoplasma* infection. *Molec. Cellular Probes*, **1994**, *8*, 497-502
- 5- Rottem, S.; Kahane, I. (eds) Mycoplasma cell membranes. *Plenum Press*; New York, **1993**.
- 6- Seto, S., Kenri, T., Tomiyama, T., Miyata, M. 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*, 1875-7.
- 7- Razin, S.; Jacobs, E. Mycoplasma adhesion. *J Gen Microbiol*, **1992**, *138*, 407.
- 8- Feberwee, A.; Mekkes, D.R.; de Wit, J.J.; Hartman, E.G.M; Pijpers, A. Comparison of culture, PCR, and different serologic tests for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infections. *Avian Dis*. **2005**, *49*, 260-268
- 9- Fraser, C.M.; Gocayne, J.D.; White, O.; Adams, M.D.; *et al*. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, **1995**, *270*, 397-403.
- 10- Blattner, F.R.; Plunkett, G. III; Bloch, C.A.; Perna, N.T.; *et al*. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, **1997**, *277*, 1453-1474.
- 11- Miles, R.J. Catabolism in mollicutes. *J. Gen. Microbio.l*, **1992**, *138*, 1773-1783.
- 12- Neyrolles, O.; Ferris, S.; Behbahani, N.; Montagnier, L.; Blanchard, A. Organization of *Ureaplasma urealyticum* urease gene cluster and expression in a suppressor strain of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, **1996**, *178*, 647-655.

- 13- Jensen, J.S. *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2004**, *18*, 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*, 1288-1291.
- 15- Rasmussen, S.; Chen, L.; Deamer, D.; Krakauer, D.C.; Packard, N.H.; Stadler, P.F.; Bedau, M.A. Evolution: Transitions from nonliving to living matter. *Science.* **2004**, *303*, 963-965.
- 16- Hutchison, C.A.; Peterson, S.N.; Gill, S.R.; Cline, R.T.; *et al.* Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science*, **1999**, *286*, 2165-2169.
- 17- Lo, S.C.; Hayes, M.M.; Tully, J.G.; Wang, R.Y.; *et al.* *Mycoplasma penetrans* sp. nov., from the urogenital tract of patients with AIDS. *Int J Syst Bacteriol.* **1992**, *42*, 357-364.
- 18- Lo, S.C.; Hayes, M.M.; Kotani, H.; Pierce, P.F.; *et al.* Adhesion onto and invasion into mammalian cells by *mycoplasma penetrans*: a newly isolated *mycoplasma* from patients with AIDS. *Mod Pathol.* **1993**, *6*, 276-280.
- 19- Taylor-Robinson, D.; Gilroy, C.B.; Keane, F.E. Detection of several *Mycoplasma* species at various anatomical sites of homosexual men. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2003**, *22*, 291-293.
- 20- Lo, S.C.; Wang, R. Y-H.; Grandinetti, T.; Zou, N.; *et al.* *Mycoplasma penetrans* infection and seroconversion in patients with AIDS: identification of major mycoplasmal antigens targeted by host antibody response. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **2005**, *44*, 277-282.
- 21- Shimizu, T.; Kida, Y.; Kuwano, K. Lipid-associated membrane proteins of *M. fermentans* and *M. penetrans* activate human immunodeficiency virus long-terminal repeats through Toll-like receptors. *Immunology.* **2004**, *113*, 121-129.
- 22- Sasaki, Y.; Ishikawa, J.; Yamashita, A.; Oshima, K.; *et al.* The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 5293-5300.

- 23- López, J.A.; Camafeita, L.E.; Beloso, A.; Albar, J.P. Proteómica: Una nueva estrategia para la identificación de proteínas. Curso práctico de proteómica, CNB-CSIC, **2001**, Madrid.
- 24- Lahm, H.W.; Lancen, H. Mass spectrometry: A tool for the identification of proteins separated by gels. *Electrophoresis*, **2000**, *21*, 2105-2114.
- 25- Pandey, A.; Mann, M.; Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, **2000**, *405*, 837-846.
- 26- Jensen, O.N.; Modification-specific proteomics: Systematic strategies for analysing post-translationally modified proteins. *Proteomics: A Trends Guide*, **2000**, 36-42.
- 27- O'Farrell, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.*, **1975**, *250*, 4007-4021.
- 28- Görg, A.; Obermaier, C.; Boguth, G.; Harder, A.; *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, **2000**, *21*, 1037-1053.
- 29- Rabilloud, T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. **1998**, *19*, 758-760.
- 30- McCarthy, J.; Hopwood, F.; Oxley, D.; Laver, M. Carbamylation of proteins in 2-D electrophoresis--myth or reality? *J Proteome Res*. **2003**, *2*, 239-242.
- 31- Görg, A.; Weiss, W.; Dunn, M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, **2004**, *4*, 3665-3685.
- 32- Henningsen, R.; Gale, B.L.; Straub, K.M.; DeNagel, D.C. Application of zwitterionic detergents to the solubilization of integral membrane proteins for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. **2002**, *2*, 1479-1488.
- 33- Chevallet, M.; Santoni, V.; Poinas, A.; Rouquie, D.; *et al.* New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. **1998**, *19*, 1901-1909.
- 34- Santoni, V.; Rabilloud, T.; Dumas, P.; Rouquie, D.; *et al.* Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels. *Electrophoresis*. **1999**, *20*, 705-11.

- 35- Herbert, B.R.; Molloy, M.P.; Gooley, A.A.; Walsh, B.J.; *et al.* Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis*. **1998**, *19*, 845-851.
- 36- Creighton, T.E.; Proteins: structures and molecular properties 2<sup>o</sup> edition, *Freeman and Company*, **1993**.
- 37- Bjellqvist, B.Ek.K.; Righetti, P.G.; Gianazza, E.; Görg, A.; *et al.* Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods*. **1982**, *6*, 317-39.
- 38- Griffiths, I.W. J.J. Thomson: The centenary of his discovery of the electron and of his invention of mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 2-16.
- 39- Beynon, J.H. The use of the mass spectrometer for the identification of organic compounds. *Mikrochim. Acta*, **1956**, 437-453.
- 40- Biemann, K.; Cone, C.; Webster, B.R.; Arsenault, G.P. Determination of the amino acid sequence in oligopeptides by computer interpretation of their high-resolution mass spectra. *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, *88*, 5598-5606.
- 41- Barber, M.; Bordoli, R.S.; Sedgwick, R.D.; Tyler, A.N. Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spectroscopy. *Nature*, **1981**, *293*, 270-275.
- 42- Liu, L.K.; Busch, K.L.; Cooks R.G. Matrix-assisted secondary ion mass spectra of biological compounds. *Analytical Chemistry*, **1981**, *53*, 109.
- 43- Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S.F.; Whitehouse, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **1989**, *246*, 64-71.
- 44- Karas, M.; Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10,000 Daltons. *Anal. Chem.*, **1988**, *60*, 2299-2301.
- 45- Tanaka, K.; Waki, 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*, 151.
- 46- Chowdhury, S.K.; Katta, V.; Chait, B.T. Probing conformational changes in proteins by mass spectrometry. *J. American Chem Society*, **1990**, *112*, 9012-9013.

- 47- Chowdhury, S.K.; Katta, V.; Chait B.T. Electrospray ionization mass spectrometric peptide mapping: a rapid, sensitive technique for protein structure analysis. *Biochem and Biophy Research Commun.* **1990**, *167*, 686-692.
- 48- Henzel, W.J.; Billeci, 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*, 5011-5015.
- 49- Gygi, S.P.; Rist, B.; Gerber, S.A.; Turecek, F.; *et al.* Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology*, **1999**, *17*, 994-999.
- 50- Hoffmann, E.; Stroobant, V. Mass spectrometry: principles and applications. 2<sup>o</sup> edition, John Wiley & Sons, LTD, Chichester, **2002**.
- 51- Wasinger, V.C.; Pollack, J.D.; Humphery-Smith, I. The proteome of *Mycoplasma genitalium*. Chaps-soluble component. *Eur J Biochem.* **2000**, *267*, 1571-1582.
- 52- Regula, J.T.; Ueberle, B.; Boguth, G.; Gorg, A.; *et al.* Towards a two-dimensional proteome map of *Mycoplasma pneumoniae*. *Electrophoresis.* **2000**, *21*, 3765-3780.
- 53- Thomas, A.; Leprince, P.; Dizier, I.; Ball, H.; *et al.* Identification by two-dimensional electrophoresis of a new adhesin expressed by a low-passaged strain of *Mycoplasma bovis*. *Res Microbiol.*, **2005**, *156*, 713-718.
- 54- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **1951**, *193*, 265-275.
- 55- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **1970**, *227*, 680-685.
- 56- Rabilloud, T. Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis. *Anal Chem.*, **2000**, *72*, 48A-55A.
- 57- Yan, J.X.; Wait, R.; Berkelman, T.; Harry, R.A.; *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*, 3666-3672.

- 58- Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D.; Ehrhardt, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. **1988**, *9*, 255-262.
- 59- Kjellstrom, S.; Jensen, O.N. Phosphoric acid as a matrix additive for MALDI MS analysis of phosphopeptides and phosphoproteins. *Anal Chem*. **2004**, *76*, 5109-5117.
- 60- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Shaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. **1997**, *25*, 3389-402.
- 61- Espadaler, J.; Aragües, R.; Eswar, N.; Martí-Renom, M.; *et al.* Detecting remotely related proteins by their interactions and sequence similarity. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **2005**, *102*, 7151-7156.
- 62- Mulder, N. J.; Apweiler, R.; Attwood, T. K.; Bairoch, A.; *et al.* InterPro, progress and status in **2005**. *Nucleic Acid Res*. 2005, *33*, D201-206.
- 63- Cedano, J.; Aloy, P.; Pérez-Pons, J. A.; Querol, E. Relation between amino acid composition and cellular location of proteins. *J. Mol. Biol*. **1997**, *266*, 594-600.
- 64- Aloy, P.; Cedano, J.; Oliva, B.; Avilés, F.X.; Querol, E. 'TransMem': a neural network implemented in Excel spreadsheets for predicting transmembrane domains of proteins. *Comput. Appl. Biosci*. **1997**, *113*, 231-234.
- 65- Yáñez, A.; Cedillo, L.; Neyroller, O.; Alonso, E.; *et al.* *Mycoplasma penetrans* bacteremia and primary antiphospholipid syndrome. *Emerg. Infect. Dis*. **1999**, *5*, 164-167.
- 66- Kannan, T. R.; Baseman, J. B. Hemolytic and hemoxidative activities in *Mycoplasma penetrans*. *Infect. Immun* **2000**, *68*, 6419-6422.
- 67- Horino, A.; Sasaki, Y.; Sasaki, T.; Kenri, T. Multiple promoter inversions generate surface antigenic variation in *Mycoplasma penetrans*. *J. Bacteriol*. **2003**, *185*, 231-242.
- 68- Riley, M. Functions of the gene products of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*. **1993**, *54*, 862-952.

- 69- Humphery-Smith, I. Replication-induced protein synthesis and its importance to proteomics. *Electrophoresis*, **1999**, *20*, 653-659.
- 70- Dhandayuthapani S.; Rasmussen W. G.; Baseman J. B. Stability of cytoadherence-related proteins P140/P110 in *Mycoplasma genitalium* requires MG218 and unidentified factors. *Arch. Med. Res.* **2002**, *33*, 1-5.
- 71- Lippmann, C.; Lindschau, C.; Vijgenboom, E.; Schroder, W.; Bosch L.; Erdmann V.A. Prokaryotic elongation factor Tu is phosphorylated in vivo. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 601-607.
- 72- De Bruyn, J.; Soetaert, K.; Buysens, P.; Calonne, I.; *et al.* Evidence for specific and non-covalent binding of lipids to natural and recombinant *Mycobacterium bovis* BCG hsp60 proteins, and to the *Escherichia coli* homologue groEL. *Microbiology* **2000**, *146*, 1513-1524.
- 73- Halbedel, S.; Hames, C.; Stülke, J. In vivo activity of enzymatic and regulatory components of the phosphoenolpyruvate: Sugar phosphotransferase system in *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 7936-7943.
- 74- Kim, S.J.; Park, Y.H.; Hong, S.P.; Cho, B.O.; *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*, 1156-1161.
- 75- Baseman, J.B.; Dallo, S.F.; Tully, J.G.; Rose, D.L. Isolation and characterization of *Mycoplasma genitalium* strains from the human respiratory tract. *J Clin Microbiol.* **1988**, *26*, 2266-2269.
- 76- Bjornelius, E.; Jensen, J.S.; Lidbrink, P. Conjunctivitis associated with *Mycoplasma genitalium* infection. *Clin Infect Dis.* **2004**, *39*, e67-e69.
- 77- Dhandayuthapani, S.; Rasmussen, W.G.; Baseman, J.B. Stability of cytoadherence-related proteins P140/P110 in *Mycoplasma genitalium* requires MG218 and unidentified factors. *Arch Med Res.* **2002**, *33*, 1-5.
- 78- Ahmed, N.; Rice, G.E. Strategies for revealing lower abundance proteins in two-dimensional protein maps. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **2005**, *815*, 39-50.
- 79- Henningsen, R.; Gale, B.L.; Straub, K.M.; DeNagel, D.C. Application of zwitterionic detergents to the solubilization of integral membrane proteins

- for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. **2002**, 2, 1479-1488.
- 80- Vandhal, B. B.; Birkelund, S.; Demol, H.; Hoorelbeke, B.; *et al.* Proteome analysis of the *Chlamydia pneumoniae* elementary body. *Electrophoresis* **2001**, 22, 1024-1223.
- 81-Mignogna, G.; Giorgi, A.; Stefanelli, P.; Neri, A.; *et al.* Inventory of the proteins in *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *J. Proteome Res.* **2005**, 4, 1361-1370.
- 82- Calisto, B.M.; Pich, O.Q.; Piñol, J.; Fita, I. Crystal structure of a putative type I restriction-modification S subunit from *Mycoplasma genitalium*. *J Mol Biol.* **2005**, 351, 749-762.
- 83- Bianchi, S.; Dotti, M.T.; Federico, A. Physiology and pathology of notch signalling system. *J Cell Physiol.* **2005**, 3.
- 84- Chiarugi, A. "Simple but not simpler": toward a unified picture of energy requirements in cell death. *FASEB J.* **2005**, 19, 1783-1788.
- 85- Edinger, A.L.; Thompson, C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* **2004**, 16, 663-669.
- 86-Kirkegaard, K.; Taylor, M.P.; Jackson, W.T. Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat Rev. Microbiol.* **2004**, 2, 301-314.
- 87-Levine, B.; Klionsky, D.J. development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, **2004**, 6, 463-477.
- 88-Shintani, T.; Klionsky, D.J. Autophagy in health and disease: a double-edge sword. *Science*, **2004**, 306, 990-995.
- 89- Layh-Schmitt, G.; Podtelejnikov, A.; Mann, M. Proteins complexed to the P1 adhesin of *Mycoplasma pneumoniae*. *Microbiology.* **2000**, 146, 741-747.
- 90- Buchner, J. Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.* **1996**, 10, 10-19.
- 91- Beinker, P.; Schlee, S.; Auvula, R.; Reinstein, J. Biochemical coupling of the two nucleotide binding domains of ClpB: Covalent linkage is not a prerequisite for chaperone activity. *J Biol Chem.* **2005**, 280, 37965-37973.

- 92-Weiner III, J.; Zimmerman, C.U.; Göhlmann, H.W.H.; Herrmann, R. Transcription profiles of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* grown at different temperatures. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 6306-6320.
- 93- Wegscheider, M. Untersuchungen zu *Bacillus cereus* enterotoxin-komplexen auf zellulärer ebene, Tesis doctoral, Universität München, **2004**.
- 94- Pollack, J.D.; Williams, M.V.; McElhaney, R.N. The comparative metabolism of the mollicutes (*Mycoplasmas*): The utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. *Crit Rev Microbiol.* **1997**, *23*, 269-354.
- 95- Ellis, R.J. Chaperomics: in vivo GroEL function defined. *Curr Biol.* **2005**, *15*, R661-3.