

5. PROTEÓMICA MICROBIANA Y DE PARÁSITOS

Coordinadores: *Aida Pitarch, Antonio Marcilla, Ana Oleaga y Manuel Rodríguez*

5.1 Aspectos generales

Problemas en el análisis proteómico de muestras procedentes de organismos ‘raros’

María Luz Valero¹, Javier Ortiz², Esther Dionís¹, Laura Cantero¹, Manuel Mateo Sánchez del Pino¹

¹Laboratorio de Proteómica. Centro de Investigación Príncipe Felipe. Avda. Autopista del Saler 16. 46012 Valencia. ²SCSIE. Universitat de Valencia

Los métodos actuales de identificación de proteínas se basan generalmente en la comparación de la información de MS (o MS/MS) obtenida con la información de secuencias de proteínas que existe en diferentes bases de datos.

Aunque algunas bases de datos incluyen un elevado número de proteínas, como por ejemplo NCBI con aproximadamente 8500000 secuencias, no todos los organismos están representados por igual. Así, en NCBI existen 508911 proteínas humanas y el número decae drásticamente hasta 110313 para rata, un organismo ampliamente utilizado en experimentación. Y el número es mucho menor para otros organismos de alto interés como parásitos (54542 entradas para *Trematoda*), vegetales (13955 para

Citrus) o especies marinas de alto interés económico (2353 entradas para *Clavicipitaceae*).

En muchos casos es necesario recurrir a la secuenciación *de novo* que requiere de espectros de MS/MS de gran calidad y es costosa en cantidad de muestra y tiempo de análisis, por lo que su aplicabilidad es limitada.

Aún así existen algunas estrategias que pueden aplicarse en el caso de disponer sólo de información de MS y MS/MS parcial. En algunos casos pueden utilizarse herramientas químicas para la mejora de los espectros de MS/MS. Mientras que en otros las herramientas son bioinformáticas, y nos permitirán obtener más información de las diferentes bases de datos existentes.

5.2 Proteómica de Microorganismos

A) Proteómica de Bacterias

Preparación de extractos proteicos bacterianos para el análisis de glicoproteínas mediante geles bidimensionales y cromatografías de afinidad

Alfonso Olaya, Lidia Gómez-Gascón, Manuel J. Rodríguez-Ortega

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba

Resumen

Las glicoproteínas bacterianas, por sus funciones y localización, son potenciales dianas para vacu-

nas. Sin embargo, su estudio mediante electroforesis bidimensional y cromatografías de afinidad, bien mediante la química de la hidrazida y del ácido aminofenilborónico o bien mediante reconocimien-

to por lectinas, presentan una serie de dificultades como la presencia de ADN o azúcares libres en la muestra respectivamente. Para intentar solventarlas nos centramos en la optimización del proceso de obtención de extractos proteicos totales, tanto en cuanto a calidad como a rapidez.

La glicosilación bacteriana es un proceso recientemente descrito y del cual todavía existen muchas incógnitas. Todas las glicoproteínas procarióticas descritas, en función de su localización, pueden clasificarse en cinco grandes tipos: de pared celular, asociadas a membrana, asociadas al pilo o flagelo, glicoproteínas secretadas y exoenzimas, y celulares (cuya localización en la célula no está muy clara y se cree que, más bien, son contaminaciones citoplasmáticas) [1]. Esto, junto con sus funciones [1], que ponen de manifiesto contacto con el hospedador en el proceso de infección, convierte a las estas moléculas en potenciales dianas para vacunas, nuestro principal objetivo para estirpes del género *Streptococcus*.

Dos de las aproximaciones que se están llevando a cabo son la electroforesis bidimensional (2-DE) en geles de poliacrilamida y las cromatografías de afinidad basadas en la química de la hidrazida, la del ácido aminofenilborónico y en la alta especificidad hacia las glicoproteínas que exhiben las lectinas [2].

Los principales problemas que nos encontramos en la 2-DE tienen que ver con el enfoque de las proteínas debido a la presencia de ADN, que provoca desenfoque horizontal y vertical de las proteínas, y la propia naturaleza altamente hidrofóbica de las glicoproteínas asociadas a membranas. En cuanto a las cromatografías nos encontramos con el problema por contaminación con azúcares libres que interfieren en la afinidad de las glicoproteínas por la hidrazida y el ácido aminofenilborónico. En base a estos problemas hemos de conseguir una preparación de la muestra eficiente en cuanto al rendimiento de obtención de proteínas, pureza, medio en las que se encuentren éstas y rapidez.

Para optimizar el método de extracción de proteínas totales hemos probado una serie de protocolos, con variaciones desde sus fuentes originales para adaptarlos a nuestros organismos. Tras cultivar las bacterias se resuspenden en distintos tampones para romper por ultrasonidos (10 ciclos de 20 segundos) tras tratamiento con mutanolisina (150 U/ml, a 37°C, O/N) debido al grosor de la pared celular de los estreptococos. La presencia de ADN en las muestras se comprueba mediante electroforesis en

gel de agarosa al 1% y espectrofotometría, y la de azúcares libres mediante la reacción de Fehling y el método de la antrona.

- 1) Rotura en presencia de tampón de rehidratación de 2-DE (Urea 7M, Tiourea 2M, Tritón X-100 0,5%, CHAPS 4%, DTT 20 mM). La eficiencia de rotura y rendimiento de obtención de proteínas es grande. Sin embargo, al no poder descartarse la fracción en la que se ha incubado con mutanolisina (y que contiene proteínas de unión a pared, liberadas por la acción de la enzima), el tampón se diluye. Otros inconvenientes son que las proteínas resuspendidas en este tampón no pueden ser tratadas enzimáticamente en solución y permanecen los azúcares y el ADN. Para eliminar los contaminantes anteriores debe cambiarse de tampón mediante, por ejemplo, precipitación de proteínas, con la consecuente pérdida de proteínas. Ultrafiltrar para dializar es imposible al formarse cristales de urea en la membrana, que la obstruyen y da lugar a una gran pérdida de proteínas.
- 2) Rotura en tampón Tris 50 mM pH 8 tras tratamiento con mutanolisina. La eficiencia de rotura y obtención de proteínas es menor. Sin embargo presenta una serie de ventajas con respecto al anterior tampón, como que las muestras se obtienen en un tampón más apto para las cromatografías de afinidad y, dependiendo del protocolo en concreto, también para la 2-DE. 2A) Precipitación con Tricloroacético [3]. Da lugar a un rendimiento en la recuperación de proteína total bajo. 2B) Rotura a pH 10 e incubación con Benzonasa [3] a pH 8, 500 U/ml a 37°C, 1,5 h. Se elimina el ADN por completo pero no los azúcares. Sin embargo, se puede ultrafiltrar fácilmente. 2C) Incubación con espermina [4] 5 mM tras subir el pH de la muestra a 10 antes de la rotura y añadir 20 mM de EDTA. En estas condiciones la ratio proteína recuperada/ADN en las muestras es muy bueno. Sin embargo, al tratarse de una molécula cargada, la 2-DE se ve comprometida y, aunque el efecto que tendría sobre los distintos análisis glicoproteicos no se ha ensayado aún, este hecho obliga a cambiar de tampón mediante, por ejemplo, ultrafiltración. 2D) Incubación con DNAasa I (4 µg/ml) y RNAasa (4 µg/ml) [5] a 37°C, 1,5 h. Con estas concentraciones se sigue observando restos de ADN, siendo además necesario un paso de limpieza de azúcares. 2E) Purificación de proteí-

nas con Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico (25:24:1 v/v/v) [3]. La cantidad de proteínas recuperadas es baja.

3) Rotura con TRI Reagent (Sigma). La eficiencia de rotura es buena, sin embargo, la cantidad de proteínas recuperadas tras seguir el protocolo es baja.

Para aumentar la resolución y el enfoque de las proteínas en 2-DE se están ensayando, en los extractos totales potencialmente más idóneos para nuestro estudio, el detergente ASB-14, el DeStreak y el método de cargado de las tiras de IPG mediante "cup loading".

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto SAF2008-00733 del Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España.

Métodos de enriquecimiento de glicoproteínas bacterianas para su posterior análisis y caracterización mediante espectrometría de masas

Lidia Gómez-Gascón, Alfonso Olaya, Manuel J. Rodríguez-Ortega

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba

Resumen

Una de las formas más comunes de modificaciones postraduccionales de proteínas es la glicosilación. Se estima que más del 50% de las proteínas conocidas, así como el 80% de las proteínas de membrana, están glicosiladas. En contra de lo que se creía, se ha demostrado que los procariontes también poseen glicoproteínas. Las glicoproteínas bacterianas parecen estar asociadas a la superficie del microorganismo. Este hecho sugiere por tanto que están implicadas en la interacción de la bacteria con el hospedador y por tanto puede existir una relación directa con la capacidad patógena del microorganismo. El objeto de este estudio consiste en desarrollar una metodología,

Referencias

- [1] Raj K. Upreti Manoj K., y V. Shankar. Bacterial glycoproteins: Functions, biosíntesis and applications. *Proteomics* 2003; 3: 363-379.
- [2] Balanova L., Hernychova L., Bilkova Z. Bioanalytical tools for the discovery of eukaryotic glycoproteins applied to the análisis of bacterial glycoproteins. *Expert Rev. Proteomics* 2009; 6(1), 75-85.
- [3] Antonioli P, Bachi A, Fasoli E., Righetti P. Efficient removal of DNA from proteomic samples prior to two-dimensional map análisis. *Journal of Chromatography A*, 1216 2009; 3606-3612.
- [4] Choe W. y Middelberg A. Selective Precipitation of DNA by Spermine during the Chemical Extraction of Insoluble Cytoplasmic Protein. *Biotechnol. Prog.* 2001; 17: 1107-1113.
- [5] Encheva V., Gharbia S., Wait R., Begum S. y Shah H. Comparison of extraction procedures for proteome analysis of *Streptococcus pneumoniae* and a basic reference map. *Proteomics* 2006; 6: 3306-3317.

mediante diversas cromatografías de afinidad, para el enriquecimiento y purificación de glicoproteínas de bacterias del género *Streptococcus*.

En contra de lo que estaba establecido hasta hace unos años, recientemente se ha demostrado que los procariontes producen glicoproteínas [1]. Estas parecen estar asociadas a la superficie del microorganismo, lo que sugiere que están implicadas en la interacción con el hospedador y por tanto, con la capacidad patógena del microorganismo. Hay dos tipos de glicosilación en procariontes: N-glicosilación, en la cual los glicanos están unidos a un residuo de asparagina, y O-glicosilación, en la cual está unido a un residuo de serina, treonina o tirosina [1,2].