

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 R<sup>1</sup>, Pérez AM<sup>1</sup>, Murgui A<sup>2</sup>, Casanova M<sup>1</sup>, Domínguez A<sup>3</sup>, Martínez JP<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Ecología, <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universitat de València/Estudi General (UVEG), Valencia, e <sup>3</sup>Instituto 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

que contienen un dominio formado por 8 cisteínas, denominado CFEM (common in several fungal extracellular membrane proteins), y que pueden actuar como receptores de superficie, en transducción de señales, y como moléculas de adhesión en las interacciones huésped-parásito (Kulkarni et al., 2003). Nuestro grupo ha clonado un gen que codifica la síntesis de una proteína de la familia CFEM (*PGA10*; también designado como *RBT51* y *HPB1*), obteniéndose el mutante nulo para dicho gen (*pga10Δ*), que forma biopelículas muy frágiles y con poca capacidad de adherencia al sustrato (Figura 1 B) frente a lo observado en la cepa parental (Figura 1 A) (Pérez et al., 2006).

**Material y métodos**

Con objeto de profundizar en el conocimiento de los componentes proteicos de la ME y caracterizar especies que puedan ser esenciales en el establecimiento y mantenimiento de la integridad estructural de las biopelículas, se ha procedido a realizar un análisis proteómico de las proteínas de la ME extraídas mediante tratamiento secuencial con etanol (Figura. 2, calles A y C) y β-mercaptoetanol (β-ME) (Fig. 2, calles B y D) de las biopelículas formadas por la cepa parental (*CAI4-URA3*) y la mutante nula para el gen *PGA10* (*pga10Δ*). Las especies solubilizadas fueron separadas mediante SDS-PAGE (Figura. 2) y las bandas seleccionadas sometidas a análisis proteómico.

**Resultados y conclusiones**

El análisis comparativo de los diferentes extractos puso de manifiesto la existencia de diferencias en los respectivos perfiles proteicos (Figura 2), detectándose especies que se expresan diferencial o mayoritariamente en la ME de la cepa parental (*CAI4-URA3*). Se destaca la presencia de 2 especies proteicas, una proteína de 29 kDa miembro de la familia ThiJ/PfpI con propiedades antigénicas que se encuentra de forma mayoritaria en la ME de la cepa parental (bandas 1 y 5) respecto a la cepa mutante (bandas 7 y 9) y otra proteína peptidil-propil isomerasa (*cyp1p*) que liga ciclosporina. Esta proteína se encuentra tanto en la cepa parental (banda 2) como en la mutante (banda 8).

**Bibliografía**

Branda, S.S., et al. (2005). Trends Microbiol. 13:20-26.

Kulkarni, R.D. et al. (2003). Trends Biochem. Sci. 28:118-121

Pérez, A.M., et al. (2006). FEMS Yeast Res. 6:1074-1084.

Thomas, D.P., et al. (2006). Proteomics, 6:6033-6041.

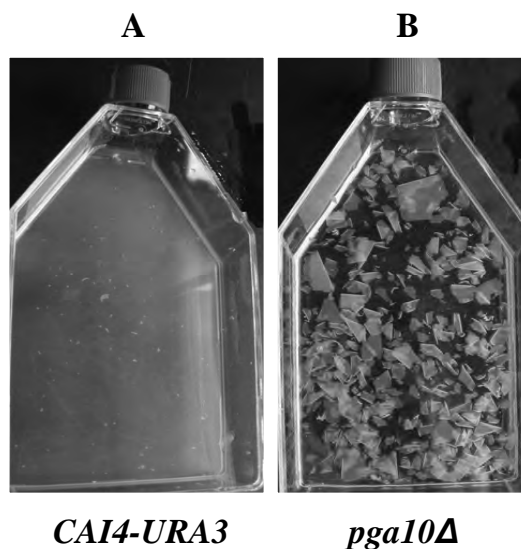


Figura 1. Cultivo de las cepas parental (*CAI4-URA3*) y mutante (*pga10Δ*).

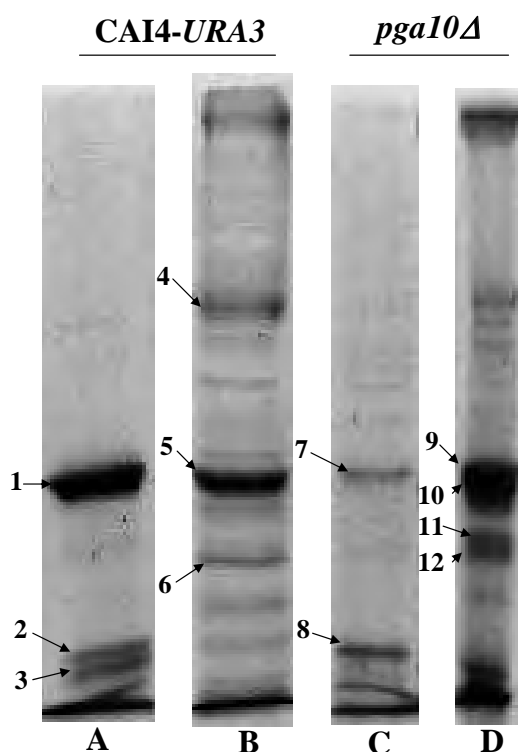


Figura 2. Perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) de extractos de la ME de células *CAI4-URA3* y *pga10Δ*, obtenidos mediante tratamiento secuencial con etanol (A y C) y β-mercaptoetanol (B y D)