

detectados. Sin embargo, cuando ambas porinas son utilizadas conjuntamente, únicamente se obtiene un tipo de complejo heteromérico (Figura 1).

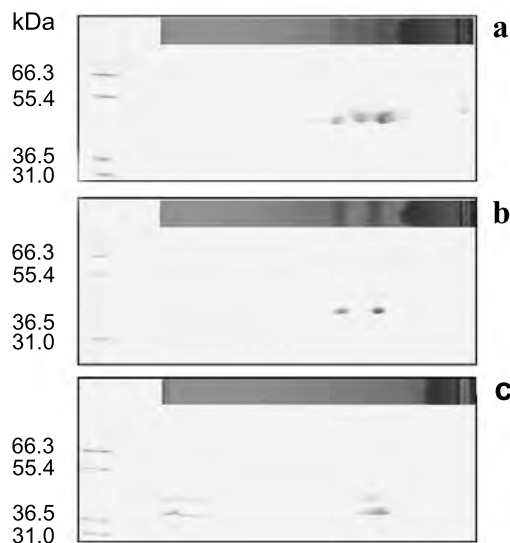


Figura 1. Análisis por 2D BN/SDS-PAGE de los complejos de porinas recombinantes de *Neisseria* incluidas en

liposomas. (a) Caracterización de homocomplejos de rPorA; (b) Caracterización de homocomplejos de rPorB; (c) Análisis de la interacción entre entre la rPoA y la rPorB. Encima de cada gel se muestra la correspondiente primera dimensión por “blue native electrophoresis”. Las imágenes se corresponden a tinciones con Comassie.

Conclusiones

El análisis por electroforesis 2D BN/SDS-PAGE de los complejos formados al incluir en liposomas los dos tipos de porinas de *Neisseria*, permitió comprobar que cuando ambas porinas están presentes en la membrana lipídica, éstas interaccionan para reorganizarse formando únicamente heterocomplejos PorA/PorB.

Bibliografía

- Derrick J P, Urwin R, Suker J, Feavers IM, et al. 1999. *Infection and Immunity*. 67: 2406–2413.
- Shägger H and von Jagow G. 1991. *Analytical Biochemistry*. 199: 223-231.

El gen *NcGRA7* codifica el antígeno inmunodominante de 17-KDa de *Neospora caninum*

Álvarez-García G¹, Pitarch A², Fernández-García A¹, Zaballos A³, Gil C², Gómez-Bautista M¹, Aguado-Martínez A¹, Ortega-Mora L.M¹.

¹Grupo SALUVET. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, Spain. ²Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n 28040-Madrid, Spain. ³Dpto. de Inmunología y Oncología. Centro Nacional de Biotecnología. U.A.M. Campus de Cantoblanco. 28049. Madrid. Spain.

Introducción

La fracción antigénica de 17-19 kDa (p17) de *Neospora caninum* es el principal antígeno inmunodominante reconocido por sueros de bovinos infectados naturalmente con *N. caninum* en geles de poliacrilamida unidimensionales (SDS-PAGE) (Álvarez-García et al., 2002).

Material y métodos y resultados

Con el objetivo de identificar las proteínas que componen la fracción p17, en primer lugar, se

construyó una genoteca de cDNA de taquizoítos de *N. caninum* la cual, posteriormente, se enfrentó a un anticuerpo purificado por afinidad que reconocía la fracción p17 (APA17). Se aislaron varios clones de cDNA cuya secuencia presentó un 100% de identidad con el gen *NcGRA7* que codifica la proteína *NcGRA7* de 33 kDa (Lally et al., 1997). A continuación se realizó un abordaje proteómico en el cual se combinó la electroforesis en geles bidimensionales de poliacrilamida (2D-PAGE), el western blot y la espectrometría de masas con la finalidad de caracterizar la fracción p17. Tanto el anticuerpo APA17 como los sueros

de bovinos con una infección natural reconocieron dos proteínas ácidas minoritarias de 17 y 33 kDa, las cuales a su vez estaban compuestas por 4 y 2 isoformas, respectivamente. La fracción p17 resuelta mediante 2D-PAGE se sometió a secuenciación peptídica mediante espectrometría de masas obteniéndose una secuencia parcial de 17 aminoácidos. La secuencia obtenida correspondió a la región amino terminal de la proteína NcGRA7. Finalmente, la proteína NcGRA7 fue clonada sin el péptido señal localizado en el extremo amino terminal y expresada en *Escherichia coli*, siguiendo la metodología descrita por Fernández-García et al. (2006). Cuando se analizó la proteína recombinante (rNcGRA7) mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas se resolvieron dos bandas de 24 y 33 kDa que correspondieron a la proteína NcGRA7.

Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran que el gen NcGRA7 codifica el antígeno inmunodominante de *N. caninum* (Álvarez-García et al., 2006).

Bibliografía

- Álvarez-García, G., Pereira-Bueno, J., Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M. Vet. Parasitol. 2002, 107, 15-27.
- Lally, N., Jenkins, M., Liddell, S., Dubey, J.P. Mol. Biochem. Parasitol. 1997, 87, 239-243.
- Fernández-García, A., Risco-Castillo, V., Zaballos, A., Álvarez-García, G. et al. Mol. Biochem. Parasitol. 2006, 146, 89-97.
- Álvarez-García, G., Pitarch, A., Zaballos, A., Fernández-García, A. et al. Parasitology 2006, 134, 41-50.

Análisis proteómico de la matriz exocelular (ME) de las biopelículas formadas por una cepa silvestre y por una mutante del hongo *Candida albicans* con una interrupción en el gen *PGA10* que codifica para una proteína que contiene el dominio CFEM rico en cisteína

Blanes R¹, Pérez AM¹, Murgui A², Casanova M¹, Domínguez A³, Martínez JP¹.

¹Departamento de Microbiología y Ecología, ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universitat de València/Estudi General (UVEG), Valencia, e ³Instituto de Microbiología Bioquímica, Universidad de Salamanca, Salamanca (España).

Introducción

Candida albicans es un hongo patógeno oportunista capaz de producir graves infecciones sistémicas en individuos inmunocomprometidos. Entre los atributos biológicos que le confieren a *C. albicans* su potencial patogénico, la capacidad de formar biopelículas parece jugar un papel esencial. Las biopelículas son comunidades celulares altamente organizadas con una compleja estructura tridimensional, adheridas a un sustrato sólido (biológico o no biológico), en la que las células se encuentran embebidas en una matriz exocelular (ME) formada por polisacáridos, proteínas y otros componentes minoritarios. La ME juega un papel crítico en el mantenimiento de la in-

tegridad estructural de las biopelículas y en la protección de las células frente a factores externos adversos como el sistema inmunitario y/o el tratamiento con antimicrobianos (Branda et al., 2005). Por lo tanto, un mejor conocimiento a nivel molecular y funcional de los constituyentes mayoritarios de la ME podría ser esencial en el desarrollo de nuevas estrategias para el diagnóstico, prevención y control de las candidiasis (Thomas et al., 2006).

La formación de biopelículas es un proceso biológico muy complejo durante el cual las células fúngicas deben establecer múltiples interacciones con el entorno ambiental. En este contexto, se ha descrito la presencia en *C. albicans* de una familia de proteínas