



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

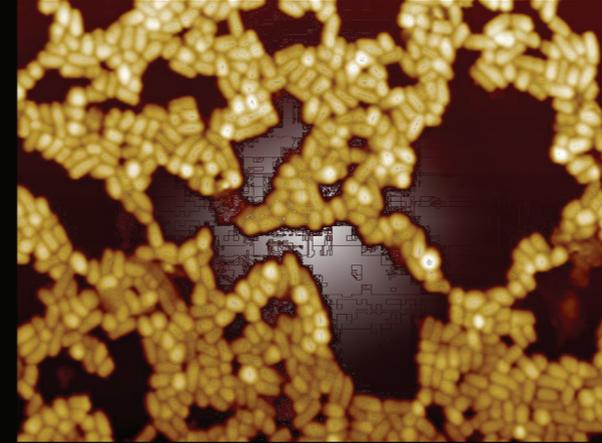
Actividad formadora de canales transmembrana en la superficie de *Gordonia jacobaea*

M^a Guadalupe Jiménez Galisteo

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



ACTIVIDAD FORMADORA DE CANALES TRANSMEMBRANA
EN LA SUPERFICIE DE *Gordonia jacobaea*

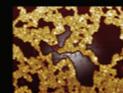
ACTIVIDAD FORMADORA
DE CANALES TRANSMEMBRANA
EN LA SUPERFICIE DE
Gordonia jacobaea

ACTIVIDAD FORMADORA DE CANALES TRANSMEMBRANA
EN LA SUPERFICIE DE *Gordonia jacobaea*

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA



PhD TESIS
M^a GUADALUPE JIMÉNEZ GALISTEO



M^a GUADALUPE JIMÉNEZ GALISTEO
L'HOSPITALET DE LLOBREGAT, 2015



TESIS DOCTORAL

**Actividad formadora de canales
transmembrana en la superficie de
*Gordonia jacobaea***

Programa de Doctorado de Biomedicina

Autor: M^a Guadalupe Jiménez Galisteo

Directores: Miguel Viñas Ciordia y Teresa Vinuesa Aumedes

Barcelona, Julio 2015





Unidad de Microbiología
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA
Y TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL
Facultad de Medicina
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

**Actividad formadora de canales
transmembrana en la superficie de
*Gordonia jacobaea***

Programa de Doctorado de Biomedicina

Autor: M^a Guadalupe Jiménez Galisteo

Directores: Miguel Viñas Ciordia y Teresa Vinuesa Aumedes

Barcelona, Julio de 2015





UNIVERSITAT DE BARCELONA



Miguel Viñas Ciordia

Molecular Microbiology and
Antimicrobials
Facultat de Medicina
Campus de Bellvitge
Pavelló de Govern, 5ª planta
08907 l'Hospitalet de Llobregat (Barcelona)



MIGUEL VIÑAS CIORDIA, Catedrático de Microbiología de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

HAGO CONSTAR,

Que la tesis doctoral presentada por la Sra. MARÍA GUADALUPE JIMÉNEZ GALISTEO, licenciada en Biología por la Universitat de Barcelona y presentada para optar al título de doctor por la Universitat de Barcelona ha sido desarrollada bajo mi dirección y la de la Dra. Teresa VINUESA AUMEDES, en el laboratorio de la Unidad de Microbiología del Departamento de Patología y Terapéutica Experimental de esta Facultad.

Que a mi juicio el mencionado Trabajo cumple con todos los requisitos formales y conceptuales para poder ser defendida ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste firma el presente en l'Hospitalet de Llobregat a 19 de Julio de 2015.

Fdo. Prof. Dr. Miguel Viñas Ciordia

*"Aprende como si fueras a vivir toda la vida,
y vive como si fueras a morir mañana".
Charles Chaplin*

*"La ciencia se construye a partir de aproximaciones que
gradualmente se acercan a la verdad".
(Anochecer) Isaac Asimov*

*"Nunca se es demasiado mayor para aprender más de lo que se sabe
y llegar a ser capaz de hacer más de lo que ya se puede".
(Los límites de la fundación) Isaac Asimov*

A mi familia y seres queridos

AGRADECIMIENTOS

En palabras de Louis Pasteur "*La suerte favorece sólo a la mente preparada*". Ante esta afirmación me gustaría añadir que muchas veces la mente no es algo individual, y que un grupo de personas puede trabajar y unir sus mentes para lograr un objetivo. Por ese motivo me gustaría agradecer a todas esas mentes, que durante estos años de trabajo han estado a mi lado, y que con sus ánimos, con sus gestos, con sus consejos, me han ayudado a lograr este objetivo.

En primer lugar, agradezco enormemente al profesor Miguel Viñas, director y tutor de esta tesis, y al Profesor Ángel Domínguez de la Universidad de Salamanca, que bien podría figurar como codirector, su dirección, sus ideas, su inestimable apoyo y ayuda, y por supuesto su trabajo de "becarios" en la anotación del genoma. Ellos me han demostrado que a pesar de ser dos veteranos de mente brillante, muestran el mismo entusiasmo por la ciencia que cuando empezaron, y para mí son un ejemplo a seguir. Sin su ayuda y su apoyo, este proyecto no habría visto la luz.

A la Dra. Teresa Vinuesa le agradezco toda su ayuda como codirectora de esta tesis, junto con su confianza, afecto y preocupación tanto a nivel profesional como personal.

Al Dr. Tomás G. Villa, a la Dra. Trinidad de Miguel y a la Dra. Patricia Veiga, les agradezco que me presentasen y me permitiesen trabajar con la minúscula *Gordonia jacobaea*, este microorganismo ha ocupado gran parte de mis pensamientos durante estos años, y si no hubiese sido por ellos, jamás habría tenido el gusto de conocerla.

Al Dr. Benz y a Elker Maier de la Universidad de Bremen (Alemania), y a la Dra. Elisa Muñoz de la Universidad de Salamanca, en la distancia su ayuda y apoyo han sido todo un regalo.

Infinitas gracias a todos los compañeros con los que he tenido el placer de trabajar en este laboratorio, me gustaría agradecerles su apoyo incondicional y cada minuto que hemos podido compartir. En su compañía el trabajo ha sido ligero, enriquecedor y hasta divertido. Especialmente me gustaría agradecer a Lidia “pequeña” y a Ester por ser mis compañeras eternas, con vosotras he pasado algunos de los momentos más difíciles de mi vida y también algunos de los más gratificantes, y siempre, **siempre**, habéis estado ahí para apoyarme y regalarme vuestra ayuda. Desde el primer día en que os conocí, hace ya mucho, mucho tiempo, habéis sido una fuente de alegría y bienestar para mí. Sois estupendas.

A Álex, Blanca, Rocío, Eulalia, Héctor, con vosotros la ciencia es otra cosa, muchas gracias por estar ahí y haberme ayudado con vuestro ánimo y apoyo. Por supuesto, gracias a Eva, quien siempre ha estado dispuesta a echarme una mano.

También quiero recordar y agradecer a aquellos que, aunque ya no están en nuestro laboratorio, han formado parte de la historia de esta tesis. Lidia “grande” y César, que me recibieron cuando entré en este intrigante mundo de la microbiología, a Jana, Cate, Indira, Iraidá, Erica y Marina, aunque compartimos poco tiempo juntas, ha sido un placer coincidir con vosotras. Y por supuesto, a Toni, Carolina y Elena.

A Rosaura, Isabel G. e Isabel E., muchas gracias por vuestra colaboración, ayuda y paciencia. Siempre que he recurrido a vosotras he sentido vuestro apoyo y cariño.

No puedo olvidarme de mi familia, que han compartido conmigo este viaje como copilotos eficaces. Gracias a mis padres, Juan Manuel y Lupe, sus gestos y enseñanzas vitales me han hecho como soy

colocando la primera piedra de mi ser. A mi hermano Carlos (Juancar), ¿qué puedo decir?, siempre has estado ahí hermanito y tu cariño y privilegiado cerebro ha sido uno de mis mejores apoyos.

A Juan, mi otra mitad, gracias por tu amor y tu apoyo incondicional, gracias por haberme insuflado la energía y la motivación para no hundirme ante los baches del camino y luchar por lograr mis objetivos en la vida. Tú siendo como eres, me has dado el empujón que necesitaba.

Sé que me dejo a muchas personas que han estado ahí y que de distintas formas me han ayudado con una frase reflexiva o con unas palabras amables, a Mariona, Tareixa, Sonia, Joseta, Isabel, Cristina, Laura, Anna, José, Encarna... cada una de ellas, a su modo, han puesto su pequeño granito de arena. Muchas gracias.

Y por último quiero recordar a quienes ya no están: mi tito Epi, mi tito Paco, mi "muma" Antonia, y a todos los seres queridos, que se que se habrían sentido muy orgullosos de este trabajo.

.....

ÍNDICE

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Género <i>Gordonia</i>	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Descripción. Propiedades morfológicas y quimiotaxonómicas	2
1.1.3. Hábitat	3
1.1.4. Taxonomía	4
1.1.4.1. Taxonomía genética del género <i>Gordonia</i>	6
1.1.5. Interés industrial del género <i>Gordonia</i>	8
1.1.5.1 Propiedades anabólicas	8
1.1.5.1.1 Biosurfactantes	8
1.1.5.1.2. Carotenoides	9
1.1.5.1.3. Acido 1 y 2 imidazol amino	10
1.1.5.1.4. Gordonano	10
1.1.5.1.5. Gordonina	11
1.1.5.1.6. Micobactina	11
1.1.5.1.7. Esteroides	12
1.1.5.1.8. Exopolisacáridos	12
1.1.5.2. Propiedades catabólicas y bioremediadoras	13
1.1.5.2.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos	13
1.1.5.2.2. Esteres de ácido ftálico	14
1.1.5.2.3. s-Triazinas	14
1.1.5.2.4. Gomas naturales y sintéticas	15
1.1.5.2.5. Petróleo y derivados	15
1.1.5.2.6. Esteroides	15
1.1.6. Patogenicidad de <i>Gordonia</i> : antecedentes de infecciones	16
1.1.6.1. Infecciones pulmonares	18
1.1.6.2. Bacteriemias	19
1.1.6.3. Infecciones de heridas quirúrgicas	19
1.1.6.4. Infecciones localizadas	20
1.1.6.5. Transmisión nosocomial	22
1.1.7. <i>Gordonia</i> , microorganismo de la flora normal	22
1.2. <i>Gordonia jacobaea</i>	23
1.2.1. Interés industrial	23
1.2.2. Posición taxonómica dentro del género	24
1.3. Porinas bacterianas. Proteínas formadoras de canal	25
1.3.1. Breve descripción del grupo <i>Corynebacterineae</i>	26
1.3.1.1. La pared celular en las <i>Corynebacterineae</i>	28
1.3.2. Proteínas formadoras de canal en el grupo <i>Corynebacterineae</i>	30
1.3.3. Porinas en el género <i>Mycobacterium</i>	31
1.3.3.1. Porinas de <i>Mycobacterium smegmatis</i>	32
1.3.3.1.1. Familia MspA	35
1.3.3.2. Porinas de <i>Mycobacterium chelonae</i>	35
1.3.3.3. Porinas de <i>Mycobacterium phlei</i>	36

1.3.3.4. Porinas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	36
1.3.3.5.1. Familia OOP: OmpA-OmpF	39
1.3.3.6. Porinas de <i>Mycobacterium bovis</i>	39
1.3.3.7. Porinas de <i>Mycobacterium marinum</i>	40
1.3.4. Porinas en el género <i>Corynebacterium</i>	40
1.3.4.1. Porinas de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	41
1.3.4.1.1 Familia PorB.....	41
1.3.4.2. Porinas de <i>Corynebacterium efficiens</i>	43
1.3.4.3. Porinas de <i>Corynebacterium callunae</i>	44
1.3.4.4. Porinas de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	44
1.3.4.5. Porinas de <i>Corynebacterium amycolatum</i>	44
1.3.5. Porinas en el género <i>Nocardia</i>	45
1.3.5.1. Porinas de <i>Nocardia farcinica</i>	45
1.3.5.2. Porinas de <i>Nocardia asteroides</i>	46
1.3.5.3. Porinas de <i>Nocardia corynebacteroides</i>	47
1.3.6. Porinas en el género <i>Rhodococcus</i>	48
1.3.6.1. Porinas de <i>Rhodococcus erythropolis</i>	48
1.3.6.2 Porinas de <i>Rhodococcus equi</i>	49
1.3.6.3. Porinas de <i>Rhodococcus jostii</i>	49
1.3.7. Porinas de <i>Tsukamurella</i>	50
1.3.7.1. Porinas de <i>Tsukamurella inchonensis</i>	50
2. OBJETIVOS	53
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
3.1. Medios de cultivo	59
3.2. Soluciones utilizadas.....	62
3.3. Condiciones de cultivo	63
3.4. Cepas bacterianas	64
3.5. Curva de crecimiento.....	64
3.6. Extracción y purificación de proteínas de pared de <i>G. jacobaea</i>	65
3.6.1. Método de Lichtinger	65
3.6.1.1. Doble extracción de lípidos.....	66
3.6.2. Método de Heinz y Niederweis	67
3.7. Electroforesis en geles SDS-PAGE	68
3.7.1. Marcadores de peso molecular.....	68
3.7.2. Método de Laemmli.....	69
3.7.2.1. Preparación de las muestras	69
3.7.2.2. Preparación del gel de poliacrilamida	69
3.7.2.3. Recorrido de las muestras	71
3.7.2.4. Tinción de los geles	71
3.7.3. Método de Schägger	72
3.7.3.1. Preparación de las muestras	72
3.7.3.2. Preparación del gel de poliacrilamida	73
3.7.3.3. Recorrido de las muestras	74
3.7.4. Tinción de los geles	75
3.7.4.1. Tinción con Coomassie coloidal, protocolo de Wang.....	75

3.7.4.2. Tinción de Schägger.....	76
3.7.4.3. Tinción con Blue silver. Protocolo de Candiano	77
3.7.4.4. Tinción rápida de Kang.....	78
3.7.4.5. Tinciones de plata	79
3.8. Extracción de proteínas de un gel de acrilamida	80
3.9. Estudio de la capacidad formadora de poro	81
3.9.1. Principios del método.....	82
3.9.2. Preparación y pre-printing de la cubeta.....	85
3.9.2.1. Adición de la muestra.....	86
3.9.4. Selectividad iónica	88
3.9.5. Dependencia de voltaje	89
3.9.6. Especificidad de sustrato (titración de sustrato).....	91
3.10. Transferencia de proteínas a una membrana de PVDF.....	92
3.11. Secuenciación de EDMAN	94
3.12. Espectrometría de masas MALDI-TOF	95
3.12.1. Identificación mediante huella peptídica.	96
3.13. Extracción DNA genómico total	96
3.13.1. Técnicas de cuantificación de DNA.....	98
3.13.2. Estimación de la pureza del DNA	98
3.13.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	99
3.13.3.1. Preparación de las muestras	100
3.13.3.2. Preparación del gel de agarosa.....	100
3.13.3.3. Marcadores de peso molecular.....	101
3.14. Secuenciación masiva del genoma.....	101
3.14.1. Secuenciación masiva del genoma por Pirosecuenciación	105
3.14.1.1. Preparación de la muestra. PCR en emulsión	105
3.14.1.2. Proceso de pirosecuenciación.....	106
3.14.1.3. 454 secuenciación y montaje	108
3.14.1.4. Ficheros de datos.....	108
3.14.2. Anotación automática del genoma	109
3.14.3. Anotación manual del genoma	110
3.15. Herramientas bioinformáticas	111
3.15.1. Bases de datos.....	111
3.15.2. Programas de alineamiento	112
3.15.3. Programas de análisis de proteínas	114
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	119
4.1. Condiciones de cultivo para la obtención de proteínas de pared.....	121
4.1.1. Estimación del tiempo de cultivo idóneo.....	125
4.2. Extracción y análisis de las proteínas de pared.....	126
4.2.1. Protocolo de Lichtinger con modificaciones.....	127
4.2.2. Extracción de Heinz.....	130
4.3. Análisis de las proteínas de pared mediante SDS-PAGE	133
4.4. Utilización de distintos protocolos de tinción de geles	136
4.5. Purificación de proteínas de pared de <i>Gordonia jacobaea</i>	138
4.6. Actividad formadora de poro (<i>Black Lipid Planar Bilayer</i>).....	142

4.6.1. Proteína de 100 kDa. Actividad formadora de poro.....	144
4.6.1.1. Conductancia de canal simple.....	144
4.6.1.2. Selectividad iónica.....	148
4.6.1.3. Dependencia de voltaje.....	152
4.6.1.4. Especificidad de sustrato.....	154
4.6.2. Proteína de 60 kDa. Actividad formadora de poro.....	157
4.6.2.1. Conductancia de canal simple.....	157
4.6.2.2. Selectividad iónica.....	160
4.6.3. Proteína de 20 kDa. Actividad formadora de poro.....	163
4.6.3.1. Conductancia de canal simple.....	163
4.6.3.2. Selectividad iónica.....	164
4.7. Obtención del DNA genómico de <i>G. jacobaea</i>	166
4.8. Secuenciación del DNA genómico.....	167
4.9. Anotación del genoma.....	169
4.9.1 Publicación del genoma de <i>G. jacobaea</i>	170
4.10.1. Mapa del locus.....	174
4.10.2. Alineamiento de las secuencias c6/281 y c6/282.....	177
4.10.2.1 Análisis de las proteínas c6/281.....	179
4.10.2.1 Análisis de las proteínas c6/282.....	180
4.10.3. Alineamiento de las proteínas c2/503 y c2/504.....	181
4.10.3.1. Análisis de la proteína c2/503.....	183
4.10.2.2. Análisis de la proteína c6/504.....	184
4.10.2. Árboles de proximidad.....	186
4.11. Análisis de la secuencia de la proteína del 100 kDa.....	189
4.11.1. Secuencia N-terminal.....	189
4.11.2. Espectrometría de masas: MALDI-TOF.....	189
4.11.3. Estudio de la proteína c6/294.....	191
4.11.3.1. Búsqueda de proteínas similares en Pfam.....	193
4.11.3.2. Comparación de la secuencia con otras porinas del grupo.....	197
4.11.3.1. Estudio bioinformático en la proteína c6/294.....	198
4.11.3.1.1. Peso molecular, punto isoeléctrico e hidrofobicidad.....	199
4.11.3.1.2. Estructura secundaria.....	202
4.11.3.1.3. Zonas de inserción transmembrana.....	207
5. CONCLUSIONES.....	215
6. BIBLIOGRAFÍA.....	223
7. PUBLICACIONES.....	249

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A: amperios
ACN: acetonitrilo
APS: persulfato de amonio
Bit score: puntuación del alineamiento
cm: centímetros.
CVC: Catéter Venoso Central
Dión.: disolución
DiphPC: Difitanoi fosfatidilcolina
DTT: Dithiothreitol
FD.: factor de dilución
G \bar{X} : conductancia promedio
g/l: gramos/litro
h: horas.
HMM: Hidden Markov Model
HPLC: high performance liquid chromatography
I: corriente del sistema
Kb: kilobases (1.000 pares de bases)
kDa: kilodaltons (1.000 Daltons)
kV: kilovoltios (1.000 voltios)
M: molar.
mA miliamperios
Mb: megabases (1000 kilobases)
mg/g: miligramos/gramo
mg/l : miligramos/litro
mg/ml: microgramos/mililitro
MiliQ: Agua ultra pura
ml: mililitros
mm: milímetros
ng: nanogramos
nm: nanómetros.
Ø poro : diámetro de poro.
Ø: diámetro
°C: grados centígrados.
Pa: permeabilidad anionica
pb: pares de bases.
Pc: permeabilidad cationica
pg/célula: picogramos/célula.
PIR: Protein Information Resource
rpm: revoluciones por minuto.
S: Conductancia
Sol.: Solución
TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TFA: trifluoroacetico

Símbolos y abreviaturas

Tpo.: tiempo

TrEMBL : Translated EMBL Nucleotide Sequence Data Librar

Tris: 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

U/ml: unidades/mililitro

U: unidades enzimáticas

UV: ultravioleta

V voltios

vol/vol: volumen/volumen

vol:vol:vol: volumen:volumen:volumen

w/v: peso/volumen

Δ : longitud de onda

μ F: microfaradays.

μ g/g : microgramos/gramo

μ g/l: microgramos/litro

μ g/ml: microgramos/mililitro

μ l: microlitros

μ m: micrometros

σ : desviación estándar

Ω : ohmios

Aminoácidos:

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutámico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Methionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Género *Gordonia*

1.1.1. Generalidades

El género *Gordonia* está formado por bacterias Gram positivas que han atraído el interés de muchos investigadores, por varias razones. Entre sus especies se han aislado algunas que poseen la capacidad de degradar sustancias xenobióticas, contaminantes ambientales y distintos tipos de polímeros, así como también se han identificado otras que pueden sintetizar y transformar compuestos de interés industrial.

La variedad de los compuestos susceptibles de ser degradados, transformados o sintetizados por los miembros de este género, hacen de estas bacterias unos microorganismos de gran interés en biotecnología industrial y en medio ambiente. Sin embargo, los miembros del género *Gordonia* están considerados patógenos oportunistas, motivo por el cual su utilización industrial o ambiental debe ser restringida en algunos casos (Arenskotter et al. 2004; Drzyzga 2012).

Otra característica interesante de este género, es su pertenencia al grupo CNM (Corinebacterias, Nocardias, Mycobacterias), un conjunto de microorganismos que poseen una pared extremadamente hidrofóbica que actúa como una barrera de permeabilidad y que confiere a las bacterias una gran resistencia a la acción de antibióticos y otros agentes antimicrobianos.

En las últimas décadas se han descrito dentro de este grupo proteínas de pared que ejercen un rol muy similar al de las proteínas formadoras de canal, porinas, características de las bacterias Gram negativas, actuando como canales facilitadores de la difusión hidrofílica de solutos entre el exterior y el interior de la célula. Dentro del grupo CNM encontramos géneros de interés clínico como *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Corynebacterium* (Drzyzga 2012).

1.1.2. Descripción. Propiedades morfológicas y quimiota-xonómicas

Los miembros de género *Gordonia* son bacterias aerobias, inmóviles y catalasa positivos. Frente a la tinción de Gram pueden mostrarse como bacterias Gram positivas o Gram variables, son ligeramente ácido-alcohol resistentes y de morfología nocardiforme. Su metabolismo es oxidativo respecto a los carbohidratos, son bacterias arilsulfatasa negativo, muestran susceptibilidad ante la lisozima y no producen esporas (Arenskotter et al. 2004). El termino nocardiforme hace referencia a la morfología bacteriana y a un crecimiento “micelar” con fragmentación del mismo para dar lugar a morfologías coco-bacilares y bacilares.

Las colonias que forman los miembros del genero *Gordonia* pueden ser desde delgadas, lisas y brillantes, a irregulares y de superficie áspera, en cuanto a la coloración, ésta puede variar entre especies e incluso dentro de una misma especie y dependiendo del medio de crecimiento, desarrollando colonias que pueden ser desde blancas a amarillas, naranjas, rojas y rosadas. Como hemos mencionado anteriormente, algunas especies pueden presentar diferente morfología colonial, como es el caso de *G. alkanivorans* DSM44369 y *G. westfalica* DSM44215 las cuales pueden mostrar morfologías coloniales tanto rugosas como lisas, y generalmente en cada especie son los fenotipos lisos los que pueden evolucionar y dar lugar a colonias rugosas, este cambio fenotípico parece ser irreversible y podría deberse a una mutación en los genes que codifican las enzimas metil-transferasas implicadas en la síntesis de los glicopeptidolípidos de la pared (Arenskotter et al. 2004).

La tipología de pared celular de los miembros del genero *Gordonia* corresponde a una pared de quimiotipo IV según Lechevalier y Lechevalier (Lechevalier MP 1974). El peptidoglicano que la compone es de tipo A1 γ , contiene ácido meso-diaminopimélico como único diamino-ácido y ácido murámico con residuos N-glicosil. Los azúcares

mayoritarios presentes en la pared son arabinosa y galactosa. En cuanto a la longitud de los ácidos micólicos varía entre 44 y 66 átomos de carbono, mayoritariamente ramificados, saturados (o mono insaturados) y de tipo 10 metil (ácido tuberculoesteárico). Respecto a los lípidos polares, típicamente están compuestos por difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilinositol manósidos. Las células contiene mayoritariamente MK-9 (H2) como isoprenoide predominante. Solo en algunas especies se aprecian trazas de MK-8 (H2) (Arenskötter M, Baumeister D, Berekaa MM, Pötter G, Kroppenstedt RM, Linos A 2001; Arenskotter et al. 2004; Bendinger et al. 1993). Esta peculiar composición de pared así como las propiedades quimiotaxonómicas mencionadas anteriormente, permiten separar claramente a este género de otros como *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Skermania* (Arenskotter et al. 2004).

1.1.3. Hábitat

Los miembros del género *Gordonia* han podido ser aislados de muestras de suelo y de distintos ecosistemas acuáticos, incluyendo sedimentos marinos y manglares. También es habitual localizarlos en hábitats próximos o relacionados con la actividad industrial humana, como en biofiltros de depuradoras, aguas residuales industriales, biorreactores, tanques de lodos activados y aireados, y suelos próximos a áreas industriales donde se manipulan productos derivados de aceites o hidrocarburos, de hecho muchos de estos microorganismos han sido aislados gracias a su capacidad para producir espuma, ya que entre sus propiedades metabólicas se halla la de sintetizar surfactantes (Goodfellow & Maldonado 2006).

En cuanto al ámbito clínico, en los últimos años se ha detectado un mayor aumento de las identificaciones de especies del género *Gordonia* (*G. bronchialis*, *G. sputi*, *G. rubripertincta*), como causantes de infecciones oportunistas y respiratorias en pacientes hospitalarios, especialmente en individuos con un sistema inmunitario debilitado. Este incremento podría explicarse, más que por un aumento de las infecciones, por un

mejor diagnóstico de estas, ya que anteriormente este tipo de infecciones se catalogaban dentro de las producidas por patógenos pertenecientes al grupo de los actinomicetos aerobios, habitualmente se diagnosticaban como causadas por *Mycobacterium* y *Nocardia* (Goodfellow & Maldonado 2006).

1.1.4. Taxonomía

El género *Gordonia* pertenece al suborden Corynebacterineae, formado por un grupo de bacterias Gram positivas o variables que se caracterizan por contener ácidos micólicos en su pared, este grupo pertenece al orden de los Actinomycetales, aunque su clasificación ha cambiado en las últimas décadas, con la reclasificación de muchas especies ya descritas y la identificación y clasificación de otras nuevas en los últimos años.

El taxón *Gordonia*, es el género tipo de la familia Gordoniaceae, al cual también pertenece el género *Williamsia*. Este género fue creado por Tsukamura en 1971 e inicialmente llamado *Gordona* en honor de la microbióloga Ruth E. Gordon (Tsukamura & Mizuno 1971). Inicialmente el género *Gordona* incluía actinomicetos de crecimiento rápido y de carácter ligeramente ácido que habían sido aislados de muestras de suelo y de esputo de pacientes con enfermedades pulmonares. Las tres especies que inicialmente formaron este taxón fueron *G. bronchialis*, *G. rubra* y *G. terrae*. En 1977 se publicó una reclasificación y estas mismas especies fueron renombradas como *Rhodococcus bronchialis*, *R. rubra* y *R. terrae* e incluidas en el género *Rhodococcus* (Goodfellow and Alderson 1977; Goodfellow et al. 1974). A finales de la década de los 80 hubo una nueva reclasificación debido a que se observó que las especies inicialmente incluidas en el género *Gordona*, mostraban diferencias determinantes respecto a los miembros del género *Rhodococcus*, en concreto una sensibilidad a antibióticos diferente, un perfil electroforético de proteínas distinto y una composición de pared en la cual los ácidos micólicos eran de entre 48 y 66 átomos de carbono, y además la mayoría de sus menaquinonas eran

dihidrogenadas y contenían nueve unidades de isopreno [MK-9 (H2)], mientras que el resto de especies incluidas en el género *Rhodococcus* se caracterizaban por tener ácidos micólicos más cortos, de entre 34 a 52 carbonos y sus menaquinonas son dihidrogenadas y con ocho unidades de isopreno, de modo que en 1988 Starkebrandt et al., restablecieron el género *Gordonia* incluyendo en el las especies *G. bronchialis*, *G. rubra*, *G. rubripertincta* and *G. terrae* (Arenskotter et al. 2004; Goodfellow & Maldonado 2006; Stackebrandt 1988). Estudios adicionales sobre el rRNA 16s realizados por Stackebrandt y Rainey (Stackebrandt E, Rainey FA 1997), acabaron de confirmar esta reclasificación e hicieron que otras especies anteriormente incluidas en el género *Rhodococcus* y *Nocardia*, fueran incluidas en el género *Gordonia*, en concreto *Rhodococcus sputi*, que fue renombrado como *G. sputi*, *Rhodococcus aichiensis* que fue renombrado como *G. aichiensis* y *Nocardia amarae*, renombrada como *G. amarae*, quedando bien definido este género dentro del orden Actinomycetales.

En 1997, Stackebrandt et al., propusieron la corrección del nombre del género, cambiando de *Gordona* a *Gordonia*. En la última revisión publicada sobre este género en 2012 se da como número válido de especies incluidas en el género *Gordonia* un total de 32 (Drzyzga 2012; Stackebrandt E, Rainey FA 1997).

Género	Acyl a	Menaquinona mayoritaria	PE b	AGC c	AM d
<i>Gordonia</i>	G	MK-9 (H2)	+	S, U, T	48-66
<i>Skermania</i>	G	MK-8 (H4 v-cys)	+	S, U, T	58-64
<i>Corynebacterium</i>	A	MK-8 (H2)	-	S, U	22-36
<i>Turicella</i>	ND	MK-10, MK-11	ND	S, U, T	-
<i>Dierzia</i>	A	MK-8 (H2)	-	S, U, T	34-38
<i>Mycobacterium</i>	G	MK-9 (H2)	+	S, U, T	70-90
<i>Nocardia</i>	G	MK-8 (H4 v-cys)	+	S, U, T	50-62
<i>Rhodococcus</i>	G	MK-8 (H2)	+	S, U, T	34-54
<i>Tsukamurella</i>	G	MK-9	+	S, U, T	64-78
<i>Williamsia</i>	G	MK-9 (H2)	+	S, U, T	50-56

Figura 1. Generalidades de las propiedades bioquímicas de las paredes de los miembros del grupo Corynebacterineae. Acyl a: Informa del tipo de acil,

siendo G es ácido murámico glicosilado, A es ácido murámico acetilado y ND que no se ha determinado. PE b: Informa de la presencia o ausencia de fosfatidiletanolamina. - indica ausencia, + presencia y ND que no se ha determinado. AGC c: Muestra el tipo de composición de los ácidos grasos, S indica que son saturados, U que son insaturados y T que se trata de ácido tuberculoesteárico. AM d: Informa de la longitud de la cadena de carbonos de los ácidos micólicos.

De acuerdo con esta nueva clasificación, *Gordonia* es el género tipo de la familia Gordoniaceae, perteneciendo a esta familia también el género *Skermania*, y quedando incluido este género dentro del suborden Corynebacterineae, que incluye a los géneros *Dietzia*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Williamsia*, *Rhodococcus*, *Skermania*, *Tsukamurella* y *Nocardia* (Arenskotter et al. 2004; Goodfellow & Maldonado 2006).

1.1.4.1. Taxonomía genética del género *Gordonia*

El contenido de G+C del DNA del género *Gordoniae* se encuentra entre el 63 y 69 mol%, variando la similitud entre los DNA genómicos de los miembros del género desde el 3.7% entre *Gordonia nítida* y *G. amarae* al 52% entre *G. alkanivorans* y *G. rubripertincta*.

La secuencia del DNA ribosomal 16S (rDNA) de las especies de *Gordonia* muestra similitudes del rango de 94.8% entre *G. amarae* y *G. sihwensis* hasta del 99.9% entre *G. alkanivorans* y *G. nítida*. Las regiones de mayor variación en la secuencia de la región 16S del rDNA se localizan en dos secuencias hipervariables localizadas entre los nucleótidos 136 a 229 y entre 996 y 1028 (de acuerdo con la numeración del rDNA 16S K-12 de *E. coli*). Todas las especies muestran diferencias en estas regiones a excepción de *G. alkanivorans* y *G. nítida* (Arenskotter et al. 2004).

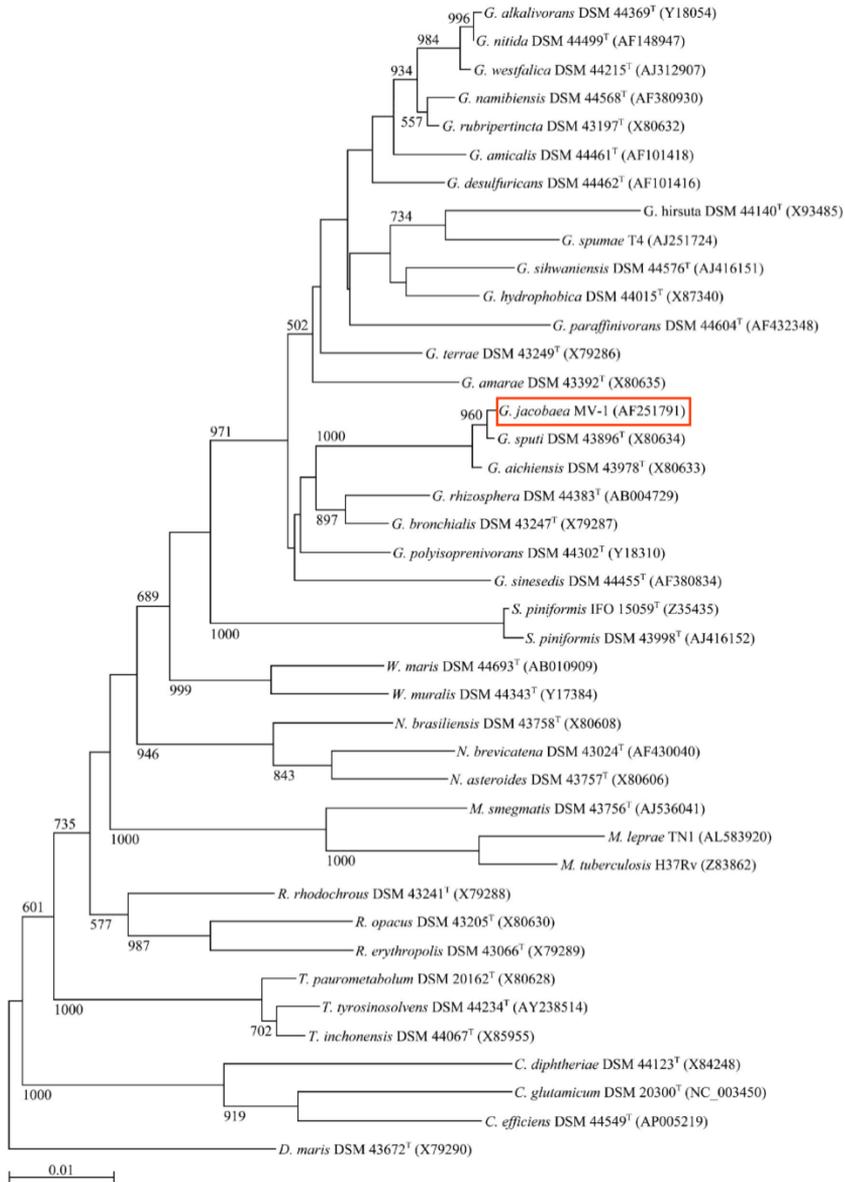


Figura 2. Dendrograma basado en la similitud de las secuencias 16S del rDNA, de *Gordonia* y otros representantes de actinomicetos incluyendo los géneros *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Skermania*, *Tsukamurella* y *Williamsia*. El número de nodos indica el nivel de confianza sobre la base de la proximidad en el análisis de 1000 muestras. Solo se muestran los valores superiores a un 50% de confianza (Arenskotter et al. 2004).

1.1.5. Interés industrial del género *Gordonia*: capacidad biodegradadora y biosintética

El género *Gordonia* contiene microorganismo de gran interés medioambiental y biotecnológico, y es un gran candidato a su uso industrial, gracias a las propiedades biodegradadoras de sus miembros, los cuales pueden degradar hidrocarburos, así como otros contaminante, tóxico, xenobióticos y compuestos naturales difíciles de eliminar. Igualmente su potencial metabólico y la tipología de las moléculas que puede sintetizar, también hacen de *Gordonia*, un buen candidato a ser una bacteria de interés industrial (Drzyzga 2012).

1.1.5.1 Propiedades anabólicas

Las especies del género *Gordonia* resultan interesantes a nivel industrial y científico por la gran variedad de compuestos que pueden producir y la diversidad de aplicaciones que se les pueden otorgar. El número de publicaciones que describen nuevos compuestos obtenidos a partir de *Gordonia* es cada vez mayor. La variedad de sustancias sintetizadas por estos microorganismos va desde la L-lisina y algunos de sus análogos, a moléculas más complejas como el gordonano, un polisacárido ácido (que induce la agregación de la línea celular de insectos BM-N4) y que en *Gordonia* podría estar implicado en la formación de *biofilm* (Kondo et al. 2000). Algunas de estas sustancias son sintetizadas exclusivamente por especies del género *Gordonia*, aunque también hay otros compuestos que son producidos por otros géneros bacterianos. Algunas de las sustancias más interesantes sintetizadas por *Gordonia* se enumeran a continuación (Arenskotter et al. 2004; Drzyzga 2012):

1.1.5.1.1 Biosurfactantes

Las cualidades del género *Gordonia* para degradar sustancias insolubles e hidrofóbicas en aguas contaminadas está directamente asociada a su capacidad para producir sustancias biogénicas

tensioactivas de tipo biosurfactante. La eficiencia de este género en cuanto a microorganismo de interés biorremediador en este campo se debe a tres factores principales. En primer lugar el propio ácido micólico de la pared de estos microorganismos favorece la adhesión de las células bacterianas a la fase hidrofóbica de sustancias contaminantes hidrofóbicas, en segundo lugar los surfactantes producidos por *Gordonia* facilitan el acceso de los compuestos hidrofóbicos a la superficie microbiana gracias a una disminución de la tensión superficial, y por último estos mismos surfactantes ayudan a dispersar los compuestos hidrofóbicos, permitiendo que los microorganismos puedan acceder a ellos y degradarlos.

Negativamente los biosurfactantes también pueden provocar una dispersión no deseada de contaminantes hidrofóbicos en medios acuosos. La producción de surfactantes ha sido descrita en varias especies de *Gordonia*, en concreto *G. amarae* es la especie más estudiada del género en cuanto a producción de estas sustancias, aunque también ha sido descrita esta actividad en *G. cholesterolivorans* y en otras cepas de este género (Lechevalier MP 1974; Dogan et al. 2006; Pagilla et al. 2002; Iwahori et al. 2001; Drzyzga et al. 2009; Fusconi R, Leal Godinho MJ, Cruz Hernández IL & NR. 2006; Fusconi & Godinho 2002; Franzetti et al. 2009; Franzetti et al. 2008; Drzyzga 2012; Arenskotter et al. 2004; Saeki et al. 2009; Wang et al. 2009; Nazina et al.).

1.1.5.1.2. Carotenoides

Algunas bacterias Gram positivas, incluyendo especies de los géneros *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* y *Mycobacterium* tienen la capacidad de sintetizar diferentes tipos de carotenoides. Estas sustancias además de proporcionar color también pueden ser interesantes a nivel industrial como precursores de vitaminas. Algunas especies de *Gordonia* también producen colonias con pigmentación rojiza, indicando su capacidad para sintetizar cantidades importantes de estos pigmentos, de hecho *Gordonia jacobaea*, fue identificada por su

gran capacidad para producir este tipo de pigmentos y es la primera especie de *Gordonia* productora de carotenoides que se ha caracterizado. Se estima que *Gordonia jacobaea* MV-1 contiene aproximadamente 200 µg de cetocarotenoide todo-trans-cantaxantina (4-4' di-ceto-β-caroteno) por gramo de peso seco, así como cantidades menores de otros tipos de trans-cantaxantinas (de Miguel et al. 2001; de Miguel et al. 2000; Veiga-Crespo et al. 2005). Con posterioridad a *G. jacobaea*, también se han descrito producción de este tipo de pigmentos en dos especies más de este género, concretamente en la cepa AIST-1 de *G. terrae* (Takaichi et al. 2008) y en la cepa mutante 47-46 de *G. polyisoprenivorans* (Arenskotter et al. 2004).

1.1.5.1.3. Ácido 1 y 2 imidazol amino

Los imidazoles son sustancias que muestran una gran variedad de actividades biológicas y son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica. Derivados de estas sustancias pueden actuar desde como drogas antihistamínicas a sedantes para combatir el insomnio, funcionar como antifúngicos e incluso como anticonvulsivos. Alrededor de 61 especies bacterianas de distintos géneros con actividad alcano-oxidante han sido ensayadas por su actividad para oxidar el N-(2-hexilamino-4-fenilimidazol 1-yl)-acetamida a ácido imidazol-2-yl amino, 5 de estas especies han mostrado una gran capacidad para realizar este proceso y de estas 2 pertenecen al género *Gordonia*, concretamente se trata de *G. rubropertincta* y *G. terrae* (Mikolasch et al. 2003; Arenskotter et al. 2004; Drzyzga 2012).

1.1.5.1.4. Gordonano

Muchas especies bacterianas poseen la capacidad de producir polisacáridos extracelulares en respuesta a distintas condiciones medio ambientales. Ejemplos como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*, producen ácidos polisacáridos como componente principal en la formación de comunidades sésiles, que dan lugar a la formación de *biofilm*. La formación de estos *biofilm* se considera esencial en la patogenicidad de estas especies. En el caso del

gordonano, es un polisacárido ácido aislado de *Gordonia*, el cual se ha observado que propiciaba la agregación de células de la línea celular BM-N4 del insecto *Bombyx mori*. El gordonano es una molécula compuesta por repeticiones de unidades de trisacáridos, que favorecen los procesos de infección y fijación a estructuras del huésped y por el momento se ha podido obtener de la cepa Y-102 de *Gordonia spp.* A pesar de esta función patógena, este compuesto podría tener un gran interés en la industria farmacéutica (Kondo et al. 2000).

1.1.5.1.5. Gordonina

Durante un estudio comparativo de la composición de los diferentes constituyentes de la pared bacteriana entre colonias rugosas y lisas de *G. hydrophobica*, se identificó un peptidolípido monoglicosilado al cual se le denominó gordonina. El carácter anfipático de muchos de estos peptidolípidos, otorga a estos compuestos distintas funciones biológicas, que van desde acciones hemolíticas, antibióticas e incluso propiedades como inhibidores de enzimas. Para *Gordonia*, al igual que para otros microorganismos que poseen este tipo de compuestos, se supone que estos peptidolípidos se encuentran inmersos en la pared celular, de modo que la cola hidrofóbica de los mismos interactuaría con los ácidos micólicos de la pared, también de carácter hidrofóbico, mientras que la parte hidrofílica estaría expuesta al medio, contribuyendo significativamente a las características fisicoquímicas de la pared y permitiendo una mejor interacción de la bacteria con el medio acuoso externo y el mantenimiento de las células en suspensión (Moormann et al. 1997).

1.1.5.1.6. Micobactina

Las micobactinas son sideróforos que captan iones de hierro del medio y facilitan su entrada dentro de la célula bacteriana. Son sintetizadas por distintos tipos de micobacterias, entre las que se encuentra *G. rubripertincta*. Una característica peculiar de estos compuestos es que existen especies que no pueden producirlas, como *M. paratuberculosis* o *M. avium*, y en estos casos, estas bacterias pueden utilizar las

micobactinas liberadas por otros microorganismos para poder captar estos iones de hierro (Tsukamura & Mizuno 1971; Drzyzga 2012).

1.1.5.1.7. Esteroides

Los esteroides son sustancias de estructura compleja y de gran interés para la industria farmacéutica. Recientemente se ha observado que una nueva especie, *G. australis* produce y secreta al medio un conjunto de esteroides llamado bendigoles, de estas moléculas, el bendigol C ha mostrado afinidad por la progesterona humana y el tipo A ha mostrado afinidad por el receptor de andrógenos, siendo candidatas a moléculas de interés para la industria farmacéutica (Schneider et al. 2008).

1.1.5.1.8. Exopolisacáridos

El petróleo y sus derivados son los mayores agentes contaminantes de las aguas marinas. Algunos microorganismos pueden sintetizar sustancias que pueden modificar los compuestos heterocíclicos y que podrían ser utilizados a nivel industrial para reducir el impacto contaminante de estos. Algunas cepas de *Gordonia*, entre las que se encuentra la CC-JG39 de *G. alkanivorans*, se han caracterizado por su capacidad para desulfurizar el benzotiofeno (BT) y el dibenzotiofeno (DBT) componentes naturales del petróleo, y de este modo favorecer su degradación (Ta-Chen et al. 2008).

<u>Especie</u>	<u>Sustancias producidas de mayor interés</u>
<i>G. alkanivorans</i>	Exopolisacáridos
<i>G. amarae</i>	Biosurfactantes
<i>G. cholesterolivorans</i>	Biosurfactantes
<i>G. hydrophobica</i>	Gordonina
<i>G. jacobaea</i>	Carotenoides
<i>G. polyisoprenivorans</i>	Biosurfactantes, carotenoides
<i>G. rubripertincta</i>	Micobactinas, acido 1 y 2 imidazol amino
<i>G. terrae</i>	Carotenoides, acido 1 y 2 imidazol amino
<i>Gordonia sp.</i>	Esteroides , biosurfactantes, gordonano

Figura 3. Principales sustancias de interés industrial y biomédico producidas por miembros del género *Gordonia*.

1.1.5.2. Propiedades catabólicas y bioremediadoras

Los miembros del género *Gordonia* son unos prometedores candidatos como organismos biodegradadores, de hecho algunas especies de este género, han sido aisladas gracias a su capacidad para degradar o modificar hidrocarburos alifáticos y aromáticos, compuestos aromáticos halogenados, benzotiofenos, nitrilos, poliisoprenos, xileno y otros compuestos orgánicos. Las largas cadenas alifáticas de los ácidos micólicos, de la pared de estas bacterias, responsables de su gran hidrofobicidad, podrían estar relacionadas con su facultad para adherirse a materiales hidrófobos como los plásticos, gomas, hidrocarburos, etc. y favorecer la degradación de estos materiales. Muchas de estas sustancias son foco de interés por su carácter contaminante y tóxico, otras por ser productos residuales industriales, domésticos, etc. Por este motivo *Gordonia* podría tener un importante papel en los procesos de depuración de aguas y en biofiltros, así como en procesos de reciclado y eliminación. Algunos de los compuestos que se ha identificado que pueden ser degradados por miembros del género *Gordonia* (Arenskotter et al. 2004; Drzyzga 2012), son:

1.1.5.2.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), son sustancias contaminantes derivadas de los combustibles fósiles, que pueden ser degradados por distintas especies de *Gordonia*. Los pirenos, un tipo de PAH, son degradados por la cepa HBS1 de *G. amicalis*. De esta cepa, se han publicado eficiencias de biodegradación de hasta el 97% de pirenos con una concentración inicial de 50 mg/l en tan solo 17 días. Esta cepa también ha mostrado capacidad biodegradadora ante xenobióticos como el benzoantraceno, el benzopireno, el indeno y el fluorantreno (Xu et al. 2011).

Las alquiperidinas son contaminantes ambientales tóxicos, se trata de compuestos aromáticos heterocíclicos difícilmente biodegradables de los cuales hay pocos estudios que describan una degradación por parte de microorganismo. Las piridinas, un tipo de alquiperidina, se

obtienen de los combustibles fósiles y es un sustrato utilizado en la industria agroquímica y farmacéutica, las cuales se ha observado que pueden ser degradadas por *G. terrae* y *G. nitida*. En el caso de *G. terrae*, se ha observado que la cepa IIPN1 puede llegar a degradar por completo las piridinas de aguas contaminadas en 5 días partiendo de concentraciones de 30 Mm (Arenskötter et al. 2005; Drzyzga 2012; Lee et al. 2001; Stobdan et al. 2008).

Otras fuentes de carbono difícilmente accesibles como el t-butil éter (ETBE), metil t-butil éter (MTBE), t-amil metil éter (TAME), alcanos-cíclicos y otros tipos de hidrocarburos aromáticos policíclicos, también se ha observado que pueden ser degradados por *G. terrae*. Esta habilidad catabólica muy probablemente se vea facilitada gracias a la capacidad por parte de estos microorganismos de producir biosurfactantes. Entre las especies de *Gordonia* que han mostrado esta actividad se encuentran *Gordonia alkanivorans* y *G. amarae* (Shavandi & Sadeghizadeh 2010; Mohebbali et al. 2008; Hernandez-Perez et al. 2001; Kästner et al. 1998).

1.1.5.2.2. Ésteres de ácido ftálico

Los ésteres del ácido ftálico, son sustancias que se añaden a los plásticos para modificar propiedades como la flexibilidad o la transparencia. A nivel orgánico ejercen una acción hormonal a través de su unión a receptores de estrógenos, estimulando la proliferación celular. Este tipo de compuesto puede ser degradado por varias cepas de *Gordonia*, de las cuales no se ha determinado la especie y que utilizan los productos de degradación de estos compuestos como fuentes de carbono (Chatterjee et al. 2005; Nishioka et al. 2006).

1.1.5.2.3. s-Triazinas

Las triazinas son sustancias xenobióticas ambientales, con estructura heterocíclica que pueden ser degradadas por miembros del género *Gordonia*. La cepa DSM 10347 de *G. rubripertinctincta* posee la enzima 1,3,5-triazina hidrolasa que es inducible y tiene la capacidad de

declarar la 1,3,5-triazina facilitando de este modo su degradación (Cook AM 1986; Cook AM 1984).

1.1.5.2.4. Gomas naturales y sintéticas

La capacidad de degradar gomas con base de isopreno (cis-1,4-poliisopreno) tanto naturales como sintéticas no es frecuente a nivel bacteriano. Varias cepas de *G. polyisoprenivorans* y *G. westfalica* han mostrado poder degradar los cis-1,4-poliisoprenos, la primera cepa descrita fue la Kd2^T, posteriormente las cepas VH2 y Y2K también lo han mostrado. No se conoce por el momento como se da esta acción biodegradadora, aunque los autores proponen que esta capacidad se ve facilitada por las propiedades hidrofóbicas de las paredes de estos microorganismos que pueden adherirse a estas sustancias, y posiblemente también a la capacidad productora de biosurfactantes (Linos et al. 1999; Linos et al. 2002; Arenskötter M, Baumeister D, Berekaa MM, Pötter G, Kroppenstedt RM, Linos A 2001).

1.1.5.2.5. Petróleo y derivados

El dibenzotiofeno (DBT) está considerado como un modelo de compuestos representativo de la fracción aromática organosulfurada tanto de los aceites crudos (combustibles fósiles) como del carbón. Varias especies de *Gordonia*, entre ellas *G. nitidia*, *G. desulfuricans* y *G. amicalis*, han sido caracterizadas por su capacidad para desulfurar el DBT y los benzotiofenos (Kim et al. 2000; Drzyzga 2012; Kim et al. 1999).

1.1.5.2.6. Esteroides

Algunas especies del género *Gordonia* poseen la capacidad de degradar, mineralizar y utilizar como fuente de carbono, distintos tipos de compuestos esteroidales como colesterol, ergosterol y estigmasterol, y en algunos casos como *G. cholesterolivorans*, hacerlo de forma muy eficiente. Otras especies como *G. amarae*, *G. hydrophobica*, *G. neofelifaecis*, *G. sihwensis* y *G. terrae*, entre otras, también han mostrado que pueden utilizar sustancias estrogénicas como fuente de carbono. Este tipo de capacidad metabólica es de gran interés ya que

frecuentemente se detectan sustancias estrogénicas en las aguas residuales domésticas y ambientales, y estos compuestos pueden provocar disrupciones metabólicas tanto en las personas como en la fauna que las consumen (Drzyzga 2012; Drzyzga et al. 2009; Drzyzga et al. 2011; Liu et al. 2011).

Especie	Compuestos biodegradados
<i>G. alkanivorans</i>	Alcanos Dibenzotiofeno
<i>G. amarae</i>	Sustancias estrogénicas
<i>G. amicalis</i>	Pirenos y dibenzopirenos
<i>G. cholesterolivorans</i>	Colesterol, esteroides
<i>G. desulfuricans</i>	Benzothiophenos
<i>G. hirsuta</i>	Aldehídos y cetonas
<i>G. hydrophobica</i>	Aldehídos y cetonas, colesterol
<i>G. kroppenstedtii</i>	Fenol
<i>G. namibiensis</i>	Compuestos de nitrilo
<i>G. neofelifaecis</i>	Colesterol
<i>G. nitida</i>	3-metil y 3-dietilpiridina
<i>G. paraffinivorans</i>	Hidrocarburos
<i>G. polyisoprenivorans</i>	Gomas, hexano
<i>G. rubripertincta</i>	Benzotiofeno, sustancias estrogénicas
<i>G. silhwensis</i>	Colesterol
<i>G. terrae</i>	MTBE, ETBE, TAME , sustancias estrogénicas
<i>G. westfalica</i>	Gomas

Figura 4. Principales compuestos biodegradados por miembros del género *Gordonia*.

1.1.6. Patogenicidad de *Gordonia*: antecedentes de infecciones

Muchas especies del género *Gordonia* han sido aisladas de fuentes ambientales, pero algunas también han sido asociadas a infecciones humanas. En estos casos los pacientes solían ser individuos inmunodeprimidos, cateterizados o afectados por infecciones previas, de modo que en general las infecciones causadas por *Gordonia* sólo se

producían secundariamente, por lo que esta bacteria se la puede considerar un patógeno oportunista (Arenskotter et al. 2004). En cuanto al tratamiento antimicrobiano empleado no se ha publicado un protocolo consensuado, y en cada caso se utiliza una combinación de antibióticos diferente. Los datos recogidos también sugieren que a diferencia de otros actinomicetos, *Gordonia* es susceptible a una amplia gama de antibióticos, entre los que se encuentran aminoglicósidos, betalactámicos (aztreonam, cefalosporinas y penicilinas) con o sin betalactamasas, carbapenems, fosfomicinas, fluoroquinolonas, glicopéptidos, lincosamidas, macrólidos y rifampicina. La mayoría de los casos de infecciones causadas por miembros del género *Gordonia* al ser tratados con estos antibióticos, mostraron recuperaciones totales después de 6 a 12 semanas de tratamiento (Drzyzga 2012; Johnson et al. 2011).

A pesar de estos datos, *Gordonia* sigue siendo responsable de infecciones relativamente raras. Este hecho se pudo observar en un estudio llevado a cabo en Tailandia entre 1996 y 2003 y en el que se analizaron 171 muestras recogidas de infecciones por actinomicetos aeróbicos, y en el que sólo un 6% de los casos eran causados por especies de *Gordonia*, mientras que el resto de los casos, eran mayormente provocados por *Nocardia spp* (Poonwan et al. 2005).

<i>Nocardia spp.</i>	56%
<i>Mycobacterium spp.</i>	12%
<i>Streptomyces spp.</i>	11%
<i>Rhodococcus spp.</i>	8%
<i>Rhodococcus spp.</i>	8%
<i>Gordonia spp.</i>	6%
<i>Tsukamura spp.</i>	0.6%
<i>Corynebacterium spp.</i>	0.6%

Figura 5. Porcentaje relativo de las infecciones causadas por miembros del grupo de las Corinebacterias.

En los últimos años se han diagnosticado un mayor número de infecciones causadas por miembros del género *Gordonia*, pero los estudios sugieren que esto se debe a la mejora en los sistemas de diagnóstico más que a un incremento real en la incidencia de las infecciones por *Gordonia*. De hecho en un estudio en el que se recogieron 66 muestras de 30 pacientes entre los años 1997 y 2008, que inicialmente se habían diagnosticado como causados por *Rhodococcus* en base a métodos bioquímicos convencionales, se observó que aproximadamente el 25% de los casos se debían realmente a infecciones causadas por especies del género *Gordonia*, esta vez identificadas con métodos moleculares como la secuenciación del gen 16S rRNA y a pruebas de polimorfismo del gen hsp65 (Drzyzga 2012; Lai et al. 2010a).

1.1.6.1. Infecciones pulmonares

El primero en identificar microorganismos del género *Gordonia* en muestras de pacientes con tuberculosis pulmonar cavitaria fue Tsukamura en 1971 (Tsukamura & Mizuno 1971), quien identificó en estos pacientes las especies *G. terrae*, *G. rubra* y *G. bronchialis*. La primera especie de *Gordonia* identificada como responsable de una infección fue a *G. rubropertincta* y se trató de una infección pulmonar diagnosticada en una paciente de 29 años, a la cual inicialmente se la había diagnosticado de tuberculosis, la confusión se aclaró al no observar micobacterias en el esputo y si numerosos bacilos Gram positivos como único microorganismo, atribuyéndosele de este modo la causa de la infección. Este caso fue tratado positivamente con dexiciclina y terapia antituberculosa oral incluyendo rifampicina. Después de este primer caso se han diagnosticado infecciones pulmonares causadas por *G. bronchialis*, *G. effusa*, *G. polyisoprevivorans*, *G. rubripertincta*, *G. sputi*, y *G. otiditis* (Johnson et al. 2011; Hart et al. 1988; Drzyzga 2012; Iida et al. 2005; Renvoise et al. 2009; Kageyama et al. 2006).

1.1.6.2. Bacteriemias

Se han descrito múltiples casos de bacteriemias causadas por distintas especies de *Gordonia*, en la mayoría de los casos se trataba de infecciones secundarias tras operaciones quirúrgicas como *bypass*, cirugías o cateterismos, y en pacientes inmunodeprimidos o con enfermedades como diabetes, hepatitis, VIH positivos, cáncer, etc. *G. araii* se ha aislado en pacientes con problemas renales y tras cirugías ortopédicas (Jannat-Khah et al. 2009; Kageyama et al. 2006). *G. bronchialis* ha sido hallada en pacientes con cáncer, diabetes, sometidos a *bypass*, con cateterismos y en neonatos prematuros sometidos a cirugía (Johnson et al. 2011; Brust et al. 2009; Blaschke et al. 2007; Werno et al. 2005; Sng et al. 2004; Richet HM, Craven PC, Brown JM, Lasker BA, Cox CD, McNeil MM, Tice AD, Jarvis WR 1991; Siddiqui et al. 2012). *G. otiditis* se ha aislado en un paciente con necrosis intestinal tratado por cateterismo (Blaschke et al. 2007). *G. polyisoprenivorans* se ha aislado en pacientes con cateterismos y afectados por leucemia (Gupta et al. 2010; Verma et al. 2006; Kempf et al. 2004). *G. sputi* se ha identificado en múltiples casos de pacientes cateterizados afectados por lupus, cáncer, hepatitis, etc. (Renvoise et al. 2009; Lai et al. 2010b; Kofteridis et al. n.d.; Kofteridis et al. 2012; Brust et al. 2009). *G. terra*, también se ha encontrado en múltiples casos de cateterismos en pacientes afectados por cáncer, o hepatitis (Blaschke et al. 2007; Pham et al. 2003; Buchman et al. 1992).

1.1.6.3. Infecciones de heridas quirúrgicas

En 1991 se informó de uno de los primeros casos de infección postquirúrgica causada por *Gordonia bronchialis*, en ese momento denominada *Rhodococcus bronchialis* (Richet HM, Craven PC, Brown JM, Lasker BA, Cox CD, McNeil MM, Tice AD, Jarvis WR 1991). Posteriormente se han publicado infecciones en heridas quirúrgicas tras tratamientos ortopédicos o cateterismos, causadas por *G. araii*, *G. polyisoprenivorans* y *G. sputi* (Jannat-Khah et al. 2009; Verma et al. 2006; Kuwabara et al. 1999).

1.1.6.4. Infecciones localizadas

Gordonia sputi y *G. terrae* han sido identificadas como causantes de infecciones oculares causando queratitis y conjuntivitis (Lai et al. 2010a), y *G. terrae* y *G. amicalis* se han hallado en infecciones cutáneas (Kampfer et al. 2012; Lai et al. 2012).

Especie	Nivel de bioseguridad	Efecto patológico	Condiciones subyacentes
<i>G. araii</i>	(1; 2; 2)	Infección	Cirugía ortopédica tornillo cónico bioabsorbible
<i>G. bronchialis</i>	(2; 2 por.; 2)	Aislada de esputo Bacteriemia infección pleural Osteomielitis Bacteriemia Infección Absceso mamario recurrente Bacteriemia pulmonar	Paciente con bacteriemia e infección pleural Linfoma, esplenectomía, cáncer de pecho Paciente diabético Neonato prematuro Adenoma hipofisario Diabetes
<i>G. otididis</i>	(2; 2 por.; 2)	Infección de la herida esternal Bacteriemia por CVC Otitis	Cirugía por <i>bypass</i> Fiebre periódica necrosis de los intestinos
<i>G. effusa</i>	(1; 2 por.; 2)	Infección del fluido pleural Neumonía bacteriana	Bronquitis
<i>G. polyisopenicillans</i>	(1; -; -)	Bacteriemia por CVC Bacteriemia Bacteriemia	Neumonía y leucemia Cateterismo y endocarditis
<i>G. rubripertincta</i>	(1; -; 1)	Bacteriemia Infección pulmonar	Leucemia y trasplante de médula Tuberculosis

Especie	Nivel de bioseguridad	Efecto patológico	Condiciones subyacentes
<i>G. sputi</i>	(2; 2 por.; 2)	Bacteriemia	Lupus eritematoso, hipertensión pulmonar
		Bacteriemia por CVC	Hepatitis C, hipertensión pulmonar
		Bacteriemia por CVC	Isquemia mesentérica, nutrición total parenteral
		Bacteriemia	Neumonía y derrame pleural
		Bacteriemia por CVC	Síndrome del intestino corto y alimentación parenteral total
		Bacteriemia	Cáncer gástrico y diabetes
		Bacteriemia por CVC	Cáncer de laringe
		Mediastinitis	Cirugía
<i>G. sputi</i>	(2; -; 1)	Bacteriemia	Lesión cutánea, melanoma y metástasis, tratamiento con interleuquina 2
		Bacteriemia	Cateterismo
		Bacteriemia	Cateterismo en paciente con cáncer de mama
<i>G. terrae</i>	(2; -; 1)	Bacteriemia por CVC	Sepsis y abuso de metadona
		Bacteriemia por CVC	Tumor de Wilm
		Bacteriemia por CVC	Leucemia
		Bacteriemia por CVC	Síndrome de Lach
		Bacteriemia	Colecistitis aguda y hepatitis
		Mastitis supurativa granulomatosa	
		Bacteriemia por CVC	Leucemia
		Bacteriemia por CVC	Tumor cerebral
		Bacteriemia por CVC	Leucemia
		Bacteriemia por CVC	Cáncer y metástasis

Especie	Nivel de bioseguridad	Efecto patológico	Condiciones subyacentes
<i>G. terrae</i>		Bacteriemia por CVC Absceso cerebral	Cáncer de tiroides y metástasis Tumor de Drancourt
		Bacteriemia por CVC Infección epidérmica	Pseudooclusión intestinal crónica
<i>Gordonia sp. (similar a G. sputi)</i>		Bacteriemia y endocarditis	Esplenectomía, hemoglobinopatía y cirrosis
<i>Gordonia sp.</i>		Bacteriemia por CVC	Cáncer de mama y ovarios

Figura 6. Revisión de los últimos casos de infecciones causadas por especies de *Gordonia*. * Nivel de bioseguridad según la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), JCM (Journal Clinical Microbiology) y NBRC (Biological Resource Centre) respectivamente.

Con exclusión de *G. polyisoprenivorans*, *G. rubripertincta* y *G. terrae*, los demás miembros del género *Gordonia* mostrados en esta tabla, están considerados como material biológico potencialmente patógeno (bioseguridad nivel 2). Estas clasificaciones se basan en la evaluación del riesgo potencial relacionado con la exposición a agentes biológicos (Drzyzga 2012).

1.1.6.5. Transmisión nosocomial

En 1991, se publicó un caso poco usual de infecciones bronquiales en 7 pacientes que se expusieron a una cepa de *G. bronchialis* durante sus respectivas operaciones, debido a la contaminación existente en el quirófano, produciéndose una infección de transmisión nosocomial (Richet HM, Craven PC, Brown JM, Lasker BA, Cox CD, McNeil MM, Tice AD, Jarvis WR 1991). Dicha cepa también fue aislada en el perro de una de las enfermeras que participó en las operaciones.

1.1.7. *Gordonia*, microorganismo de la microbiota normal

Además de en pacientes con infecciones, también se ha identificado a miembros del género *Gordonia* en la cavidad oral, los cuales podrían

formar parte de la microbiota normal, la especie identificada fue *G. terrae*, y ésta se halló en muestras de placa dental (Drzyzga 2012; Hung et al 2011).

1.2. *Gordonia jacobaea*

Aislada por primera vez en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela, *Gordonia jacobaea* MV-1 es una bacteria bacilar, no formadora de esporas, catalasa positivo, con un porcentaje molar de guaninas citosinas del 61% (determinado con el sistema *thermal hyperchromicity method*) y Gram positiva, que fue caracterizada siguiendo el *Sistema Biolog* (de Miguel et al. 2000). Los resultados obtenidos con el *Sistema Biolog* indicaron que se trataba de una bacteria perteneciente al género *Corynebacterium*, con una similitud del 84% con *C. jeikeium*, siendo dentro de este grupo la especie con la que mostraba un ajuste más cercano. Pero ciertas características de esta cepa, tales como la presencia de carotenoides y la capacidad de utilizar ciertas fuentes de carbono no coincidente con *C. jeikeium*, junto con los estudios de secuenciación del rRNA 16S y el posterior análisis de los resultados obtenidos en la base de datos GenBank®, reveló que la bacteria aislada pertenecía sin ningún tipo de ambigüedad al género *Gordonia*, siendo *G. sputi* la especie más cercana con un grado de similitud del 99.5%. De este modo la bacteria aislada fue propuesta como *G. jacobaea* MV-1 CECT 5282 (Colección Española de Cultivos Tipo), y el número de acceso a su gen 16S rRNA en el GenBank® *Nucleotide Sequence Database* es AF251791 (de Miguel et al. 2000).

1.2.1. Interés industrial

Gordonia jacobaea es una bacteria mesófila cuya temperatura óptima de crecimiento se halla entre los 20 a los 37 grados Celsius, aunque el punto óptimo se sitúa alrededor de los 30 °C, a esta temperatura el crecimiento máximo se da en unas 50h.

Como fuente de carbono puede utilizar distintos sustratos energéticos, entre ellos glicerol, D-fructosa, D-rafinosa, D-glucosa, L-arabinosa y xilosa. En cuanto a su capacidad para producir carotenoides, la temperatura en la que se obtiene la máxima producción se sitúa en los 30 °C, cuantificando las máximas concentraciones de estos pigmentos a las 75 horas de cultivo, y lográndose máximas producciones en medios suplementados con glucosa, un glúcido de bajo coste. Teniendo en cuenta estas características fisiológicas y que una temperatura de 30 °C se considera normal dentro de los procesos industriales, se concluye que *G. jacobaea* posee un interesante potencial dentro de la industria de producción de carotenoides (de Miguel et al. 2001).

1.2.2. Posición taxonómica dentro del género

Los porcentajes de similitud en el alineamiento de las secuencias 16S rRNA de *G. jacobaea* con otros miembros del género son:

99.50%	<i>G. sputi</i>
96.00%	<i>G. rubropertincta</i>
95.80%	<i>G. bronchialis</i>
95.10%	<i>G. terrae</i>

El análisis de la secuencia 16S rRNA muestra dos puntos de variabilidad, mientras que muestra 4 secuencias altamente conservadas con las especies anteriormente mencionadas. Estos puntos son las transversiones en la base 25 (G→C) y la transición en la base 601 (A→G). Además existe una transición entre las secuencias de *G. jacobaea* y *G. sputi* presente en la base 157 (A→G). Otra característica destacable de *G. jacobaea* es la inserción de una adenina en la posición 17, la cual no aparece en las otras especies y dos deleciones en las bases 1414 y 1421, que si se han detectado en *G. sputi* y *G. rubropertincta*. Estas variaciones en el rRNA 16S junto con las diferencias fenotípicas con los otros miembros del género hicieron que *G. jacobaea* se propusiera como una nueva especie en 2001 (de Miguel et al. 2001).

	G. <i>bronchialis</i>	G. <i>rubropertincta</i>	<i>G. sputi</i>	<i>G. terrae</i>	<i>G. jacobaea</i>
D- celobiosa	+	-	+	+	-
D-galactosa	-	+	+	+	-
Meso-inositol	+	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	+	+	-
L-ramnosa	-	-	-	+	-
2,3-butandiol	-	-	+	+	-
Ácido butírico	-	+	-	-	-
L-serina	-	+	-	+	-

Figura 7. Capacidad de crecimiento y utilización de sustratos como fuente de carbono de varios miembros del género *Gordonia* (Veiga-Crespo et al. 2005).

1.3. Porinas bacterianas. Proteínas formadoras de canal

Las membranas celulares actúan como barreras naturales que permiten la compartimentación de las células y en el caso de organismos eucariotas también de los orgánulos. Las células salvan esta barrera gracias a proteínas de canal que se insertan en las membranas y permiten el transporte entre el exterior y el interior de sustratos, solutos y otras sustancias de interés. Las células bacterianas, además de la membrana plasmática, poseen una pared externa que les confiere resistencia, ayuda a mantener su estructura celular y genera una segunda barrera de protección. La naturaleza de esta pared, especialmente en el caso de las bacterias Gram negativas y en los miembros del complejo *Corynebacterium-Nocardia-Mycobacterium* (CNM) evita la entrada de sustancias como sales biliares, agentes antibacterianos (rifampicina, eritromicina), etc., pero también dificulta la entrada de ciertos nutrientes imprescindibles para el crecimiento y desarrollo de las funciones bacterianas. En 1976 se identificó por primera vez en *Salmonella* una proteína de canal que permitía el paso inespecífico de solutos hidrofílicos a través de su membrana externa. A este tipo de proteína formadora de canales de difusión no específicos se la bautizó como porina (Nakae 1976). Desde ese momento se han

identificado porinas en todas las bacterias Gram negativas estudiadas, así como en algunos miembros del grupo CNM (Smit & Nikaido 1978).

1.3.1. Breve descripción del grupo Corynebacterineae

El reino Procariota está dividido en dos grandes dominios, las Archaea y las Eubacterias. Las Eubacterias a su vez se dividen en tres grandes categorías, las bacterias Gram negativas, las Gram positivas y los micoplasmas que carecen de pared celular. Las bacterias Gram positivas se dividen a su vez en dos grandes grupos, las que muestran un genoma con un alto contenido en G+C (>50%) denominadas actinomicetos y las que muestran un bajo contenido de G+C (<50%) entre las cuales se encuentra *Clostridium*, *Bacillus* y *Streptococcus* (Woese 1987). El termino actinomiceto tiene dos raíces griegas, *actino* que quiere decir rayo de luz y *mycete* que quiere decir hongo.

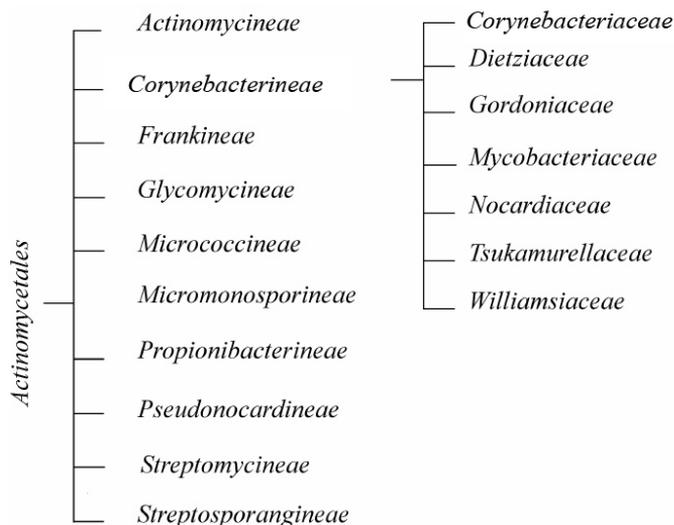


Figura 8. Ubicación del grupo de Corynebacterias dentro del orden Actinomycetales.

Actualmente se sabe que el grupo de los actinomicetos es un grupo evolutivamente heterogéneo. Normalmente son bacilos Gram positivos, que en general crecen mejor en condiciones aeróbicas y en el que algunas especies han mostrado la capacidad de formar micelios ramificados. Los actinomicetos comprenden un gran número de líneas bacterianas y cada vez se describen más especies (Woese et al. 2000). En este grupo se encuentran bacterias productoras de distintos tipos de metabolitos, como por ejemplo antibióticos (estreptomycina) por parte del género *Streptomyces*. Dentro de este orden está ubicado el suborden *Corynebacterineae*, en el cual se encuentran especies responsables de enfermedades como la tuberculosis, la lepra o la difteria, pero en el que también hallamos otras especies interesantes por su capacidad de producir aminoácidos (glutamato, lisina, etc.) y otras sustancias de interés para la industria.

El complejo CNM se caracteriza por poseer una pared celular constituida por una gruesa capa de lípidos y parece estar más relacionado con el grupo de las bacterias Gram negativas, a pesar de comportarse tintóreamente como bacterias Gram positivas. La proximidad entre bacterias Gram negativas y los miembros del complejo CNM se debe a factores como la homología en la secuencia 16s ribosomal y a que ambos grupos poseen una delección de 12 residuos, a diferencia de otros miembros del grupo de las arqueobacterias y del grupo de los Gram positivos (Nikaido 2003). Además, a pesar de que los miembros del orden Corinebacterineae están clasificados como bacterias Gram positivas en base al análisis filogenético de su rRNA 16S, el modelo de pared propuesto para el género *Mycobacterium* y otros miembros de este complejo, incluye la presencia de una membrana lipídica externa similar a la de las bacterias Gram negativas. Y por último el análisis de la glutamina sintetasa, uno de los enzimas más antiguos, también sugieren que las bacterias Gram positivas con niveles altos de G+C, al cual pertenece el complejo CNM, están más relacionadas con las con las bacterias Gram negativas que

con las bacterias Gram positivas con bajos niveles de G+C (Fu 2002; Niederweis 2003).

1.3.1.1. La pared celular en las Corynebacterineae

La pared bacteriana juega un papel vital en el crecimiento y supervivencia de estos microorganismos en medios hostiles. Sus funciones incluyen: dar apoyo a la membrana citoplasmática para soportar la elevada presión osmótica interna, controlar la morfología celular, actuar como mediadora de la adhesión a superficies y a otras células, participar en el transporte de productos entre el interior y el exterior de la célula. Sin embargo la función de la pared bacteriana como barrera en microorganismos Gram negativos, Gram positivos y en la familia de los micolata es diferente.

La membrana externa de las bacterias Gram negativo supone una barrera importante frente al transporte entre el interior y el exterior de la célula de pequeñas moléculas hidrofílicas, reduciendo los niveles de entrada y excluyendo por completo la entrada de moléculas de mayor tamaño. Este grupo bacteriano, para poder adquirir y eliminar sustancias, utiliza porinas. Estas propiedades de barrera son las que le proporciona a este grupo bacteriano su gran resistencia a los antimicrobianos (Lambert 2002).

Las bacterias Gram positivas, por otro lado poseen una pared gruesa de peptidoglicanos que normalmente no restringe la entrada de sustancias hidrosolubles, aunque sin embargo sí que se ha observado que pueden darse casos de resistencia a antibióticos hidrófilos cuando esta pared se ve engrosada, como es el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VISA) (Pfeltz et al. 2000).

Sin embargo, la pared de los micolata muestra una estructura mucho más compleja que la de los microorganismos Gram positivos, a pesar de estar incluidas en este grupo. Es una pared rica en lípidos de alto peso molecular que forman una barrera protectora alrededor de la célula análoga a la membrana externa de las bacterias Gram negativas.

La parte más interna y próxima a la membrana celular está formada por una capa de peptidoglicanos, más delgada que la del resto de bacterias Gram positivas, a la que se unen un polímero de polisacáridos formados por arabinogalactanos, estos dos componentes forman el esqueleto básico de la pared celular. La disposición exacta de estos dos componentes no está clara, aunque los modelos sugieren que las cadenas de peptidoglicanos se disponen perpendicularmente sobre la pared. Los ácidos micólicos son largas cadenas de ácidos grasos ramificados, habitualmente de 70 a 90 átomos de carbonos y que suponen alrededor del 60% del peso seco de la bacteria. Estos ácidos grasos están covalentemente unidos al polímero de arabinogalactano formando una capa interna y cerosa que rodea el esqueleto de peptidoglicanos y arabinogalactanos.

La parte más externa de esta capa protectora está constituida por un número complejo de otros componentes lipídicos y ceras que incluyen glicopeptidolípidos, trealosas que contienen lipooligosacáridos, sulfolípidos, dimicocerosato y glicolípidos fenólicos. Ocupando la parte más externa de la pared, se encontrarían las porinas con propiedades similares a las de las bacterias Gram negativas, cuya función sería proveer a la célula de una ruta de entrada de nutrientes hidrofílicos de pequeño tamaño. Los lipoarabinomicolatos (LAM) se cree que están anclados a los fosfatidilinositoles de la cara externa de la membrana plasmática y atravesarían la pared saliendo al exterior de la célula del mismo modo en que lo hacen los ácidos lipoteicoicos (LTA) en las bacterias Gram positivo. Además y aunque no se ha caracterizado suficientemente, se estima que algunas micobacterias también pueden producir cápsula externa formada por polisacáridos y proteínas (Lambert 2002; Bayan et al. 2003).

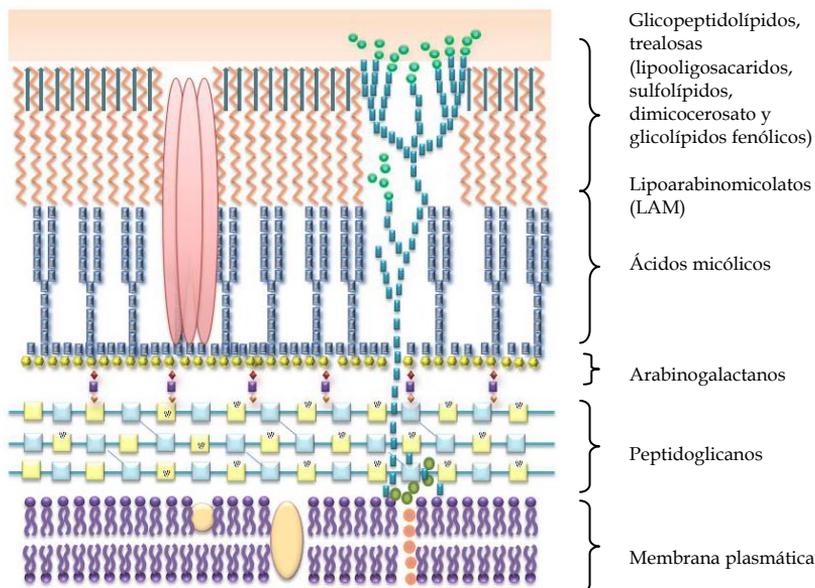


Figura 9. Modelo de estructura de pared de *M. tuberculosis*, esquema reproducido a partir del modelo modificado con permiso a partir del esquema propuesto por Lee en 1996 (Park & Bendelac 2000).

1.3.2. Proteínas formadoras de canal en los miembros del grupo *Corynebacterineae*

Se han descrito y caracterizado porinas en las paredes de miembros de los géneros *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella*. Gracias al estudio de las propiedades fisicoquímicas de estas porinas y de sus secuencias proteicas y genómicas, se ha establecido tres familias de porinas. La familia MspA, inicialmente descubierta por Trias y Benz en *M. smegmatis*, constituye una familia de porinas exclusiva de este grupo. Mientras que en micobacterias de crecimiento lento se han hallado porinas pertenecientes a la familia OmpA-F, además de la PorB de *Corynebacterium*.

A pesar de la existencia de porinas en este grupo, la impermeabilidad a sustancias hidrofílicas de estas bacterias es mucho mayor que en las

bacterias Gram negativas. Esto podría deberse a que las micobacterias aunque poseen estas proteínas formadoras de canal, parece ser que las expresan en mucha menor cantidad que en el caso de las bacterias Gram negativas. Se estima por ejemplo que en el caso de *M. smegmatis*, tan solo hay 1000 porinas de tipo MspA por μm^2 mientras que los miembros del grupo de bacterias Gram negativas son unas 15 veces más abundantes (Engelhardt et al. 2002; Kessel et al. 1988).

1.3.3. Porinas en el género *Mycobacterium*

De los distintos géneros del complejo CNM (*Corynebacterium*, *Nocardia*, *Mycobacterium*), es el estudio de las porinas del género *Mycobacterium* uno de los que despierta más interés, ya que en este género se encuentra *M. tuberculosis*. Se estima que este microorganismo ha infectado a dos billones de personas, causa alrededor de dos millones de muertes al año, más que cualquier otro agente infeccioso, y cada año se producen quinientos mil casos de resistencia a antibióticos, además los movimiento migracionales están produciendo que cada vez se den más casos de infecciones por causa de este patógeno, en países que prácticamente lo habían erradicado (Ibrahim et al. 2012; Niederweis 2003).

Los miembros del género *Mycobacterium* destacan por poseer una pared gruesa y rica en lípidos excepcionalmente largos, de hecho sus ácidos micólicos constituyen entre el 30 y el 40% del peso seco de su pared y en concreto los ácidos micólicos que sintetiza este género son los más largos identificados en la naturaleza. Evidencias científicas obtenidas por difracción de rayos X muestran que el empaquetado de estos lípidos es casi cristalino y parece ser que no están unidos covalentemente sino que se ordenan como una bicapa asimétrica. Se podría considerar que las micobacterias han perfeccionado la función protectora de su pared gracias a la longitud de sus ácidos micólicos que forman la membrana externa más gruesa que se conoce, de entre 9 y 10 nanómetros de grosor, además las cabezas polares de sus arabinogalactanos y peptidoglicanos están unidas covalentemente

formando un copolímero que reduce enormemente la movilidad de los ácidos micólicos, explicando estos dos hechos que la pared de estos microorganismos sea extremadamente poco fluida, compleja y eficiente como barrera protectora ante agentes tóxicos, antibióticos, agentes quimioterapéuticos y desinfectantes químicos (Niederweis 2003; Hoffmann et al. 2008).

Debido a las características de su pared, también el transporte a través de esta se da de un modo similar a como sucede en las bacterias Gram negativas: los compuestos hidrofóbicos penetran disolviéndose en la pared y los compuestos hidrofílicos a través de pequeños canales proteicos llenos de agua (porinas). Es por este motivo que aumenta el interés en sus porinas, ya que estas son esenciales para la captación de nutrientes por parte de las bacterias, pero también son la vía por donde pueden penetrar distintas drogas, antibióticos y compuestos hidrofílicos de interés sanitario. Conocer la estructura y las propiedades de estas porinas como canales de transporte, así como la forma en que se regula su expresión, constituye una vía eficiente y práctica para diseñar nuevos antibióticos contra estos patógenos micobacterianos. Tres de los cuatro agentes antimicrobianos utilizados en clínica para tratar las infecciones por *Mycobacterium*, en concreto etambutol, isoniacida y pirazinamida, son moléculas de carácter hidrofílico y se postula que su entrada en la célula se da a través de porinas (Niederweis 2003). Estudios con *M. chelonae* y *M. smegmatis* mostraron que cepas que tenían una deficiencia en la expresión de la porina MspA presentaba mayor resistencia a rifampicina, vacomicina, ciprofloxacina, claritomicina, eritromicina, linezolid y tetraciclina (Svetlíková et al. 2009).

1.3.3.1. Porinas de *Mycobacterium smegmatis*

La primera porina identificada en *M. smegmatis* se denominó MspA. Al estudiar la conductividad de esta porina, mediante experimentos de *Black Lipid Bilayer*, se obtuvieron conductancias de 2.3 y 4.6 nS en 1M de KCl. Esta duplicidad de valores fue justificada como la inserción

simultánea de dos poros, ya que los valores eran uno el doble del otro. En cuanto a su selectividad iónica, se observó que era fuertemente catiónica, también se estimó su carga y se determinó que su punto isoeléctrico era de 4.49. El gen de la MspA codifica una proteína de 211 residuos con una secuencia señal en posición N-terminal de 27 kDa, que una vez madura contiene 184 aminoácidos y que al ensamblarse da lugar a una porina octamérica con un peso molecular aparente de 100 kDa. MspA mostró una alta estabilidad y mantenimiento de su estructura octamérica cuando se trató a pH de entre 0 y 14, incluso al ser hervida en presencia de SDS durante 30 minutos (Pavlenok et al. 2012; Heinz & Niederweis 2000). Al ser hervida con DMSO se disgregaba en monómeros de unos 20 kDa que no mostraban actividad formadora de canal por separado (Niederweis et al. 1999).

Estructuralmente la porina MspA, es un octámero extremadamente estable que forma un único canal. Tridimensionalmente se asemeja a una copa que queda anclada en la pared bacteriana por su parte más estrecha, que forma una estructura similar a un cinturón formado por una serie de láminas beta que corren en el sentido contrario a las agujas del reloj alrededor del poro central, y que son de carácter más hidrofóbico, dejando un canal de unos 3.7 nm de diámetro. Estas cadenas están orientadas en sentido contrario a como lo están en las porinas de las bacterias Gram negativas, que también se caracterizan por poseer una estructura en lámina beta similar, y de las que también difieren por formar un solo poro, mientras que en las bacterias Gram negativas suelen formar tres (Remmert et al. 2010; Engelhardt et al. 2002). La parte más globular de la MspA está formada por láminas beta antiparalelas y los aminoácidos que la constituye, generan un canal más hidrofílico. En conjunto el canal formado por la MspA tiene una longitud de 10 nm de longitud (Mahfoud, Sukumaran, Grieger, et al. 2006; Shavandi et al. 2009). Este poro es dos veces y media más largo que en los canales típicos de las bacterias Gram negativas, esto se correlaciona con el mayor grosor de la membrana externa de las

micobacterias, debido a la mayor longitud de los ácidos micólicos que las forma (Faller et al. 2004; Koebnik et al. 2000; Niederweis 2003).

Experimentos de delección de la porina MspA en *M. smegmatis* mostraron que esta es la porina mayoritaria en esta especie (Niederweis 2003; Faller et al. 2004; Stahl et al. 2001).

El gen de la porina MspA se expresó en *E. coli*, observándose la producción del monómero y su ensamblaje para constituir la porina y también se comprobó que esta mantenía su actividad, por lo que se pudo concluir que la porina MspA es extremadamente estable en cuanto a su capacidad formadora de canal. Al ser expresada en *M. tuberculosis*, se observó que aumentaba la captación de glucosa del medio, por parte de la célula, así como la sensibilidad de esta bacteria a β -lactamasas, isoniazida, estreptomycinina y etambutol (Mailaender et al. 2004).

La estabilidad y robustez de esta proteína ha convertido a la MspA en una buena herramienta en nanotecnología, y se ha comprobado su utilidad en secuenciadores de DNA (Derrington et al. 2010).

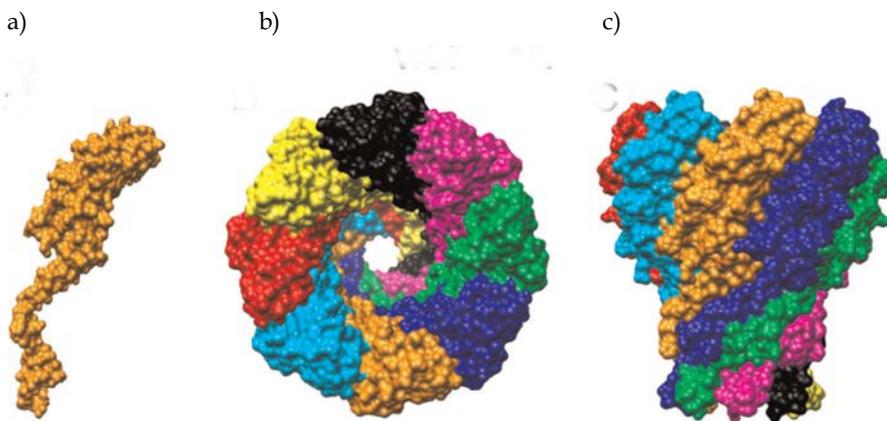


Figura 10. Representación esquemática de la porina MspA. La figura a) muestra la representación tridimensional del monómero de esta porina, ocho de estos monómeros ensamblados dan lugar a la porina funcional, como se observa en las figuras b) y c) (Pavlenok et al. 2012).

En el genoma de *M. smegmatis* encontramos tres genes homólogos a MspA, que son el MspB y MspC que codifican para proteína de 215 aminoácidos y el MspD que codifica para una proteína de 207 aminoácidos, y que mantienen una homología respecto a la MspA del 93%, más del 98% y del 82% respectivamente. Respecto a sus propiedades de conductancia iónica y sus características electrofisiológicas, las cuatro porinas son muy similares. Sin embargo MspA es la porina principal de *M. smegmatis*, y solo MspA y MspC se expresan en las cepas salvajes. Tras deleciones de estas dos porinas, se pudo observar que se producía una expresión de las porinas MspB y MspD, por lo que estas podrían actuar como genes reservorio (Stephan et al. 2005; Stahl et al. 2001).

1.3.3.1.1. Familia MspA

La proteína MspA no muestra una homología significativa respecto a las secuencia con otras proteínas descritas en las bases de datos actuales, por lo que ha pasado a constituir la porina tipo de la familia MspA. Muestra un dominio conservado e identificado en la base de datos del *Conserved Domain Database* (Marchler-Bauer et al. 2011) y por el momento comprende más de 60 proteínas presentes en diferentes especies de *Mycobacterium* así como en o miembros de los géneros *Rhodococcus*, *Tsukamura*, *Segniliparus* y *Gordonia*. Excepcionalmente MspA no está presente en micobacterias de crecimiento lento como *M. tuberculosis* y *M. leprae* así como en el género *Corynebacterium* (Pavlenok et al. 2012).

1.3.3.2. Porinas de *Mycobacterium chelonae*

La primera porina descubierta en el género *Mycobacterium* se produjo en 1992 y pertenece a *M. chelonae* (Trias et al. 1992; Trias & Benz 1993). Se trata de una proteína de 59 kDa que a diferencia de las porinas de bacterias Gram negativas no muestra cambios en el peso molecular al ser tratada con calor y agentes reductores. Al estudiar esta proteína, se obtuvieron tres tipos de actividad formadora de canal, dos con una conductancia de 0.4 nS (uno de ellos fluctuante) y uno de 2.7 nS en 1M

KCl. Esta proteína de canal mostró ser dependiente de voltaje de modo que con voltajes superiores a 40 mV la porina cambiaba de conformación cerrando el poro, y esta dependencia además variaba en función del lado de la membrana donde se aplicaba el voltaje, lo que sugiere que esta porina se inserta asimétricamente en la membrana, posiblemente por poseer un dominio altamente hidrofóbico. Respecto a su selectividad, mostró ser ligeramente catiónica, posiblemente por la presencia de cargas negativas netas en la entrada del canal. En cuanto al diámetro de poro se estimó que era de entre 2 y 2.2 nm. Este descubrimiento dio pie a iniciar la búsqueda de nuevas porinas en otros miembros tanto del género *Mycobacterium* como del resto de géneros del orden Corinebacterineae. Más tarde se pudo comprobar que el gen de esta porina presentaba homología con el de la familia MspA (Niederweis 2003).

1.3.3.3. Porinas de *Mycobacterium phlei*

En *M. phlei* es una micobacteria de crecimiento rápido en la que se identificó una porina de 135 kDa de peso molecular formada por monómeros de unos 22 kDa, que formaba poros con una conductancia de 4.5 nS en 1 M KCl, dependiente de voltaje, con una alta selectividad por los cationes y con un diámetro aproximado de poro de entre 1.8 y 2 nm. Las propiedades de este canal se compararon con las de otros miembros del grupo de los micolata observándose características comunes a la porina MspA de *M. smegmatis* y apreciándose que los genes de ambas porinas poseen secuencias homólogas con el gen MspA (Riess et al. 2001a).

1.3.3.4. Porinas de *Mycobacterium tuberculosis*

La existencia de porinas en *M. tuberculosis* fue demostrada por dos grupos entre los años 1998 y 1999 (Kartmann et al. 1999; Senaratne et al. 1998) y fruto de ello se identificaron tres porinas. La primera porina identificada por Senaratne, se trataba de una porina que mostraba una conductancia de 0.7 nS en 1 M KCl, sensible al voltaje, cerrándose reversiblemente a voltajes altos. Su peso molecular se estimó en unos

38 kDa, se observó que tenía una baja actividad específica y que el diámetro de su poro era de entre 1.4 y 1.8 nm. Esta porina se halló al secuenciar el genoma de *M. tuberculosis* (Cole et al. 1998), identificándose una pauta abierta de lectura (ORF) que codificaba un gen que mostraba alta homología con la familia OmpA-OmpF. Esta es una familia de proteínas de membrana externa previamente descritas, dentro de la cual se hallan porinas de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* o *Pseudomonas aeruginosa* (Niederweis 2003; Senaratne et al. 1998). Sin embargo cuando se buscó homología con otras porinas micobacterianas, no se halló ninguna. A esta porina se le asignó el nombre de OmpATB y al gen la denominación de Rv0899 (Li et al. 2012; Senaratne et al. 1998). La delección de OmpATB no es letal para *M. tuberculosis* y tampoco se aprecia ningún efecto sobre el crecimiento en condiciones normales. Se estima que esta proteína tiene dos funciones en *M. tuberculosis*, por un lado actúa como proteína formadora de poros y en segundo lugar como mecanismo de supervivencia, ya que se ha observado que a pH bajos (como los que se dan en el interior de los linfocitos T) la presencia de esta proteína permite la supervivencia de la bacteria y le ayuda a superar las defensas del huésped, permitiendo su crecimiento dentro de los macrófagos (Raynaud et al. 2002; Senaratne et al. 1998).

Una vez secuenciado el genoma de *M. tuberculosis*, se buscó e identificó el gen de la porina OmpATB (Rv0899). Se observó que esta proteína no posee la estructura secundaria habitual de láminas beta antiparalelas típica de la familia MspA y de otras familias de porinas, sino que muestra una estructura mixta de hélices alfa y láminas beta, pero en la que abundaba sobre todo las hélices alfa (Senaratne et al. 1998). También se observó que en el genoma, el gen de la OmpATB está seguido por dos genes más que codifican dos pequeñas proteínas de membrana Rv0900 y Rv0901. Las proteínas codificadas por estos dos genes actúan sobre la regulación de la expresión de la OmpATB y contribuyen a prevenir su degradación, siendo ambas necesarias para la expresión de OmpATB (Veyron-Churlet et al. 2011).

Las otras dos porinas fueron identificadas por el grupo de Kartmann un año más tardes. La primera presentaba una conductancia de 0.7 nS en 1M KCl. Se trata de una porina sensible al calor, catión selectiva y probablemente formada por varias subunidades de 15 kDa de peso molecular cada una, ya que la actividad formadora de porina se detectaba en las extracciones proteicas obtenidas entre los rangos de 60 y 15 kDa. La segunda con un peso estimado de más de 60 kDa, parecía estar formada por subunidades de distinto peso molecular. Esta última porina mostraba una conductancia de 3 nS en 1M KCl (Kartmann et al. 1999).

En 2008 y a partir del genoma secuenciado de *M. tuberculosis*, se realizó una búsqueda de posibles genes de proteínas formadoras de canal. Dicha búsqueda consistió en estudiar los distintos genes de *M. tuberculosis*, traducirlos a secuencia de aminoácidos y estudiar las características estructurales y funcionales esperadas de las proteínas obtenidas, buscando especialmente características comunes en porinas ya conocidas. Gracias a este estudio se identificó un gen denominado Rv1698 que posee características proteicas de porinas previamente descritas. Al ser clonado el gen Rv1698 en una cepa de *M. smegmatis* mutada para el gen de la MspA se pudo observar que restituía parcialmente la baja permeabilidad de estos mutantes devolviéndoles su sensibilidad a antibióticos hidrofílicos, confirmando que las proteínas producidas a partir del Rv1698 podían sustituir parcialmente a la porina MspA. La proteína Rv1698 fue purificada, obteniéndose una proteína de 33 kDa, y estudiada su conductancia en experimentos de bicapa lipídica obteniéndose valores de conductancia de 4.5 nS en 1M de cloruro potásico, así mismo se observó que tenía selectividad catiónica, también se observó que las fracciones de 35 kDa no mostraban actividad formadora de poros, por lo que se estima que es su dímero el que realiza esta función. Parece ser que esta proteína no está relacionada con las dos previamente descritas por Kartmann. Se ha podido identificar la existencia de genes homólogos al Rv1698 en

miembros de *Nocardia*, *Corynebacterium*, *M. leprae* y también en *M. smegmatis*. (Siroy et al. 2008; Song et al. 2008).

1.3.3.4.1. Familia OOP: OmpA-OmpF

La gran familia de proteínas de membrana OOP, incluye la porina OmpA de *Escherichia coli*, así como la OprF de *Pseudomonas aeruginosa* (Baldermann et al. 1998). Estas proteínas presentan un dominio N-terminal de 350 aminoácidos que forman 8 láminas beta transmembrana y un dominio en C-terminal globular que queda embebido en el periplasma (Grizot & Buchanan 2004), es el dominio N-terminal el que muestra homología con la porina OmpATB de *M. tuberculosis* (Niederweis 2003). La familia OmpA juega importantes funciones en la patogenicidad, capacidad de adhesión incluso en la evasión de las defensas del huésped o la activación de citoquinas inflamatorias (Confer & Ayalew 2013).

1.3.3.5 Porinas de *Mycobacterium bovis*

En *M. bovis* BCG, se han identificado dos tipos de porinas. La primera se trata de una porina de canal simple que produce poros con una conductancia de 4 nS, de selectividad catiónica y dependiente de voltaje, de tal forma que se mantiene abierta al transporte de iones mientras el potencial de membrana es bajo, pero que se vuelve prácticamente impermeable a los iones, cuando el potencial aumenta. Esta porina muestra similitudes con otras descritas en *M. smegmatis* y *M. chelonae*. La segunda porina se identificó en extractos completos y en ellos se detectó la presencia de una porina que mostraba una conductancia de tan solo 0.78 nS, era independiente de voltaje y anión selectiva (Lichtinger et al. 1999).

Tras secuenciar el genoma de *M. bovis* se realizó una búsqueda de genes de posibles porinas, y se halló un gen que se denominó OmpA por su homología con los genes de la familia OmpA de las bacterias Gram negativas. Este gen contiene 981 pares de bases que dan lugar a una proteína de 33.5 kDa (Singh & Verma 2008). Esta porina parece

tener una conductancia de 1.6 nS en 1M KCl y entre sus otras características destaca por poseer un dominio N-terminal que le es necesario para traslocarse en la membrana y también se postula que debe estar implicado en el proceso de formación del oligómero funcional como porina (Alahari et al. 2007).

1.3.3.6. Porinas de *Mycobacterium marinum*

La última porina descrita dentro del género *Mycobacterium* es la proteína denominada NMAR_0617 aislada de la especie *M. marinum*. Se trata de una porina que forma un único canal con una conductancia de 0.8 nS una vez reconstituida en experimentos de conductancia en bicapa lipídica, y como característica diferencial muestra un dominio rico en treoninas en posición carboxilo terminal formado por una cadena de 11 residuos de treonina consecutivos (van der Woude et al. 2013).

1.3.4. Porinas en el género *Corynebacterium*

Corynebacterium es un género que contiene 89 especies y que están divididas en 3 grupos en función de su acción como patógenos humanos, como patógenos animales y por no ser patógenos, grupo de utilidad biotecnológica (Liebl 2006). Las paredes de los miembros de este género poseen paredes formadas por una capa de peptidoglicanos unidos covalentemente a arabinogalactanos y sus ácidos micólicos parecen estar unidos a los polisacáridos. En este género se encuentran microorganismos tanto de interés industrial como clínico. De las especies que lo forman, la más estudiada hasta el momento es *C. glutamicum* que fue identificada por primera vez en 1957 y que en la actualidad se emplea industrialmente en la producción de más de dos millones de toneladas al año, del aminoácido ácido glutámico. Además de *C. glutamicum*, otras especies del género también revisten gran interés industrial como *C. ammoniagenes* o *C. efficiens* (Poetsch et al. 2011). A pesar de su interés biotecnológico, en este género también encontramos miembros de interés clínico como es el caso de *C. diphtheriae* causante de la difteria y otros microorganismo patógenos

oportunistas como *C. jeikeium* que a pesar de formar parte de la flora normal humana está asociado con infecciones nosocomiales graves (Bernard 2012).

1.3.4.1. Porinas de *Corynebacterium glutamicum*

Se han identificado varias proteínas formadoras de canal en *C. glutamicum*. En 1995 aparece el primer artículo en el cual se identifica una posible porina en la cepa MH-20-22B de *C. glutamicum*, una cepa auxotrófica para la leucina obtenida a partir de la cepa salvaje ATCC 13032. Esta porina mostraba una conductancia de 6 nS en 1 M KCl, era moderadamente selectiva para los cationes y con un diámetro estimado de poro de unos 2 nm (Niederweis et al. 1995; Engelhardt et al. 2002).

En 1998 se realizaron nuevos estudios que identificaron una segunda porina, esta proteína purificada mediante gradiente de densidad de sacarosa y cromatografía en columna Mono-Q, mostró ser una proteína oligomérica formada por monómeros de tan solo 5 kDa. Esta porina formaba canales de membrana simples con una conductancia de 5.5 nS en 1M KCl, con alta selectividad por los cationes y un diámetro estimado de poro de unos 2.2 nm. Se obtuvo parte de la secuencia de los monómeros que no mostró homología con ninguna otra proteína descrita hasta el momento (Lichtinger et al. 1998). En el 2003 se ampliaron los estudios sobre esta proteína formadora de canal, que fue bautizada como PorA_{c.glut}, se observó que se trata de una proteína de 45 aminoácidos, que presentaba un exceso de cargas negativas, responsables de su selectividad catiónica, alta permeabilidad a los iones y que era codificada por un gen de 138 pb. En este mismo estudio se deleccionó este gen en la cepa salvaje ATCC 13032 y se obtuvo un mutante cuyo crecimiento era pobre y lento, aunque el hecho de que creciese indicaba que *C. glutamicum* debía poseer otras porinas que permitan el paso de sustancias hidrofílicas a través de la membrana, además también se observó que dicho mutante era más resistente que la cepa salvaje ante la presencia de ciertos

antibióticos (Costa-Riu, Burkovski, et al. 2003). El mismo año se presentó un artículo donde se demostraba la existencia de otra porina en *C. glutamicum*. En este caso se trata de una proteína formadora de canal que mostraba una conductancia de 0.7 nS en 1 M KCl, con selectividad aniónica y un diámetro de poro estimado de 1.4 nm, que fue bautizada como PorB_{c.glut}. Esta porina tenía un peso molecular de unos 10 kDa y estaba formada por 126 aminoácidos, de estos en posición N-terminal se identificaron 27 residuos que estaban implicados en el transporte de la proteína hasta la pared, dando como resultado una proteína funcional de 99 aminoácidos que era transportada hasta la pared mediante la vía Sec. Cuando PorB_{c.glut} fue secuenciada se descubrió que estaba formada por 381 pares de base, y al ampliar la región secuenciada se hayo a 138 pares de bases *downstream*, una pauta de lectura abierta (ORF) que codificaba para una proteína con un 30% de homología con PorB_{c.glut}, a la cual se la llamó PorC_{c.glut}. El alineamiento de ambos genes *porB* y *porC* sugieren que ambos pertenecen al mismo clúster y después de realizar una RT-PCR se pudo observar que ambos genes se cotranscriben (Costa-Riu, Maier, et al. 2003).

Dos años más tarde, en 2005 se identificó la cuarta porina en *C. glutamicum*, a la que bautizaron como PorH. Esta proteína inicialmente detectada en extractos crudos y que se expresaba en mayor cantidad cuando la bacteria era cultivada en medios mínimos, fue purificada hasta homogeneidad por cromatografía líquida a través de una HiTrap-Q. Al estudiar su conductancia se observó que mostraba una conductividad de 2.5 nS en 1M KCl y que era selectiva para los cationes. Su peso molecular se estimó mediante electroforesis de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE) observándose que se trataba de una proteína de 12 kDa de peso molecular aparente. La secuenciación parcial de esta proteína permitió hallar el gen y determinar que en realidad se trataba de una proteína formada por 57 aminoácidos con una masa molecular de 6.1 kDa y que no mostraba secuencia líder en posición N-terminal, por lo que esta proteína no es

transportada hasta la pared mediante la vía *Sec*. También se pudo confirmar que en el genoma de *C. glutamicum*, el gen de $\text{PorH}_{\text{Cglut}}$ está muy próximo al del gen $\text{PorA}_{\text{Cglut}}$, tan solo los separan 83 pb, compartiendo un putativo operón formado por 13 genes, de hecho pruebas de RT-PCR confirma que ambas porinas se cotranscriben. Pruebas de detección inmunológica confirman que las cuatro porinas descritas hasta el momento para *C. glutamicum*, $\text{PorA}_{\text{Cglut}}$, $\text{PorB}_{\text{Cglut}}$, $\text{PorC}_{\text{Cglut}}$ y $\text{PorH}_{\text{Cglut}}$, coexisten en la pared bacteriana (Hüntén, Costa-Riu, et al. 2005; Hüntén, Schiffler, et al. 2005).

1.3.4.1.1. Familia **PorB**

Pequeña familia de porinas del genero *Corynebacterium* que se caracteriza por ser de pequeño tamaño, unos 45 aminoácidos, ser mayoritariamente cationicas, no poseer secuencia líder y no son transportadas por la via *Sec* hasta la membrana.

1.3.4.2. Porinas de *Corynebacterium efficiens*

En 2005 se identificó una porina en *C. efficiens* que tras ser parcialmente secuenciada mostró tener alta homología con la porina *porH* descrita en este mismo género, por lo que fue nombrada como $\text{PorH}_{\text{Ceff}}$. Esta porina mostró tener una conductancia de entre 2 y 3 nS en 1M KCl, ser ligeramente selectiva para aniones y mostrar un peso molecular estimado de 6 kDa. Gracias a la secuenciación parcial de esta proteína se pudo hallar su gen, formado por 174 pb que codificaba una proteína completa formada por 57 aminoácidos, la cual en posición N-terminal únicamente mostraba una metionina líder y carecía de secuencia líder que permitiera su transporte mediante la vía *Sec*, por lo que se desconoce hasta el momento el mecanismo que transporta esta proteína hasta la pared. En *C. efficiens* también se identificó el gen $\text{PorA}_{\text{c.glut}}$, que para diferenciarlo del de *C. glutamicum* se denominó $\text{PorA}_{\text{c. eff}}$, al analizar la posición de este gen respecto al de $\text{PorH}_{\text{Ceff}}$, se observó que solo estaban separados por 77 pb y que entre ellos no había señal de finalización de transcripción, por lo que ambos

deben transcribirse juntos a modo de clúster (Hüntten, Schiffler, et al. 2005).

1.3.4.3. Porinas de *Corynebacterium callunae*

La porina hallada en *C. callunae*, mostró ser muy similar a la de *C. efficiens*, se trataba también de una porina de unos 6 kDa con una conductancia de entre 2 y 3 nS en 1M KCl, pero en este caso ligeramente selectiva para los cationes y con un diámetro de poro estimado de unos 2.2 nm, a la que se la denominó PorH_{Ccall}. La obtención de una secuencia parcial del extremo N-terminal permitió identificar el gen que codifica para PorH_{Ccall} mostrando que este codificaba para una proteína sin secuencia líder pero sí iniciada por una metionina, y que al igual que PorH_{Ceff}, también era altamente homóloga a PorH_{Cglut} (Hüntten, Schiffler, et al. 2005).

1.3.4.4. Porinas de *Corynebacterium diphtheriae*

En *C. diphtheriae* mediante extracción con solventes orgánicos, se obtuvo una porina a la que se la denominó CdporA que en análisis en SDS-PAGE mostraba una un peso molecular de 66 kDa formada por subunidades de 5 kDa. Experimentos de conductancia demostraron que esta porina tenía una conductancia de 2.25 nS a 1M KCl y que era ligeramente selectiva para los cationes. Estudios de inmunodetección con anticuerpos anti-PorA demostraron la alta homología entre la porina de *C. diphtheriae* y la porina PorA, sugiriendo que esta proteína posee epítetos altamente conservados respecto a la porina de *C. glutamicum*. Aprovechando esta alta homología se pudo identificar el gen, el cual codificaba para una proteína de 45 aminoácidos sin secuencia líder que permitiese su transporte hasta la pared mediante la vía *Sec* (Schiffler et al. 2007).

1.3.4.5. Porinas de *Corynebacterium amycolatum*

En 2009 se describió la primera porina de *C. amycolatum*. Hay que destacar que esta especie a pesar de pertenecer al género *Corynebacterium* no contiene ácidos corinemicólicos en su pared. Aun

así en 2009 se identificó una porina que presentaba una conductancia de 3.8 nS en 1M KCl, mayor que la de las porinas halladas en la mayoría de las bacterias Gram negativas y mayor también que la PorB de *C. glutamicum*, pero muy similar a las porinas PorA y porH. En cuanto a su selectividad, se observó que tanto cationes como aniones podía pasar a través de ella, aunque mostraba una ligera selectividad respecto a los cationes. También se pudo concluir que esta porina era dependiente de voltaje, aparentemente forma un solo canal y tiene un peso molecular de 43 kDa (Dörner et al. 2009). Esta porina, al estudiar su secuencia genómica se observó que mantenía una alta homología con la porina PorA de *C. glutamicum* (Soltan Mohammadi et al. 2013).

1.3.5. Porinas en el género *Nocardia*

El género *Nocardia* pertenece a la familia *Nocardiaceae*, al igual que el género *Rhodococcus*, y se trata de un género formado por microorganismos nocardiformes, Gram positivo, no móviles, catalasa positivo. Estas bacterias forman extensas y rudimentarias hifas ramificadas, que únicamente se observan al microscopio, y que se fragmentan apareciendo células cocoides o en forma de bacilo. Algunos miembros de este género tienen la capacidad de producir pigmentos carotenoides. Sus colonias pueden estar pigmentadas y la capacidad de producir hifas que le confieren un aspecto aterciopelado. El género *Nocardia* está constituido por 38 especies, que pueden aislarse tanto de medios acuáticos como terrestres, y también hay algunas especies de interés clínico, por estar consideradas como patógenos oportunistas tanto de humanos como de animales, como es el caso de *N. asteroides* y *N. farcinica* (Goodfellow & Maldonado 2006).

1.3.5.1. Porinas de *Nocardia farcinica*

La primera porina descrita del género *Nocardia*, se aisló en la especie *N. farcinica* un microorganismo aerobio estricto. La porina, una vez purificada hasta homogeneidad mostro tener un peso molecular de 87 kDa, y al ser hervida en presencia de dodecilsulfato (SDS) mostró que se trataba de un heterooligómero que se disociaba en dos subunidades

de 19 y 23 kDa. Esta proteína de canal mostraba una conductancia de 3 nS en 1M KCl, con selectividad para los cationes y una dependencia de voltaje asimétrica. A partir del análisis de la conductancia de canal simple con diferentes soluciones de sales y usando el factor de corrección de Renkin, se pudo estimar que su poro tenía un diámetro aproximado de entre 1.4 y 1.6 nm. La secuencia parcial de las subunidades de esta porina, que fueron denominadas NfpA y NfpB, se obtuvieron mediante la técnica de degradación de Edman obteniéndose varias secuencias tras degradaciones parciales de las proteínas, a partir de estos resultados se pudo identificar los correspondientes genes que se denominaron nfa15890 and nfa15900. Los resultados mostraron que ambas unidades tenían una homología entre sí de un 59%, que en el extremo N-terminal se apreciaron las secuencias de aminoácidos necesarias para ser transportadas hasta la pared mediante el sistema *Sec*. Al estudiar la secuencia de aminoácidos de estas porinas con otras descritas, se apreció algunas similitudes con la proteína formadora de canal de *Mycobacterium smegmatis* MspA, con MppA de *M. phei* y con TipA de *Tsukamurella inchonensis*. En esta porina también se estudió el modo en cómo se insertaba en las membranas, mostrando que este era unidireccional y como resultado, que una vez reconstituida en bicapas lipídicas mostraba propiedades asimétricas en cuanto a la difusión de iones. También se observó su dependencia de voltaje, mostrando mayor afinidad por los péptidos a traslocar a menores voltajes (Kläckta et al. 2011; Singh et al. 2012).

1.3.5.2. Porinas de *Nocardia asteroides*

Microorganismo de interés clínico debido a ser causante de infecciones, *N. asteroides* también se han hallado porinas en él. Sus proteínas formadoras de canal tienen un peso molecular aproximado de 84 kDa. Tras ser hervida la proteína y vuelta a analizar por electroforesis, no se observó la presencia de bandas definidas, deduciéndose que los oligómeros que forman esta porina son de

tamaño variable. Una vez fueron purificadas mediante elución de geles preparativos de electroforesis de SDS-PAGE, y reconstituidas en membranas de bicapa lipídica, esta porina mostro tener una conductancia de 3 nS en 1M KCl, ser moderadamente dependiente de voltaje y tener un diámetro de poro de 1.4 nm (Riess et al. 1999).

1.3.5.3. Porinas de *Nocardia corynebacteroides*

Nocardia corynebacteroides es una bacteria no patógena perteneciente al grupo de los micolata. En el año 2000 se identificó la presencia de proteínas formadoras de canal en su pared, las cuales tras ser purificadas hasta homogeneidad se observó que tenían un peso molecular de 134 kDa y que al ser hervidas en presencia de dodecilsulfato (SDS), se disociaba en subunidades de 23 kDa. Se estudió su punto isoeléctrico y se estimó que este era de 4.5. Tras reconstituir la proteína purificada en bicapas lipídicas artificiales se observó que mantenía la capacidad formadora de canal mostrando una conductancia de canal de 5.5 nS en 1M KCl, ser selectiva para cationes y mostrar una asimetría dependiente de voltaje. Mediante el estudio de la conductancia de canal simple con diferentes soluciones de sales y usando el factor de corrección de Renkin, se pudo estimar que su poro tenía un diámetro aproximado de 2.2 nm. Tanto el peso molecular de la porina y de las subunidades que la constituyen, así como de su punto isoeléctrico y su diámetro, son muy similares a la porina de *M. smegmatis*. También es destacable la capacidad de agregación de las subunidades de esta proteína formadora de canal, ya que aunque las eluciones obtenidas de los geles preparativos correspondientes a la banda de 23 kDa no mostraba actividad formadora de canal, las eluciones obtenidas de bandas de peso molecular mayor a 23 kDa sí que mostraban actividad formadora de canal, aunque esta actividad era mucho menor que la mostrada por el oligómero de 134 kDa (Riess & Benz 2000).

1.3.6. Porinas en el género *Rhodococcus*

El género *Rhodococcus* es el segundo género, junto con el de *Nocardia*, que constituyen la familia *Nocardiaceae*. Los miembros del actual género *Rhodococcus* fueron descritos por primera vez en la edición de 1923 del *Manual of Determinative bacteriology* de Bergey, aunque desde entonces han sufrido múltiples reclasificaciones hasta acabar siendo incluidos en la familia *Nocardiaceae*. Se trata de bacterias que tintóreamente se comportan desde Gram positivas a Gram variables, son catalasa positivo, forman desde bacilos a extensas hifas ramificadas, y en función de su estadio de crecimiento también pueden mostrar morfologías desde cocoides a bacilares o filamentosas. Los miembros de este género son de crecimiento lento y se aíslan generalmente de muestras de suelo. En algunos casos también puede ser patógeno de humanos y animales, como es el caso de *R. bronchialis* o *R. equi*. Como en el resto de microorganismos actinomicetos, *Rhodococcus* presenta una envoltura de ácido micólico que se une covalentemente a los petidoglicanos-arabinogalactanos que forman el esqueleto de su pared celular, pero a diferencia de otros miembros de los actinomicetos, las cadenas de ácido micólico que forman parte de su pared son de las más cortas que se han descrito, de hecho *Rhodococcus* junto con *Corinebacterium* son los géneros que muestran las cadenas de ácidos micólicos más cortas de entre 30 y 45 carbonos para *Rhodococcus* y de 22 a 28 para *Corinebacterium*. Además de ácido micólico, *Rhodococcus* también presenta en su pared otros lípidos como trealosa dimicolato, glycosil monomicolato y peptidolipidos. Hasta el momento se han identificado porinas en *R. equi* y en *R. erythropolis* (Goodfellow & Maldonado 2006).

1.3.6.1. Porinas de *Rhodococcus erythropolis*

En *Rhodococcus erythropolis* se ha identificado una porina de un peso aparente de 67 kDa, formada por oligómeros de 8.4 kDa. La proteína purificada forma grandes canales, que en experimentos de *Black Lipid Bilayer* mostraron tener una conductancia de 6 nS en 1M KCl. A

corriente cero, las medidas de potencial de membrana con distintas sales, sugieren que el canal es altamente selectivo para cationes y con un diámetro de aproximadamente 2 nm. Comparativamente las propiedades de los canales estudiados en *R. erythropolis* y en *Corynebacterium glutamicum* son muy similares. En ambos casos los canales tienen el mismo diámetro y contienen puntos de carga negativa que limitan su permeabilidad a aniones, sin embargo las secuencias parciales de sus subunidades no muestran una homología remarcable, aunque en base a predicciones de estructura secundaria estas podrían basarse en estructuras lámina beta cilíndricas (Lichtinger et al. 2000).

1.3.6.2 Porinas de *Rhodococcus equi*

En *Rhodococcus equi* por el momento se han identificado dos porinas que han sido denominadas PorA_{Req} y PorB_{Req}. PorA_{Req} es una porina formada por un solo canal que presenta una conductancia de 4 nS a 1M KCl y que muestra dependencia de voltaje. Experimentos a alto potencial de membrana sugieren que esta dependencia de voltaje es simétrica y que esta simetría es independiente de donde sea añadida la proteína, en un lado u otro de la membrana. PorA_{Req} tiene un peso aparente de 67 kDa y no se ha observado disociación en monómeros, el diámetro de poro calculado es de entre 1.8 a 2 nm y es selectiva para cationes. La porina bautizada como PorB_{Req} muestra una conductancia de 0.3 nS, es de carácter aniónico y no es dependiente de voltaje. PorB_{Req} tiene un peso aparente de 11 kDa, pero según los autores, este tamaño es demasiado pequeño para formar por si solo un poro, el cual calculan que es de 1.8 nm, por lo que sugieren que este es el peso del monómero (Riess et al. 2003).

1.3.6.3. Porinas de *Rhodococcus jostii*

Recientemente se ha descrito en *R. jostii* un gen ortólogo al gen de la porina MspA, que ha sido llamado RjpA. La supresión de este gen mostró un retraso en el crecimiento de estos microorganismos cuando se les hacía crecer en medios de cultivo enriquecidos con colato, pero

no se observó diferencias de crecimiento cuando el medio estaba enriquecido con colesterol. Esta delección por su parte estimulaba la expresión de otros genes formadores de porinas que fueron denominados RjpB y RjpC. Los autores de este estudio concluyeron que estas porinas parecen ser esenciales para la absorción de ácidos biliares por parte de estas bacterias (Somalinga & Mohn 2013).

1.3.7. Porinas de *Tsukamurella*

Los miembros del género *Tsukamurella* fueron inicialmente clasificados dentro del grupo *Corynebacterium*, pero la presencia de ácidos micólicos de cadena larga y altamente insaturados propicio su reclasificación como taxón propio. El género *Tsukamurella* está formado por 7 especies. Sus miembros se caracterizan por ser bacterias Gram positivas, parcialmente ácido-alcohol resistentes, catalasa positivas, resistentes a la lisozima, productoras de ácido por oxidación de la glucosa, no móviles y con morfologías celulares que van desde formas cocobacilares a bacilos rectos o ligeramente curvados, que se pueden disponer en solitario, formando parejas o grupos (Goodfellow & Maldonado 2006).

1.3.7.1. Porinas de *Tsukamurella inchonensis*

En 2004 Dörner et al describieron la primera y única porina estudiada por el momento en el género *Tsukamurella*, concretamente en la especie *T. inchonensis*, a la que denominaron TipA. Esta proteína mostraba un peso molecular aparente de unos 33 kDa. TipA fue purificada mediante elución de un gel preparativo de electroforesis de SDS-PAGE y tras reconstituir el poro en una membrana de bicapa lipídica artificial, se observó una conductancia de 4.5 nS en 1 M de KCl. Se obtuvieron extractos mediante elución del gel en los rangos entre 30 y 80 kDa, que también mostraron actividad porina, por lo que los autores sugieren que la banda de 33 kDa realmente corresponde a una subunidad de un complejo mayor. La proteína formadora de canal también mostró ser selectiva para cationes, en cuanto a la relación entre la conductancia y la concentración de KCl no era lineal, lo que

sugiere que los canales de *T. inchonensis* contienen puntos de carga neta (*point net charges*), similares a los descrito en *Mycobacterium smegmatis*, *M. chelonae* y *Corynebacterium glutamicum*. Respecto a la dependencia de voltaje se observó que este era asimétrico de unos 20 mV. Los potenciales a corriente cero de membrana, fueron analizados usando la ecuación de Goldman-Hodgkin-Kantze, obteniéndose una relación de permeabilidad de P_K dividida por la permeabilidad de P_{Cl} de 4, indicando selectividad de estos canales hacia los cationes (Dörner et al. 2004).

Basándose en la similitud en las propiedades de las porinas de *T. inchonensis* con porinas de *Mycobacterium smegmatis*, *M. chelonae* y *Corynebacterium glutamicum*, los autores utilizaron *primers* de *M. smegmatis* para clonar la proteína TipA, y tras su secuenciación se pudo comprobar que los genes codificantes para esta porina eran idénticos entre *T. inchonensis*, *M. smegmatis*, *M. chelonae* y que se trataba de una porina formada por monómeros de 22 kDa. Además experimentos de *Southern blot* donde se hibridó esta porina con sondas de MspA, mostraron una alta reactividad positiva en condiciones de alta astringencia (60 °C), el anticuerpo de MspA y las porinas obtenidas de *M. phlei* y *T. inchonensis* confirmando que estas contienen regiones altamente conservadas (Dörner et al. 2004).

2. OBJETIVOS

- I.- Revisar y testar los protocolos de extracción de proteínas de pared bacteriana en el grupo de CNM. Adaptar y mejorar dichos protocolos a las particularidades de *Gordonia jacobaea*.
- II.- Estudiar y adaptar las técnicas de electroforesis en SDS-PAGE para mejorar la visualización de las proteínas de pared de *G. jacobaea*, y poder utilizar este método de análisis como método de purificación de dichas proteínas.
- III.- Analizar la actividad formadora de canal de las distintas proteínas de pared de *G. jacobaea*, obtenidas por electroforesis preparativas.
- IV.- Secuenciar el genoma de *G. jacobaea*.
- V.- Identificar el gen y hallar la secuencia proteica correspondiente a las porinas identificadas.
- VI.- Buscar en el genoma de *G. jacobaea*, la presencia de secuencias con alta similitud a familias de porinas ya descritas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Medios de cultivo

TSB (Caldo de triptona y soja)

Medio de cultivo líquido de uso general, altamente nutritivo y que permite el crecimiento de bacterias tanto aerobias como anaerobias, así como de hongos. Gracias a la presencia de peptonas y triptona de soja, favorece el crecimiento de organismo exigentes sin la necesidad de añadir al medio ningún otro componente enriquecedor. Casa comercial: Scharlab.

	g/l
Triptona	17.0
Peptona de soja	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato di-potásico	2.5
Glucosa	2.5

Se preparó disolviendo 30 gramos del producto en 1 litro de agua destilada y ajustando el pH a 7.3 ± 0.2 a 25 °C. Una vez disuelto se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

TSA (Agar de triptona y soja)

Medio de cultivo sólido de uso general, altamente nutritivo y en el cual crecen tanto bacterias aerobias, como anaerobias y hongos. Este medio es nutricionalmente equivalente al TSB pero carece de glucosa y fosfatos. Casa comercial: Scharlab.

	g/l
Triptona	15.0
Peptona de soja	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0

Se preparó disolviendo 40 gramos del producto en 1 litro de agua destilada y ajustando el pH a 7.3 ± 0.2 a 25 °C. Una vez disuelto se calentó hasta ebullición para su completa disolución, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Tras extraer de autoclave, se dejó enfriar a 50 °C y distribuyó en placas de Petri estériles.

MHB (Caldo de Mueller Hinton)

Medio de cultivo líquido que se emplea en la realización de estudios de sensibilidad a antibióticos. Casa comercial: Scharlab.

	g/l
Peptona	17,5
Extracto de carne	300,0
Almidón	1,5
Agar	2,0

Se preparó disolviendo 21 gramos del producto en 1 litro de agua destilada y ajustando el pH a 7.3 ± 0.1 a 25 °C. Una vez disuelto se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

MHA (Agar de Mueller Hinton)

Medio de cultivo líquido que se emplea en la realización de estudios de sensibilidad a antibióticos, por el método de difusión en agar. Casa comercial: Scharlab.

	g/l
Peptona	17.5
Almidón	1.5
Extracto de carne	4.0
Agar	15.0

Se preparó disolviendo 40 gramos del producto en 1 litro de agua destilada y ajustando el pH a 7.3 ± 0.2 a 25 °C. Una vez disuelto se calentó hasta ebullición para su completa disolución, se esterilizó en

autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Tras sacar de autoclave, se dejó enfriar hasta 50 °C y se distribuyó en placas de Petri estéril.

LB (Caldo de Luria)

Medio de cultivo líquido utilizado de forma habitual para el crecimiento de bacterias. Su principal característica es la simplicidad de su composición lo que permite modificaciones en el mismo. Este medio es utilizado habitualmente como medio de crecimiento previo a la realización de estudios genéticos (extracción de DNA cromosómico y plasmídico) y moleculares (obtención de proteínas). Casa comercial: Scharlab.

	g/l
Peptona tríptica de caseína	10.0
NaCl	0.5
Extracto de levadura	5.0

Se preparó disolviendo 15 gramos de producto en un litro de agua destilada y calentando hasta su total disolución. Seguidamente se ajustó el pH a 7.2 ± 0.2 a 25 °C, y finalmente se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121 °C.

BHI (*Brain Heart Infusion*)

Medio líquido altamente nutritivo, empleado habitualmente en el crecimiento de cepas de *Streptococcus*, y empleado como medio alternativo para el crecimiento de *G. jacobaea*. Casa comercial: Scharlab.

	g/l
Extracto de cerebro	7.8
Extracto de corazón	9.7
Peptona de proteasa	10.0
Dextrosa	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato di-sódico	2.5

Se preparó disolviendo 37 g de producto en un litro de agua destilada y calentando hasta su total disolución. Seguidamente se ajustó el pH a 7.2 ± 0.2 a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, y finalmente se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2. Soluciones utilizadas

PBS (Tampón fosfato salino) pH 7.4

Se utilizó como solución amortiguadora de pH en el lavado de los microorganismos. Se preparó una solución *stock* a una concentración diez veces superior a la de su utilización.

PBS X 10	
NaCl	80.0 g
KCl	2.0 g
Na ₂ HPO ₄	14.2 g
KH ₂ PO ₄	2.7g
Agua miliQ c.s.p.	1 l

Preparación: Se disolvieron todos los componentes en 1 litro de agua destilada y se ajustó el pH a 7.4 ± 0.2 . Posteriormente, se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

TBE

Este tampón se preparó 10 veces concentrado. Se utilizó como tampón amortiguador en las electroforesis de DNA.

Tampón TBE x10	
Tris-HCl (890 mM, pH7.5)	108 g
EDTA 0,5M pH8	40 ml
Ácido bórico (890 mM)	55 g
Agua miliQ c.s.p.	1 l

Preparación: Se disolvieron todos los componentes y posteriormente, se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

TE

Esta solución se empleó como tampón en la disolución de DNA.

Tampón TE x1	
Tris-HCl 1M pH 7,5	10 ml
EDTA 0,5M pH8	2 ml
Agua miliQ c.s.p.	1 l

Preparación: Se disolvieron todos los componentes y posteriormente, se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

Tampón Tris

Este tampón se empleó en distintos experimentos. Se partió de una solución tamponada a pH 7 de Tris 1 M, de la cual se obtuvieron los distintos tampones a las concentraciones necesarias.

Tampón Tris M	
Tris-HCl	121 g
Agua miliQ c.s.p.	1 l

Preparación: Se disolvieron todos los componentes en la mitad del volumen final, se ajustó el pH al valor deseado con HCl 1N, y se acabó de completar el volumen a preparar. Posteriormente, se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

3.3. Condiciones de cultivo

Los cultivos en medio líquido de *Gordonia jacobaea* se llevaron a cabo en condiciones aeróbicas en matraces Erlenmeyer y en agitación continua, entre 250 a 300 rpm, durante periodos de entre 48 a 72 horas a una temperatura de 30 °C (Veiga-Crespo et al. 2005). Los cultivos en medio sólido se llevaron a cabo en medios de cultivos preparados en placas de Petri y se dejaron crecer en estufa a 30 °C durante más de 72 horas,

tiempo mínimo necesario para visualizar con suficiente claridad las colonias bacterianas.

Para establecer las mejores condiciones de cultivo y obtener la mayor cantidad de biomasa, se hicieron pruebas a diferentes tiempos de cultivo y se ensayaron cuatro medios de cultivo distintos y de uso habitual en nuestro laboratorio: TSA, BHI, MH y LB.

3.4. Cepas bacterianas

Se utilizaron dos cepas de *Gordonia jacobaea* cedidas por el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela. La cepa MV1 corresponde a la cepa original *wild type*, y la cepa denominada MV26 corresponde a un mutante productor de mayores niveles de xantinas (de Miguel et al. 2001; Veiga-Crespo et al. 2005).

3.5. Curva de crecimiento

Se determinó la curva de crecimiento para la cepa MV1 de *G. jacobaea*. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

. Partiendo de cultivos de 72 horas de *G. jacobaea*, se tomaron alícuotas con las que se inocularon los cultivos que se emplearon para determinar la curva de crecimiento. Los medios de cultivos que se ensayaron en dichas curvas de crecimiento fueron: TSB, MHB, BHI y LB.

. Los cultivos se incubaron a 30 °C en agitación continua a 250 rpm durante al menos 120 horas.

. Se determinó la densidad óptica de los cultivos a 550 nm, en intervalos de 12 horas. Las distintas medidas de densidad óptica se representaron gráficamente frente al tiempo.

3.6. Extracción y purificación de proteínas de pared de *Gordonia jacobaea*

Debido a la ausencia de un protocolo de extracción de proteínas de pared establecido para los miembros del género *Gordonia* y bacterias relacionadas, se revisó la bibliografía existente y se estudiaron los distintos protocolos publicados para la extracción de proteínas de pared en los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium* y *Rhodococcus*. Se optó por probar dos métodos de extracción, el primero basado en la extracción de proteínas de pared mediante el uso de disolventes orgánicos (método de Lichtinger), y un segundo método en que se empleaba detergentes como el Genapol X-80 para facilitar la extracción de las proteínas de pared (método de Heinz y Niederweis).

3.6.1. Método de Lichtinger

Se trata de un método de extracción de proteínas de pared realizado mediante disolventes orgánicos. Descrito por Lichtinger en 1999, que se llevó a cabo incluyendo algunas modificaciones, las cuales se describen a continuación (Lichtinger et al. 1998).

. Se prepararon cultivos de *G. jacobaea* en Erlenmeyers de 1 litro con 200 ml de medio de cultivo TSB, que se mantuvieron en agitación continua a 30 °C durante 72 horas.

. Se centrifugaron los cultivos durante 10 minutos a 5000 rpm y 4 °C, con un rotor Sorval en una centrifugadora Hermle modelo Z 230 MA, tras lo cual se realizaron 1 o 2 lavados con tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.4. Se descartó el sobrenadante.

. El *pellet* celular se resuspendió en una disolución acabada de preparar con una parte de cloroformo y dos partes de metanol, en una proporción de 6 ml de disolución por cada gramo de *pellet* celular. Esta suspensión se mantuvo en agitación durante 24 horas en un recipiente cerrado herméticamente para evitar la evaporación del cloroformo. En el protocolo original de Lichtinger la extracción se llevaba a cabo a

30° C y durante tan solo 10 horas, en nuestro caso se optó por prolongar el proceso de extracción y hacerlo a temperatura ambiente con la intención de ayudar a preservar la actividad de las proteínas y aumentar la extracción de estas.

. Tras 24 horas de agitación, la suspensión se incubó durante una hora en hielo y se centrifugó a 10.000 rpm y 4 °C durante 10 minutos utilizando un rotor Sorvall en una centrífuga Hermle modelo Z 230 MA.

. Se descartó el *pellet* y el sobrenadante se diluyó 10 veces con éter frío, tras lo cual se mantuvo durante 24 horas a -20 °C. En el protocolo presentado por Lichtinger la incubación fue *over night*, en nuestro caso ampliamos el periodo de incubación a -20°C porque observamos que con 12 horas de incubación la suspensión se mantenía muy turbia y apenas se apreciaba precipitado proteico, mientras que a 24 horas obteníamos un precipitado estable y la solución se observaba totalmente transparente.

. El precipitado y la mayor parte de la suspensión se centrifugó durante 30 minutos a 5000 rpm y 4 °C utilizando una centrífuga Hermle modelo Z 230 MA, se descartó el sobrenadante. Se dejó evaporar el éter residual durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió con una mínima cantidad Genapol X-80 al 1% en Tris 10 mM pH8.

3.6.1.1. Doble extracción de lípidos

Consiste en mejorar la purificación de las proteínas obtenidas mediante una segunda eliminación de los lípidos residuales de la pared, con una segunda extracción con éter. El proceso se llevó a cabo del siguiente modo.

. Se tomó 40 µg de *pellet* proteico y se añadió 40 µl de Genapol X-80 al 1% en Tris 10 mM y 2 mM de EDTA a pH8.

. Una vez resuspendido el *pellet*, se añadió 900 µl de éter frío, se agitó y se mantuvo a -20 °C durante 24 horas.

. La suspensión se centrifugó a 5000 rpm en una centrifugadora Sorval RC 50 plus con rotor Sorval ss-34 durante 20 minutos a 4 °C tras lo cual se formaron dos fases una superior de aspecto graso y otra inferior más fluida. Ambas muestras se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE.

3.6.2. Método de Heinz y Niederweis

Se halló un segundo método de extracción de proteínas de pared en micobacterias, en el cual se emplean detergentes en lugar de disolventes orgánicos. Consiste en poner las bacterias en contacto directamente con una solución de Genapol X-80. Este método ha sido empleado en la purificación de la porina MspA de *Mycobacterium smegmatis* (Heinz & Niederweis 2000). El protocolo que se siguió fue el siguiente:

. Se prepararon cultivos de *G. jacobaea* en erlenmeyers de 1 litro con 200 ml de medio TSB, y se mantuvieron en agitación continua a 30 °C durante 72 horas.

. El cultivo se centrifugó a 8000 rpm a 4 °C durante 5 minutos en una microcentrífuga Hermle modelo Z 230 MA, el *pellet* celular se lavó con PBS y se volvió a centrifugar.

. Se resuspendieron las células bacterianas en un solución PO05 (solución de Genapol) en una relación de 1.5 ml de solución por cada 100 mg de *pellet* celular.

Solución PO05	
Genapol X-80	0.5 ml
Na H ₂ PO ₄ (100mM)	50 ml
Na ₂ H PO ₄ (100mM)	50 ml
EDTA (0.1M)	50 µl
Na Cl	0.43 g
pH final	6.5

. La suspensión se incubó a 80°C durante 30 minutos, tras lo cual se incubó 10 minutos más en hielo.

. Se centrifugó la suspensión a 13.000 rpm y 4 °C durante 30 minutos en una centrifugadora Sorval RC 50 plus con rotor ss-34.

. El sobrenadante se recuperó y se concentró diez veces mediante un *Speed Vap*.

. La muestra obtenida se analizó en electroforesis SDS-PAGE.

3.7. Electroforesis en geles SDS-PAGE de las proteínas de pared de *G. jacobaea*

Inicialmente para la visualización de las proteínas de pared mediante electroforesis en gel de acrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), se utilizó el protocolo descrito por Laemmli en 1970, pero dada la baja nitidez de las bandas obtenidas se decidió cambiar de método y emplear el desarrollado por Schägger en 1987. Este último sustituye el ión glicina por tricina, obteniéndose una mejor resolución en las proteínas de peso molecular bajo (Schägger & Jagow 1987; Schägger 2006). La medida de los geles fue de 100 mm por 80 mm y 1.6 mm de grosor y se llevaron a cabo en cubetas Ecogen.

3.7.1. Marcadores de peso molecular

En todos los geles, junto a la muestra, se incluyó un marcador de peso molecular.

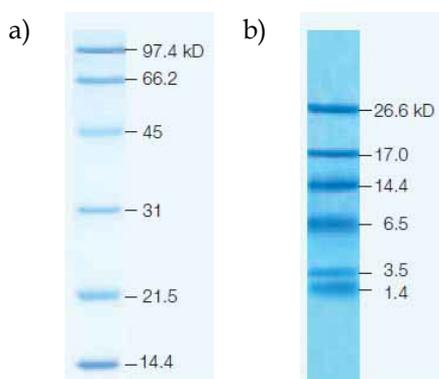


Figura 11. Marcadores de peso molecular utilizados. a) SDS-PAGE Standards Low Range de Bio Rad. b) Polypeptide SDS-PAGE Standard de Bio Rad.

3.7.2. Método de Laemmli

Este protocolo fue descrito por Laemmli en 1970 y modificado por Ames et al., en 1974 (Ames et al. 1974) y permite la separación de proteínas con un rango de pesos moleculares de entre 500 y 1 kDa. El protocolo se realizó del siguiente modo.

3.7.2.1. Preparación de las muestras

Se resuspendió 3 µg de *pellet* proteico con 6 µl de agua destilada estéril y 3 µl de tampón de muestra. La función del tampón de muestra es cargar negativamente las cadenas proteicas permitiendo que estas migren por acción de la carga eléctrica aplicada a la electroforesis y al mismo tiempo marcar el frente migratorio para permitirnos visualizarlo.

Una vez preparada la muestra se trató de dos formas distintas, se incubó a 37 °C durante 30 a 60 minutos o bien se hirvió durante 5 minutos con el fin de desnaturalizar las proteínas de la muestra.

Tampón de carga (método de Laemmli):

Agua destilada	4 ml
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	1 ml
Glicerol	0.8 ml
SDS 10% (w/v)	1.6 ml
2 β-mercaptoetanol	0.4 ml
Azul de bromofenol 0.05% (w/v)	0.2 ml

3.7.2.2. Preparación del gel de poliacrilamida

Para la elaboración de un gel separador (*separating*) con una concentración de acrilamida del 10% y la elaboración del gel concentrador (*stacking*) con una concentración de acrilamida del 4%, las cantidades de tampones y soluciones que se utilizaron fueron:

	Gel separador	Gel iniciador
Agua destilada	3.96 ml	4.06 ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	2.5 ml	
Tris-HCl 0.5M pH 6.8		1.66 ml
Acrilamida/bisacrilamida (30/1.6)	3.24 ml	860 ml
SDS 10%	100 µl	66 µl

Una vez preparadas las soluciones, se desgasificaron durante 15 minutos manteniéndolas al vacío, ya que el oxígeno es un inhibidor de la polimerización de la acrilamida a estas concentraciones. Seguidamente se inició la polimerización y para ello se añadió a las soluciones:

	Gel separador	Gel iniciador
APS 10%	50 µl	33 µl
TEMED	5 µl	7 µl

. Primero se polimerizó el gel separador, para ello se rellenó el molde hasta ocupar aproximadamente 2/3 del total, se vertieron unas gotas de isopropanol saturado en agua para evitar que el gel entrase en contacto con el aire y así favorecer su polimerización.

. Una vez polimerizado, se limpió la superficie del gel y se eliminó cualquier rastro de isopropanol con agua destilada y se incorporó la solución del gel concentrador, se colocó el molde de los pocillos y se dejó polimerizar a temperatura ambiente.

Las soluciones empleadas fueron:

. APS al 10%

Se preparó justo antes de elaborar los geles.

. Solución de acrilamida/bisacrilamida 30/1.6

Se preparó de modo que la concentración final fue de un 29.2 % de acrilamida y un 0.8 % de bisacrilamida. La solución se preparó con agua destilada utilizando guantes y mascarilla ya que la acrilamida

tanto en polvo como disuelta es neurotóxica. Tras la completa disolución de la acrilamida, se filtró y conservó a 4 °C en oscuridad guardada en un recipiente impermeable a la luz.

3.7.2.3. Recorrido de las muestras

Las muestras se corrieron a un voltaje de unos 10 mA (aproximadamente 70 V) en condiciones de corriente variable hasta que las muestras acabaron su recorrido por el gel concentrador, y a unos 15 mA (aproximadamente de 100 a 110 V) en condiciones de corriente continua hasta que el frente de la electroforesis llegó al final del gel separador.

Solución de recorrido (x5)

Tris base	15 g/l
Glicina	72 g/l
SDS	5 g/l
pH final 8.3	

3.7.2.4. Tinción de los geles

Una vez finalizada la electroforesis, se siguieron los siguientes pasos para teñir y visualizar las bandas de proteínas analizadas en los geles de acrilamida.

. Se sacaron los geles y se sumergieron en 50 ml de solución I durante una hora y en agitación constante.

. Se llevó a cabo la destinción de los geles decantando la solución I y sustituyéndola por solución II. Se realizaron varios lavados de los geles, hasta obtener una visualización correcta de las bandas de proteínas.

. Por último se sumergió el gel en solución III, la cual permitió mantenerlo hidratado durante varios días.

Solución I

Metanol	450 ml
Ácido acético	50 ml
Azul de Coomassie	1 g
Agua destilada	450 ml

Solución II

Metanol	500 ml
Ácido acético	100 ml
Agua destilada	500 ml

Solución III

Metanol	10 ml
Ácido acético	10 ml
Agua destilada	180 ml

3.7.3. Método de Schägger

Las electroforesis de poliacrilamida realizadas con tricina se utilizan comúnmente para separar proteínas de entre 1 y 100 kDa, pero sobre todo para proteínas del orden de 30 kDa. Los geles con tricina se utilizan a una concentración menor de acrilamida lo que permite una mejor separación de las proteínas de menor peso molecular, así como una más fácil electrotransferencia y elución de las proteínas de la matriz de acrilamida. Esta cualidad resulta especialmente interesante en el estudio de las proteínas de naturaleza hidrofóbica (Schägger & Jagow 1987; Schägger 2006).

3.7.3.1. Preparación de las muestras

Se resuspendió 3 µg de *pellet* proteico con 6 µl de agua destilada estéril y 3 µl de tampón de muestra, este nos permitió visualizar el frente migratorio de la electroforesis y cargar las proteínas negativamente para poder ser movilizadas hacia el cátodo. Las muestras, antes de ser

cargadas en el gel e iniciar la electroforesis fueron tratadas a 100 °C durante 5 minutos y a 37 °C durante 60 minutos para comprobar si estaban formadas por más de una subunidad. También fueron incubadas con tampones de carga con β -mercaptoetanol y sin este agente reductor, para estudiar la existencia de puentes disulfuro entre las distintas cadenas proteicas.

Solución de muestra

La solución de muestra se preparo tanto en condiciones reductoras añadiendo β -mercaptoetanol, como no reductoras.

	Tampón de muestra reductor	Tampón de muestra no reductor
SDS	12 g	12 g
β -mercaptoetanol	6 ml	
Glicerol	30 ml	30 ml
Coomassie blue G-250	0.05 g	0.05 g
Tris HCl (pH 7)	1.82 g	1.82 g

3.7.3.2. Preparación del gel de poliacrilamida

Las concentraciones de acrilamida en el gel separador fueron del 10% y del 16% y en el gel concentrador siempre se utilizaron concentraciones del 4%.

	Separating (10%)	Separating (16%) + urea	Staking
Acrilamida AB3 (50%)	2 ml	3.33 ml	0.5 ml
Agua destilada	3.66 ml	2.33 ml	4 ml
Diön. amortiguadora	3.33 ml	3.33 ml	1.5 ml
Glicerol	1 ml		1.66 ml
Urea		3.6 g	
APS 10%	50 μ l	50 μ l	45 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l	4.5 μ l

Inicialmente se vertió la solución del gel separador hasta ocupar 2/3 del total del molde del gel, se dejó polimerizar entre 15 y 30 minutos. A continuación se incorporó la solución del gel concentrador, se introdujo el molde de los pocillos y se dejó polimerizar.

. Solución de acrilamida/bisacrilamida AB3

Se preparó de modo que la concentración final de acrilamida fuese un 49.5 % de acrilamida y un 3 % de bisacrilamida. La solución se preparó con agua miliQ templada utilizando guantes y mascarilla ya que la acrilamida tanto en polvo como disuelta es neurotóxica, tras la completa disolución se filtró y conservó a 4°C en oscuridad.

. Solución amortiguadora del gel

Se preparó de modo que la concentración final de este tampón fuese de un 0.3% de SDS y 3M de tris-HCl, ajustando la solución a un pH final de 8.45.

3.7.3.3. Recorrido de las muestras

Las muestras se corrieron a un voltaje inicial de 30 V en corriente variable. Una vez las proteínas entraron en el gel separador se pasó a 60 a 80 mA y corriente continua. Para la realización de la electroforesis se prepararon tampones distintos para sumergir la parte de gel en contacto con el ánodo y otra distinta para la parte en contacto con el cátodo.

. Solución de recorrido (x10)

	Ánodo	Cátodo
Tris base	12 g	12 g
Tricina		18 g
SDS		1 g
Agua destilada	100 ml	100 ml
pH final	8.9	No ajustado

3.7.4. Tinción de los geles

Inicialmente los geles de acrilamida se tiñeron siguiendo el protocolo establecido en nuestro laboratorio:

. Se introdujeron los geles en una solución de metanol al 45%, ácido acético al 5% y azul de Coomassie Blue R-250 0.1%, durante una hora en agitación continua.

. La solución de tinción se decantó y se añadió una solución compuesta por metanol al 45% y ácido acético al 10%. Se realizaron varios lavados con esta solución hasta que el gel quedó suficientemente desteñido como para observar las bandas de proteínas.

. Finalmente se rehidrató el gel introduciéndolo en una solución de metanol al 5% y ácido acético al 5%.

Con la utilización de esta técnica la visualización de las bandas fue muy pobre por este motivo se buscaron otras técnicas de tinción basadas en el colorante Coomassie Blue pero que fuesen más sensibles y compatibles con otras técnicas de uso posterior, como la espectrometría o la secuenciación de Edman.

3.7.4.1. Tinción con Coomassie coloidal, protocolo de Wang

Se trata de una modificación del protocolo de tinción con Coomassie coloidal publicado por Neuhoff en 1985 y modificado por Wang en 2007 (Wang et al. 2007; Dyballa & Metzger 2009). Esta técnica de tinción es compatible con posteriores estudios de espectrometría de masas y su sensibilidad permite detectar proteínas en cantidades de nanogramo. La mayor sensibilidad respecto a otros métodos de tinción se consiguió gracia a la incorporación de un 10% de metanol en la solución fijadora del gel, la introducción de una fase de sensibilización, y al incremento de la concentración de Coomassie Blue G-250, del 0.1% al 0.125%, en la solución de tinción. El proceso de tinción se describe a continuación:

. Se sumergió el gel durante 1 hora en la solución fijadora preparada con ácido acético al 10%, metanol al 10% y etanol al 40%.

. La solución fijadora se decantó y el gel se puso en contacto con una solución de sensibilización preparada con ácido acético al 1%, sulfato de amonio al 10%, durante 2 horas.

. El gel se tiñó con una solución de ácido acético al 5%, etanol al 45%, y Coomassie Blue al 0.125%, durante como mínimo 4 horas, aunque lo aconsejable es mantenerlo *over night*, en agitación continua.

. Se decantó el colorante y se añadió una primera solución de destinción I, preparada con ácido acético al 5% y etanol 40%. Se mantuvo en agitación durante 1 hora.

. La finalización del desteñido del gel se logró introduciéndolo este en una solución de destinción II preparada con ácido acético al 3% y etanol al 30%. Esta solución se cambió varias veces hasta que el gel quedó suficientemente desteñido.

Esta técnica de tinción posee una sensibilidad estimada aproximada de 1 ng de proteína por mm².

3.7.4.2. Tinción de Schagger

Se trata de una modificación del método de tinción descrito por el mismo autor en 1987. Inicialmente en la solución de tinción se utilizó como colorante Servan Blue G, en esta modificación se reemplazó este pigmento por Coomassie Blue G-250. Para acelerar el proceso de teñido y fijación, no se utilizó metanol ni en la solución de tinción ni en la de destinción, logrando de este modo una mayor nitidez de las bandas al conseguir una fijación más rápida, especialmente en las bandas de proteínas de menor tamaño (Schagger 2006). El proceso de tinción se describe a continuación:

. Se introdujo el gel en una solución fijadora preparada con ácido acético al 10%, metanol al 50% y acetato de amonio a una

concentración final de 100 mM, durante una hora como mínimo. Los geles se pueden mantener en esta solución durante varios días.

. Se inició la tinción, introduciendo el gel en una solución de ácido acético al 10% y Coomassie Blue G-250 al 0.025%, una hora como mínimo.

. Se transfirió el gel teñido a una solución de destinción preparada con ácido acético al 10% y se cambió esta solución hasta que el gel quedó suficientemente desteñido.

Esta técnica de tinción posee una sensibilidad aproximada de 10 ng de proteína por mm².

3.7.4.3. Tinción con Blue silver. Protocolo de Candiano

Se trata de una modificación del protocolo de tinción con Coomassie coloidal publicado por Neuhoff en 1985, que según sus autores ofrece una sensibilidad similar a la de tinción de plata. Las modificaciones propuestas por Candiano en 2004 (Candiano et al. 2004) consisten en aumentar la concentración de Coomassie Blue G-250 de 0.1 a 0.12% e incrementar la concentración del ácido fosfórico del original 2% a un 10%. Las ventajas obtenidas al seguir este método se deben a la acidificación de la solución gracias a la introducción de este ácido. Al bajar el pH, los grupo sulfurados de las moléculas de Coomassie Blue, tanto R-250 como B-250, se unen iónica o hidrofóbicamente a las moléculas de proteína. En esta unión los aminoácidos básicos, lisina, histidina y arginina son muy importantes, por este motivo la acidificación del medio podría favorecer que algunos residuos de ácido glutámico y aspártico quedasen parcialmente disociados, así como el grupo carboxilo terminal, al mismo tiempo que el grupo sulfurado del Coomassie también quedase más disociado, facilitando la unión y teñido de las proteínas, ya que parece ser que en estas condiciones las moléculas de pigmento se unen más favorablemente gracias a esta acción iónica. Los pasos seguidos fueron:

. Se introdujo el gel en 20 volúmenes de solución fijadora preparada con ácido acético al 10% y etanol al 40%, durante una hora como mínimo.

. El gel se lavó con agua destilada 2 veces durante 10 minutos.

. Se inició la tinción sumergiendo el gel en la solución de tinción preparada con ácido fosfórico al 10%, sulfato de amonio al 10%, Coomassie Blue al 0.12% y metanol al 20%, y se mantuvo en agitación continua *over night*.

. Se decantó la solución de tinción y se introdujo el gel en una solución de mantenimiento preparada con ácido acético al 1%.

Esta técnica de tinción posee una resolución aproximada de 3 ng de proteína por mm².

3.7.4.4. Tinción rápida de Kang

Para lograr una mayor sensibilidad, este método propone el uso de sales de aluminio III, las cuales, según los autores, aumentan la penetración de los pigmentos en la matriz del gel de acrilamida y acelera el proceso de teñido. También propone sustituir el metanol por etanol, menos tóxico, para preparar la solución de fijación. Este tipo de tinción no necesita desteñido, y las bandas empiezan a ser visibles a partir de una hora desde inicio de la tinción y a las 2 horas, los autores afirman que se obtiene el 90% del máximo de resolución de la técnica (Kang et al. 2002). El proceso de tinción se describe a continuación:

. Se introdujo el gel en 20 volúmenes de solución de fijación preparada con ácido fosfórico al 2% de y etanol al 30%, durante 2 horas.

. Se puso a teñir el gel en 20 volúmenes de solución de tinción preparada con ácido fosfórico al 2%, sulfato de aluminio al 5%, etanol al 10% y Coomassie Blue al 0.2%, durante 2 horas en agitación.

. Según el protocolo publicado no es necesario desteñir el gel.

Esta técnica de tinción posee una resolución aproximada de 1 ng de proteína por mm².

Tinción	Sensibilidad	Tpo.	Peculiaridad	Compatibilidad
Comassie Coloidal	1 ng/mm ²	24 h		Espectrometría Edman
Schägger	10 ng/mm ²	8 h	Fijación rápida/Mejor visualización de proteínas pequeñas	Espectrometría Edman
Blue Silver	3 ng/mm ²	12 h	Acidificación, mejor visualización	
De Kang	1 ng/mm ²	2 h	Rápida/No metanol	

3.7.4.5. Tinciones de plata

Con la intención de mejorar aún más la sensibilidad y detección de las bandas de proteínas en geles de acrilamida, los geles también se tiñeron siguiendo el protocolo de tinción con plata establecido en el laboratorio. Para ello:

. El gel se introdujo en una solución de lavado durante 3 horas, preparada con acético al 5% y etanol absoluto al 35%. El gel se puede mantener en esta solución *over night*.

. Se sensibilizó el gel sumergiéndolo en una solución preparada con acético al 5%, etanol absoluto al 35% y ácido periódico al 0.7%.

. Se realizaron 3 lavados con agua destilada durante 15 minutos cada uno.

. Inmediatamente antes de iniciar la tinción, se preparó la solución de nitrato de plata de la siguiente forma. Se preparó una solución A con 0.5 gramos de nitrato de plata en 2.5 ml de agua destilada y una solución B con 1.4 ml de hidróxido de sodio 1N, 1 ml de amoníaco al 30% y 70 ml de agua destilada. La solución A y B se mezclaron en agitación constante justo antes de su uso.

. Se mantuvo el gel sumergido en la solución de tinción durante 7 minutos.

. Se realizaron tres lavados con agua destilada, cada uno de ellos durante 5 minutos.

. Se reveló el gel sumergiéndolo en una solución preparada con 50 μ l de ácido acético al 10%, 50 μ l de formaldehído y 100 ml de agua destilada. La solución de revelado se dejó actuar hasta que aparecieron las bandas.

. Se paró el revelado introduciendo el gel en una solución preparada con 10 ml de acético al 10%, 90 ml de agua destilada y unas gotas de metilamina.

3.8. Extracción de proteínas de un gel de acrilamida por elución pasiva

Como método de purificación de las proteínas de pared extraídas de *G. jacobaea* se utilizaron electroforesis preparativas. Las bandas proteicas obtenidas por electroforesis, pero no teñidas ni fijadas, fueron eluidas pasivamente y su actividad formadora de poro se estudió mediante la técnica de *Black Lipid Bilayer*. Los pasos que se siguieron para eluir las bandas fueron:

. Los geles destinados a obtener proteínas purificadas se prepararon añadiendo un primer carril con un marcador proteico, un segundo carril con una muestra de la extracción proteica a analizar, y un tercer carril, generalmente de mayor tamaño (macro carril), que contendría las bandas de proteínas a purificar.

. Tras finalizar la electroforesis se lavó el gel con agua destilada durante unos minutos en agitación continua, este proceso se llevó a cabo para eliminar el exceso de SDS, pero no se prolongó más de 3 minutos para evitar que las bandas de proteínas difundiesen.

. Con un bisturí estéril, se cortaron los carriles que contenían el marcador proteico y la muestra de referencia, y se inició su tinción.

. Se tomó el macrocarril restante que contenía las proteínas a purificar y se procedió a seccionarlo en fragmentos paralelos que pudieran contener cada una de las posibles bandas.

. Los fragmentos de gel fueron triturados con ayuda de una jeringa, introducidos en eppendorfs estériles y se pusieron en contacto con la solución extractora. Se añadió entre 30 y 40 μl de solución extractora por banda de proteína. Las soluciones extractora utilizada fue: Genapol X-80 1% en Tris-HCl 10 mM pH8, pero también se probó la extracción con agua destilada estéril y acetonitrilo.

. Los eppendorfs se pusieron en agitación durante 24 a 48 horas a temperatura ambiente.

. Seguidamente los eppendorf se centrifugaron a 10.000 rpm en una centrifugadora Biofuge Fresco Heraeus, durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante.

. A continuación se procedió a realizar una segunda extracción de las proteínas del gel repitiendo los pasos anteriormente descritos.

. La solución de elución se conservó un mínimo de 24 h a -80°C , transcurrido este tiempo se liofilizó en un liofilizador Telstar Cryodos .Este liofilizado mantiene las muestras a -50°C y en vacío hasta la evaporación total del agua.

3.9. Estudio de la capacidad formadora de poro. *Black Lipid Bilayer Technique*

Existen varias metodologías para estudiar la capacidad formadora de poro de las proteínas de membrana. En nuestro caso optamos por el método desarrollado por el Dr. Benz y Hancock en 1978 en la Universidad de Wurzburg, Alemania (Benz, R. 1978).

3.9.1. Principios del método

Este método consiste en el estudio de la conductancia eléctrica a través de una membrana lipídica artificial, la cual es impermeable a los iones. Cuando en esta membrana se insertan proteínas, péptidos o toxinas con capacidad formadora de poro (porinas), se producen orificios por los cuales pueden atravesar los iones de una cámara a otra y este paso de iones se manifiesta como un cambio de corriente eléctrica que es detectada por unos electrodos de plata (Ag/AgCl) y los cuales reflejan un aumento de la conductancia de la membrana. La conductancia de cada porina dependerá del tamaño de orificio que forme en la membrana, así como del tipo de canal formado y estará influenciada por las cargas internas del poro.

Cada porina posee unas cualidades propias de conductancia y selectividad. Por ejemplo la porina MspA de *M. smegmatis* posee una conductancia de 2.3 nS mientras que la conductancia de una de las porinas de *E. coli*, la Tsx está alrededor de 10 pS. Algunas porinas son selectivas para el transporte de solutos concretos, otras tienen mayor afinidad por el transporte de iones catiónicos o aniónicos, o no muestran ningún tipo de selectividad. Con la técnica de la *Black Lipid Bilayer* intentamos obtener esta información de las porinas obtenidas de *G. jacobaea*.

Equipo

El experimento se realiza en dos cámaras de teflón, separadas por una pared en la cual se le había practicado un orificio de aproximadamente 0.5 mm². En el extremo de una de las cámaras hay una ventana para poder observar el estado de la bicapa lipídica que se ha de formar en el orificio y en la cual se insertarán las proteínas formadoras de poro que se vayan a estudiar. A cada una de las cámaras se añadió una solución salina que contenía el ión o el soluto del cual se quiso estudiar su transporte a través de los poros formados en membrana lipídica, y para detectar los cambios de potencial eléctricos, se sumergió en cada una de las cámaras un electrodo de Ag/AgCl.

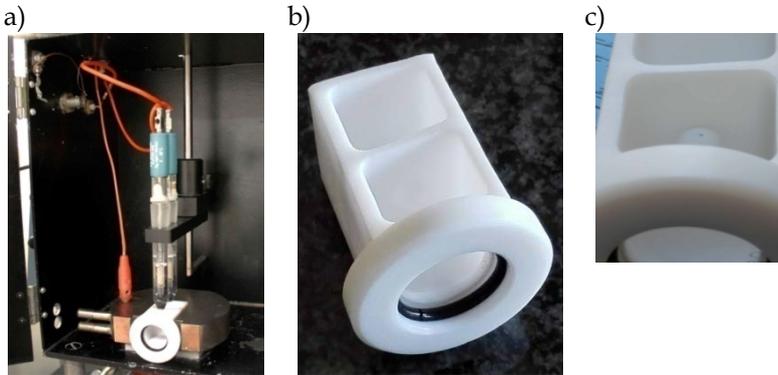


Figura 12. a) Cámara de F araday que contiene la cámara doble de teflón en la que se sumergen los dos electrodos de Ag/AgCl. b) Imagen de la cámara de teflón y c) detalle de orificio entre las dos cámaras.

La cámara y los electrodos se encuentran dentro de una caja de F araday cuya función es la de evitar que fuerzas externas puedan ser detectadas por los componentes, disminuyendo de este modo el ruido de fondo de la señal.

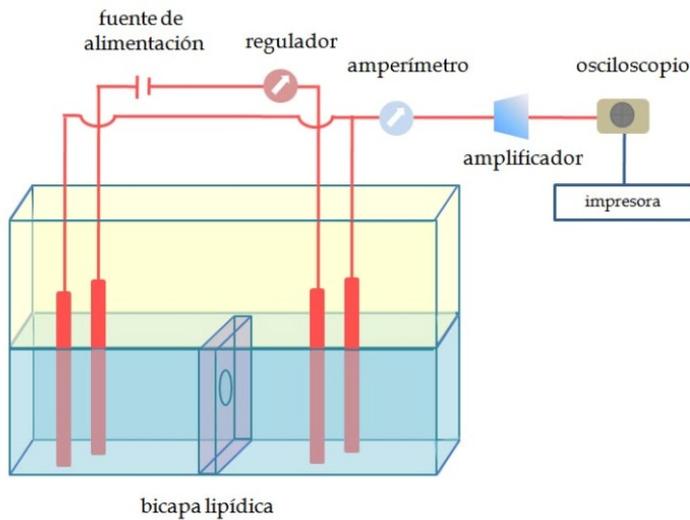


Figura 13. Disposición esquemática del sistema de Black Lipid Bilayer.

Material y métodos

Uno de los electrodos está conectado a una fuente de voltaje y el otro detecta los incrementos de conductancia de la membrana y envía la señal a un amplificador. El amplificador a su vez, cumple dos funciones, filtrar la señal recibida y enviarla a una impresora donde queda registrada. Estos resultados pueden ser matemáticamente analizados.

Otros elementos del sistema de *Black Lipid Bilayer* son:

- . Un electrómetro que verifica la simetría electroquímica de los electrodos.
- . Un osciloscopio que ayuda a distinguir inserciones rápidas en la membrana, cuando la actividad de la muestra es demasiado alta para reconocer inserciones de poros individuales.
- . Un telescopio que permite visualizar el orificio de la cámara e interpretar si la bicapa lipídica se ha formado correctamente.
- . Una base amortiguada neumáticamente que estabiliza el conjunto y evita que vibraciones externas alteren la estabilidad de la membrana o den falsas señales de inserción.
- . Un agitador magnético que ayuda a mezclar los solutos ensayados en experimentos de selectividad de iones o de titración.

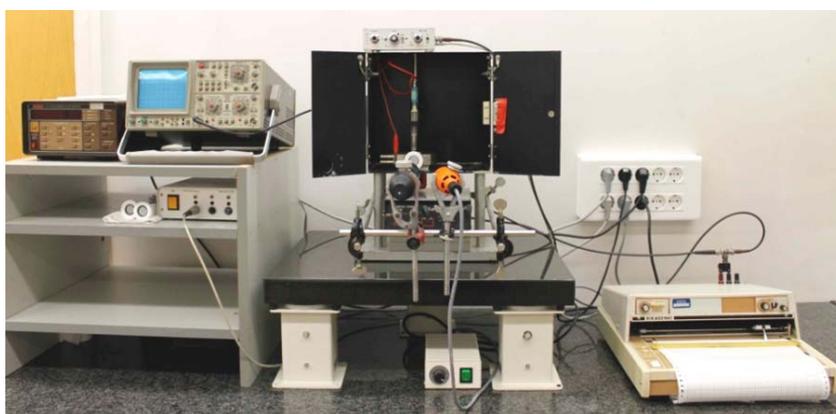


Figura 14. Equipo completo *Black Lipid Bilayer*.

3.9.2. Preparación y *pre-printing* de la cubeta

Previo a la formación de la membrana lipídica, es necesario preparar los bordes del orificio donde esta se formará, mediante un *pre-printing*, es decir un encebado de los bordes con un lípido que facilite la formación y extensión de la bicapa lipídica. Los pasos que se siguieron se explican a continuación:

. Se limpió la cubeta con etanol al 90% para evitar restos de muestras, lípidos, etc.

. Se aplicaron 2 μ l de DiphPC (Difitanoil fosfatidilcolina) al 2% (w/v) disuelto en cloroformo alrededor del poro que separa las dos cámaras de la cubeta, tanto por la parte trans (la más alejada del vidrio) como por la cis.

. La cubeta se secó introduciéndola en una cámara al vacío durante 5 a 10 minutos.

. Se colocó la cubeta en el soporte y se añadieron 5 ml de la solución salina a testar en cada una de las cámaras.

. Se pasó a la construcción de la membrana lipídica. Para ello y con ayuda de un asa circular, limpiada previamente con etanol al 99° y bien seca, se aplicaron 2 μ l de DiphPC 1% sobre el lado trans de la cubeta alrededor del orificio del poro. Los lípidos se arrastraron sobre el poro para propiciar la formación de la membrana.

. Para confirmar que la membrana estaba correctamente formada y estaba constituida por una sola bicapa lipídica, se observó ésta con ayuda de un telescopio. Si la imagen observada es la de un orificio oscuro y no hay reflexión de luz, es que la membrana esta correctamente construida. En este estado no se produce paso de iones a través de la bicapa y por tanto no se detecta paso de corriente. La membrana (bicapa lipídica) se dejó estabilizar durante 5 minutos antes de añadir la muestra a analizar.

Las soluciones salinas utilizadas fueron:

KCl en las siguientes concentraciones 0.1, 0.3, 1 y 3M.

LiCl a la concentración de 1M

Acetato potásico a la concentración de 1M

Formiato potásico a la concentración de 1M

3.9.2.1. Adición de la muestra

Con ayuda de una pipeta, se añadió de 1 a 5 μ l de la muestra proteica a testar, esta debe contener una concentración aproximada de proteínas de 100 ng/ml. Seguidamente se aplico un potencial de voltaje de +20 mV y se realizó el registro de la conductancia de membrana, que se utilizó para calcular la conductancia (G).

3.9.3. Conductancia de canal simple

Una membrana lipídica pura es impermeable a los iones; por lo tanto, cuando se aplica un voltaje a través de ella, no hay conductancia a través de la membrana. Cuando una porina se inserta en la membrana, esta se hace permeable a los iones, que ahora pueden pasar a través de la ella. El aumento de la conductancia con la inserción de cada porina se puede registrar y visualizar con ayuda de una impresora.

Para realizar la medición, la tensión de escala completa en la impresora se ajustó entre 100 y 500 mV. Fueron necesarias las inserciones de unas 100 porinas para tener un valor de conductancia estadísticamente significativo, valor que se representó a través de un histograma que permite identificar la conductancia más frecuente.

La conductancia de canal simple de una porina se define como el valor de conductancia más frecuente observado en una muestra pura. Matemáticamente la conductancia se define como:

$$G = \frac{I}{U_e}$$

Es decir

$$\text{Conductancia (S)} = \frac{\text{Corriente del sistema (A)}}{\text{Tensión aplicada (V)}}$$

En la configuración experimental, la corriente del sistema (I) es amplificada y transforma en un voltaje de salida (Us) que se convierte en el parámetro registrado. Este voltaje de salida es proporcional a la corriente del sistema (I) y a Vf (V/A) que es el factor de amplificación en el proceso de registro. De modo que la corriente de sistema la podemos definir como:

$$I = \frac{Us}{Vf}$$

Es decir:

$$\text{Corriente(I)} = \frac{\text{Tensión de salida (V)}}{\text{Factor de amplificación (V/A)}}$$

En consecuencia:

$$G = \frac{Us}{VfxUe}$$

$$\text{Conductancia(S)} = \frac{\text{Tensión de salida(V)}}{\text{Factor de amplificación } \left(\frac{V}{A}\right) \times \text{Tensión de entrada (V)}}$$

En la práctica, la conductancia se evalúa mediante el registro impreso de los cambios de potencial en un papel dividido en 100 particiones. Para calcular cuanta diferencia de potencial corresponde a cada una de estas particiones, se divide el potencial aplicado total por 100 (escala) (Uv). Sustituyendo este valor en la ecuación anterior, podemos obtener la conductancia por partición (Cs):

$$Gk = \frac{Uv}{VfxUe \times 100}$$

De este modo la conductancia de canal simple de una porina se obtiene de multiplicar G_k (conductancia por partición) por el número de separaciones (particiones) del papel milimetrado.

3.9.4. Selectividad iónica

Algunas porinas muestran mayor permeabilidad hacia cationes o hacia aniones, esto se debe a la diferente distribución de cargas eléctricas en el interior del canal de la porina. Para testar si una porina muestra selectividad iónica, y de qué tipo, se establece un gradiente de concentración iónica entre las dos cámaras. El tipo de ión por el cual la porina muestra selectividad es transportado preferentemente de la cámara más concentrada a la más diluida. El proceso se detiene cuando el potencial electroquímico se equilibra entre ambas cámaras. Esta diferencia de potencial se puede medir con un electrómetro y el coeficiente de permeabilidad (P_c/P_a) puede calcularse con la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz.

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_c C_t + P_a C_c}{P_c C_c + P_a C_t}$$

Donde

V_m es el potencial de membrana.

R es la constante de los gases.

T es la temperatura absoluta

F es la constante de Faraday

P_c es la permeabilidad de los cationes

P_a es la permeabilidad de los aniones

C_c es la concentración iónica en el compartimento cis

C_t es la concentración iónica en el compartimento trans cuando $C_t > C_c$

El procedimiento fue el siguiente:

. Se llenaron ambas cámaras con 5 ml de KCl a una concentración de 0.1 M y se construyó la membrana.

. Se introdujo la muestra proteica y se registraron al menos 100 inserciones, hasta que el proceso entró en fase estacionaria, es decir dejaron de producirse inserciones.

. Se detuvo la aplicación de voltaje y se añadió 100 μ l de la solución salina a estudiar, con una concentración de 3 M en la cámara cis, al mismo tiempo que se añadió 100 μ l más de solución de KCl 0.1M en la cámara trans, para equilibrar los volúmenes e impedir que se produjese un movimiento de iones producido por presiones osmóticas.

. El valor de tensión se apreció después de alcanzar el potencial electroquímico. El proceso se repitió varias veces aumentando proporcionalmente el gradiente de concentración de la sal a estudiar. De este modo si la tensión aumenta positivamente, la porina se considera catiónica ($P_c/P_a > 1$), sin embargo, si los valores son negativos se la considera aniónica ($P_c/P_a < 1$). En el caso de que la porina no muestre cambios de voltaje, o que estos sean próximos a 0 o con un P_c/P_a cercano a 1, se considerará que no es selectiva para iones.

Además de KCl se pueden emplear otras sales con radios hidrodinámicos catiónicos y aniónicos diferentes. En el caso del LiCl, el radio catiónico del (Li^+) es mayor que el del anión (Cl^-), en el caso del KCH_3COO el anión (CH_3COO^-) es mucho mayor que el catión (H^+). Este efecto se ha de tener en cuenta antes de categorizar una porina como aniónica o catiónica ya que en algunos casos una porina no selectiva puede mostrar una carga de membrana negativa en presencia de LiCl con valores $P_c/P_a < 1$, no por una cuestión de selectividad, sino por un tamaño de poro pequeño que dificulte el paso de los iones Cl^- .

3.9.5. Dependencia de voltaje

Algunas porinas muestran la propiedad de cerrarse total o parcialmente, de un modo temporal o permanente, dependiendo del

voltaje que se les aplica, y este voltaje de cierre es característico de cada canal. Porinas dependientes de voltaje permiten el flujo de sustratos a través de los canales iónicos que forman, pero cuando el voltaje a través de la membrana en la que se inserta la porina alcanza un cierto nivel, la porina cambia de conformación y la conductancia a través de ella disminuye e incluso se puede cerrar. Estos cierres pueden ser definitivos o reversibles, en cuyo caso, la porina puede volver a abrir su canal de transporte una vez finaliza o se reduce la aplicación del voltaje.

El procedimiento fue el siguiente:

. Se añadieron 5 ml de KCl 1 M a cada una de las cámaras y se construyó la membrana lipídica en el orificio de separación.

. Se ajustó la escala completa a 500 mV, y 5 microlitros de la solución de porinas se pipetearon en cada compartimiento de la cubeta. La membrana se dejó a saturar con porinas (unas 100 inserciones o hasta estabilizarse las inserciones).

. Cuando la conductancia a través de la membrana fue constante, la pluma en la grabadora se ajustó de modo que está quedase en el medio del papel.

. Se aplicó un pico de voltaje de 10 mV y se observó si se producía un corto periodo de cierre de los poros.

. Cuando la conductancia volvió a estabilizarse, se repitió el proceso esta vez aplicando un pico de voltaje negativo de -10 mV.

. Se repitieron los picos de voltaje en este orden 20, -20, 30, -30 y así continuamente, permitiendo cada vez la estabilización de la membrana, hasta testar picos de 100 a 150 mV.

. El porcentaje de poros cerrados se representó gráficamente. Este gráfico muestra la simetría o asimetría respecto al voltaje para valores positivos y negativos, así como la independencia de voltaje.

3.9.6. Especificidad de sustrato (titración de sustrato)

Algunas porinas muestran especificidad sobre el tipo de sustrato que las atraviesa. El método de *Black Lipid Bilayer* se puede utilizar para determinar esta especificidad a sustrato mediante la observación de la conductancia cuando el sustrato se añade a la cubeta experimental. Aunque el paso de sustratos a través de los canales que forma la porina no se pueden medir directamente, el hecho de que una porina se una a su sustrato con una constante de unión específica permite poder aplicar la ecuación cinética de Michaelis Menten. Con esta ecuación es posible relacionar la conductancia de una porina respecto al incremento de concentración del sustrato en cuestión.

$$C_s = \frac{C_{max}}{1 + K \cdot c}$$

Donde:

C_s es la conductancia después de la adición del sustrato

C_{max} es la conductancia antes de añadir el sustrato

K es la constante de estabilidad molar (l/mol)

C es la concentración de sustrato (m/l)

El procedimiento fue el siguiente:

. Se llenaron ambas cámaras con 5 ml de KCl 1M y se construyó la membrana.

. Se ajustó la escala completa a 500 mV, y 5 μ l de la solución de porinas se pipetearon en cada compartimiento de la cubeta. A la membrana se le permitió llegar a saturarse de porinas (unas 100 inserciones o hasta alcanzar la fase de estabilización).

. Una vez saturada la membrana se inició la incorporación de los sustratos a estudiar, añadiéndose 10 μ l en cada compartimiento y se esperó 5 minutos para permitir la distribución de estos a través de los

compartimentos y registrar cualquier efecto sobre la conductancia de la membrana saturada de porinas.

. Cuando se estabilizó de nuevo la conductancia, se añadieron 20 μl más del sustrato y se repitió el proceso de estabilización y registro.

. Este proceso se repitió con 50, 100, 200, 500 y 1000 μl , hasta que no se pudieron producir más adiciones o bien se produjo una clara disminución en la conductancia.

Con estos valores se puede calcular el porcentaje de porinas cerradas, el cual está vinculado con la constante de unión y la concentración del sustrato.

$$\frac{C - C}{C} = \frac{K \cdot c}{1 + K \cdot c}$$

La constante de saturación de una porina es la concentración de sustrato a la cual la mitad de los poros quedan bloqueados. Este valor K_1/K_2 es el recíproco de la constante de unión.

3.10. Transferencia de proteínas a una membrana de PVDF. *Souther blot*

Esta técnica consiste en transferir las proteínas inmersas en un gel de poliacrilamida hasta una membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride) utilizando para ello la fuerza de un campo eléctrico. La transferencia de las proteínas separadas mediante gel de poliacrilamida SDS-PAGE se realizó para poder obtener la secuencia N-terminal de la proteína en estudio, mediante la técnica de secuenciación automática de proteínas por degradación química de Edman.

Los pasos que se siguieron fueron:

. Los geles teñidos se equilibraron con tampón de transferencia durante 15 minutos.

. Se recortaron fragmentos de membrana de PVDF (Immobilon-PSQ PVDF Western Blotting Membranes, Roche) de 8 por 9 centímetros, se sumergieron durante 30 segundos en metanol para activar la

membrana y seguidamente se lavaron con agua destilada, tras lo cual se sumergieron en tampón de transferencia para equilibrarla.

. El gel y la membrana se colocaron entre varias capas de papel Whatman de 3 mm (Chromatography Paper, 3 MM CHR, Whatman) siguiendo la orientación presentada en la figura 15 y evitando la formación de burbujas.

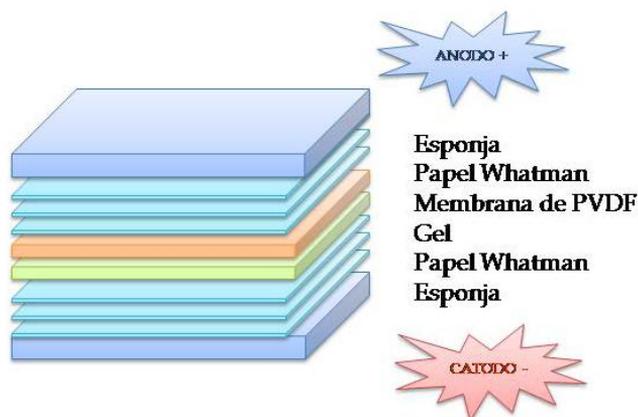


Figura 15. Disposición esquemática del montaje del casete para la transferencia de proteínas.

. La transferencia se llevó a cabo a 100 V durante una hora. Una vez finalizada las membranas se lavaron con abundante agua destilada, se dejaron secar y se conservaron a 4 °C durante 24 horas o a -20 °C si el almacenaje se prolongaba durante varios días.

Tampón de transferencia se preparó 10 veces concentrado, se diluyó y se añadió metanol justo antes de realizar la transferencia.

Solución de transferencia x10		
Tris	30 g	250 mM
Glicina	188 g	2.5 M

Solución de transferencia final:

Solución de transferencia x10	100 ml
Metanol	100 ml
H ₂ O csp	1000 ml

3.11. Secuenciación del extremo N-terminal mediante degradación de EDMAN

La degradación de EDMAN es la técnica con la que se puede determinar la secuencia del extremo amino terminal de una proteína, mediante degradaciones secuenciales de sus aminoácidos, los cuales son consecutivamente analizados e identificados. Esta técnica fue desarrollada por Pehr Edman en 1950.

En la preparación de la degradación de EDMAN las proteínas purificadas deben inmovilizarse en una membrana, generalmente una membrana porosa de polivinilideno fluorado (PVDF) o en un disco de fibra de vidrio modificada. Los ciclos químicos de Edman consisten en tres estadios:

1.- Unión: en esta fase el aminoácido situado en la posición amino-terminal de la proteína se une a una molécula de fenil isotiocianato (PITC) en condiciones básicas, para formar un fenil tiocarbanil (PTC) polipéptido.

2.- Rotura: en esta fase el residuo amino-terminal PTC, es separado de la cadena someténdolo a condiciones ácidas. Al quedar liberado se forma una estructura inestable denominada anilintiazolinona (ATZ).

3.- Conversión: en esta última fase el amino-ATZ es transformado en su correspondiente derivado feniltiohidantoina (PTH), siendo en este estado estable.

El aminoácido PTH es separado al finalizar cada ciclo de Edman y es identificado por cromatografía de HPLC clásica siendo detectados los picos de elución por absorbancia de UV.

La secuenciación de EDMAN se llevó a cabo en la Unidad de Proteómica de los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Barcelona.

3.12. Espectrometría de masas MALDI-TOF

La espectrometría de masas mide la relación entre masa y carga (m/z) de los iones en fase gaseosa. Consiste en una fuente de iones que convierte las moléculas a analizar en iones en fase gaseosa, un analizador de masas que separa las moléculas ionizadas en función de su relación m/z (masa/carga) y un detector que registra el número de iones y le asigna a cada uno un valor m/z . En el caso del MALDI (desorción/ionización por laser, asistida sobre matriz) se produce una ionización suave óptima para ionizar tanto péptidos como proteínas. Los 4 tipos de analizadores de masas más habituales son: cuadrupolo (Q), trampa de iones (trampa de iones cuadrupolo, QIT, iones lineal trampa, LIT o LTQ), analizador de masas por tiempo de vuelo (TOF), y el analizador de masas transformado de Fourier o ciclotrón de iones por resonancia (FTICR). Sus principios físicos y analítica obtenida varían en función del caso. A parte de estos se han desarrollado instrumentos "híbridos" diseñados para combinar las capacidades de diferentes analizadores de masas que incluyen el QQQ, QQ-LIT, Q-TOF, TOF-TOF, y LTQ-FTICR (Han et al. 2008).

Al identificar la proteína de 100 kDa susceptible de ser una porina, se realizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Previamente se procedió a su aislamiento mediante electroforesis en SDS-PAGE. Tanto la electroforesis como la fijación y tinción del gel se realizaron siguiendo el protocolo de Shägger. Una vez desteñido el gel, la banda de interés se recortó y se analizó mediante espectrometría de masas en el servicio de Proteómica de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Los pasos que siguieron fueron.

Digestión trípica de la banda del gel para ello:

. Destinción de la banda de proteína (recortada) con bicarbonato amónico 50 mM/ACN 50%.

. Reducción con DTT 20mM durante 40 minutos en agitación.

. Alquilación de la proteína con iodoactamida 25 mM durante 40 minutos en agitación y oscuridad.

. Digestión con tripsina 40 ng (sequencing grade-Promega) durante 3h y 30min a 37 °C.

. Elución con ACN al 50% y 0.2% de TFA.

. Preparación de la muestra para el análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF:

.Se mezcló 1:1 muestra: matriz (0.5 µl:0.5 µl), se depositó 1 µl sobre la placa *ground steel*. Se analizó la muestra usando un método con modo reflector y un voltaje de aceleración de 25 kv. El análisis se calibró utilizando calibradores externos (Bruker Daltonics).

El análisis espectral se llevó a cabo en un equipo MALDI-TOF UltrafleXtreme (Bruker Daltonics), se utilizó una placa *Ground steel* y se usó una matriz de ácido α -4-hidroxicinámico (hcca).

3.12.1. Identificación mediante huella peptídica

La identificación de las proteínas se realizó con los dos péptidos resultantes de la digestión e identificación con MALDI-TOF, y que se analizaron en la base de datos NCBIInr, mediante el motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science, USA).

3.13. Extracción DNA genómico total

Se procedió a la extracción de DNA genómico para su secuenciación. El proceso que se utilizó se basó en la extracción y purificación con

fenol:cloroformo (Sambrook J. 2001). Los pasos que se siguieron en este protocolo fueron:

. Se preparó un cultivo de *G. jacobaea* en fase estacionaria. Se tomaron 15 ml y se centrifugaron durante 15 minutos a 15.000 rpm en una centrifugadora Sorval RC 50 plus con un rotor Sorval SS-34.

. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en 5 ml de tampón de lisis. Se añadieron perlas de vidrio de 0,22 μm de diámetro y las células se incubaron durante 45 minutos a 30 °C en agitación continua.

. Se añadió a la suspensión 2 ml de SDS al 5% y se agitó vigorosamente, tras lo cual se incubó durante 10 minutos a 60 °C.

. A continuación la suspensión se incubó de nuevo a temperatura ambiente durante 5 minutos más y se añadió 2 ml de la mezcla de fenol:cloroformo:alcohol:isoamilico, en ese momento se procedió de nuevo a agitar vigorosamente.

. Se centrifugó la suspensión durante 20 minutos a 15 °C y 10.000 rpm una centrifugadora Sorval RC 50 plus con un rotor Sorval SS-34.

. Se recogió la fase superior y se le añadió una decima parte de su volumen de acetato sódico 3M pH 5.2 y un volumen de isopropanol puro. Se mezcló por inversión unas 10 veces.

. Se centrifugó la suspensión a 10.000 rpm a 15 °C durante 10 minutos en una centrífuga Sorval RC 50 plus con un rotor Sorval SS-34 y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se resuspendió en agua doblemente desionizada o en tampón TE.

Solución de lisis para 15 ml de cultivo

Tris HCl 1M pH 8	125 μl
EDTA 0,5 M	150 μl
Sacarosa 1 M	1,5 ml
Lisozima 1%	1 ml
H ₂ O	2,12 ml

3.13.1. Técnicas de cuantificación de DNA

Para conocer la concentración del DNA genómico obtenido se utilizaron técnicas de espectrofotometría y se aplicaron las siguientes fórmulas:

$$A_{260} \times 50 \times FD = \mu\text{g/ml}$$

Para obtener unos valores más precisos de la concentración de DNA también se utilizó la siguiente formula, que elimina la absorbencia debida a contaminantes:

$$(A_{260} - A_{320}) \times 62.9 - (A_{260} - A_{320}) \times 26 \times FD = \mu\text{g/ml}$$

Las medidas espectrofotométricas se llevaron a cabo en un NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer o bien y utilizando cubetas de cuarzo en un espectrofotómetro Thermo Scientific Helios.

3.13.2. Estimación de la pureza del DNA

Para confirmar la calidad y pureza del DNA obtenido, se utilizaron varios índices de pureza y se realizó una electroforesis del DNA obtenido. Para evitar distorsiones debidas al pH de la solución en la que se encontraba el DNA, se disolvió este en tampón TE a pH 8.0. Esta precaución la tomamos debido a que medios más ácidos suelen reducir estos índices de calidad y medios más básicos pueden elevarlos hasta en órdenes de 20 al 30%.

Los cálculos aplicados para estimar la calidad y pureza del DNA fueron:

Índice A_{260}/A_{280}

Entre 1.8 y 2 se consideran valores aceptables. Valores por debajo de 1.5 son indicativos de contaminación por RNA, proteínas o sustancias aromáticas como el fenol. Valores entre 1.5 y 1.8 indican presencia de RNA.

Índice $A_{260}-A_{320} / A_{280}-A_{320}$

Son aceptables valores entre 1.2 y 1.8. A DO_{320} se detectan las partículas en suspensión, por tanto restando estos valores se obtiene un valor más real de la pureza del DNA. Es deseable que las lecturas a DO_{320} sean mínimas ya que en caso contrario se tendría que considerar la presencia de una contaminación inespecífica.

Índice A_{260}/A_{230}

Este índice muestra la contaminación por sales, carbohidratos o solventes orgánicos. Son aceptables valores mayores a 1.8 aunque lo óptimo para considerar un DNA de buena calidad son valores de 2.0 a 2.2. Este índice al igual que el de A_{260}/A_{280} se puede calcular restando previamente las lecturas a DO_{320} .

Índice A_{260}/A_{270}

Este índice alerta de la contaminación por fenol. A DO_{270} se encuentra otro pico de absorbencia para el fenol y otras moléculas aromáticas, de modo que un índice de 1.2 aproximadamente, sería indicativo de una muestra libre de fenol.

3.13.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Esta técnica se llevó a cabo para visualizar el DNA genómico obtenido de *G. jacobaea*, y confirmar el estado del mismo. Se utilizó como método rutinario el descrito por Sambrook et al (Sambrook J. 2001) .

La electroforesis de DNA consiste en separar las distintas moléculas de DNA gracias a la carga negativa que presenta en condiciones de pH neutro, favoreciendo así su desplazamiento hacia el polo positivo una vez este es sometido a un campo eléctrico. De este modo se fuerza su desplazamiento a través de la matriz porosa que constituye el gel de agarosa, logrando una separación de las distintas cadenas en función de su conformación y tamaño. Bajo estas condiciones el DNA se desplaza (migra) a una velocidad inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. El tamaño de cada cadena se estima

gracias al uso de un patrón de tamaños moleculares. Así mismo existe una relación directa entre el logaritmo de la movilidad electroforética y la porosidad del gel, de modo que la concentración de agarosa del gel se modifica en función del rango de tamaños del DNA que se quiere estudiar.

Concentración de agarosa (%)	Rango optimo de separación (kb)
0,30	5-60
0,60	1-20
0,70	0,8-10
0,90	0,5-7
1,20	0,4-6
1,50	0,2-4
2	0,1-3

La agarosa utilizada fue de tipo baja electroendosmosis (Boehringer Mannheim), es decir, con baja densidad de carga propia para evitar la distorsión del proceso de migración del DNA.

3.13.3.1. Preparación de las muestras

. Las muestras se mezclaron con un buffer de carga en una proporción de 1 µl de buffer (x5) por cada 4 µl de muestra (o patrón).

3.13.3.2. Preparación del gel de agarosa

El gel de agarosa se preparó del siguiente modo:

. Se disolvió la cantidad apropiada de agarosa en tampón TBE y se llevó a ebullición.

. Una vez atemperado se añadieron 5 µl RedSafe™ por cada 100 ml de solución de agarosa. Se vertió la solución en el molde del gel y se colocó el molde de los pocillos. Se dejó enfriar hasta su total gelificación.

. Se colocó el gel en la cubeta y se cubrió con tampón TBE.

. Se cargaron las muestras en los pocillos y se inició la electroforesis. Para la separación de DNA genómico, como fue nuestro caso, se aplicó un voltaje de entre 50 y 90 V en condiciones de corriente continua (CC). Para fragmentos más pequeños el voltaje puede ir de 75 a 110 V.

. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se visualizaron con ayuda de un Gel Doc XR+ imaging system y del software de análisis Quantity One.

3.13.3.3. Marcadores de peso molecular

En los geles de agarosa donde se analizó el estado del DNA purificado, se incluyó un marcador de peso molecular.

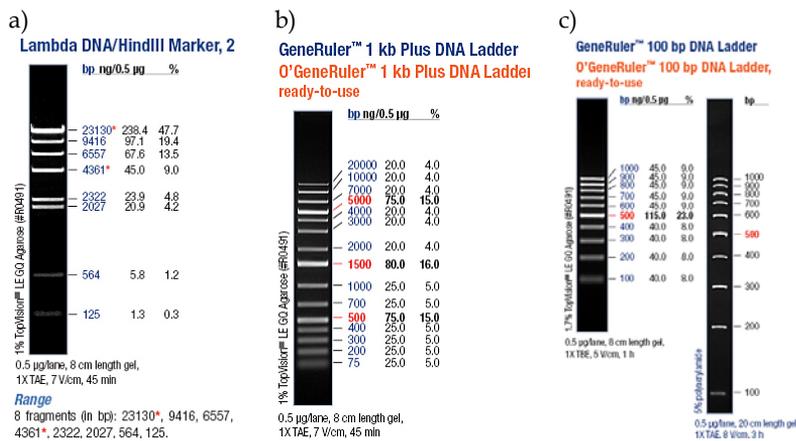


Figura 16. Marcadores de peso molecular utilizados. a) Lambda DNA/HindIII Marker de Fermentas. b) GeneRules™ 1kb DNA Leader Plus de Fermentas. c) GeneRules™100 pb DNA Leader Plus de Fermentas. Los valores se expresan en pares de bases.

3.14. Secuenciación masiva del genoma

Hasta hace unos años solo se disponía de la secuenciación de Sanger, pero en los últimos años han aparecido nuevas técnicas, cada vez más rápidas y eficientes. A continuación resumimos brevemente las más utilizadas:

Técnicas por adición del nucleótido único

Su funcionamiento se basa en la secuenciación por síntesis dependiente del enzima DNA polimerasa, y utiliza ciclos de lectura y lavado. Son técnicas más rápidas que la de Sanger y que pueden secuenciar un gran número de cadenas de ADN simultáneamente. Estas técnicas son:

Pirosecuenciación. Roche/454 Life Sciences (Hyman 1988; Ronaghi et al. 1999).

Secuenciador semiconductor (Ion Torrent's sequencer): semejante a la pirosecuenciación, en lugar de transformar el pirofosfato liberado en luz, mide el cambio de pH producido por el protón liberado (Yeo et al. 2012).

Técnicas de terminación reversible cíclica

Se basan en la acción del enzima DNA polimerasa y en ciclos de secuenciación, donde se unen nucleótidos modificados que llevan incorporados una molécula fluorescente que no permite continuar con la incorporación de nuevos nucleótidos hasta que no es eliminada. Los ciclos se realizan incorporando el nuevo nucleótido a la cadena en formación, lavado de los nucleótidos no añadidos, lectura de la señal fluorescente del nucleótido añadido y retirada del grupo fluorescente para permitir un nuevo ciclo. Estas técnicas son:

Con fluorescencia de 4 colores: Illumina/Solexa (Bentley et al. 2008).

Con fluorescencia de 1 color: Helicos BioSciences (Harris et al. 2008).

Secuenciación por ligación

Este tipo de secuenciación utiliza una DNA ligasa en lugar de una DNA polimerasa, y basa su funcionamiento en crear una cadena complementaria al DNA problema uniendo sondas de 1 o 2

nucleótidos marcados con fluorescencia, que puedan o no hibridar con el fragmento a secuenciar. A esta técnica pertenece la plataforma:

SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) (Valouev et al. 2008).

Secuenciación en tiempo real

Basadas en la acción de la enzima DNA polimerasa, estas técnicas no frenan la secuenciación tras la incorporación de cada nucleótido ni invierten tiempo en ciclos de lavado, por lo que son más rápidas, tampoco necesitan amplificación por lo que no sufren desfase. Entre estas técnicas se encuentran:

Zero-mode waveguide Pacific BioSciences (Eid et al. 2009).

Técnica FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (Braslavsky et al. 2003).

Técnicas de secuenciación basadas en nanoporos

Estas técnicas se basan en la identificación de los distintos nucleótidos de la cadena de ADN gracias a la variación que se produce en una corriente eléctrica al pasar la cadena de DNA a través de un nanoporo anclado a una membrana lipídica (Branton et al. 2008). Curiosamente la porina MspA de *M. smegmatis*, ha sido propuesta como proteína formadora de estos nanoporos para realizar secuenciaciones de DNA (Derrington et al. 2010).

Observación directa del ADN con técnicas de microscopía

Desarrollada por compañías como Halcyon o ZS Genetics permite leer la secuencia del ADN directamente por métodos de microscopía electrónica (Kanavarioti et al. 2012).

Transistor IBM

Se trata de una técnica de secuenciación por paso a través de nanoporos, esta vez artificiales y formados por capas alternas de un material dieléctrico y metal. El DNA pasa a través de estos poros

produciendo alteraciones en la corriente eléctrica que son diferentes en función del nucleótido y que permite descifrar la secuencia. La velocidad de paso de DNA a través de los poros se puede controlar modulando la corriente aplicada a este material (Wang et al. 2014).

Dadas las ventajas y desventajas, así como el acceso a las mismas, optamos por secuenciar el genoma de *G. jacobaea* mediante piro-secuenciación.

Plataforma	Técnica	Lecturas	Error	Tpo.
Roche 454	Pirosecuenciación PCR emulsión	Largas	1%	Horas
	Positivo		Negativo	
	Secuenciación rápida		Mala interpretación de secuencias homopoliméricas	
	No se producen sustituciones		Económicamente costosa	
Plataforma	Técnica	Lecturas	Error	Tpo.
Illumina/Solexa HiSeq v3	DNA polimerasa	Cortas	<0,1%	Días
	Positivo		Negativo	
	Amplificación en fase sólida		El error más frecuente son las sustituciones	
	Económica			
	Eficaz			
Plataforma	Técnica	Lecturas	Error	Tpo.
SOLID 5500	DNA ligasa	Cortas	<0,01%	Días
	Positivo		Negativo	
	PCR emulsión		Lenta	
	Tasa de errores muy baja			
Plataforma	Técnica	Lecturas	Error	Tpo.
Pacific Biosciences	Síntesis	Muy largas	15%	Minutos
	Positivo		Negativo	
	No necesita preparación de la muestra		Frecuentes inserciones y deleciones	
	Gran longitud de lecturas			
Plataforma	Técnica	Lecturas	Error	Tpo.
Oxford Nanopore	Nanoporos		40%	
Plataforma	Técnica	Lecturas	Error	Tpo.
Halcyon, ZS Genetics, etc.	Microscopia electrónica			
	Positivo		Negativo	
	Permite leer la secuencia del ADN directamente por microscopia			

3.14.1. Secuenciación masiva del genoma por Pirosecuenciación

La pirosecuenciación, también conocida como secuenciación 454, es una tecnología que permite secuenciar el DNA a gran escala, incluso sobre genomas completos (Roche 2010). Los pasos a seguir se resumen brevemente a continuación.

3.14.1.1. Preparación de la muestra. PCR en emulsión

Es necesario partir de un DNA de buena calidad antes de empezar su secuenciación. Inicialmente la cadena de DNA se rompe en fragmentos de distinto tamaño que posteriormente son unidos a través de sus extremos a unas moléculas llamadas adaptadores. El conjunto de todos estos fragmentos es denominado biblioteca.

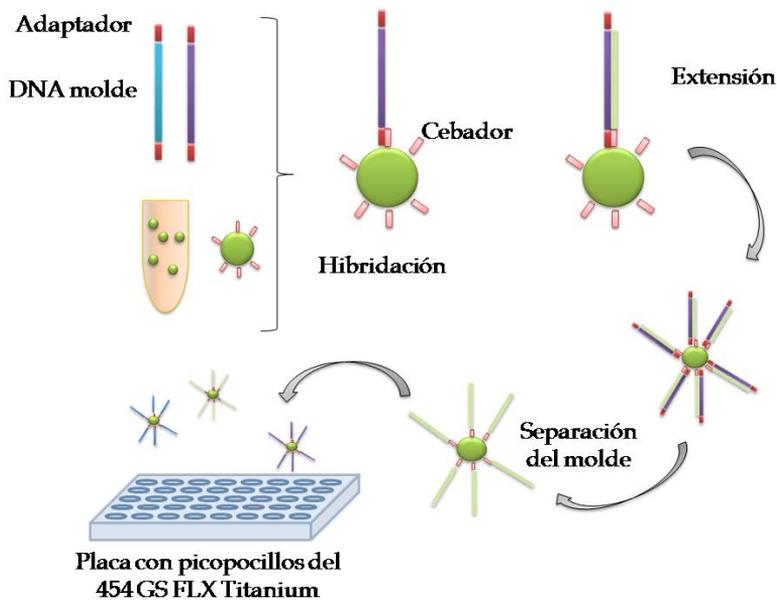


Figura 17. Esquema del funcionamiento del proceso de pirosecuenciación.

En el caso de la técnica de pirosecuenciación, es necesaria una amplificación del DNA a analizar, que se consigue mediante una PCR

en emulsión. Esta consiste en unir los fragmentos de DNA a unos adaptadores que se incluyen en una emulsión oleo-acuosa. En esta emulsión se encuentran unas microesferas recubiertas con moléculas que hibridan con los adaptadores y que actúan como cebadores de la reacción de PCR, y además contiene todos los ingredientes necesarios para que se lleve a cabo la PCR. A continuación se generan las condiciones necesarias para que cada esfera hibride únicamente con un fragmento de DNA, y sobre esta se producirán múltiples ciclos que permitirán la generación de copias clonales de ese fragmento concreto. Finalmente las microesferas serán inmovilizadas en una superficie para ser secuenciadas. En nuestro caso se inmovilizaron en la superficie de una placa con picopocillos del 454 GS FLX Titanium (Roche), cada uno de los cuales recoge únicamente una sola esfera que quedará unida al pocillo mediante una hebra de fibra óptica. Posteriormente se inicia la reacción añadiendo pequeñas bolas magnéticas y de látex de 1 μm de diámetro que tienen inmovilizadas las enzimas necesarias para la reacción de pirosecuenciación, junto con las soluciones de nucleótidos y de reactivos.

3.14.1.2. Proceso de pirosecuenciación

El proceso de pirosecuenciación se inicia cuando un dNTP (deoxiribonucleósido trifosfato) añadido a la solución corresponde con el complementario de la cadena molde, en ese momento se activa la DNA polimerasa, que lo une a la cadena y se libera un pirofosfato. Este pirofosfato se convierte en luz visible gracias a sulfurilasas y luciferasas, también añadidas al medio. Esta luz, de intensidad variable según el número de nucleótidos incorporados, es recogida y cuantificada, revelando tras ser analizada la secuencia original de DNA (Ronaghi et al. 1999; Margulies et al. 2005).

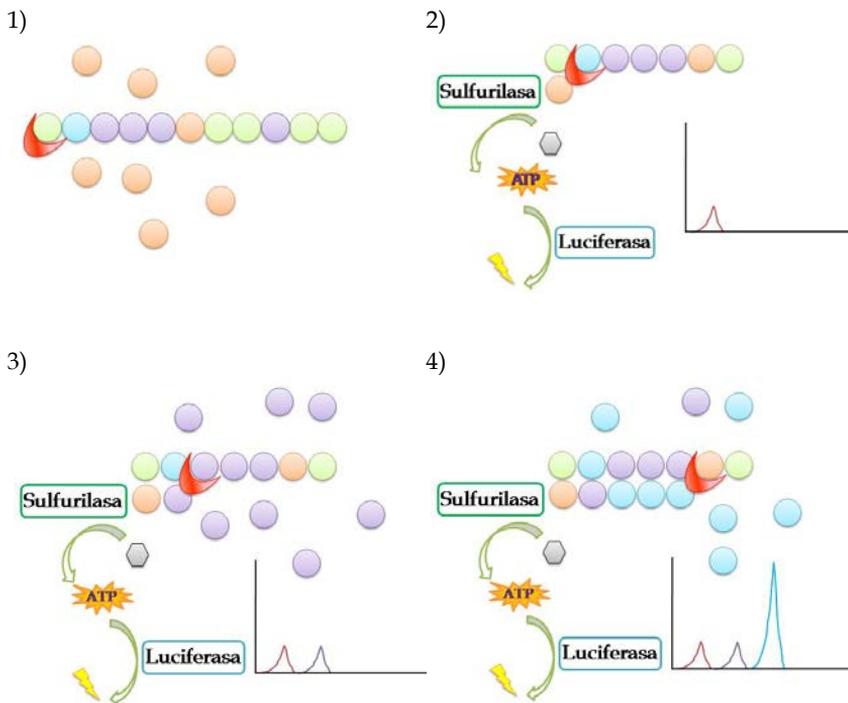


Figura 18. Dinámica del proceso de pirosecuenciación.

Los pasos del proceso de secuenciación se representan en la figura 18 y son:

- 1) La polimerasa se une al fragmento de DNA que se quiere secuenciar. Se incorpora una solución de con un solo dNTP. Al corresponder con el complementario de la cadena original, la DNA polimerasa lo incorpora y libera un pirofosfato (⊖). 2) Éste se transforma en ATP por acción de una sulfurilasa, y este ATP en luz gracias a una luciferasa. La luz es recogida por unos sensores y representada como un pico en un gráfico. Se produce un lavado y eliminación de los dNTP sobrantes. Se añade un nuevo dNTP, si no es complementario a la cadena a secuenciar, no es unido por la DNA polimerasa y no se libera luz. 3) Se produce un nuevo lavado y nueva incorporación de otro dNTP. 4) Si es complementario a la cadena problema y si hay más de uno se producirá mayor luz y en

consecuencia se detectará en forma de un pico de mayor tamaño que será proporcional al número de nucleótidos repetidos.

3.14.1.3. 454 secuenciación y montaje

Para generar la biblioteca de secuenciación se tomaron 500 ng de DNA genómico que se fragmentó usando gas nitrógeno comprimido de acuerdo con el protocolo estándar del fabricante (GS FLx titanium Rapid Library preparation kit, Roche Diagnostics). Se obtuvieron fragmentos de terminaciones romas que se ligaron a adaptadores de ADN. Los fragmentos pequeños de menos de 350 bp se eliminaron utilizando el kit AMPure XP (Beckman Coulter). La biblioteca obtenida se evaluó mediante el sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Por último, la biblioteca de ADN se diluyó en una matriz de trabajo de 1×10^7 moléculas / μ l en TE (Tris-EDTA).

La pirosecuenciación con el sistema 454 se realizó con el kit de secuenciación GS Titanium XLR 70 (Roche Diagnostics) en un 454 GS-FLX Sequencer (454 Life Sciences) siguiendo el protocolo estándar del fabricante (Roche Diagnostics). Para ensamblar las secuencias obtenidas se utilizó la versión GS De Novo (Roche Diagnostics).

3.14.1.4. Ficheros de datos

Del proceso de pirosecuenciación se obtienen tres tipos de ficheros de datos:

Con extensión *fna* (FASTA) son datos que contienen todas las secuencias generadas por la pirosecuenciación 454.

Con extensión *qual*: se trata de un archivo generado automáticamente por el secuenciador y que proporciona un primer informe sobre la eficiencia y calidad del proceso y las secuencias obtenidas en la pirosecuenciación.

Con extensión *sff*: es un archivo binario, que recoge conjuntamente la intensidad de las señales luminosas que aparecen durante la generación de las secuencias, las secuencias y la

información sobre la calidad y eficiencia de todo el proceso. Este archivo es importante porque permite estimar la probabilidad de errores de todo el proceso de pirosecuenciación.

Los datos obtenidos fueron ensamblados mediante el software GS novo GS AssemblerRun Browser versión 2.6 (Roche 2010).

3.14.2. Anotación automática del genoma

Una vez obtenidas las secuencias concatenadas del genoma o *contigs*, se procedió a realizar una anotación automática de las mismas, para ello se utilizaron dos programas Prokka y el programa Prokaryotic Genome Automatic Annotation Pipeline.

PROKKA

Este programa fue diseñado por Seemann (Seemann 2014) y se trata de un software que se puede instalar en cualquier sistema Unix. Realiza anotaciones ricas y fiables de secuencias genómicas bacterianas. Para su instalación es necesario disponer de un ordenador con un mínimo de cuatro núcleos y puede anotar el genoma completo de una bacteria en unos 10 minutos.

El uso de PROKKA supone mucha rapidez a la hora de obtener los resultados respecto a otros sistemas de anotación automática como el *Prokaryotic Genome Automatic Annotation Pipeline* (PGAAP) propuesto por la NCBI que devuelve los resultados vía mail y con varias semanas de espera; RAST que es un programa de anotación que tarda varios días en dar los resultados, o xBASE2 que, aunque es más potente que RAST, tarda varias horas en proporcionar los resultados y es más lento que PROKKA.

PGAAP

Prokaryotic Genome Automatic Annotation Pipeline es un software de anotación automática asociado a la publicación de genomas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI). Realiza la anotación tanto de genes codificadores de proteínas, como de RNAs

estructurales, tRNAs, pequeños RNAs, pseudogenes, regiones de control, repeticiones directas e invertidas, secuencias de inserción, transposones y otros elementos móviles. NCBI desarrolló este sistema de anotación automática que combina algoritmos de predicción de genes *ab initio* con métodos basados en homologías. La primera versión de este software de anotación es del año 2005 (Angiuoli et al. 2008), aunque en la actualidad el software activo corresponde a una versión mejorada.

3.14.3. Anotación manual del genoma

Las anotaciones automáticas suponen rapidez y eficiencia, pero en algunos casos, sobre todo cuando se contrastan secuencias de organismos o bien de proteínas poco estudiadas, pueden ser menos fiables. Por este motivo se procedió a la anotación manual del genoma. Para ello se revisaron las posibles proteínas obtenidas utilizando el programa PROKKA y se realizaron alineamientos locales con BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Esta herramienta bioinformática realiza alineamientos locales mediante el uso de algoritmos heurísticos (Altschul et al. 1990; National Center for Biotechnology Information n.d.).

Las condiciones de búsqueda y astringencia para la realización del BLAST fueron:

Base de datos	Database Non-redundant protein sequences (nr)
Algoritmo de búsqueda	Blastp (protein-protein BLAST)
Parámetros de puntuación	
Matriz	BLOSUM62
Coste de los GAPS	Existencia 11, Extensión 1
Ajuste de composición	Conditional compositional score matrix adjustment

3.15. Herramientas bioinformáticas

En las últimas décadas y gracias al avance de la informática y de las ciencias biológicas, han aparecido multitud de herramientas informáticas para el estudio de las ciencias de la vida.

3.15.1. Bases de datos

. **Genbank** (blast.ncbi.nlm.nih.gov), es la base de datos de secuencias genéticas del NIH (National Institutes of Health de EEUU). Esta base de datos la utilizamos para realizar el alineamiento durante la anotación manual del genoma de *G. jacobaea* (Benson et al. 2006).

. **Pfam** (pfam.xfam.org), es una base de datos de motivos estructurales o funcionales donde se provee información para la búsqueda de secuencias homólogas remotas y para la predicción de función, de secuencias de aminoácidos conservadas por su función y que utiliza la matriz de sustitución BLOSUM que es más efectiva para comparar secuencias funcionales que la matriz PAM (Finn et al. 2014). Es optima para identificar proteínas con funciones muy conservadas pero resulta poco eficiente si la proteína a estudiar muestra mucha divergencia respecto a la familia a la que pertenece (Finn et al. 2014).

Para acelerar la búsqueda y poder reducir el número de secuencias de trabajo, Pfam ha creado un sistema que agrupa las secuencias en proteomas representativos (RPs), cada uno de estos proteomas contiene proteomas similares calculados sobre la base de la co-pertenencia a grupos UniRef50. Así eligiendo los proteomas representativos con un 75%, 55%, 35% o 15% de umbral de co-pertenencia (CMT) el usuario puede disminuir o aumentar la granularidad de los resultados a obtener. En nuestro caso elegimos un CMT de 55% (RP55) ya que se ha comprobado que este sigue más de cerca las clasificaciones taxonómicas estándar (Chen et al. 2011).

En Pfam, si existe una homología significativa, además de datos numéricos proporciona un esquema del grado de similitud de la

secuencia a estudiar, con respecto a la secuencia consenso de la familia de proteínas más similar a ella. En este esquema aparecen las secuencias y varias líneas en la parte inferior con la siguiente información.

. La primera línea muestra la secuencia consenso de la familia de proteínas con la que estamos comparando nuestra proteína problema. Esta secuencia consenso ha sido obtenida en base al modelo de Hidden Markov (HMM). En letras mayúsculas aparecen las posiciones más conservadas.

. La segunda línea marca con un “+” las sustituciones conservadas e identifica además los aminoácidos coincidentes.

. La tercera línea indica el grado de confianza en cada residuo alineado, donde 0 significa un grado de confianza entre 0-5%, 1 un grado de confianza entre 5-15% y así sucesivamente, hasta llegar a 9 que significa un grado de confianza del 85-95% y por último indicando con “*” que significa un grado de confianza del 95-100%.

. En la última línea aparecen la secuencia problema, donde se marca con un “-” las deleciones en la secuencia consultada con respecto a la secuencia consenso. El color de las columnas marca la probabilidad que va del rojo 0% al verde 100%.

3.15.2. Programas de alineamiento

Los programas de alineamiento que se utilizaron para la búsqueda de homología fueron:

. **BLAST** realiza alineamientos globales con huecos entre la secuencia de consulta y la secuencia de la base de datos usando una variación del algoritmo de Smith-Waterman. Al realizar el alineamiento, la matriz de sustitución que utiliza proporciona valores estadísticos significativos que ayudan a interpretar la homología, de modo que valores de *score* superior a 40, pueden empezar a tomarse como válidos. El *E-value* es otro índice que nos proporciona este ali-

neamiento y nos indica la probabilidad de que la alineación realizada se diese por azar, de modo que cuanto menor es ese valor mejor es la lineación. Por último muestra el número de residuos coincidentes así como el porcentaje de la secuencia cubierto.

. **Clustal Omega** es un paquete para hacer múltiples alineamientos globales de secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos, de forma rápida y precisa. Se trata de una actualización de los programas Clustal anteriores que realiza alineamientos locales y resulta útil cuando las secuencias a comparar son de longitudes similares (Sievers & Higgins 2014).

. **T-Coffe**: es un algoritmo de alineamiento múltiple de secuencias que destaca por su exactitud. Fue desarrollado en el Centro de Regulación Genómica de Barcelona (CRGB) y está clasificado como el algoritmo progresivo basado en consistencias de secuencia más efectivo de la última década. Su eficiencia se basa en que este programa combina alineamientos múltiples globales y locales, de modo que primero realiza una comparación de pares global utilizando el algoritmo CLUSTALW para después realizar una comparación local utilizando el algoritmo FASTA. Este programa resulta más útil cuando las secuencias a comparar son más diversas (Ridgeway 2000).

Matrices de sustitución

. **PAM** (Pont Accepte Mutation) es una matriz que se calcula observando las diferencias en proteínas cercanamente relacionadas (con un mínimo del 85% de similitud). El funcionamiento de esta matriz se basa en un modelo evolutivo y en mutaciones observadas en un alineamiento global. Valores de *score* altos obtenidos con esta matriz, indican grandes distancias evolutivas.

. **BLOSUM** (BLOck SUBstitution Matrix) trabaja identificando similitudes en secuencias distantes. Las probabilidades usadas en el cálculo de esta matriz se basan en la computación de "bloques" de secuencias funcionales conservadas encontradas en múltiples

alineamientos de proteínas. Se asume que estas secuencias conservadas son de importancia funcional dentro de las proteínas relacionadas.

3.15.3. Programas de análisis de proteínas

Los análisis de las características estructurales y bioquímicas de las proteínas se llevaron a cabo utilizando las herramientas disponibles en el servidor SIB EXPASY (<http://expasy.org/tools/>). Este servidor es un portal de recursos bioinformáticos creado por el Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) y fue diseñado, desarrollado y es mantenido por el grupo SIB y por sus usuarios. Ofrece muchos recursos científicos, bases de datos y software aplicables al estudio de las ciencias de la vida (Artimo et al. 2012).

.GPMAW: se utilizó para la predicción de distintas características y propiedades teóricas de las proteínas: peso molecular, punto isoeléctrico, porcentaje de aminoácidos y otros parámetros (www.alphalyse.com/gpmaw_lite.html).

.CFSSP: este software predice el porcentaje de hélices alfa, hojas beta y estructuras al azar de la proteína (Chou & Fasman 1974) en función de la frecuencia relativa de aparición de los aminoácidos en cada una de estas estructuras, basándose en proteínas previamente analizadas. El resultado se obtiene tanto en un esquema donde aparecen anotadas las α -hélices en rojo, las laminas β en verde, los giros en azul y en amarillo la falta de estructura o *coiled coil* (chofas.sourceforge.net).

.GOR4: este programa predice la estructura secundaria de las proteínas en función de la frecuencia relativa de cada aminoácido en aparecer en cada una de estas estructuras, es muy similar a CFSSP pero es más complejo ya que tiene en cuenta en la probabilidad de aparición de cada aminoácido respecto de los aminoácidos vecinos (npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html) (Sen et al. 2005).

JPred: predicen el porcentaje de hélices alfa, hojas beta y estructuras al azar de la proteína través de comparar la secuencia problema contra estructuras secundarias de proteínas previamente caracterizadas y registradas en el RCSB-Protein Data Bank (PDB) (Cole et al. 2008). Este programa se puede utilizar *online* (www.compbio.dundee.ac.uk) o bien llamarlo desde la aplicación Jalview (www.jalview.org) un programa de libre acceso y con múltiples funciones, desde la alineación de hasta 500 secuencias, su edición y visualización, análisis filogenéticos, etc. Los resultados que se obtiene aparecen en un diagrama con la siguiente información:

La secuencia de nuestra proteína.

LUPAS_21 un predictor de estructuras *coiled coil*.

JNETPred, resumen consenso de la predicción de Jpred.

JNETCONF, un histograma que muestra el grado de confianza de la predicción.

Valor entre 0 y 9 que nos informa del grado de confianza, donde 9 es el valor de máxima confianza.

JNETSOL informan de la solvatación de la proteína, es decir la superficie expuesta al solvente, de modo que JNETSOL25 indica una predicción binaria de la accesibilidad de los solventes en un 25% en el caso de JNETSOL5, de un 5% en el caso de JNETSOL5, y de un 0% en el caso de JNETSOL0.

JNETHMM basado en la predicción de PSSM indican en rojo las zonas de más probabilidad de formación de hélices alfa y en verde las laminas beta.

JNETFREQ marca la frecuencia de aminoácidos formadores de hélices alfa en rojo y lamias beta en verde

JNETJURI donde se anota con * los puntos en los que hay discrepancia.

.TMpred: es un programa que hace predicciones de regiones transmembrana y su orientación. El algoritmo se basa en el análisis estadístico de TMbase, una base de datos de motivos estructurales de secuencias transmembrana (Hofmann & Stoffel n.d.).

.PHOBIUS: es un programa que predice la topología transmembrana y la presencia de péptidos señal en la secuencia de aminoácidos de la proteína (Kall et al. 2004).

.PROTTER: es un programa que predice la topología de la proteína y posibles segmentos transmembranas a partir de datos experimentales de proteómica y anotaciones de proteínas (Omasits et al. 2014; Omasits et al. 2013).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Condiciones de cultivo para la obtención de proteínas de pared

Elección del medio de cultivo

El género *Gordonia*, crece bien en múltiples medios de cultivo, desde medios generales como TSB (Tryptic Soy Agar) a otros más específicos como el medio de Bennett, BHI (Brain Heart Infusion), Lowenstein-Jensen, GYA (Glucose Yeast Extract Agar), medio de Sutton suplementado con tiamina, etc. (Goodfellow & Maldonado 2006). Optamos por probar inicialmente cuatro medios de cultivo de uso habitual en nuestro laboratorio, como sustrato de crecimiento para la obtención de proteínas de pared de *G. jacobaea*. Los medios seleccionados fueron:

TSB, es un medio de cultivo general óptimo para el cultivo tanto de microorganismos fastidiosos como no fastidiosos, y tanto de microorganismos aerobios como anaerobios. Se trata de un medio de cultivo nutritivo rico en nitrógeno proveniente de las peptonas y del extracto de levadura que contiene, así como con buenos niveles de vitaminas, minerales, azúcares y cloruro de sodio que contribuye a mantener una osmosis correcta.

BHI, este medio se escogió por ser altamente nutritivo, gracias al extracto de cerebro, de corazón y a las peptonas, y apto para el crecimiento de un gran número de microorganismos tanto aerobios como anaerobios, y tanto fastidiosos como no fastidiosos.

LB, este medio se escogió por su simplicidad y por ser uno de los medios más empleados en el crecimiento y posterior obtención de DNA y proteínas microbianas.

MH, este medio habitualmente se utiliza para determinar la concentración mínima inhibitoria (MICs), pero siendo un medio rico en nutrientes aportados por los extractos de carne y levadura, así como

por la caseína hidrolizada, también se tuvo en cuenta como medio de crecimiento.

Se mantuvieron las condiciones de cultivo optimizadas por de Miguel en el 2000 (de Miguel et al. 2000), de modo que *Gordonia jacobaea* se cultivó a 30 °C y con agitación continua para favorecer las condiciones aerobias.

Con la intención de determinar cuál de estos medios resultaba más favorable para obtener mayor cantidad de biomasa bacteriana y presumiblemente de proteínas de pared, se llevaron a cabo cultivos en paralelo con los cuatro medios de cultivo, durante el transcurso de los cuales se determinó la curva de crecimiento midiendo cada 12 horas la densidad óptica del cultivo a 550 nm. El tiempo de cultivo se prolongó durante 120 horas.

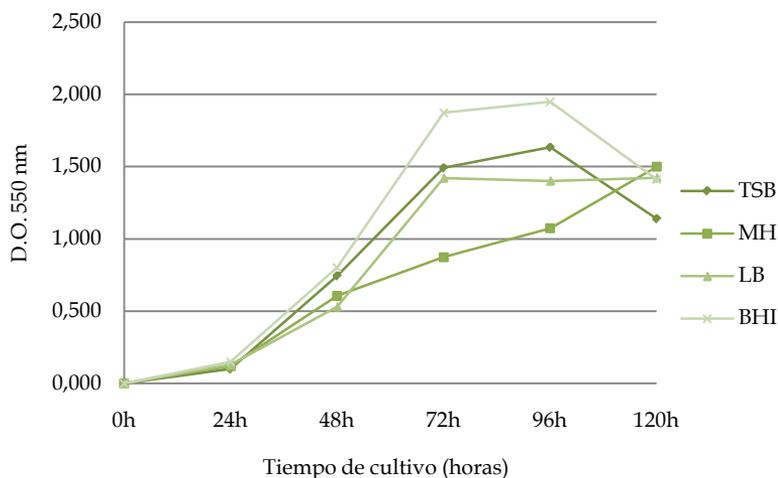


Figura 19. Curva de crecimiento de *G. jacobaea* a 30 °C y en agitación continua, con cuatro medios de cultivo distintos.

Se observó que los cultivos iniciaban su fase exponencial a las 24 horas aproximadamente y que mientras que los cultivos en TSB, LB y BHI tenían un crecimiento exponencial bastante marcado que acababa a las 72 horas aproximadamente, el cultivo en MH mostraba un crecimiento

menos marcado pero más progresivo. De los tres medios de crecimiento más rápido, el crecido en BHI era el más eficiente en cuanto a producción de biomasa, seguido por el de TSB y en último lugar el de LB. A partir de las 96 horas se observó que los cultivos en TSB, BHI y LB parecían iniciar la fase estacionaria, mientras que los cultivos crecidos en MH aun mostraban un crecimiento positivo.

Una vez determinado el inicio de la fase estacional se realizó un cultivo con los cuatro medios probados, manteniendo el crecimiento a 30 °C, con agitación continua y durante 72h, tras lo cual se recogió el *pellet* celular por centrifugación y se pesó para estimar la cantidad de biomasa obtenida y de este modo valorar qué medio de cultivo podía ser más apto para obtener mayor cantidad de proteínas de pared.

Cepa	Medio de cultivo	Promedio <i>pellet</i> celular (g/100 ml de cultivo)
MV1	LB	0.85 ± 0.20
MV1	MHB	0.46 ± 0.04
MV1	TSB	1.27 ± 0.36
MV1	BHI	1.4 ± 0.5

Figura 20. Peso de los pellets bacterianos obtenidos por 100 ml de cultivo y tras 72 h a 30 °C.

Al igual que en la curva de crecimiento, los cultivos en MH fueron los menos eficientes, mientras que los tres cultivos restantes, crecidos con LB, TSB y BHI, mostraban unas tasas de producción de biomasa más aceptables, especialmente los cultivos en TSB y BHI.

Por último quisimos asegurarnos de que el tipo de medio de cultivo empleado no alteraba el perfil de proteínas de pared. Se realizaron extracciones de proteínas de pared de cultivos de *G. jacobaea* llevados a cabo en medio LB, BHI, TSB y MH, que se mantuvieron en agitación continua durante 72 horas y a 30 °C. La extracción se realizó siguiendo el protocolo de Lichtinger (Lichtinger et al. 1999) y la visualización del perfil de proteínas se analizó mediante electroforesis en geles de

poliacrilamida al 10% siguiendo el protocolo de Schägger (Schägger & Jagow 1987; Schägger 2006). Las muestras fueron incubadas durante una hora a 37 °C con tampón de carga no reductor.

Tras desteñir el gel aparentemente se observó una mayor intensidad de las bandas proteicas en los extractos obtenidos a partir de cultivos llevados a cabo en TSB. Tal y como se aprecia en la figura 21 , además de una aparente mayor intensidad de las proteínas, cosa que podría explicarse por pequeñas diferencias en el protocolo de extracción. Sobre todo nos interesó que el perfil proteico parecía mostrar con mayor intensidad una banda de proteínas con un peso molecular aparente de 100 kDa. Esta banda también estaba presente en los demás extractos, aunque con una intensidad muy baja.

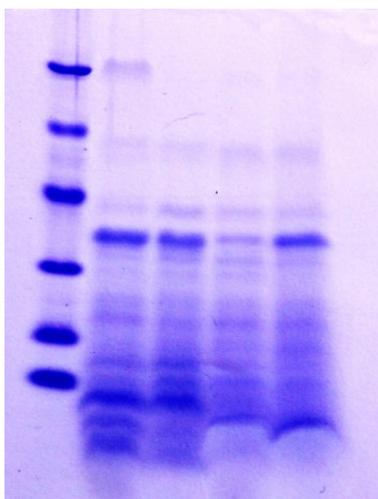


Figura 21. Perfiles electroforéticos de proteínas de pared de *G. jacobaea*, obtenidos en distintos medios de cultivo. Electroforesis SDS PAGE al 10% de acrilamida con tricina. Carril 1: Marcador 97.4, 66.7, 45, 31, 21 y 14 kDa. Carril 2 al 5: Extractos proteicos obtenido de cultivos en TSB, BHI, LB y MH, respectivamente.

Ante los resultados obtenidos se decidió escoger el medio de TSB como medio de cultivo masivo para el crecimiento de *G. jacobaea*, en

primer lugar por ser un medio que favorecía la obtención de cantidades aceptables de biomasa bacteriana, en segundo lugar por ser un medio de cultivo de fácil utilización y relativamente económico, y por último porque aparentemente los extractos obtenidos mostraban bandas con mayor intensidad.

4.1.1. Estimación del tiempo de cultivo idóneo

Se estudió si el patrón de bandas de proteínas de pared de *G. jacobaea* mostraba alguna variación respecto a la duración de los cultivos. Para ello se obtuvieron extractos proteicos de pared de cultivos de 48, 72, 96 y 120 horas crecidos en medio TSB e incubados a 30 °C en agitación continua para favorecer las condiciones aeróbicas. No se obtuvieron extractos de cultivos a 24 horas, ya que con un tiempo tan reducido, no se pudo obtener *pellet* celular manipulable.

Los *pellets* proteicos se incubaron con tampón de carga reductor durante una hora a 37 °C y no reductor durante 10 minutos a 100 °C, y se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAG) al 10 % con tricina.

En la figura 22 se puede apreciar como el patrón de bandas resultó muy similar en todos los casos, apreciándose múltiples bandas proteicas de 100, 60, 40, 35, 27, 20, 15 y 10 kDa de peso molecular aparente.

Cabe destacar que no apreciamos diferencias en el patrón de bandas de las proteínas hervidas y sin hervir, aunque si notamos que en los casos en que las proteínas habían sido hervidas, la banda de 100 kDa parecía más tenue y aumentaba la intensidad de la banda de 35 kDa. Esto estaría indicando que la proteína de 100 kDa podría ser polimérica y en su constitución contener una proteína de 35 kDa, y que el proceso de ebullición con SDS no sería suficiente para la disociación total de la misma.

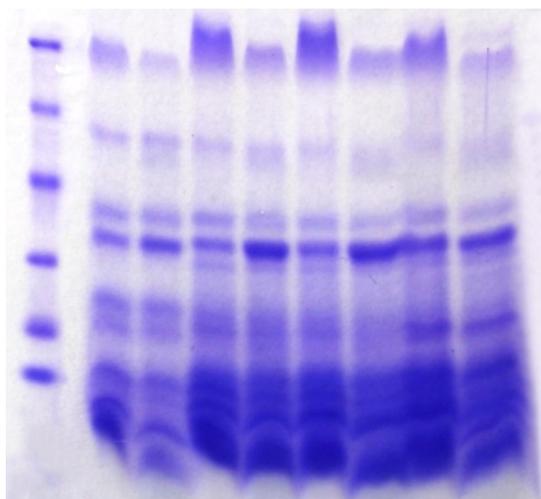


Figura 22. Perfiles electroforéticos de extractos proteicos obtenidos en distintos tiempos de cultivo. Electroforesis SDS PAGE al 10% de acrilamida con tricina. Carril 1: Marcador 97.4, 66.7, 45, 31, 21 y 14. Carril 2 y 3: Extractos de cultivos de 48 horas. Carril 4 y 5: Extractos de cultivos de 72 horas. Carril 6 y 7: Extractos de cultivos de 96 horas. Carril 8 y 9: Extractos de cultivos de 120 horas. Las bandas 3, 5, 7 y 9 corresponden a 3 µg de *pellet* proteico incubado con tampón de carga no reductor durante 30 minutos a 37 °C. Las bandas 2, 4, 6 y 8 corresponden a 3 µg de *pellet* proteico incubado con tampón de cargar reductor y hervidos durante 10 minutos.

4.2. Extracción y análisis de las proteínas de pared

Inicialmente se revisó la bibliografía publicada en busca de protocolos de extracción para proteínas de pared formadoras de canal de miembros del grupo *Corynebacterineae*, pero se observó que no existía consenso y que cada investigador utilizaba distintas técnicas al resto, e incluso modificaba las suyas propias en distintos experimentos. Se comprobó que gran parte de los protocolos de extracción se basaban en el uso de solventes orgánicos (cloroformo, metanol, etanol, etc.) aunque también existía referencia al uso de Genapol X-80 y otros detergentes como vía de obtención de las proteínas de pared. La explicación del porqué de estas técnicas se encuentra en la naturaleza de estas proteínas. Presumiblemente las proteínas de canal de las paredes de los miembros del suborden *Corynebacterineae* están

inmersas en una gruesa capa de lípidos presentes en la pared de la bacteria, por lo que es de suponer que son proteínas altamente hidrofóbicas (Costa-Riu, Burkovski, et al. 2003; Lambert 2002). Es esta hidrofobicidad la que se explota al utilizar estos dos tipos de métodos de extracción, solventes orgánicos y detergentes, los cuales y según estudios previos, permiten la extracción de estas proteínas formadoras de canal sin afectar aparentemente a su funcionalidad.

4.2.1. Proteínas obtenidas mediante el protocolo de Lichtinger con modificaciones

Se puso en práctica un protocolo de extracción de proteínas de pared basado en el uso de cloroformo y metanol como solventes orgánicos de extracción y propuesto por Lichtinger en 1999 (Lichtinger et al. 1999), con la diferencia de que la extracción se llevó a cabo a temperatura ambiente y no a 40 °C como propone el autor, ya que nuestro objetivo era purificar las proteínas preservando al máximo su funcionalidad y no quisimos someterlas a esta temperatura, para evitar que pudieran sufrir modificaciones que afectasen a su funcionalidad. Otra modificación que se introdujo fue el aumentar el periodo de precipitación con éter durante 24 horas en lugar de *over night* como propone Lichtinger, ya que observamos que a 12 horas, el precipitado no se producía por completo.

Este protocolo tiene una duración de dos días, más un tercer día si se realiza una segunda extracción de lípidos del *pellet* proteico obtenido.

Inicialmente se hizo un seguimiento y detección de la presencia de proteínas de pared en cada una de las etapas de la extracción. Se recogió 1 ml del sobrenadante del extracto inicial que se concentró por evaporación en un *speed vap* hasta obtener un volumen final de 20 µl. Se recogieron 10 ml de la solución de extracto y éter que fueron evaporados y resuspendidos en 10 µl de agua. Por último se recogió el *pellet* proteico obtenido tras mantener la solución de extracto y éter durante 24 horas a -20° C y de estos se utilizaron 7 µg. Todas las

muestras se incubaron durante una hora a 37 °C con *buffer* de carga no reductor en una proporción de 3 partes de muestra y 1 parte de tampón de carga. Las muestras se analizaron en electroforesis al 10 % de acrilamida con tricina.



Figura 23. Perfiles electroforéticos de extractos proteicos obtenidos en distintas fases de extracción. Carril 1: Marcador 97.4, 66.7, 45, 31, 21 y 14 kDa. Carril 2: Solución de extracción con solventes orgánicos. Carril 3: Extracto diluido 1:10 con éter. Carril 4: Extracto precipitado.

En la figura 23 se observa la presencia de las bandas de proteína en las distintas fases de extracción, de este modo podemos comprobar que tras la agitación del *pellet* celular con la mezcla de solventes orgánicos (cloroformo y metanol) obteníamos una banda difusa a lo largo de todo el carril. Esto nos estaría indicando la presencia de múltiples bandas de proteínas ineficientemente separadas, algo lógico ya que en esta fase tenemos el extracto al completo de la pared bacteriana. En el tercer carril, correspondiente al extracto con solventes orgánicos diluido con éter en una proporción 1:10, observamos que las proteínas se localizan en un peso molecular inferior a 20 kDa, esto nos podría estar indicando que la mayoría de proteínas de la pared de *G. jacobaea*, tienen pesos moleculares en ese rango.

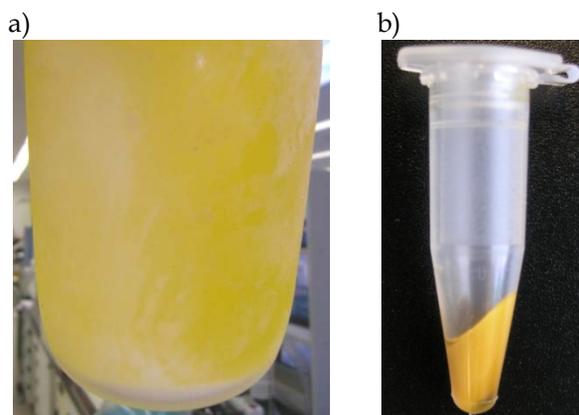


Figura 24 .a) Imagen del precipitado proteico formado tras 24 horas incubación a -20° C. b) Imagen del *pellet* proteico recogido tras la centrifugación del precipitado.

Y por ultimo en el precipitado proteico, recogido tras incubar la muestra 24 horas de incubación a -20° C, cuando se pueden visualizar bandas proteicas definidas, observando un perfil de proteínas que van desde de la mayor de 100 kDa a la menor por debajo de los 14 kDa. Este precipitado tan sólo lo pudimos obtener cuando aumentamos el tiempo de incubación a -20° C, a 24 horas.

Dado que disponíamos de dos cepas de *G. jacobaea*, la MV1 *wild type* y una segunda cepa denominada MV26 obtenida tras varias rondas de mutaciones con el propósito de mejorar su capacidad de síntesis y acumulación de cantaxantinas y β -caroteno (Veiga-Crespo et al. 2005), se quiso determinar si se observaban diferencias en el patrón de bandas proteicas de los extractos de su pared, tras someter los extractos proteicos a electroforesis en geles de acrilamida al 10 % con tricina.

Al observar la figura 25 pudimos comprobar que el perfil proteico obtenido en el gel de acrilamida aparentemente no mostraba variaciones importantes, únicamente la presencia de bandas un poco más intensas en algún caso, que se podrían explicar por pequeñas variaciones en la cantidad de muestra aplicada y no por una

constitución proteica distinta. Por lo que podemos concluir que la constitución de las proteínas de pared de las cepas MV1 y MV26 es la misma.

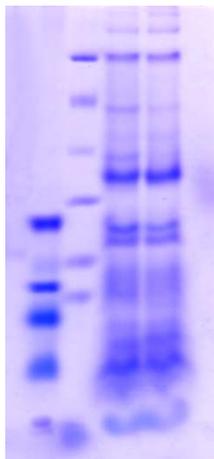


Figura 25. Perfiles electroforéticos de extractos proteicos obtenidos de la cepa MV1 y MV26. Carril 1: Marcador 26, 21, 14 y 6 kDa. Carril 2: Marcador 97.4, 66.7, 45, 31, 21 y 14 kDa. Carril 3: Proteínas de pared de la cepa MV1. Carril 4: Proteínas de pared de la cepa MV26.

4.2.2. Extracción de Heinz

Se probó un segundo método de extracción de proteínas de pared basado en el uso de Genapol X-80 como detergente de extracción y propuesto por Heinz en el 2000 (Heinz & Niederweis 2000). Este método fue empleado en la extracción de la porina MspA de *M. smegmatis*, una porina de unos 100 kDa formada por subunidades de 20 kDa y muy estable tanto a altas temperaturas como a agentes químicos. Este protocolo presenta distintas ventajas respecto a los protocolos en los que se utilizan solventes orgánicos. Es más rápido y puede reducir el tiempo de extracción de 48 a 1.5 horas, es más específico ya que en el caso de *M. smegmatis* se lograba obtener la proteína prácticamente purificada cuando la extracción se realizaba a temperaturas superiores a 60° C, es más eficiente obteniéndose mayores cantidades de porina y no es necesario utilizar solventes

orgánicos. Pero en nuestro caso no obtuvimos los resultados esperados cuando probamos esta metodología de extracción con *G. jacobaea*.

Siguiendo el protocolo de Heinz e incubando las células con la solución extractora con Genapol X-80 a una temperatura de entre 60 y 80 °C, obtuvimos extractos que al analizarlos mediante electroforesis al 10% de poliacrilamida con tricina, mostraban la presencia de proteínas en rangos de pesos moleculares de entre 40 y 20 kDa, tanto cuando previamente a ser sometidos a electroforesis, eran incubados con tampones de carga reductores como no reductores, y en todos los casos se dejaba de detectar las proteínas de 60 y 100 kDa, que si se observan en las extracciones realizadas con solventes orgánicos. Lo que sí que apreciamos en una mayor intensidad de las bandas, y por tanto mayor obtención de proteínas, a medida que aumentamos la temperatura de incubación con el solvente orgánico.

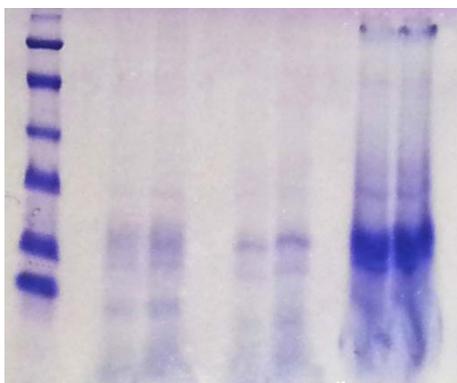


Figura 26. Perfiles electroforéticos de extractos proteicos obtenidos con el protocolo de Heinz en SDS-PAGE al 10% con tricina. Carril 1 marcador 97.4, 66.7, 45, 31, 21.5 y 14.4 kDa. Carril 2 y 3: Extractos obtenidos a 60 °C e incubados a durante 30 minutos a 37 °C y 10 minutos a 100 °C respectivamente. Carril 4 y 5: Extractos obtenidos a 70 °C e incubados a durante 30 minutos a 37 °C y 10 minutos a 100 °C respectivamente. Carril 6 y 7: Extractos obtenidos a 80 °C e incubados a durante 30 minutos a 37 °C y 10 minutos a 100 °C respectivamente. Los carriles 2, 4 y 6 corresponden a las muestras tratadas con tampón de carga no reductor y los carriles 3, 5 y 7 a las muestras cargadas con tampón reductor.

Debido a la baja presencia de bandas proteicas obtenidas mediante el protocolo de Heinz, introducimos una modificación que consistía en someter el *pellet* celular a ultrasonidos junto con la solución de extracción de Genapol X-80 hasta la total dispersión de las células, tras lo cual se incubó a 80 °C durante 30 minutos, ya que debido a la gran hidrofobicidad de la pared de nuestras bacterias, observábamos que no se producía una correcta dispersión de las células con la solución extractora, sino que se quedaban agrupadas.

En estas condiciones el perfil electroforético de proteínas cambió drásticamente, mostrando en este caso abundantes bandas proteínas de pesos moleculares de entre 100 y 20 kDa, destacando especialmente una banda de aproximadamente 60 kDa. Al tratar las muestras con tampón de carga no reductor y reductor, a 37 y 100 °C, no se apreciaron diferencias significativas en el perfil de bandas proteicas.

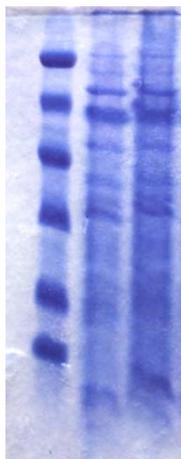


Figura 27. Perfiles electroforéticos de extractos proteicos obtenidos con el protocolo de Heinz, tras un tratamiento con ultrasonidos y 80 °C, en SDS-PAGE al 10%. Carril 1: Marcador 97.4, 66.7, 45, 31, 21.5 y 14.4 kDa. Carril 2: Muestra incubada con tampón de carga no reductor durante 30 minutos a 37 °C. Carril 3: Muestra incubada con tampón de carga reductor durante 10 minutos a 100 °C.

Como podemos comprobar en la figura 27, los perfiles proteicos entre la muestra hervida y sin hervir, aparentemente eran los mismos, con ligeras diferencias en la intensidad de las bandas.

Podemos concluir que este método también resulta válido y eficiente para extraer las proteínas de pared de *G. jacobaea*, ya que las proteínas de pesos moleculares superiores a 40 kDa aparecen nitidas y bien visibles.

Vistos los resultados de perfiles electroforéticos de proteínas de pared de *G. jacobaea*, obtenidos mediante la extracción de Lichtinger y la de Heinz, se decidió finalmente proseguir con la extracción de Lichtinger por varias razones. A pesar de que la extracción de Heinz era más resolutive, rápida y aparentemente eficiente, nuestra intención era purificar las proteínas de pared de *G. jacobaea* mediante electroforesis preparativas, y el elevado número y la proximidad de las bandas obtenidas mediante el protocolo de Heinz dificultaba este proceso. Aún y así el método de Heinz resultaría muy eficiente si tras realizar la extracción las proteínas pudieran ser separadas con otras técnicas de purificación, como la cromatografía.

4.3. Análisis de las proteínas de pared en SDS-PAGE

Los dos sistemas de electroforesis con SDS empleados habitualmente para la separación de proteínas son el sistema SDS-PAGE con glicina desarrollado por Laemmli en 1970 (Laemmli 1970), y el sistema SDS-PAGE con tricina desarrollado por Schagger en 1985 (Schägger & Jagow 1987; Schägger 2006). Ambos protocolos se emplean en la separación de proteínas de entre 2 y 100 kDa aunque el protocolo desarrollado por Schagger es mucho más eficiente y resolutive en el rango de proteínas de entre 30 y 10 kDa, esto se debe al diferente pK de la glicina (9.6) y de la tricina (8.15), que favorecen el apilamiento de las proteínas de un modo distinto en función de su tamaño, de modo que en el caso de la glicina favorece el apilamiento de proteínas de

mayor tamaño (alrededor de 100 kDa), mientras que la tricina favorece el apilamiento de proteínas de entre 30 y 10 kDa.

Inicialmente y dado que en nuestro laboratorio el protocolo que se empleaba habitualmente en el análisis electroforético de proteínas era el propuesto por Laemmli, iniciamos el análisis de las proteínas de pared de *G. jacobaea* con éste, de modo que tras obtener un *pellet* proteico mediante el protocolo de extracción de Lichtinger, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 y al 12%.

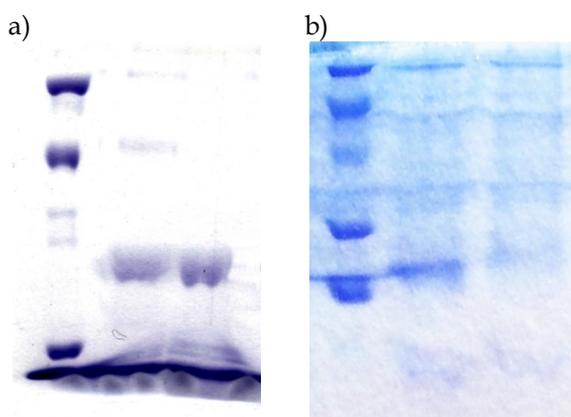


Figura 28. Perfiles electroforéticos de extractos proteicos de *G. jacobaea* separados mediante electroforesis SDS-PAGE con glicina. a) SDS-PAGE al 8% de acrilamida. Carril 1: Marcador 97.4, 66.7, 45, 31, 21.5 kDa. Carril 2: Muestra incubada con tampón de carga reductor durante 30 minutos a 37° C. Carril 3 Muestra incubada con tampón de carga reductor durante 5 minutos a 100° C. b) SDS-PAGE al 12% de acrilamida. Carril 1: Marcador 97.4, 66.7, 45, 31, 21.5 kDa. Carril 2: Muestra incubada con tampón de carga reductor durante 30 minutos a 37° C. Carril 3 Muestra incubada con tampón de carga reductor durante 5 minutos a 100° C.

Aunque pudimos observar la presencia de bandas proteicas, los resultados no eran resolutivos, ya que las bandas aparecían muy difuminadas, muy difusas, y con poca definición. Esta fue la razón principal por la que decidimos proseguir nuestro estudio utilizando el método de Schagger. Secundariamente, también elegimos este protocolo porque es compatibles con otras técnicas de análisis de proteínas como la espectrometría de masas o la secuenciación de

Edman, técnicas que también queríamos emplear. Además los geles de acrilamida elaborados según el protocolo de Schagger forman una malla de poliacrilamida menos densa que permite una mejor elución de las proteínas contenidas y dado que el sistema que queríamos utilizar para purificar nuestras proteínas era el de electroforesis preparativas con eluciones pasivas de las proteínas, este protocolo se ajustaba mucho mejor a nuestras necesidades.

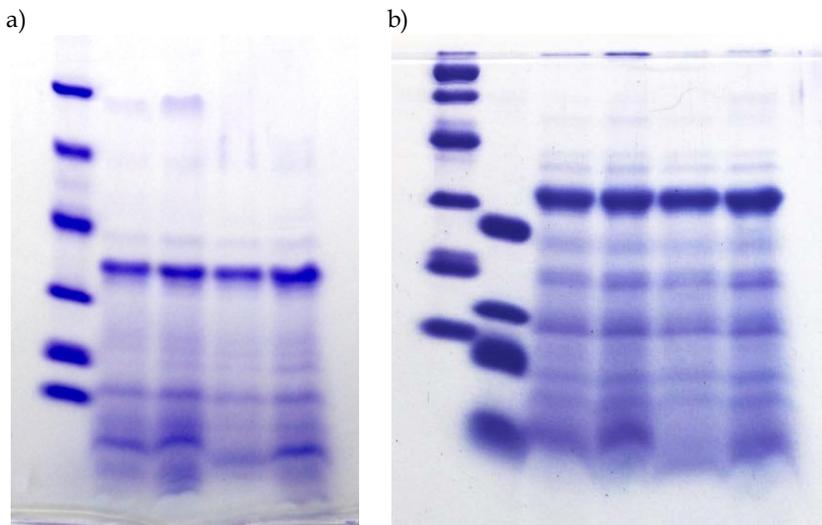


Figura 29. Perfiles electroforéticos de extractos proteicos de *G. jacobaea*. a) SDS-PAGE con tricina al 8% de acrilamida. Carril 1: Marcador de peso molecular 97.4, 66.7, 45, 31, 21 y 14 kDa. Carril 2: Muestra incubada con tampón de carga no reductor durante 30 minutos a 37 °C. Carril 3: Muestra incubada con tampón de carga reductor durante 30 minutos a 37 °C. Carril 4: Muestra incubada con tampón de carga no reductor durante 5 minutos a 100 °C. Carril 5: Muestra incubada con tampón de carga reductor durante 5 minutos a 100 °C. b) SDS-PAGE con tricina al 16% de acrilamida con urea 6 M. Carril 1: Marcador de peso molecular 97.4, 66.7, 45, 31, 21 y 14 k Da. Carril 2: Marcador de peso molecular 26, 21, 14 y 6 kDa. Carril 3: Muestra incubada con tampón de carga no reductor durante 30 minutos a 37 °C. Carril 4: Muestra incubada con tampón de carga reductor durante 30 minutos a 37 °C. Carril 5: Muestra incubada con tampón de carga no reductor durante 5 minutos a 100 °C. Carril 6: Muestra incubada con tampón de carga reductor durante 5 minutos a 100 °C.

4.4. Utilización de distintos protocolos de tinción de geles de poliacrilamida

A pesar de que la técnica de tinción presentada por Schagger en 2006 mostró una buena sensibilidad, quisimos comprobar si otros protocolos de tinción basados en el colorante Coomassie, podían ser mejores. Se probaron los protocolos propuestos por Schagger (Schägger 2006), Kang (Kang et al. 2002), Candiano (Candiano et al. 2004), Wang (Wang et al. 2007) y por último se utilizó también el protocolo que habitualmente se utilizaba en nuestro laboratorio.

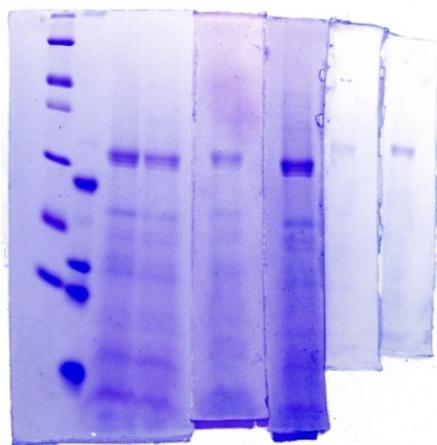


Figura 30. Bandas de proteínas de pared de *G. jacobaea*, extraídas por el método de Lichtinger con modificaciones y analizadas en electroforesis SDS-PAGE al 10% de acrilamida con tricina. Carril 1: Marcador de peso molecular 97.4, 66.7, 45, 31, 21 y 14 kDa. Carril 2: Marcador de peso molecular 26, 21, 14 y 6 kDa. Carriles 3 y 4: Gel teñido con el protocolo de Schagger, Carril 5: Gel teñido con el protocolo de Kang, Carril 6: Gel teñido con el protocolo de Candiano. Carril 7: Gel teñido con el protocolo de Wang. Carril 8: Gel teñido con el protocolo habitualmente utilizado en el laboratorio.

Para realizar este ensayo, se utilizó un extracto de pared de *G. jacobaea* incubado durante 10 minutos a 100 °C, el cual se empleó para realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida con tricina. Tras la finalización de la electroforesis, el gel se dividió en cinco partes, cada una de la cual se sometió a uno de los cinco protocolos de tinción. De

este modo, pretendíamos partir de la misma muestra, tratada en las mismas condiciones, para que de este modo los resultados fuesen totalmente comparables.

Al observar la figura 30 pudimos comprobar que las tinciones de Wang y la que empleábamos habitualmente en el laboratorio, eran las que teñían con menor intensidad, además de producirse una retracción del gel, lo cual puede distorsionar la visualización de las bandas de proteínas y la estimación de los pesos moleculares de las mismas.

Los protocolos de Schagger, Kang y Candiano mostraban mejor resolución, sin embargo, el gel teñido con el protocolo de Kang mostraba una ligera retracción y era el menos resolutivo de los tres, siendo el gel teñido con el protocolo de Schagger el que mostraba una mayor resolución y una nitidez de las bandas más evidente.

Finalmente y dados los resultados obtenidos decidimos proseguir nuestros estudios utilizando la tinción de Schagger, ya que aunque el protocolo de Candiano daba muy buenos resultados, era ligeramente más elaborado y largo que el de Schagger (8 horas aproximadamente respecto a 12).

Por último también probamos la tinción de plata con nuestros geles. Comprobamos que realmente tanto la visualización como la resolución de la bandas era mucho mayor, e incluso que podíamos ver bandas que en la tinción con Coomassie no se apreciaban, como se puede observar en la figura 31. Sin embargo esta técnica únicamente la utilizamos para visualizar mejor las bandas, ya que se trata de una tinción irreversible e incompatible con el estudio de las proteínas mediante espectrometría de masas y con la degradación de Edman, dos técnicas que teníamos intención de utilizar.

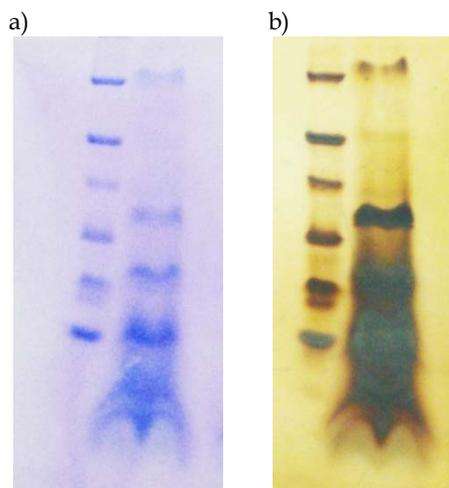


Figura 31. . Perfiles electroforéticos de extractos proteicos de *G. jacobaea*. a) Gel teñido con el protocolo de Schägger. Carril 1: Marcador de peso molecular 97.4, 66.7, 45, 31, 21 y 14 kDa. Carril 2: Muestra incubada con tampón no reductor durante 30 minutos a 37 °C. b) Gel teñido con tinción de plata. Carril 1: Marcador de peso molecular 97.4, 66.7, 45, 31, 21 y 14 kDa. Carril 2: Muestra incubada con tampón no reductor durante 30 minutos a 37 °C.

4.5. Purificación de proteínas de pared de *Gordonia jacobaea* mediante electroforesis preparativas

Se obtuvieron proteínas purificadas mediante el uso de electroforesis preparativas, para ello los extractos de proteína de pared fueron incubadas con un tampón de carga no reductor y sometidas a electroforesis en geles al 10% de acrilamida. Una vez concluida la electroforesis, las bandas proteicas se cortaron y las proteínas se extrajeron de los geles mediante elución pasiva utilizando una solución de Genapol al 1% en Tris 10 mM pH8. Las eluciones proteicas se congelaron a -80 °C y fueron liofilizadas para conservarlas durante más tiempo, al mismo tiempo que aumentábamos la concentración de las proteínas.

Se realizaron varias extracciones de proteínas de los geles preparativos, obteniéndose resultados variables, especialmente en la extracción de las proteínas de 100 kDa.

Pudimos comprobar que las proteínas eluidas en el rango de peso molecular de 100 kDa, aunque no se visualizasen en el gel de origen, cuando analizábamos su eluido volviéndolos a someter a electroforesis SDS-PAGE, sí que aparecía. Ésto posiblemente se debe a que partíamos de cantidades pequeñas de esta proteína y la tinción utilizada resultaba poco eficiente, de modo que cuando concentrábamos el eluido gracias a la liofilización a la que sometíamos las eluciones pasivas de los geles, las proteínas podían ser visualizada.

También comprobamos que al correr los extractos eluidos de la banda proteica del rango de 100 kDa, sin ser previamente hervidos, en algunas ocasiones, nos mostraba dos bandas proteicas que aparecían en el rango de 30 a 45 kDa. E igualmente, cuando analizábamos mediante electroforesis los extractos de las bandas de entre 30 y 45 kDa, nos aparecía la banda de proteína de 100 kDa. Estas observaciones las obtuvimos tratando las muestras con tampón de carga no desnaturizante y sometiéndolas a 30 °C durante una hora. De aquí podemos deducir que la proteína de 100 kDa está formada aparentemente por dos subunidades de unos 35 y 40 kDa, que es una proteína bastante estable que tiende a reconstituirse y que la separación de las bandas de 35 y 40 kDa no se logra adecuadamente cuando intentamos purificarlas mediante electroforesis preparativas.

Algo similar observamos respecto a la proteína de 60 kDa, aunque en este caso, y dado la proximidad electroforética respecto a las proteínas de 100, 35 y 40 kDa, no podemos afirmar que se trate de parte de un polímero.

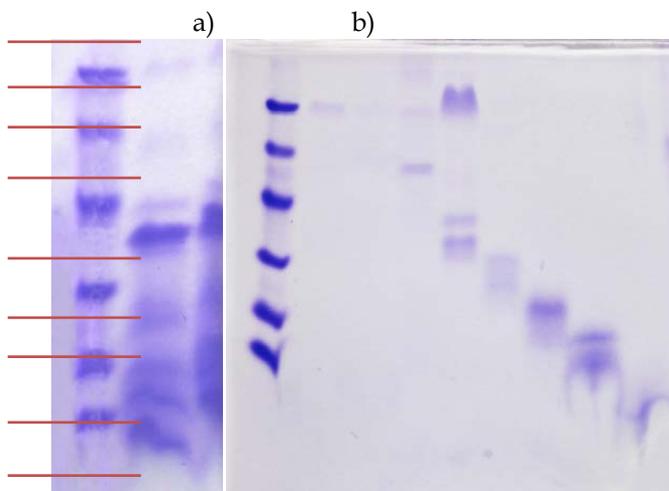


Figura 32. Perfiles electroforéticos de eluciones proteicas. a) Gel control del que se realizaron las extracciones. Carril 1: Marcador de peso molecular 97.4, 66.7, 45, 31, 21 y 14 kDa. Carril 2: Muestra incubada con tampón no reductor durante 30 minutos a 37°. Las líneas rojas indican los puntos de corte del gel. b) Gel de las eluciones. Carril 1: Marcador de peso molecular 97.4, 66.7, 45, 31, 21 y 14 kDa. Carril 2: Eluido de 120 a 90 kDa. Carril 3: Eluido de 90 a 65 kDa. Carril 4: Eluido de 65 a 50 kDa. Carril 5: Eluido de 50 a 35 kDa. Carril 6: Eluido de 35 a 30 kDa. Carril 7: Eluido de 30 a 25 kDa. Carril 8: Eluido de 25 a 15 kDa. Carril 9: Eluido de 15 a 5 kDa. Las líneas rojas marcan los puntos de corte.

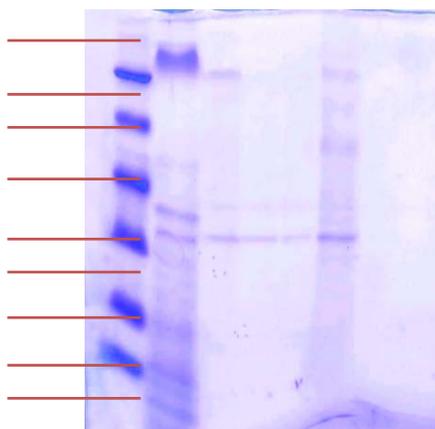


Figura 33. Perfiles electroforéticos de eluciones proteicas. Carril 1: Marcador de peso molecular 97.4, 66.7, 45, 31, 21 y 14 kDa. Carril 2: Muestra incubada con tampón no reductor durante 30 minutos a 37° C. Carril 3: Eluido de 120 a 90 kDa. Carril 4: Eluido de 90 a 65 kDa. Carril 5: Eluido de 65 a 45 kDa. Carril 6: Eluido de 45 a 30 kDa. Carril 7: Eluido de 30 a 20 kDa. Carril 8: Eluido de 20 a

17 kDa. Carril 9: Eluido de 17 a 10 kDa. Carril 10: Eluido por debajo de 10 kDa. Las líneas rojas marcan los puntos de corte.

Al observar el gel comprobamos que las bandas de 100 y 60 kDa podían ser purificadas mediante esta técnica, ya que quedaban suficientemente separadas. Las bandas de 40 y 35 kDa, resultaban más difíciles de separar ya que la resolución del gel no permitía una separación adecuada. En cuanto a las bandas de menor peso molecular, la proximidad aun era mayor. Aun y así, se decidió purificar las bandas de menor peso molecular ya que partíamos de una ventaja debido al tipo de bacteria con la que trabajamos. Las bacterias Gram positivo pertenecientes al grupo de las actinobacterias, como es el caso de *G. jacobaea*, a diferencia de las bacterias Gram negativo, presentan un limitado número de tipos de porina por especie. Por ese motivo nos permitimos el estudiar la actividad formadora de poros de estos extractos de proteínas, ya que aun asumiendo que no estuviesen totalmente purificadas, era de esperar que las proteínas contaminantes no tuviesen actividad porina (Niederweis 2003; Nikaido 2003).

En un intento de obtener unos extractos más puros, probamos la elución pasiva de las proteínas con agua y con tricloroacético.

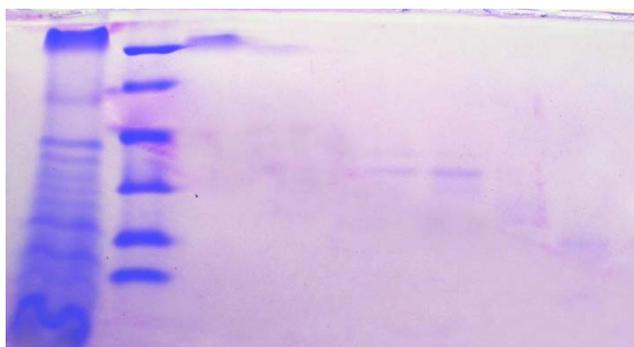


Figura 34. Perfiles electroforéticos de eluciones proteicas. Carril 1: Muestra incubada con tampón no reductor durante 30 minutos a 37 °C. Carril 2: Marcador de peso molecular 97.4, 66.7, 45, 31, 21 y 14 kDa. Carril 3: Eluido de 120 a 90 kDa. Carril 4: Eluido de 90 a 65 kDa. Carril 5: Eluido de 65 a 50 kDa.

Carril 6: Eluido de 50 a 35 kDa. Carril 7: Eluido de 35 a 30 kDa. Carril 8: Eluido de 30 a 25 kDa. Carril 9: Eluido de 25 a 15 kDa. Carril 10: Eluido de 15 a 5 kDa.

En la figura 34 pudimos comprobar que era posible obtener eluidos con agua, sobre todo de la banda de 100 kDa, aunque con concentraciones muy bajas. Sin embargo con la elución con tricloroacético, no conseguimos obtener ninguna banda de proteína visible (datos no mostrados).

4.6. Determinación de la actividad formadora de poro

Se estudió la actividad formadora de poro, de las proteínas de *G. jacobaea* purificadas mediante electroforesis preparativas. Preliminarmente se probaron eluciones de las cepas: MV1 y MV26. La actividad formadora de poro de las proteínas de la pared de *G. jacobaea*, se determinó mediante la técnica de *Black Lipid Planar Bilayer*.

En la cepa MV1, se probaron soluciones concentradas de las proteínas purificadas mediante elución de geles preparativos de poliacrilamida correspondientes a los pesos moleculares de 100, 60, 40-35, 20 y menos de 15 kDa, en esta cepa se estudió la proteína de 100 kDa. En el caso de la cepa MV 26 se probaron las bandas 60, 40-35, 25, 20 y menos de 15 kDa. Se pudo detectar actividad formadora de poro en todas las eluciones, a excepción de en el rango de 30 a 20 kDa. En esta cepa se estudiaron las proteínas de 60 y 20 kDa.

Cepa	Rango de la proteína	Actividad porina
MV1	10-15 kDa	+++
MV1	MV 26 20 kDa	+++
MV1	25 kDa	débil
MV1	30 kDa	débil
MV1	35 kDa	++++
MV1	40 KDa	++++
MV1	MV 26 60 KDa	++++
MV1	100 kDa	++++

Figura 35. Valoración cualitativa de la actividad formador de poro de diferentes extractos proteicos de *G. jacobaea*. ++++ indica una actividad formadora de poro muy alta.

La conductancia se determinó bañando la membrana lipídica en una solución salina de cloruro potásico 1M a pH 7, 20 °C (temperatura ambiente) y aplicando un potencial eléctrico que varió dependiendo de la muestra, entre de 10 y 20 mV. En las figuras 36 se puede observar dos ejemplos de registros obtenidos durante el análisis de la proteína de 60 kDa y de la proteína de 100 kDa, de la cepa MV1.

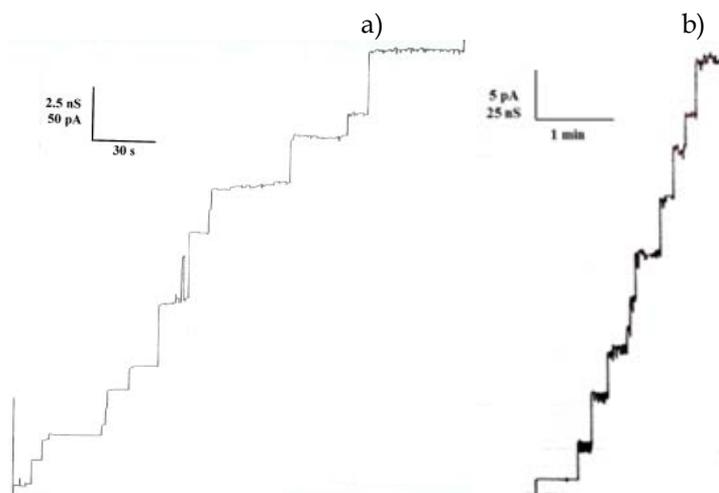


Figura 36. Ejemplos de registros de conductancia de canales simples recogidos durante la determinación de la capacidad formadora de canal de las proteínas de *G.jacobaea*. a) proteína 66 kDa y b) proteína 100 kDa.

Los registros de conductancia obtenidos se procesaron para elaborar histogramas de frecuencia que nos facilitaron el poder determinar la conductancia promedio mayoritaria de las proteínas analizadas.

Al obtener los registros, pudimos observar cierta dispersión aparente en cuanto a los valores de conductancia registrados, este hecho es algo habitual en este tipo de registros por ese motivo se recurre a la construcción de histogramas de frecuencia o probabilidad de los índices de conductancia anotados, y de ese modo se puede determinar los valores más frecuentes y por ende la conductancia estimada de la porina en estudio. De todos modos esta dispersión podría deberse también a inserciones simultáneas de varias porinas, producidas por

inserciones simultaneas aleatoria, bien porque estas estuviesen agrupadas formando multímeros, porque se produjesen inserciones simultaneas, o también podrían deberse a pequeñas contaminaciones con otras porinas arrastradas durante el proceso de purificación.

4.6.1. Proteína de 100 kDa. Actividad formadora de poro

Los extractos de la proteína de 100 kDa de la cepa MV1 de *G. jacobaea*, obtenidos mediante elución pasiva de geles preparativos de acrilamida, fueron congelados a $-81\text{ }^{\circ}\text{C}$ y seguidamente liofilizados y resuspendidos con agua miliQ estéril.

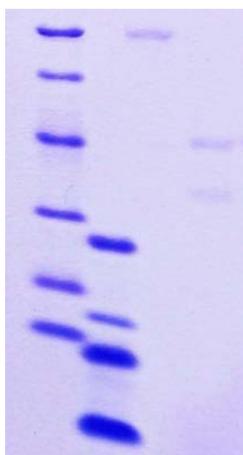


Figura 37. Figura 4.18. Perfil electroforéticos de la proteína de 100 kDa. Carril 1: Marcador de peso molecular 97.4, 66.7, 45, 31, 21 y 14 kDa. Carril 2: Muestra incubada con tampón no reductor durante 30 minutos a 37°C . Carril 3: Muestra incubada con tampón reductor durante 10 minutos a 100°C .

Esta proteína aparentemente está formada por 2 subunidades de 45 y otra de 35 kDa, de peso molecular aparente.

4.6.1.1. Conductancia de canal simple

La actividad formadora de poros de los extractos de proteína de 100 kDa, se estudió mediante la técnica de *Black Lipid Bilayer* (Benz et al. 1979), sumergiendo la bicapa lipídica en distintas concentraciones de

soluciones salinas de cloruro de potasio (KCl), así como de cloruro de litio (LiCl) y acetato de potasio (CH₃COOK).

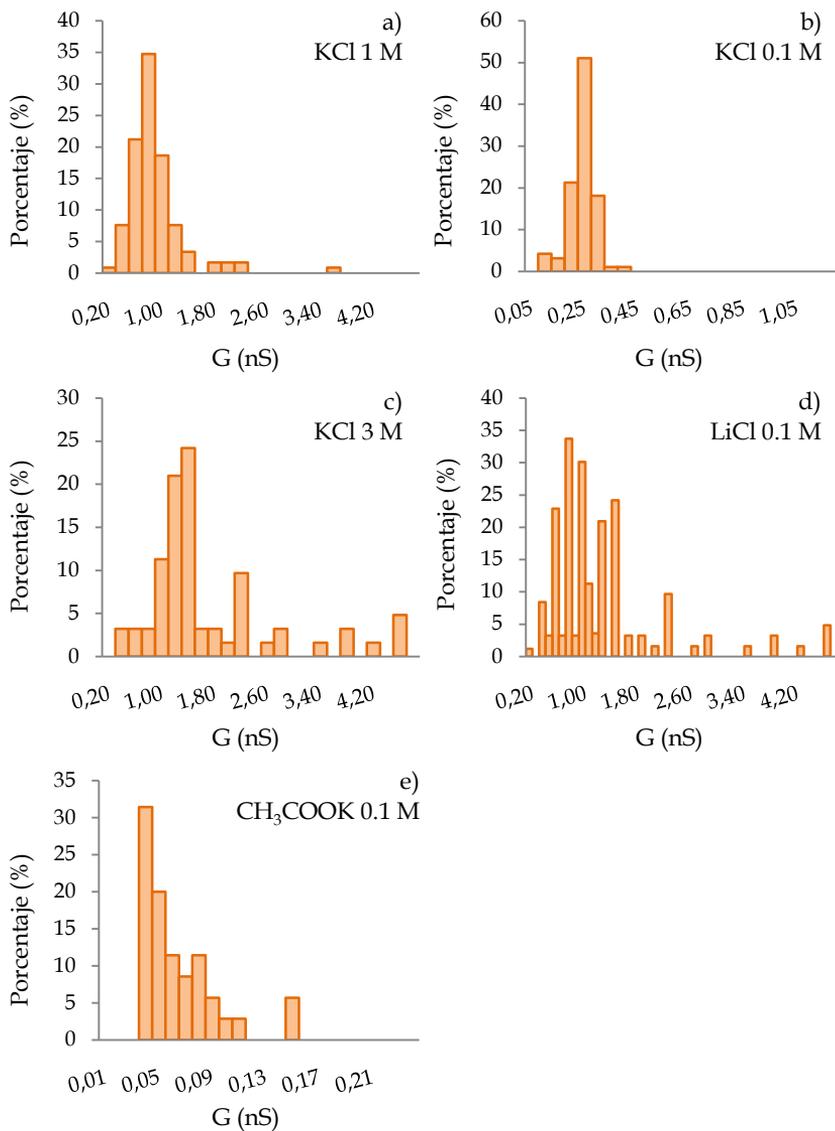


Figura 38. Histogramas de todas las unidades conductivas observadas en membrana de DipHPc/n-decano, de un extracto de la proteína de 100 kDa de la cepa MV1 de *Gordonia jacobaea*. Las medidas se llevaron a cabo sumergiendo la bicapa lipídica en distintas soluciones salinas, a 20 °C y sometiéndola a un potencial de 10 mV. Las soluciones salinas empleadas fueron. a) KCl 1 M pH7.

Resultados y discusión

Conductancia media de canal: 0.8 nS. b) KCl 0.1 M pH7. Conductancia media de canal: 0.25 nS. c) KCl 3 M pH 7. Conductancia media de canal: 1.4 nS. d) LiCl 0.1 M pH7. Conductancia media de canal: 0.2 nS. e) CH₃COOK 0.1 M pH7. Conductancia media de canal: 0.04 nS.

En soluciones de 1M de KCl pH7, más de la mitad de las inserciones produjeron conductancias de entre 0.7 y 0.9 nS, no observándose otros picos de conductancia destacables. A 0.1M de KCl más de la mitad de las inserciones produjeron conductancias de 0.25 a 0.3 nS y tampoco se observaron otros picos destacables. En cambio a concentraciones de 3M KCl, además de los dos picos mayoritarios que suponían un 45% de las inserciones y que correspondían a una conductancia de entre 1.2 y 1.4 nS, observamos un pico menor, con un 9% de las inserciones y una conductancia de 2.2 nS, este pico podría deberse a inserciones dobles de la porina. A 0.1 M de CLi volvimos a obtener picos mayoritarios, que abarcaban el 75% de las inserciones, con unas conductancias de entre 0.2 y 0.25 nS, y en el caso el caso de 0.1 M de CH₃COOK, de nuevo obtuvimos dos picos, uno mayoritario con un 50% de las inserciones y una conductancia de entre 0.04 y 0.05 nS y un segundo con un 11% de las inserciones y una conductancia de 0.08 nS, que podría deberse a inserciones dobles . En la figura 39 se muestran las conductancias obtenidas con la proteína de 100 kDa.

Solución salina	Concentración (M)	$G \bar{X}$ (nS)
KCl	0,03	0,125
KCl	0,05	0,125
KCl	0,1	0,25
KCl	0,3	0,4
KCl	1	0,8
KCl	3	1,4
CLi	0,1	0,2
CH3COOK	0,1	0,04

Figura 39. Conductancia de canal simple del extracto de proteína de 100 kDa obtenidas con diversas sales y a distintas concentraciones.

Se estudió la relación entre conductancia y concentración de KCl y se observó que la relación entre ambas no proporcionaba una función lineal, esto sería indicativo de que se trata de canales llenos de agua, similares a los que se han identificado en bacterias Gram negativo (Benz 1988). En lugar de esto, lo que observamos es que incrementos de la concentración de KCl del orden de 100 veces, solo suponían incrementos de la conductancia del orden de unas 12 veces. Esto indica que los canales presentan puntos netos de carga que podrían ser lugares de unión para los iones. Estos resultados sugieren, que al igual como en otros casos de bacterias gram-positivas concretamente porinas de *M. chelonae*, *M. smegmatis*, *N. farcinica* y *C. glutamicum* (Riess et al. 2001b; Costa-Riu, Maier, et al. 2003; Riess et al. 1998; Matsui et al. 2001), estos canales llenos de agua están influenciados por puntos de carga neta localizados en su interior o próximos a su abertura. Como consecuencia de estas cargas, los canales se saturan a elevadas concentraciones de sales reduciéndose su conductividad.

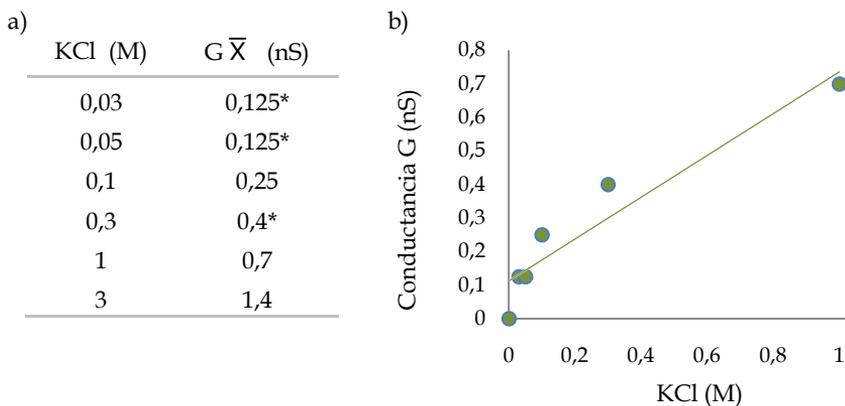


Figura 40. a) Promedio de la conductancia simple de canal obtenidas a 20 °C y con voltaje de 10 mV, en función de la concentración de KCl en la que se sumergió la membrana de 1% DiphPC/n-decano. b) Representación grafica de los resultados mostrados en la tabla a).

Como habíamos observado que la banda de 100 kDa, al ser hervida y analizada en electroforesis, daba lugar a dos bandas de unos 35 y 40 kDa, y a la inversa, quisimos comprobar si estas bandas

mostraban actividad formadora de poro. Tras analizar en *Black Lipid Bilayer* sus extractos observamos que mostraban unas conductancias de unos 0.6 y 0.5 nS respectivamente. Esta diferencia de conductancia respecto a la esperable de 0.8 nS podría deberse a alteraciones en la constitución de la porina, aunque también podría ser causada por una incorrecta separación de las proteínas, ya que éstas se obtuvieron mediante extracción de geles preparativos y la proximidad de las bandas dificultó en gran medida su correcta separación, por lo que podríamos estar encontrándonos con subunidades que no podrían formar la porina de 100 kDa en estado nativo, dado que quizás su estequiometría no sería la correcta.

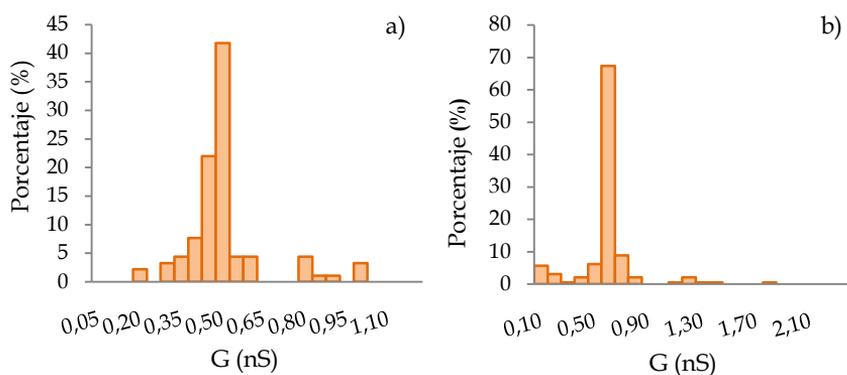


Figura 41. Histograma de todas las unidades conductivas observadas en membrana de DipHPc/n-decano. Las medidas se llevaron a cabo sumergiendo la bicapa lipídica en una solución de KCl 1M a pH 7, a 20° C y sometiéndola a un potencial de 20 mV. a) Extracto de la proteína de 40 kDa de la cepa MV1 de *Gordonia jacobaea*. b) Extracto de la proteína de 35 kDa de la cepa MV1 de *G. jacobaea*.

4.6.1.2. Selectividad iónica

Para estudiar si la proteína de 100 kDa mostraba algún tipo de selectividad iónica, se compararon las conductancias mostradas en presencia de cloruro de potasio, cloruro de litio y acetato de potasio.

Solución salina	Concentración (M)	$G \bar{X}$ (nS)
KCl	0,1 M	0,25
CLi	0,1 M	0,2
CH ₃ COOK	0,1 M	0,04

Figura 42. Promedio de la conductancia simple de canal obtenida a 20 °C y con voltaje de 10 mV, en función de la concentración de distintas sales, en una membrana de 1% DiphPC/n-decano.

Observando estos datos podemos comprobar que las conductancias entre el cloruro de potasio y el cloruro de litio son muy similares, esto se puede interpretar del siguiente modo. Cuando sustituimos el catión potasio por el catión litio, que es menos móvil, no se observa variación de conductancia. Mientras que cuando sustituimos el anión cloruro por el acetato, la conductancia es 5 veces menor, lo que indica que hay cargas negativas en el interior o en la entrada del canal que genera una superficie que repele los aniones enlenteciendo su paso a través del canal a medida que el anión es mayor (KCl=LiCl>Kacetato) y disminuyendo la conductancia. Estos resultados sugieren que la proteína de 100 kDa tiene selectividad para los aniones y no para los cationes, ya que el litio y el potasio tienen aproximadamente la misma movilidad en fase acuosa, y la conductancia simple de canal del acetato fue mucho menor que para la del cloruro (Costa-Riu, Maier, et al. 2003; Abdali et al. 2013).

Para ampliar el estudio de la selectividad de canal de la porina se realizaron experimentos de medición del potencial de membrana a corriente cero.

Después de saturar la membrana permitiendo la inserción de un elevado número de porinas en una membrana de 1% DiphPC/n-decano sumergida en una solución de 0,1 M de cloruro potásico, se establecieron gradientes salinos a través de la membrana mediante la adición de pequeñas cantidades de soluciones concentradas de estas

mismas sales, pero añadidas en uno solo de los lados de la membrana. Este mismo experimento se realizó también sumergiendo la bicapa lipídica en 0.1 M de cloruro de litio y 0.1 M de acetato de potasio.

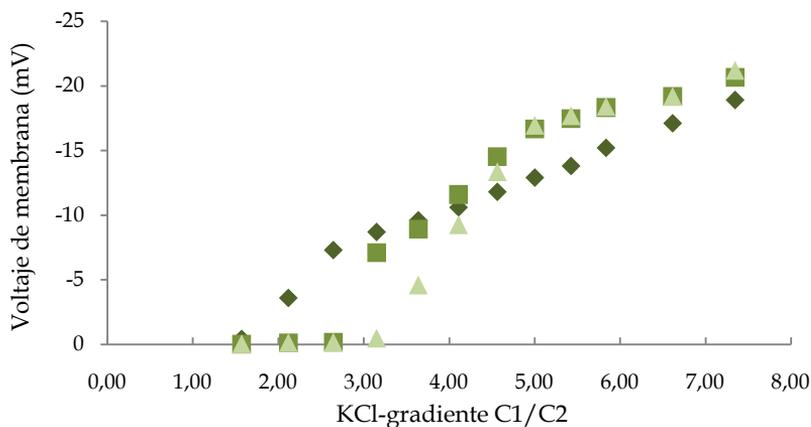


Figura 43. Potencial de membrana (V) a corriente cero. V se define como la diferencia del potencial del lado diluido menos el potencial en el lado concentrado. V se midió con un electrómetro Keithley 617 mediante electrodos de calomelanos con puentes de sal. 1% DiphPC/n-decano. Gradiente KCl, a temperatura ambiente y pH 6.

En el ensayo con KCl, la parte más diluida de la membrana se volvió más negativa al incrementar el gradiente de concentración de iones a través de la membrana (Figura 43). Mediante la ecuación de Goldman-Hodkin-Katz (Benz et al. 1979) se pudo calcular el ratio de permeabilidad P_{K^+}/P_{Cl^-} que fue de 0,56, indicando un movimiento ligeramente preferencial de los iones cloruro a través del canal y confirmando que el canal tendría una ligera selectividad aniónica.

Se realizó el mismo experimento sustituyendo el cloruro de potasio por cloruro de litio, y los resultados fueron similares. El potencial de membrana a corriente cero, siendo negativo en el lado más diluido, se volvió aun más negativo a medida que se incrementaba el gradiente de concentración. La permeabilidad de la porina fue 6,5 veces

superior para el Cl^- que para el Li^+ ($P_{\text{Li}^+}/P_{\text{Cl}^-}=0.15$), indicando una fuerte preferencia por los aniones sobre los cationes (Figura 44.).

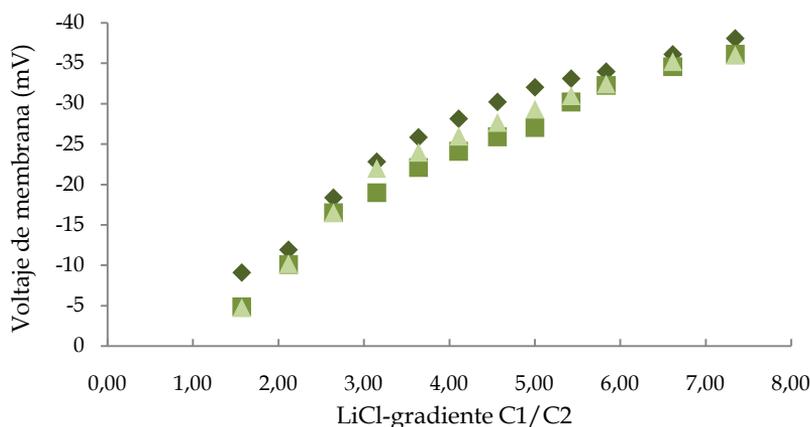


Figura 44. Potencial de membrana (V) a corriente cero. V se define como la diferencia del potencial del lado diluido menos el potencial en el concentrado lado. V se midió con un electrómetro Keithley 617 mediante electrodos de calomelanos con puentes de sal. 1% DiphPC/n-decano. Gradiente LiCl. T= 20 °C; pH 6.

Cuando este ensayo se realizó con gradientes de acetato potásico, el potencial de membrana a corriente cero fue inicialmente positivo en la parte más diluida y se volvió negativo al incrementar el gradiente de concentración. El ratio de permeabilidad $P_{\text{K}^+}/P_{\text{CH}_3\text{COO}^-}$ mediante la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz fue de 1,22, lo que indica una preferencia por el catión potasio en comparación con el ión menos móvil acetato (Figura 45). Esta preferencia aparente por el catión potasio podría deberse no a una preferencia por su carga, sino a que el catión potasio tiene un diámetro mucho menor que el del acetato, lo que facilitaría su entrada en el canal por una cuestión de tamaño y no de carga.

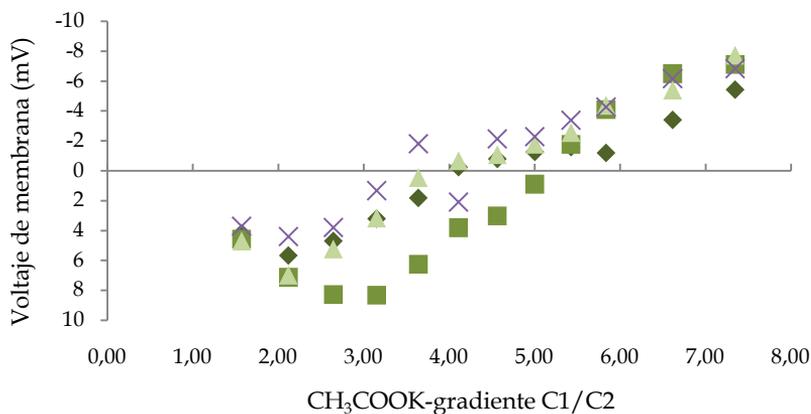


Figura 45. Potencial de membrana (V) a corriente cero. V se define como la diferencia del potencial del lado diluido menos el potencial en el concentrado lado. V se midió con un electrómetro Keithley 617 mediante electrodos de calomelanos con puentes de sal. 1% DiphPC/n-decano. Gradiente CH₃COOK. T= 20°C; pH 6.

De estos tres experimentos se puede concluir que la porina es moderadamente selectiva para aniones. Dentro del grupo de los actinomicetos esta característica es minoritaria ya que la mayoría de las porinas descritas son catión selectivas, y con esta característica por el momento solo se han descrito porinas con actividad anión selectiva en *C. glutamicum*, *C. efficiens*, *M. bovis* y *R. equi*, siendo esta una propiedad más habitual en bacterias Gram negativas (Hüntner, Costa-Riu, et al. 2005; Piñeiro et al. 2011; Lichtinger et al. 1999; Riess et al. 2003).

4.6.1.3. Dependencia de voltaje

Se estudió la dependencia de voltaje de la proteína de 100 kDa, observándose que después de aplicar un voltaje creciente en un rango de +100 a -90 mV, no se observaban cambios en la conductancia. Sólo un muy bajo porcentaje de poros se cerró al aplicar voltajes superiores a -100 mV y +120 mV. Esto indica que la porina apenas es dependiente del voltaje.

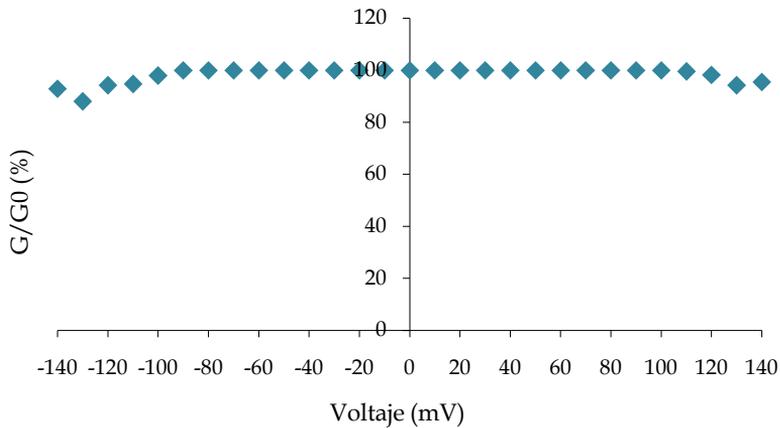


Figura 46. Ratio de conductancia G/G_0 en función del potencial de membrana (V_m). El potencial de membrana se refiere a la cara cis de la membrana. Fase acuosa: 1MKCl. Membrana: 1% DiphPC/n-decano. $T = 20^\circ\text{C}$.

Esta ausencia de cambio de conductancia después de aplicar potenciales de hasta 140 mV, indica que la porina no se cierra por causa del aumento de potencial eléctrico y mantiene su conductividad casi sin alterar. Esto podría deberse bien a que la proteína se inserta en la membrana reconstituyendo su estructura y manteniendo su estabilidad fuertemente, o bien, que el propio canal no reacciona al potencial eléctrico. Esta característica es poco habitual en las porinas de este grupo, que tienden a ser dependientes de potencial (Riess & Benz 2000; Riess et al. 1999; Riess et al. 2003; Abdali et al. 2013; van der Woude et al. 2013; Mafakheri et al. 2014). Como hemos indicado, en general, las porinas de este grupo suelen ser dependientes de voltaje, de modo que cuando se les aplica un voltaje creciente, cambian su conformación y reducen su conductividad, en algunos casos incluso llegando a cerrarse el canal por completo de modo irreversible (Molle et al. 2006). Por el momento solo una de las porinas de *M. bovis* y la PorB_{Req} de *R. equi* ha mostrado ser independiente de voltaje, como en el caso de nuestra proteína de 100 kDa (Riess et al. 2003).

4.6.1.4. Especificidad de sustrato

Por último para estudiar si la porina podía tener un sitio de unión a fosfatos se realizaron experimentos de especificidad de sustrato. Para ello y tras obtener una membrana estable saturada con múltiples inserciones de la porina en estudio, se añadieron concentraciones crecientes de fosfato a ambos lados de la membrana.

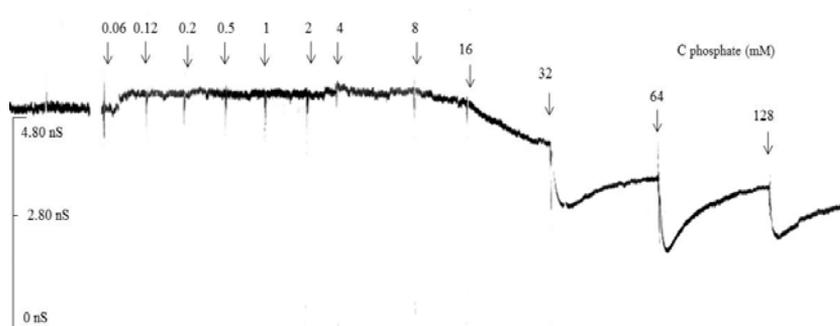


Figura 47. Titulación de la conductancia de membrana inducida por una porina bacteriana. Membrana 1% DiphPC/n-decano. Fase acuosa: 1 M KCl. Voltaje aplicado: +10 mV; T= 20° C.

Se observó que a medida que aumentaba la concentración de fosfato en el medio, se producía un bloqueo dosis-dependiente de la conductancia, apreciándose un descenso de la misma a partir de concentraciones de fosfato mayores a 16 mM (figura 47).

Para realizar estos experimentos se estableció la conductancia a una determinada concentración de sustrato (C_s), en nuestro caso fosfatos, respecto a la conductancia inicial sin fosfato (C_{max}) (Benz et al. 1986; Schulein et al. 1991), y se aplicó la siguiente ecuación:

$$C_{max} - C_s / C_{max} = (K \cdot c) / K \cdot c + 1$$

La constante media de saturación, K_s , es el inverso de la constante de estabilidad $1/K$.

Los resultados que se obtuvieron fueron:

Conc. Fosfato (mM)	K (L/mmol)	Ks (mM)
0	/	/
0,0625	-1,51	-0,66
0,125	-0,75	-1,33
0,25	-0,38	-2,65
0,5	-0,19	-5,3
1	-0,11	-9
2	-0,06	-18
4	-0,01	-100
8	0,03	40
16	0,03	38,86
32	0,02	64
64	0,01	89,6

Figura 48. Constante de estabilidad y constante de estabilización para distintas concentraciones de fosfato. Membranas 1% DiphPC en n-decano. Voltaje aplicado: 20 mV; pH 6; T= 20° C.

La figura 4.28 muestra el porcentaje de poros cerrados en función de la concentración de fosfato.

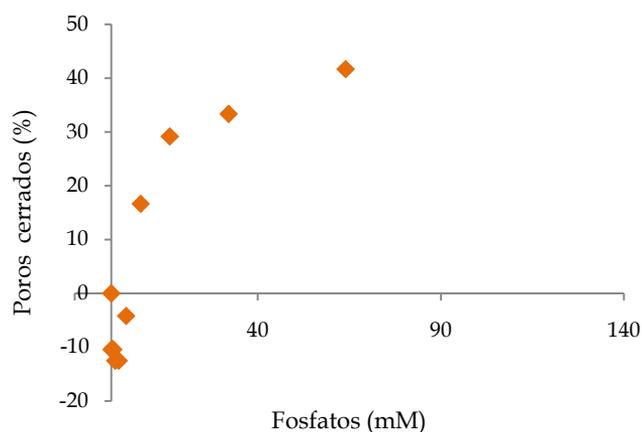


Figura 49. Porcentaje de poros cerrados en función de la concentración de fosfato. Membrana 1% DiphPC/n-decano, en una fase acuosa de 1 M KCl, con un voltaje aplicado de +10 mV a 20° C.

Estos resultados demuestran que la conductancia de la membrana decrece al aumentar la concentración de fosfato. Además, el ruido de la señal en los registros fue menor cuando fue aumentada la concentración de fosfato.

Las figuras 47, 48 y 49 indican que a elevadas concentraciones de fosfato existe una disminución de la conductancia a través de la membrana que podría ser causada por la unión del fosfato en el interior del canal causando un cierre total o parcial del mismo.

De los datos de conductancia de la proteína de 100 kDa podemos concluir que se trata de una proteína con selectividad aniónica y una conductancia media de 0.8 nS en soluciones de 1M de KCl, pero menor que las otras porinas estudiadas en *G. jacobaea*.

A diferencia de la mayoría de porinas del grupo no muestra dependencia de voltaje y el canal se mantiene abierto al aplicar potenciales de hasta -100 mV y +120 mV. Esto podría estar indicando que la porina actúa como un canal de difusión especializado en el transporte de aniones, siendo la carga y el tamaño de las moléculas los limitantes del paso a través del canal. Algo similar pasa en el caso de *Micobacterium bovis* y de *Rhodococcus equi*. Estas bacterias al ser estudiadas la presencia de porinas, se pudo identificar una porina de mayor conductancia, con unas conductancias de 4 nS en ambos casos, selectivas para cationes y dependientes de voltaje. Pero simultáneamente también se observaron unas porinas con menor conductancia, 0.78 nS en el caso de *M. bovis* y 0.3 nS en el caso de *R. equis* que eran selectivas para aniones, algo poco habitual dentro del grupo, y además no dependientes del voltaje (Lichtinger et al. 1999; Riess et al. 2003). En nuestro caso la diferencia respecto a estos dos casos, es que aunque sí detectamos otras porinas con más conductividad en nuestra bacteria, éstas no mostraron una conductancia tan elevada. En el caso de la porina de 60 kDa de peso aparente, detectamos conductancias de canal simple de 1, 2 y 3 nS, lo que parecería indicar una estructura trimérica, pero en este

caso la conductancia mayoritaria era de 1 nS. Eso podría explicarse por una incompleta agregación de la porina debido a las condiciones experimentales.

Respecto a la otra porina que se ha estudiado en *G. jacobaea*, la correspondiente a 20 kDa de peso molecular aparente, su conductancia es de entre 1.75 y 2 nS.

4.6.2. Proteína de 60 kDa. Actividad formadora de poro

Los extractos de la proteína de 60 kDa de la cepa MV26 de *G. jacobaea*, obtenidos mediante elución pasiva de geles preparativos de acrilamida, fueron congelados a -81 °C y seguidamente liofilizados y resuspendidos en una cantidad mínima de agua MiliQ estéril.

4.6.2.1. Conductancia de canal simple

La actividad formadora de poros de los extractos de proteína de 60 kDa, se estudió mediante la técnica de *Black Lipid Bilayer*, y para ello se emplearon distintas concentraciones de soluciones de cloruro de potasio (KCl), así como de cloruro de litio (CLi), formiato potásico (HCOOK) y acetato de potasio (CH₃COOK).

Estudio de la proteína de 60 kDa de la cepa MV26

De la proteína de peso molecular aparente de 60 kDa, tras ser eluída del gel de SDS-PAGE, se analizó su actividad formadora de poro.

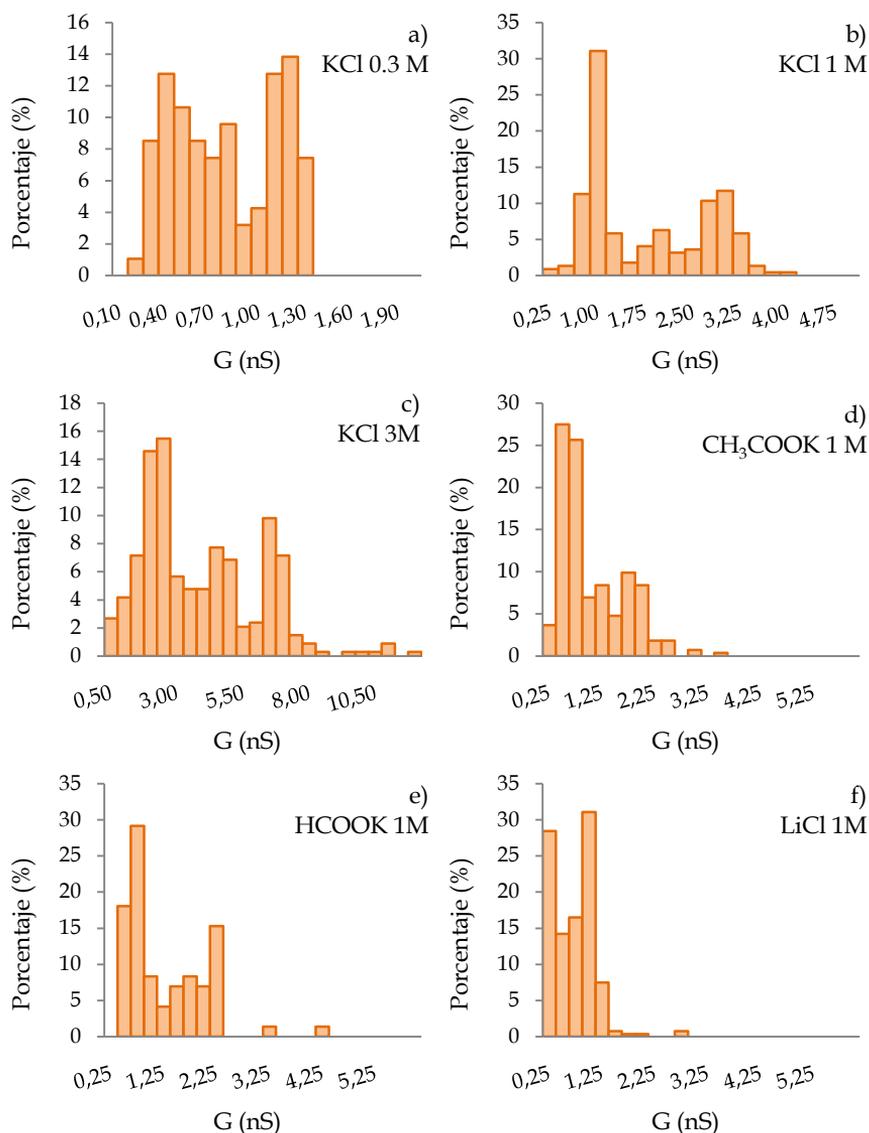


Figura 50. Histogramas de todas las unidades conductivas observadas en membrana de DipHPc/n-decano, de un extracto de la proteína de 60 kDa de la cepa MV26 de *Gordonia jacobaea*. Las medidas se llevaron a cabo sumergiendo la bicapa lipídica en distintas soluciones salinas, a 20 °C y sometiéndola a un potencial de 20 mV. Las soluciones salinas empleadas fueron. a) KCl 0.3 M pH7. Conductancia media de canal: 1.2 nS. b) KCl 1 M pH7. Conductancia media de canal: 1 nS. c) KCl 3 M pH7.T. 20°C. Conductancia media de canal: 2.5 nS. d) CH₃COOK 1 M pH7. Conductancia media de canal: 0.5 nS. e)

HCOOK 1 M pH7. Conductancia media de canal: 0.75 nS. f) LiCl 1 M pH7. Conductancia media de canal: 1 nS.

A diferencia de las medidas tomadas con la proteína de 100 kDa, la proteína de 60 kDa, mostró mayor dispersión en los valores de conductancia. Los valores registrados cuando las medidas se realizaron sumergiendo la membrana en una solución de KCl mostraron aparentemente 3 picos. El histograma resultante de las medidas con KCl 1 M mostró una conductancia mayoritaria con el 31% de las inserciones de 1 nS en KCl 1M, y dos picos de conductancia de 3 nS con un 11% de las inserciones y 2 nS con un 6% de las inserciones. En el caso del histograma resultante de las medidas con KCl 0.3M mostró una conductancia mayoritaria con el 13% de las inserciones de 1.2 nS, seguido de uno de 0.4 nS con el 12.8% de las inserciones y un tercero de 0.8 nS con el 9.6% de las inserciones. Y en el caso del histograma resultante de las medidas con KCl 3M mostró una conductancia mayoritaria con el 15.5% de las inserciones de 2.5 nS, seguido de uno de 6.5 nS con el 10% de las inserciones y un tercero de 4.5 nS con el 8% de las inserciones. Estos resultados parecen indicar que el extracto analizado podría contener poros formados por proteínas triméricas o bien que la proteína tiende a agruparse con mucha facilidad y propicia la inserción de dímeros o trímeros.

Solución salina	Concentración (M)	$G \bar{X}$ (nS)
KCl	0,3 M	1.2
KCl	1 M	1
KCl	3 M	2.5
CH ₃ COOK	1 M	0,5
HCOOK	1 M	0,75
CLi	1 M	1

Figura 51. Conductancia de canal simple del extracto de proteína de 60 kDa obtenidas con diversas sales y a distintas concentraciones.

Se estudió la relación entre conductancia y concentración de KCl y se observó que mostraba una función no lineal lo que sugiere, como en otros casos de bacterias Gram positivas y al igual que vimos en la proteína de 100 kDa, que estos son canales aparentemente llenos de agua (Riess et al. 2001b; Costa-Riu, Maier, et al. 2003). También se observó que el aumento de concentración de sales no iba acompañado de un aumento igualmente proporcional de la conductancia, esto indica que en el interior del canal o en la entrada del mismo, existen puntos de cargas netas que podrían ser lugares de unión específicos para iones y los cuales estarían interfiriendo en el movimiento de los mismos.

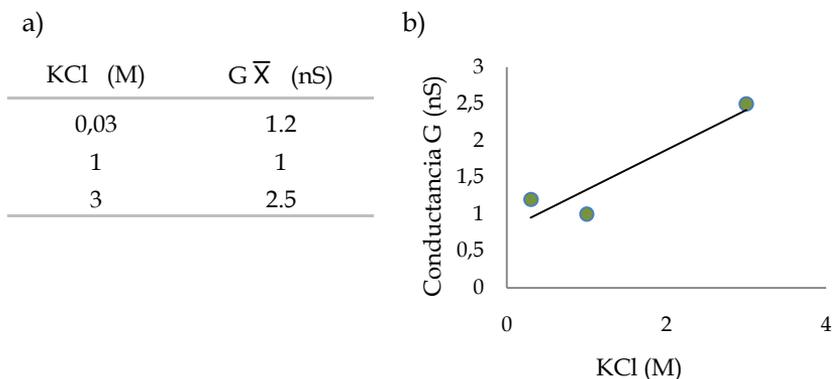


Figura 52. a) Promedio de las conductancias simple de canal obtenidas a 20° C y con voltaje de 20 mV, en función de la concentración de KCl de la solución acuosa donde está sumergida una membrana de 1% DiphPC/n-decano. b) Representación gráfica de los resultados mostrados en la tabla a).

4.6.2.2. Selectividad iónica

Para estudiar si la proteína de 60 kDa mostraba algún tipo de selectividad iónica, se compararon las conductancias obtenidas en presencia de cloruro de potasio (KCl), cloruro de litio (CLi), formiato potásico (HCOOK) y acetato potásico (CH₃COOK).

Solución salina	Concentración (M)	$G \bar{X}$ (nS)
KCl	1 M	1
ClLi	1M	1
HCOOK	1 M	0,75
CH ₃ COOK	1 M	0,5

Figura 53. Conductancia de canal simple del extracto de proteína de 60 kDa obtenidas con diversas sales y a distintas concentraciones.

De estos datos podemos deducir, que cuando sustituimos el catión potasio por el catión litio, que es meno móvil, no se observa variación de conductancia, por lo que parece que la carga del catión no interfiere con la conductancia de la porina. En cambio cuando sustituimos el cloruro por el formiato o por acetato, aniones cada vez con más volumen, si que apreciamos un ligero descenso de la conductancia ($\text{Cl}^- > \text{HCOO}^- > \text{CH}_3\text{COO}^-$). Esta disminución de la conductancia es muy pequeña y podría explicarse por un efecto del tamaño de los iones, ya que el radio del acetato es mayor que el del formiato y este mayor que el del potasio (Trias & Benz 1993; Costa-Riu, Maier, et al. 2003; Riess et al. 1999).

Para ampliar el estudio de la selectividad de canal de la porina se realizaron experimentos de medición del potencial de membrana a corriente cero.

Después de saturar la membrana permitiendo la inserción de un elevado número de porinas, entre 100 y 1000, en una membrana sumergida en una solución de 0,1 M de cloruro potásico, se fue añadiendo en una de las cámaras, cantidades crecientes de cloruro potásico hasta establecer un gradiente en cada una de las cámaras 100 mM y 500 mM. Este gradiente a través de la membrana resulto en un potencial asimétrico de +80 mV en la cámara más diluida, estos resultados estarían indicando una preferencia por el movimiento de los cationes potasio respecto los aniones de cloro.

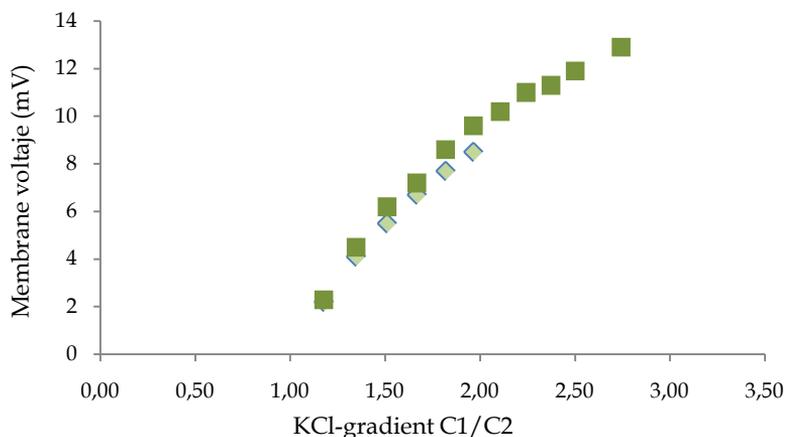


Figura 54. Potencial de membrana (V) a corriente cero. V se define como la diferencia del potencial del lado diluido menos el potencial en el concentrado lado. V se midió con un electrómetro Keithley 617 mediante electrodos de calomelanos con puentes de sal. 1% DiphPC/n-decano, en un gradiente de KCl, a 20 °C y pH 6.

Mediante la ecuación de Goldman-Hodkin-Katz (Benz et al. 1979) se pudo calcular el ratio de permeabilidad P_{K^+}/P_{Cl^-} que fue de 3.35, confirmando el movimiento preferencial de los cationes potasio a través del canal (Trias & Benz 1993; Costa-Riu, Maier, et al. 2003; Riess et al. 1999; Riess et al. 2003). Esta selectividad por los cationes podría deberse a la presencia de cargas negativas en la entrada del canal que atrajesen a los cationes hacia su interior, facilitando de este modo su entrada y siendo algo muy habitual en las bacterias del grupo.

Estos resultados junto con los obtenidos con la proteína de 100 kDa son similares a lo descrito en *M. bovis* y *R. equi*, donde la bacteria muestra dos tipos de porinas, una catiónica con una conductancia alta y una aniónica con una conductancia más baja. Aunque en nuestro caso la proteína de 60 kDa, no tenga una conductancia tan notablemente elevada como sucede en estas otras dos especies, y aunque sí que observamos al estudiar la conductancia de la porina en presencia de

1M KCl valores de 2 y 3 nS, la conductancia mayoritaria es de 1 nS (Lichtinger et al. 1999; Riess et al. 2003).

4.6.3. Proteína de 20 kDa. Actividad formadora de poro

Los extractos de la proteína de 20 kDa de la cepa MV26 de *G. jacobaea*, obtenidos mediante elución pasiva de geles preparativos de acrilamida, fueron congelados a $-81\text{ }^{\circ}\text{C}$ y seguidamente liofilizados y resuspendidos en una cantidad mínima de agua MiliQ estéril.

4.6.3.1. Conductancia de canal simple

La actividad formadora de poros de los extractos de proteína de 20 kDa, se estudió mediante la técnica de *Black Lipid Bilayer*, y para ello se emplearon distintas concentraciones de soluciones de cloruro de potasio (KCl), así como de cloruro de litio (LiCl), formiato potásico (HCOOK) y acetato de potásio (CH_3COOK).

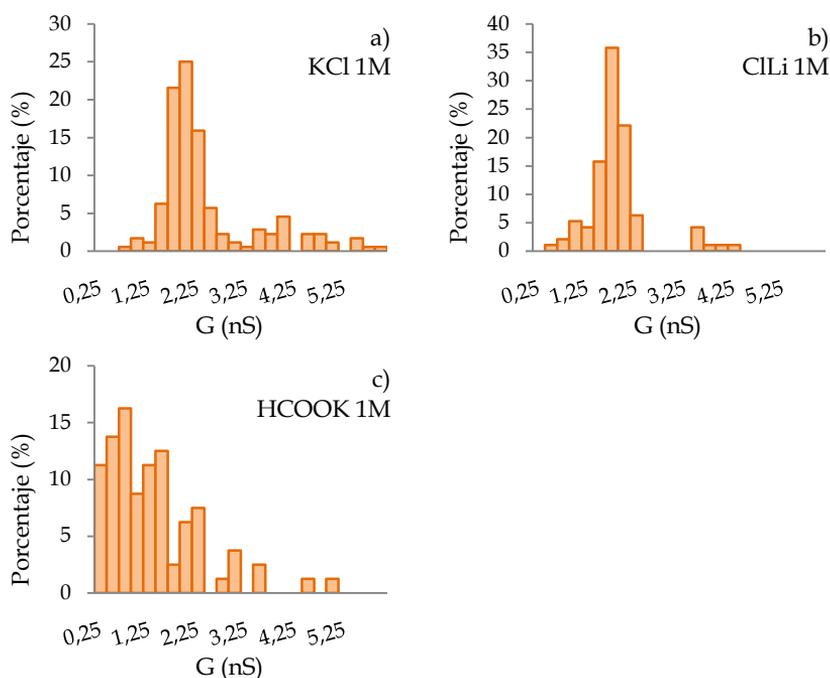


Figura 55. . Histogramas de todas las unidades conductivas observadas en membrana de DipHPc/n-decano, de un extracto de la proteína de 20 kDa de la

cepa MV26 de *Gordonia jacobaea*. Las medidas se llevaron a cabo sumergiendo la bicapa lipídica en distintas soluciones salinas, a 20 °C y someténdola a un potencial de 20 mV. Las soluciones salinas empleadas fueron. a) KCl 1 M pH7. Conductancia media de canal: 2 nS. b) CLi 1 M pH7. Conductancia media de canal: 1.75 nS. c) HCOOK 1M pH7.T.20°C. Conductancia media de canal: 0.75 nS.

Los valores registrados cuando las medidas se realizaron sumergiendo la membrana en una solución de 1M de KCl mostraron un pico mayoritario con una conductancia de 2 ns y el 25% de las inserciones seguido de un segundo pico de 1.75 nS con el 21% de las inserciones. Los valores registrados cuando la membrana se sumergió en LiCl 1M fueron de un pico mayoritario de 1.75 nS y el 35% de las inserciones. Y los valores registrados cuando la membrana se sumergió en HCOOK 1M fueron mucho más dispersos obteniéndose tres picos de 0.75, 1.5 y 2.25 nS con el 16, 12 y 7.5% de las inserciones respectivamente.

Solución salina	Concentración (M)	$G \bar{X}$ (nS)
KCl	1 M	2
CLi	1 M	1,75
HCOOK	1 M	0,75

Figura 56. Conductancia de canal simple del extracto de proteína de 20 kDa obtenidas con diversas sales y a distintas concentraciones.

4.6.3.2. Selectividad iónica

Los datos de conductancia de esta proteína en cloruro de potasio y cloruro de litio, como se observa en la figura 56, son muy similares, 2 y 1.75 nS respectivamente, lo que nos podría estar indicando que los cationes potasio y litio tienen una movilidad similar por lo que la porina no tendría selectividad por los cationes. La del litio, algo menor, podría explicarse porque este catión tiene una movilidad menor a la del potasio. En cambio cuando comparamos el anión formiato con el anión cloruro, comprobamos que su conductancia es menor. Esto nos estaría indicando que la porina parece mostrar selectividad ante los aniones, pero dado que la diferencia no es demasiado grande y además el ion formiato es de mayor tamaño que el

cloruro, no podemos concluirlo (Hüntten, Costa-Riu, et al. 2005; Piñeiro et al. 2011; Lichtinger et al. 1999; Riess et al. 2003).

Especie	Familia	G (nS)*	(kDa)	Selectividad.	Dep. voltaje	Øporo (nm)
<i>M. chelonae</i>	MspA	0,4-2,7	20	catiónica	sí	2-2,2
<i>M. phlei</i>	MspA	4,5	22	catiónica	sí	1,8 a 2
<i>M. smegmatis</i>	MspA	2,3-4,6	20	catiónica	sí	3
<i>N. asteroides</i>	MspA	3	84	catiónica	sí	1,4
<i>N. corynebacteroides</i>	MspA	5,5	134 (23)	catiónica	sí	2,2
<i>N. farcinica</i>	MspA	3	87 (19,23)	catiónica	sí	1,4/1,6
<i>T. inchonensis</i>	MspA	4,5	22	catiónica	sí	2,1
<i>M. bovis</i>	OmpA	1,6	33			
<i>M. tuberculosis</i>	OmpA	0,7		catiónica	sí	1,4-1,8
<i>D. maris</i>	PorB	5,75	120	catiónica	sí	2,1
<i>R. erythropolis</i>	PorB?	6	67 (8,4)	catiónica	sí	2
<i>C. amycolatum</i>	PorB	3,8	45	catiónica	sí	
<i>C. callunae</i>	PorB	2-3	4,8/6	catiónica	sí	2,2
<i>C. diphtheria</i>	PorB	2,25	66 (5)	catiónica	sí	2,2
<i>C. efficiens</i>	PorB	2-3	6	aniónica	sí	
<i>C. glutamicum</i>	PorB	6 (5,5)	5	catiónica	no	2,2
<i>C. glutamicum</i>	PorB					
<i>C. glutamicum</i>	PorB	0,7	10	aniónica	no	1,4
<i>C. glutamicum</i>	PorB	2,5	12 (6,1)			
<i>C. jeikeium</i>	PorB	1,25	5	aniónica	sí	1,4
<i>G. jacobaea</i>		0,8	100	aniónica	no	
<i>G. jacobaea</i>		2	20	catiónica		
<i>G. jacobaea</i>		1	60	catiónica		
<i>M. bovis</i>		4		catiónica	sí	
<i>M. bovis</i>		0,78		aniónica	no	
<i>M. marinum</i>		0,8				
<i>M. tuberculosis</i>		0,7		catiónica		
<i>M. tuberculosis</i>		3				
<i>M. tuberculosis</i>		4				
<i>R. equi</i>		4	67	catiónica	sí	1,8-2
<i>R. equi</i>		0,3	11	aniónica	no	1,8

Figura 57. Comparación de las propiedades de los canales de la pared celular de diferente mycolata (Mafakheri et al. 2014) con respecto a los descritos en esta tesis. La conductancia se expresa según los valores obtenidos a 1M KCl*.

La gruesa pared de las bacterias del grupo CNM haría pensar que las proteínas de canal que les permiten introducir nutrientes deberían ser similares. Al estudiar las cualidades de distintos miembros de este grupo, podemos ver que existe cierta constancia en cuanto a que las porinas tienden a ser selectivas para los cationes y dependientes de voltaje. En nuestro caso hemos podido identificar tres posibles porinas una de ellas con una conductancia relativamente baja, de un peso molecular aparente de 100 kDa y a diferencia de la norma en el grupo, selectiva para aniones y no dependiente de voltaje. Las otras dos porinas identificadas, de 20 kDa y 60 kDa, aparentemente selectiva para cationes, y muestran mayor conductancia. En algún caso ya se ha descrito este tipo de situación, donde la bacteria produce dos tipos de porinas, catiónicas y aniónicas, con el fin de poder captar plenamente un mayor rango de solutos hidrofílicos (Costa-Riu, Burkovski, et al. 2003; Lichtinger et al. 1999).

4.7. Obtención del DNA genómico de *G. jacobaea*

Tras extraer el DNA genómico de *G. jacobaea*, este fue separado en una electroforesis de agarosa al 1%. Tras la tinción del gel comprobamos que aparecía una sola banda de DNA genómico.

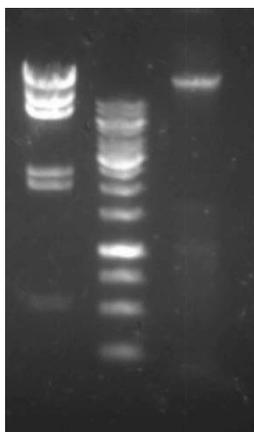


Figura 58. . Carril 1: Marcador de peso molecular Lambda DNA/HindIII. Carril 2: Marcador GeneRules™ 1kb DNA Ladder Plus. Carril 3: DNA genómico de *G. jacobaea*.

	DO ₂₆₀ / D ₂₈₀	Pureza neta*	DO ₂₆₀ / DO ₂₃₀	DO ₂₆₀ / DO ₂₇₀	(µg/ml)
Promedio	1,98	2,02	2,04	1,11	340
σ	0,24	0,28	0,25	0,48	320
Aceptable	1,8-2	1.2-1,8	2,0-2,2	1,2	

Figura 59. Estimación de la concentración e índices de pureza del DNA purificado de *G. jacobaea*. La pureza neta corresponde a la pureza neta no nucleotídica*.

El DNA obtenido mostró un bajo índice de contaminación con fenol o con restos de RNA (índice DO₂₆₀/DO₂₈₀), así como de contaminación por sales, carbohidratos o solventes orgánicos (índice DO₂₆₀/DO₂₃₀). Aunque si se detectaron bajos niveles de contaminación por partículas en suspensión, que se identificaron partir del cálculo del índice DO₂₆₀-DO₃₂₀/DO₂₈₀-DO₃₂₀.

Este DNA, se empleó para realizar la secuenciación masiva del genoma mediante la técnica de pirosecuenciación.

4.8. Secuenciación del DNA genómico.

El genoma de *G. jacobaea* se secuenció por pirosecuenciación. En total las secuencias recogidas sumaron unos 40 Mb (381.558.214 pb). La longitud media de las carreras (fragmentos secuenciados) fue de 468 pares de bases, que se ordenaron en 52 *contigs*, el mayor con una longitud de 660.996 pares de bases y el menor de tan solo 146. De estos se consideraron solo los 33 de mayor tamaño, con calidad suficiente. La suma de los 33 *contig* corresponde aproximadamente a 4.9 MB (4.920.416 pb). El contenido de GC de las secuencias analizadas fue de 65.3%. Se obtuvo un total de 4,400 secuencias codificantes.

Contig	pb	Contig	pb	Contig	pb	Contig	pb
1	660.996	14	70.007	27	2.565	40	322
2	642.467	15	51.622	28	2.509	41	300
3	611.668	16	38.368	29	2.008	42	207
4	541.032	17	19.963	30	1.621	43	207
5	477.903	18	8.746	31	1.286	44	199
6	405.534	19	6.462	32	1.129	45	189
7	327.729	20	6.205	33	1.129	46	189
8	251.359	21	5.148	34	929	47	181
9	214.903	22	5.131	35	870	48	175
10	179.016	23	4.844	36	762	49	170
11	133.359	24	4.508	37	746	50	168
12	128.897	25	3.601	38	635	51	168
13	105.520	26	3.181	39	350	52	146

Figura 60. Relación de los *contigs* obtenidos por pirosecuenciación en relación con el tamaño en pares de bases (pb) de los mismos.

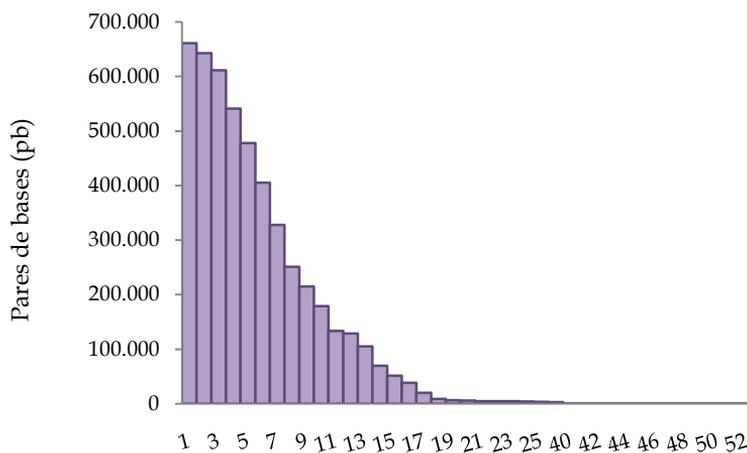


Figura 61. Representación gráfica del tamaño de los *contigs* obtenidos tras la secuenciación del genoma de *G. jacobaea*.

Al comparar estos resultados con los descritos en el caso de otros miembros del grupo de las corinebacterias nos encontramos con casos como el de *M. smegmatis* con un genoma de casi 7 MB y casi 7.000

secuencias codificantes a *C. glutamicum* con un genomas de unos 3 MB y unas 2.800 secuencias codificantes. Si nos centramos en el género *Gordonia*, encontramos que los genomas publicados hasta el momento están entre 4.2 MB y 4.032 genes codificantes en el caso de *G. neofelifaecis* y 5.2 MB y 4.732 genes codificantes en el caso de *G. amicalis*. Viendo estos resultados y comparándolos con los obtenidos en la secuenciación de *G. jacobaea*, todo apunta a que hemos podido secuenciar casi por completo su genoma (Ivanova et al. 2010; Prasanna & Mehra 2013; Linos et al. 2002; Domingos et al. 2013; Ge et al. 2011).

4.9. Anotación del genoma

De los *contigs* obtenidos se procedió a la anotación automática de los 25 de mayor tamaño, *contigs* 1 a 25, para ello se utilizó el programa PROKKA. Esta anotación facilitó notablemente el análisis de las secuencias codificadas y posteriormente traducidas.

Respecto a la similitud de los genes anotados con otras especies bacterianas encontramos que el 94% de los genes presentaban máxima similitud con genes de miembros del genero *Gordonia*, pero también observamos que había genes que mostraban máximas similitudes con otras especies del grupo de las corinebacterias e incluso de fuera del grupo.

G. sputi es la especie con la que *G. jacobaea* muestra mayor número de genes similares, seguida por *G. aichiensis* y *G. otiditis*, suponiendo estos tres, el 88% de las máximas similitudes.

Especie	Genes	% del total
<i>G. sputi</i>	3.455	78,33
<i>G. aichiensis</i>	296	6,71
<i>G. otiditis</i>	202	4,58
<i>G. polyisoprenivorans</i>	25	0,57
<i>G. bronchialis</i>	13	0,29
<i>G. amicalis</i>	11	0,25
<i>G. rhizosphaera</i>	7	0,16
<i>G. soli</i>	6	0,14

Especie	Genes	% del total
<i>G. neofelifaecis</i>	5	0,11
<i>G. terrae</i>	5	0,11
<i>G. paraffinivorans</i>	4	0,09
<i>G. alkanivorans</i>	2	0,05
<i>G. amarae</i>	2	0,05
<i>G. hirsuta</i>	2	0,05
<i>G. namibiensis</i>	2	0,05
<i>G. rubripertincta</i>	2	0,05
<i>G. sihwensis</i>	2	0,05
<i>G. araii</i>	1	0,02
<i>G. effusa</i>	1	0,02
<i>G. kroppenstedtii</i>	1	0,02

Figura 62. Tabla resumen del grado de similitud de los genes anotados de *G. jacobaea* respecto a otros miembros del género *Gordonia*.

En cuanto a la similitud con otros microorganismos, los géneros *Rhodococcus* y *Mycobacterium* son con los que mostraron mayor número de genes similares, aproximadamente el 1.5%.

Género	Genes	% del total
<i>Gordonia</i>	4.155	94,20
<i>Rhodococcus</i>	40	0,91
<i>Mycobacterium</i>	32	0,73
<i>Streptomyces</i>	15	0,34
<i>Nocardia</i>	8	0,18
<i>Williamsia</i>	6	0,14

Figura 63. Tabla resumen del grado de similitud de los genes anotados de *G. jacobaea* respecto a otros microorganismos.

4.9.1. Publicación del genoma de *G. jacobaea*

Una vez tuvimos la secuencia del genoma de *G. jacobaea* se procedió a su publicación en la base de datos GenBank (NCBI). Los códigos de BioProject, BioSample y el número de acceso al genoma fueron:

SUBID	BioProject	BioSample	Accession number
SUB944574	PRJNA283616	SAMN03653484	LDTZ00000000

La publicación en GenBank se realizó junto con su anotación automática llevada a cabo el Prokaryotic Genome Automatic Annotation Pipeline (PGAAP) que es la pipeline desarrollada por NCBI en 2005 y que fue actualizada en el 2008. Esta pipeline se desarrolló para anotar genomas de bacterias y combina la predicción de genes *ab initio* con métodos basados en homologías (Angiuoli et al. 2008). Se identificaron 4.451 genes de los cuales, 4.282 fueron CDS, 117 pseudogenes, 4 rRNA (5s, 16s, 23s), 47 tRNA y 1 crRNA.

4.10. Búsqueda de porinas en el genoma de *G. jacobaea*

4.10.1. Porinas de la familia MspA

Tras la anotación automática con PROKKA, identificamos 4 secuencias susceptibles de ser proteínas pertenecientes a la familia de porinas MspA. Estas secuencias se localizaron emparejadas y consecutivas, dos de ellas, en el *contig* 6 en las posiciones 281 y 282, y dos más en el *contig* 2, en las posiciones 503 y 504.

Las secuencias localizadas en el *contig* 6 se situaban una a lado de la otra, con tan solo 36 nucleótidos de separación y pasamos a denominarlas c6/282 de 228 aminoácidos de extensión (corresponde a la secuencia marcada en verde de la figura 64 y c6/281 de 229 aminoácidos de extensión (corresponde a la secuencia marcada en azul de la figura 64).

```

ttcgttcacgttttgtttctcgcgtcatctcagtacagttcgcgcggagttgccgctggggc
F V H V L F S V I S V Q F A R S C R W G
gacgaccggcgacgcgccggatcgagcgcgagcgcgagcaatgaattcatcttgaggg
D D R R S A R I E R A S R A M N S S - G
gactacatgaccaccaacgagtcacggatgcgacgggggtgccgttgggcactggccatc
D Y M T T N E S R M R R G A V G A L A I
ggtgccgtcgcgaccgcccgtcggcatggccgcggctcccgcacacggcgacgccttcggt
G A V A T A V G M A A A P A H G D A F V
cgtttgcggggaggaacggctaccggagacggactgacgctcaccgcaccactgaatct
R L P G G T A T G D G L T L T R T T E S

```

```

gcgagatttcgacctctctcgggcaaatggcctcggcgcaccgcgtgggtgagcgga
A Q I S P S L A A N G L G R T A W V S G
agcgtcgtcctcaaggcgccgggactgaaagacgccaaggcgggaccgaacaacgggtgc
S V V L K A P G L K D A K A G P N N G V
ggttcgaacggcgagaccacctaccggggcacggggcggtgctgcagcgatggcgccg
G S N G E A T Y P G T G G V S T D G A A
cgcagcctcctgggtggctacatcgtcgggtgccaggtgaacgtcggatcgatgacggtc
A T L S V G Y I V G C Q V N V G S M T V
ggcgccaccgggacactgaaactgctgagcgcggcgcggtatcgggttcgggacgctc
G A T G T L N L L S A G A V S G S G S L
agcattccgctgacgcccgggtcaggtgggtgtttgccagctcgattacaaggacatcgag
S I P L T P G Q V V F A Q L D Y K D I E
aagaaggcactacttcaattgggaccgcacgcagttgaacatcaacaattggccc
K K G T Y Y F N W D R T Q L N I N N C A
ggttacgcgcaggcccgcctcgtacgcggctcgtggagaccaccggcagcgatcaccagaag
G Y A Q A R S Y A V V E T T G S D H Q K
gtcaacctctacggcaagcccttctcgcagcggctgaccgctcctcatcaccacca
V N L Y G K P F S I G - P L S S R P Q P
ttgagggaaaaaatgaaacatcagtttgaagcggctcgtcaccatcggcgcgcccgcgga
L R E K M N I S L K R L V T I G A P A A
ttcaccacgctgcgcacctgatggcaccggccatcgacacgcgcagctccaagvtcgca
F T T V A A L M A P A I A H A D C A G Y A A
cttccgctcacagaccgaccagcagaccctcggcgacggcaccggtgtgtcgggtgaccgct
L P S Q T D Q Q T L G D G T V V S V T R
accaacgagacggccaacatcaaccgctcgtcggcggaacgcgctgcaccgcaacgca
T N E T A N I N P S L G G T P L H R N A
tgggtgtcggctacctacgcagtcaagaccagcaaggacgccaagaacatcaagatcagg
W V S A T Y A V K T S K D A K N I K I R
gcggttacatcgtttggctgccaggtcaacatctccgggtgctcagcggtagcggaacgggt
A G Y I V G C Q V N I S G V S G S G N G
gctgcatccggcaagccgggtccgaatatcgacagcccgcgcaatcagttcggcaacg
A A S G K P G P N I D S P P A I S S A T
acggcgccggaacttcgctgctcgggtcgggtccgggaccaggtgctcgcctattacgtgaac
T G A T A N L S V G P G Q A V A Y Y V N
actgtcaggtccgacgacttcggcaaccagaagctgagcaacaaggctcgggtacaag
T V E S A D D F G N Q K L S N K V G Y K
gccaccaaccatgcgaagctcagctataccaacgagcagatcgggatcaacggctgcgcg
A T N H A K L S Y T N E Q I G I N G C A
ggttacgcgcaggctcgttctgtttgcccagctgtacgtcaacacaccaacgcagaacag
G Y A Q A R S F A D V Y V N T P N A E Q
atcgtgacgttctacggaaagcccttcagcctcggataacctctcaccggagtcggatt
I V T F Y G K P F S L G - P L T R V W I

```

Figura 64. Secuencia de los genes c6/282 (marcada en verde) y c6/281 (marcada en azul). En rojo se marca el codón de inicio.

Las secuencias localizadas en el *contig* 2 se situaban una a lado de la otra, con solo 78 nucleótidos de separación. Las denominamos c2/503 de 214 aminoácidos de extensión (secuencia marcada en verde en la figura 65 y c2/504 de 239 aminoácidos de extensión (secuencia en marcada en azul en la figura 65).

```

cggagtggacgatgattccccgagccgccaaggtcaaccocgagggaaacgagttcgtctc
R S G R - F P R A A K V N P R E R V R L
cctcggtaaacagccgaatcctgtgagagggaaacgaatgagcaagttcagcaagcttggg
P R I T A E S C E R E R M S K F S K L G
cgccgaggagctgtcgggtcgccgtcgccgctgcccgggtgattggcgcaaccagcatg
R R G A A A V A V A A A A V I G A T S M
ggggcgggacacgcccaggcgcagaagctcgccgggtacaagaaggccgtcgccgagc
G A G H A E A Q K L A P G Y K K A V A S
gacggtacgactgttgagacctggcgcaacgggtgagtacttcaactcagctgagcaacagtg
D G T T V E T W R N G E Y F T R V G T V
gccaaacaccgctgtcggggggctggcgatttccggcacctacaccgtgaagaccgct
A N N P L S R R G L A I S G T Y T V K T A
gccgggtgctggcgccgtaaacgtcgggtacatcatcggttgcaggctcgacatctcc
A G V G G Q V N V G Y I I G C Q V D I S
ggcatcagcctcgaccttgggtggcacttttgacatcggttgggggactgaccggcagc
G I S L D L G G T F D I V G G G L T G S
ggcagcgtcactctgccgatcaagccgggcccagatcgcaactacgctcaccgacatg
G S V T L P I K P G Q I A N Y A L S D M
agcatctcggacaagggcgtggcatcgctccaggtttccgatctccagggtattctcgac
S I S D K G V A S L Q V S D L Q V I L D
aagtggcggtcagcgtcggcagcgtcgtactctcgtctacgcggcggcaagggattc
K C G G Y A S A R S Y V S V Y A A K G F
gatgccaaagggcggcagcgtgaacgtcgacggaccttgggtgaagtcactctgtacggc
D A K G G T L N V D G P L V K S T L Y G
cagccttcaacgtcagttaaagccgcagcagtaattcaacaactcactctgagatttat
Q P F N V S - A A A G N S T T H S E I Y
tctgctcgtagggcagattgacattccacgaaggggaatcatgaagaagagcaaacctcgc
S A R R Q I D I P R R G I M K K S N T R
cgctggcggtgtcgccgcgctcgccgggtgccgcgggatgggtctgagcagtgctcagt
R L A A V A A V A G A A A M G L S S V S
gcaggacacgctgacgctgggccactgcccggggcaaggtcaccaagacgcttctcgac
A G H A D A G P L P G G K V T K T L V D
ggaactccggtcagcatcacgctttcgaacgagagcatcagcgtccagcgtccgggtcaac
G T P V S I T L S N E S I S V Q R P V N
cagagtgcgctgagccgcgaagcctggggatcgggaacggctcagcgtcaaccggggcggc
Q S A L S R E A W G S G T V S V N V G G
aaggccaagggcggcaccatcaaggtcggctatgagctgggatgccaggttgactcggc
K A K G G T I K V G Y E L G C Q V D F G
gtgtccggcgtctcgggacccggcggttcaagccggggctgccaaaccggaatgcc
V S G G L G A G G G F K P G A A N P N A
atcggttgggaccgacccgactggagtcgctccgctgggtggcaacgggtcggtgacctc
I G G G T D A D W S R S A G G N G S V T L
ggggccggcggtgaccaagtactggctcatcagcgggtgacagcctcggaacagcactc
G P G G V T K Y W L I S G D S L G N S I
cagtcgctggcagctgacgaacaaggatgatgacaactacaccgccagcaatctgacctc
Q S S D V T N K D D D N Y T A S N L T F
accggttccaccgggtggagtcacctacagccaggagcacttctgactgaacgggtcgcg
T G S T G G V T Y S Q E H F V L N G C A
ggatacgcgtcagccgggacgatcgtccagggtaccgtcaagacggactccgtcaagggg
G Y A S A R T I V Q V T V K T D S V K G
atcgtcacctacacgggtaagccctcagcctcggctgatcgccgctgtcgcaacaaga
I V T Y T G K P F S L G - S R L S H N R
acacaaccgccccggggaaccgatatgggtccccgccccgggtctttttctcgtcagcg
T Q P R G G N R Y G S R P A V F F R S A

```

Figura 65. Secuencia de los genes c2/503 (marcado en verde) y c2/504 (marcado en azul). En rojo se marca el codón de inicio.

4.10.1. Mapa del locus

Se elaboraron mapas de las zonas donde localizamos estas secuencias. Para ello se utilizó el programa Snap Gene Viewer 2.8. (www.snapgene.com).

En el *contig 2*, tal y como se puede observar en la figura 66, se puede apreciar que junto con las dos secuencias similares a la porina MspA, se localiza una posible gen para un canal mecanosensible de gran conductancia y un canal Na⁺/H⁺.

En el *contig 6*, tal y como se puede observar en la figura 67, se puede apreciar que próximos a las dos secuencias similares a la porina MspA, se localiza un posible gen para el flujo de iones de hierro, un gen de la familia de transportadores ABC-2, y el gen *c6/294*, que identificamos en el extracto de 100 kDa activo para la formación de canales, y que en la figura se marca como una flecha de color verde.

Junto al gen *c6/294*, localizamos dos proteínas putativas, marcadas con flechas en gris, la más próxima no pudimos identificar ninguna función entre las proteínas publicadas más similares a él, en cambio la segunda secuencia marcada también en gris, al realizar un alineamiento en la Uniprot, pudimos comprobar que muestra similitud con una putativa FMNH₂-dependent monooxygenase de *Gordonia sputi* (NBRC 100414).

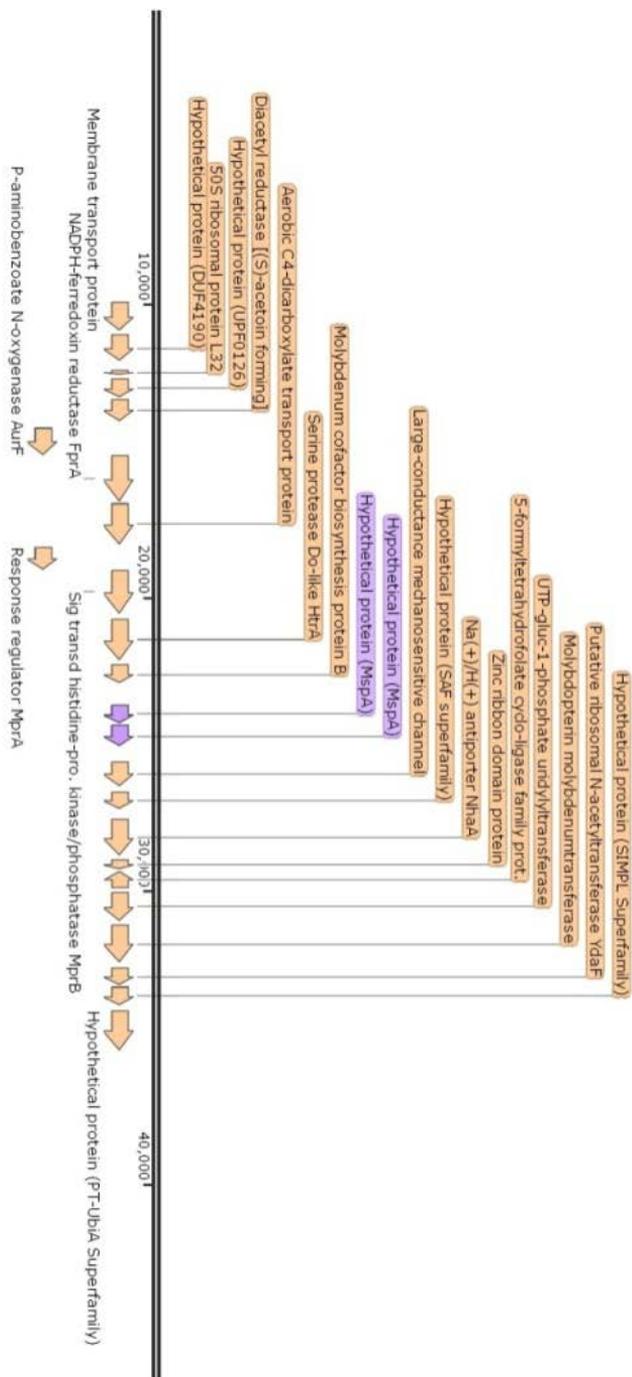


Figura 66. Mapa genómico del locus 503/504 del contig 2.

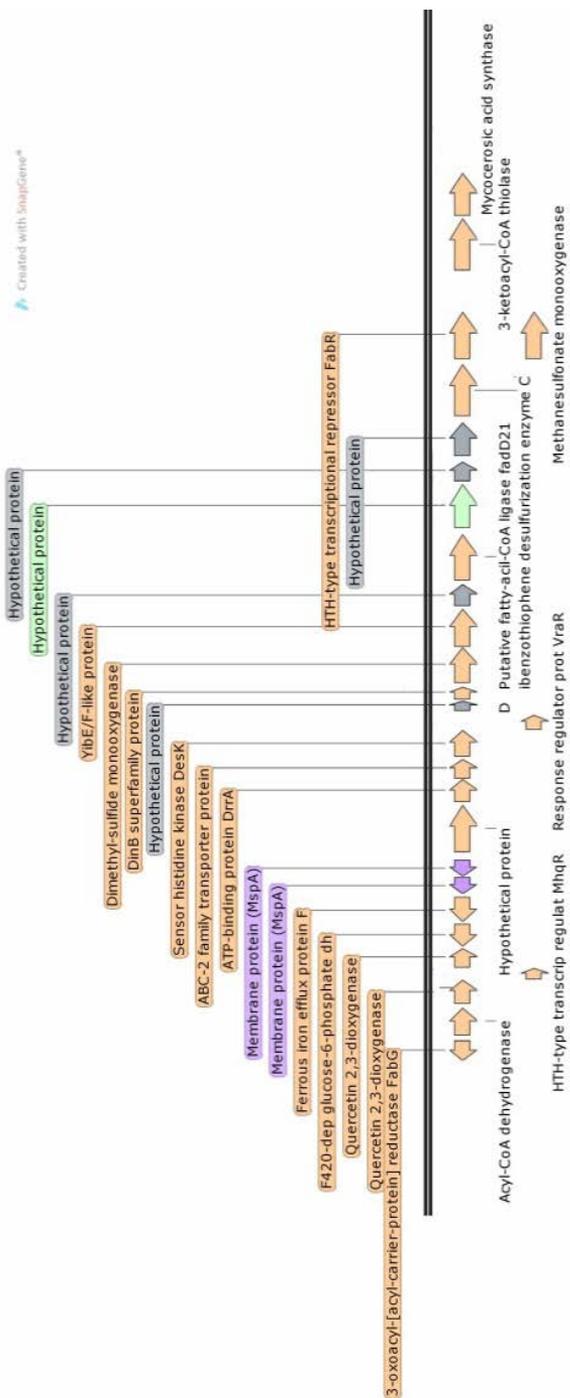


Figura 67. Mapa genómico del locus 281/282 del *contig* 6.

4.10.2. Alineamiento de las secuencias c6/281 y c6/282

Para estudiar el grado de similitud con otras MspA publicadas en bases de datos de proteínas, realizamos un alineamiento (Basic Local Alignment Search Tool) en www.uniprot.org/blast, para cada una de las secuencias encontradas. UniProt es el recurso online que trabaja con proteínas, es de carácter universal y utiliza un repositorio central de datos sobre proteínas creado por la combinación de Swiss-Prot, TrEMBL y PIR. Por lo que está considerado como el recurso líder mundial de almacenando de información sobre proteínas.

En el caso de las secuencias c6/281 y c6/282, al realizar el alineamiento, obtuvimos resultados de identidad muy similares en los dos casos y fue posible identificar en las primeras 10 proteínas obtenidas con mayor identidad y menor *E-value*, MspA pertenecientes a miembros del género *Gordonia*.

Alineamiento de la proteína c6/281

La primera identificación de una MspA de otro género en el caso de c6/281 aparece en la posición 35 y corresponde a una MspA de *Rhodococcus* sp. con un *E-value* de 25E-45, un *score* de 402 y una identidad del 42.3%.

Entrada	<i>E-value</i>	<i>Score</i>	Ident.	Especie	Proteína
H5TVG6	1,5E-156	1,138	97.4%	<i>G. sputi</i>	P.U.P.
H5THP1	8,8E-129	955	82.5%	<i>G. otitidis</i>	P.U.P.
L7KN28	1,6E-123	914	78.5%	<i>G. aichiensis</i>	P.U.P.
D0L616	1.9E-93	728	65.4%	<i>G. bronchialis</i>	MspA family
H0R5S0	1,2E-82	656	58.8%	<i>G. effusa</i>	P.U.P.
H6MRN9	1.8E-72	589	53.5%	<i>G. polyisoprenivorans</i>	MspA family
H0RGT3	1.8E-72	589	53.5%	<i>G. polyisoprenivorans</i>	P.U.P.
G7GYV2	8,1E-61	511	51.5%	<i>G. araii</i>	P.U.P.
J9RWE6	3,7E-58	495	50.7%	<i>Gordonia</i> sp.	MspA family
G7GYV0	1.2E-51	446	50.3%	<i>G. araii</i>	P.U.P.
J1Z3M5	25E-45	402	42.3%	<i>Rhodococcus</i> sp. JVH1	MspA family

Figura 68. Valores de alineamiento BLAST en Uniprot (www.uniprot.org/blast) de la secuencias c6/281, realizada contra 49.989.704

secuencias con un total de 16.639.369.033 letras. Alineamiento calculado según la matriz Blossum 62. P.U.P. (Putative uncharacterized protein), U.P. (Uncharacterized protein).

Alineamiento de la proteína c6/282

En el caso de c6/282, la primera identificación de una MspA de otro género aparece en la 26 y corresponde a una MspA de *Nocardia vulneris* con un *E-value* de $980 \cdot 10E^{-54}$, un *score* de 451 y una identidad del 46.1%.

Entrada	<i>E-value</i>	<i>Score</i>	Ident.	Especie	Proteína
H5TVG7	1,80E-157	1,151	97.4%	<i>G. sputi</i>	P.U.P.
H5THP0	3,00E-131	978	83.0%	<i>G. otitidis</i>	P.U.P.
L7KNT5	2,70E-127	952	81.2%	<i>G. aichiensis</i>	U.P.
D0L617	3,10E-104	801	70.4%	<i>G. bronchialis</i>	MspA family
H0R5R9	4.6E-96	746	63.9%	<i>G. effusa</i>	P.U.P.
H6MRN8	3,30E-91	714	62.9%	<i>G. polyisoprenivorans</i>	U.P.
H0RGT2	3.7E-90	707	62.5%	<i>G. polyisoprenivorans</i>	P.U.P.
H0R3J5	8,60E-80	638	57.9%	<i>G. effusa</i>	P.U.P.
J9REK6	1.9E-75	609	55.0%	<i>Gordonia sp.</i>	MspA family
H5UGR5	3.8E-75	607	54.5%	<i>G. terrae</i>	P.U.P.
M0QQF3	1,30E-74	604	55.8%	<i>G. soli</i>	U.P.
G7GYU8	2,90E-74	602	54.5%	<i>G. araii</i>	P.U.P.
R7Y7X6	3E-74	601	53.6%	<i>G. terrae</i>	MspA family
A0A0C1AVE8	980E-54	451	46.1%	<i>Nocardia vulneris</i>	MspA family

Figura 69. Valores de alineamiento BLAST en Uniprot (www.uniprot.org/blast) de la secuencia c6/282, contra 51,413,886 secuencias con un total de 17,099,525,395 letras. Alineamiento calculado con la matriz Blossum 62. P.U.P. (Putative uncharacterized protein), U.P. (Uncharacterized protein).

Teniendo en cuenta que además al estudiar las proteínas de pared formadoras de canal de *G. jacobaea*, habíamos detectado una proteína de unos 20 kDa, que corresponderían al rango de peso molecular de las subunidades de la MspA, es un factor más a tener en cuenta para apoyar que estas secuencias corresponden a proteínas de esta familia y que darían lugar a porinas.

Las identidades con MspA resultan muy significativas tanto en la secuencia c6/281 como en la c6/282, ya que las alineaciones con *scores* a partir de 35 a 40, se pueden empezar a considerar significativas, en este caso además tenemos el apoyo de un *E-value* muy bajo, éste es un índice que nos indica la probabilidad de que la alineación anotada se diese por azar, y en nuestro caso es extremadamente bajo. Así mismo la identidad es significativa ya que implica una coincidencia de aminoácidos alta y las longitudes de las secuencias comparadas también son suficientemente coincidentes, ya que la longitud de las proteínas c6/21 y c6/282, son de 229 y 228 aminoácidos, mientras que la proteína tipo de la MspA es de 211 aminoácidos, pudiendo concluir que estas dos secuencias corresponden a proteínas de la familia MspA.

4.10.2.1 Análisis de la proteína c6/281

Con la intención de hacer más restrictiva la búsqueda, comparamos nuestras secuencias con la base de datos del The European Bioinformatics Institute – Part of the European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI) (pfam.xfam.org/search) para confirmar si se producía algún tipo de reconocimiento de familia.

Al buscar la secuencia de la proteína c6/281 en la base Pfam obtuvimos un reconocimiento positivo como proteína perteneciente a la familia MspA. La región con mayor homología abarcaba del residuo 48 al 226, con un *score* de 116 y un *E-value* de 9.4E-34. Dentro de esta región solo se identificaron 3 zonas con menor homología, marcadas en rojo en el esquema que aparece en la figura 70. Del alineamiento las posiciones 1 a 175 fueron las que mostraron mayor homología con la secuencia consenso de la MspA (HMM).

Cobertura		Alineamiento		HMM			Bit score	E-value
Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Longitud		
48	226	48	226	1	175	175	116	9.4E-34

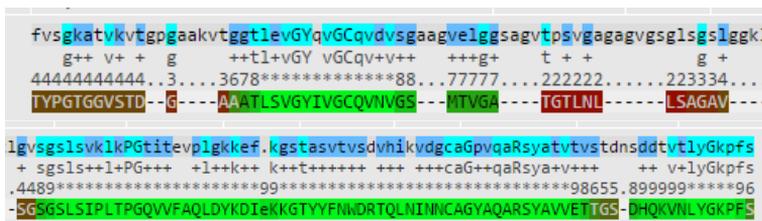


Figura 70. Alineamiento en Pfam de la proteína c6/281. La primera línea en azul indica la secuencia consenso, en mayúscula se señalan los aminoácidos más conservados. La segunda línea indica los aminoácidos compartidos y con un signo “+” las sustituciones conservadas. La tercera línea indica el grado de confianza de cada residuo, donde 0 significa del 0 a 5%, 1 del 5 a 15% y así sucesivamente hasta 9 que significa del 85 al 95% y con un signo “*” del 95 al 100%. En la cuarta línea se visualiza la secuencia estudiada marcando en verde los residuos con el 100% y en rojo el 0% de los grados de confianza de la probabilidad anterior. HMM indica la longitud de la secuencia comparada con la secuencia modelo de la MspA según el modelo oculto de Markov.

4.10.2.1 Análisis de la proteína c6/282

Para la proteína c6/282 se hallaron dos regiones reconocidas como pertenecientes a la familia MspA. El inicio de la región con mayor homología van del residuo 90 a 227, en esta región las posiciones 105 a 227 son las más conservadas y muestran una similitud más alta con respecto a la secuencia consenso de la MspA, con un score de 82 y un *E-value* de 3.4E-23. Del alineamiento las posiciones 30 a 175 fueron las que mostraron mayor homología con la secuencia de la MspA según el modelo de Markov (HMM). La segunda región se localizó en posición más amino terminal y con valores menos significativos.

Cobertura		Alineamiento		HMM			Bit score	E-value
Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Longitud		
90	227	105	227	30	175	175	82.2	3.4E-23



Cobertura		Alineamiento		HMM			Bit score	E-value
Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Longitud		
20	58	23	55	4	36	175	20.2	0.00038

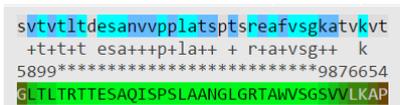


Figura 71 .Alineamiento con Pfam de la proteína c6/282. Las figuras indican en la primera línea en azul indican la secuencia consenso, en mayúscula se señalan los aminoácido más conservados. La segunda línea indica los aminoácidos compartidos y con un signo “+” las sustituciones conservadas. La tercera línea indica el grado de confianza de cada residuo, donde 0 significa del 0 a 5%, 1 del 5 a 15% y así sucesivamente hasta 9 que significa del 85 al 95% y con un signo “*” del 95 al 100%. En la cuarta línea se visualiza la secuencia estudiada marcando en verde los residuos con el 100% y en rojo el 0% de los grados de confianza de la probabilidad anterior. HMM indica la longitud de la secuencia comparada con la secuencia modelo de la MspA según el modelo oculto de Markov.

Todos estos datos parecen apoyar el que las secuencias c6/281 y c6/282 correspondan a genes de la porina MspA.

4.10.3. Alineamiento de las proteínas c2/503 y c2/504

En el caso de las secuencia c2/503 y C2/504, al realizar el alineamiento, no obtuvimos los mismos resultados entre las dos proteínas, aunque sí muy similares. En cuanto a los *E-value*, *scores* e identidades, uno fue mejor que el otro.

Alineamiento de la proteína c2/503

Al realizar el alineamiento (*Basic Local Alignment Search Tool*) en www.uniprot.org/blast, para la proteína c2/503, no identificamos ninguna MspA entre las primeras 10 secuencias, la primera MspA identificada aparece en la posición 18 y corresponde a una proteína de *Gordonia* con un *E-value* de 92E-48, un *score* de 414 y una identidad de 45% y, no es hasta la posición 35, cuando aparece la primera MspA de un género diferente, en este caso *Rhodococcus* con un *E-value* de 3.9E-24, un *score* de 261 y una identidad de 34%.

Entrada	<i>E-value</i>	Score	Iden.	Especie	Proteína
H5TPW5	9,00E-94	728	68.8%	<i>G. otitidis</i>	P.U.P.
W9D9W3	3,70E-74	598	56.7%	<i>G. alkanivorans</i>	U.P.
F9VSR7	3,70E-74	598	56.7%	<i>G. alkanivorans</i>	P.U.P.
L7KX13	1,50E-73	594	56.3%	<i>G. amicalis</i>	U.P.
H5UBW0	5,40E-71	577	54.7%	<i>G. terrae</i>	P.U.P.
L7KMK1	1,60E-70	574	55.3%	<i>G. aichiensis</i>	U.P.
J9SB98	4,30E-70	571	53.7%	<i>Gordonia</i> sp.	U.P.
R7Y730	4,30E-70	571	53.7%	<i>G. terrae</i>	U.P.
H5U650	1,70E-67	554	54.6%	<i>G. sputi</i>	P.U.P.
M3UQ98	6,20E-65	537	50.0%	<i>G. paraffinivorans</i>	U.P.
M6ZYA0	95E-48	414	45.2%	<i>Gordonia</i> sp. NB4-1Y	MspA family
A0A076EJL6	38E-27	275	34.1%	<i>Rhodococcus opacus</i>	MspA family

Figura 72. Valores de alineamiento BLAST en Uniprot (www.uniprot.org/blast) de la secuencia c2/503, contra 49.989,704 secuencias con un total de 16.639.369.033 letras. Alineamiento calculado con la matriz Blosum 62. P.U.P. (Putative uncharacterized protein), U.P. (Uncharacterized protein).

Alineamiento de la proteína c2/504

Al realizar el alineamiento (*Basic Local Alignment Search Tool*) en www.uniprot.org/blast, para la proteína c2/504, identificamos 3 MspA entre las primeras 10 secuencias, pertenecientes todas ellas a miembros del género *Gordonia*. La primera identificación de una MspA de otro género aparece en la 32 posición y pertenece a una MspA de

Rhodococcus sp. con un *E-value* de 31E-42, un *score* de 382 y una identidad del 39%.

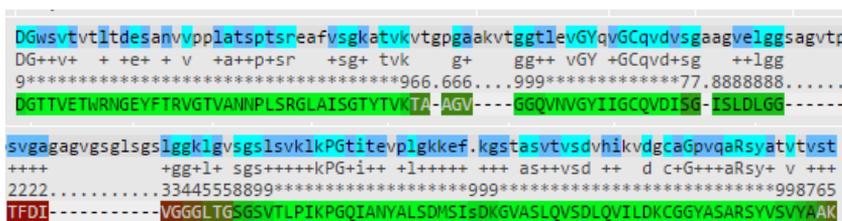
Entrada	<i>E-Value</i>	<i>Score</i>	Iden.	Especie	Proteína
H5TPW6	2.3E-78	631	57.3%	<i>G. otiditis</i>	P.U.P.
M3TMA6	1,00E-74	605	52.3%	<i>G. paraffinivorans</i>	U.P.
H5U649	5.6E-72	587	55.6%	<i>G. sputi</i>	P.U.P.
L7KJZ6	1.5E-69	572	51.8%	<i>G. aichiensis</i>	U.P.
J9S526	2.4E-69	570	52.9%	<i>Gordonia</i> sp.	MspA family
R7Y751	2.4E-69	570	52.9%	<i>G. terrae</i>	MspA family
L7KWC0	3.3E-69	569	51.2%	<i>G. amicalis</i>	U.P.
W9DCN9	2,70E-68	563	50.8%	<i>G. alkanivorans</i>	Membrane protein
F9VSR8	2,70E-68	563	50.8%	<i>G. alkanivorans</i>	P.U.P.
D0L6C7	5,90E-68	560	50.6%	<i>G. bronchialis</i>	MspA family
J1Z3M5	33E-42	382	39.2%	<i>Rhodococcus</i> sp. JVH1	MspA family

Figura 73. Valores de alineamiento BLAST en Uniprot (www.uniprot.org/blast) de la secuencia c2/504, contra 49.989,704 secuencias con un total de 16.639.369.033 letras. Alineamiento calculado con la matriz Blosum 62. P.U.P. (Putative uncharacterized protein), UP (Uncharacterized protein).

4.10.3.1. Análisis de la proteína c2/503

El alineamiento en Pfam de la proteína c2/503 encontramos dos regiones reconocidas como pertenecientes a la familia MspA. En la de mayor longitud, corresponde a una región que abarcaba del residuo 49 a 212, en esta región las posiciones 49 a 186 son las que muestran una similitud más alta con la secuencia consenso (HMM) de la MspA, con un *score* de 83 y un *E-value* de 1.7E-23. Mientras que la segunda región mostró unos resultados menos significativos.

Cobertura		Alineamiento		HMM			<i>Bit score</i>	<i>E-value</i>
Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Longitud		
49	212	49	187	1	161	175	83.2	1.7E-23



Cobertura		Alineamiento		HMM			Bit score	E-value
Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Longitud		
11	43	26	42	40	56	175	-2,4	3300

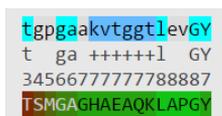


Figura 74. Alineamiento con Pfam de la proteína c2/503. Las figuras indican en la primera línea en azul la secuencia consenso, en mayúscula se señalan los aminoácidos más conservados. La segunda línea indica los aminoácidos compartidos y con un signo “+” las sustituciones conservadas. La tercera línea indica el grado de confianza de cada residuo, donde 0 significa del 0 a 5%, 1 del 5 a 15% y así sucesivamente hasta 9 que significa del 85 al 95% y con un signo “*” del 95 al 100%. En la cuarta línea se visualiza la secuencia estudiada marcando en verde los residuos con el 100% y en rojo el 0% de los grados de confianza de la probabilidad anterior.

4.10.2.2. Análisis de la proteína c2/504

El alineamiento en Pfam de la proteína c2/504 mostró que el inicio de la región con mayor homología iba del residuo 47 a 237, toda esta región mostró la similitud más alta con la secuencia consenso (HMM) de la MspA, con un score de 127.4 y un *E-value* de 4.7E-37.

Cobertura		Alineamiento		HMM			bit score	E-value
Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Longitud		
47	237	47	237	1	175	175	127.4	4.6E-37



Figura 75. Alineamiento con Pfam de la proteína c2/504. La primera línea en azul indica la secuencia consenso, en mayúscula se señalan los aminoácidos más conservados. La segunda línea indica los aminoácidos compartidos y con un signo “+” las sustituciones conservadas. La tercera línea indica el grado de confianza de cada residuo, donde 0 significa del 0 a 5%, 1 del 5 a 15% y así sucesivamente hasta 9 que significa del 85 al 95% y con un signo “*” del 95 al 100%. En la cuarta línea se visualiza la secuencia estudiada marcando en verde los residuos con el 100% y en rojo el 0% de los grados de confianza de la probabilidad anterior.

De las 4 secuencias reconocidas por su similitud como posibles MspA, la c2/504 es la que muestra un *score* mayor y un menor *E-value*.

	Exten. (aa)	Cobertura		Alineamiento		Exten. (HMM)	score	E-value
		Inicio	Fin	Inicio	Fin			
c6/281	228	48	226	48	226	178	116.6	3.4e-34
c6/282	229	90	227	105	227	122	82.2	3.4e-23
c2/503	214	49	212	49	186	137	83.2	1.7e-23
c2/504	239	47	237	47	237	190	127.4	4.7e-37

Al observar los datos, podemos comprobar que los resultados indican un buen grado de similitud de las 4 proteínas con respecto a la familia MspA. Los *E-values* son muy bajos, lo que indica que la probabilidad de que estas secuencias sean altamente similares a las proteínas de la familia MspA haya sido al azar queda descartado. Por el otro lado tenemos *scores* muy altos (por encima de 40 sería significativo) lo que mantiene nuestra hipótesis de que estas secuencias codifican para proteínas de la familia MspA.

Por último observamos que las extensiones de las secuencias comparadas y alineadas son muy altas, abarcando casi por completo

las secuencias. De nuestras 4 secuencias, casualmente encontramos que en cada *contig* tenemos una con mayor similitud, la c6/281 y la c2/504, y dos con menor, la c6/282 y c2/503.

Si tenemos en cuenta que las porinas de la familia MspA tienen un peso molecular de unos 20 kDa, y que en el extracto que obtuvimos correspondiente a ese rango observamos actividad formadora de canales con una conductancia de 2 nS (Trias & Benz 1993), similar a las descritas en otras MspA funcionales, podemos postular que la proteína que analizamos pertenece a la familia de las porinas MspA y que es fruto de uno de estos genes.

En cuanto a la presencia de 4 posibles genes, también es coincidente con lo observado en *M. tuberculosis*, que presenta 4 posibles genes de MspA (MspA, MspB, MspC y MspD) de los cuales en condiciones normales sólo expresa 2, y sólo cuando estos son delecionados, expresan los dos restantes, actuando éstos últimos como genes de reserva, o de seguridad, para garantizar la supervivencia del microorganismo (Stephan et al. 2005; Stahl et al. 2001).

4.10.2. Árboles de proximidad

Para realizar los árboles de proximidad se utilizó el software Jalview 2.8.2. (Marassi 2011). Se realizó un alineamiento de las secuencias c6/281, c6/282, c2/503 y c2/504 en la base de datos Uniprot y se recogieron las secuencias de las proteínas identificadas como pertenecientes a la familia MspA. Tras este paso se realizó un alineamiento con ClustalO y también con T-coffee. Posteriormente se realizaron árboles de proximidad por porcentaje de identidad, con cada uno de estos alineamientos.

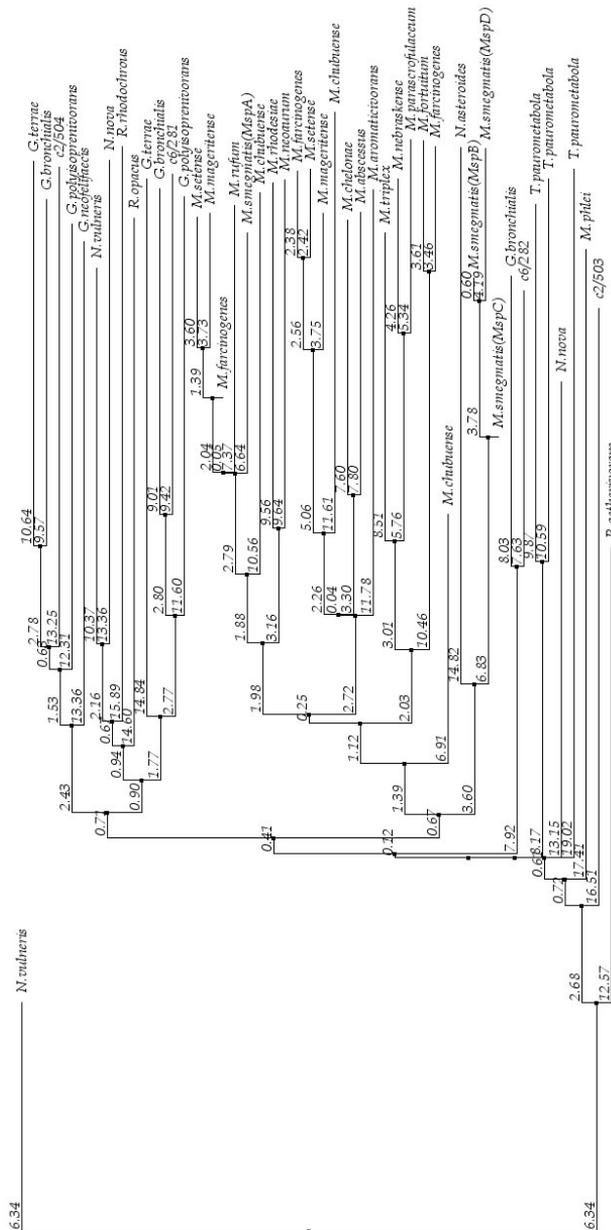


Figura 77. Filograma resultante del estudio del alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas MspA publicadas en la base de datos Uniprot y más similares a las secuencias encontradas en *G. jacobaea*. El alineamiento se realizó con Tcoffee y se usó el programa Jalview 2.8.2. El filograma muestra la distancia relativa entre las especies estudiadas en función de la unión de vecinos por porcentaje de identidad.

En estos resultados podemos comprobar que las secuencias identificadas en el genoma como MspA están bien integradas dentro de la familia. De las 4 secuencias, las correspondientes a c2/504 y c6/281 se hayan más próximas a las MspA de otros miembros del género *Gordonias* y miembros del género *Rhodococcus* y están mejor integradas, tanto tras una alineación con ClustalO como con Tcoffee.

4.7. Análisis de la secuencia de la proteína del 100 kDa

A continuación procedimos a localizar y estudiar la secuencia correspondiente a la proteína formadora de canal de 100 kDa, caracterizada en esta tesis.

4.7.1. Secuencia amino terminal

La banda que contenía la proteína de 100 kDa de *G. jacobaea* se transfirió a una membrana de PVDF, tras lo cual se seccionó y se determinó la secuencia amino terminal mediante la técnica de degradación de EDMAN. La secuencia de aminoácidos obtenida fue ADLKP~~L~~E_YI (Alanina-Aspartico-Leucina-Lisina-Prolina-Leucina-Glutámico-Cisteína-Tirosina-Isoleucina). De esta secuencia se nos informó que la leucina aparecida en tercer lugar era dudosa, y que el aminoácido no registrado en octava posición podría ser una cisteína, ya que el proceso de secuenciación de EDMAN no detecta este aminoácido en las cromatografías de análisis, aunque no se nos dio una confirmación en firme.

4.7.2. Espectrometría de masas: MALDI-TOF

Se separó una muestra de proteína de 100 kDa mediante electroforesis SDS-PAGE al 10% de acrilamida con tricina, tras lo cual la proteína fue teñida con Coomassie Blue. Una vez finalizado el proceso de tinción y destinción, se seccionó la banda correspondiente a la proteína de 100 kDa y fue llevada para analizar por espectrometría de masas al Servicio de Proteómica y Biología Estructural (sePBioEs) de la

Universidad Autónoma de Barcelona. Tras la digestión típtica no se obtuvieron péptidos identificables, sino masas moleculares (m/z). Después de hacer el MS/MS se pudieron obtener las secuencias de 2 péptidos, que tan solo diferían entre ellos en un aminoácido. Tras realizar una búsqueda comparativa de masas similares a las dos obtenidas por MS/MS en la base de datos NCBI nr, mediante el motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science, USA), se obtuvo una coincidencia con un score de 78 con una hipotética proteína de *G. sputi* con un código de entrada NCBI gi|377529934. El porcentaje de cobertura fue del 3%. Los péptidos fueron localizados en dicha secuencia difiriendo solamente en un aminoácido, que casualmente era el último de una de ellas, fueron: YLNDVLNDPSQADDVLK y YLNDVLNDPSQADDVLKK.

```

1 MQRSAPIALQ GDIEVPPKAP RAWVAAGVAI AGASVMAVAP GVHSEVPTAY
51 KATTEATVRL AADWKPLEPY IDAFNEASKN AATLAHNYFL APGLPLQQII
101 ANQSKYLNDV LNDPSQADDV LKKMRANLEA VISGVTGIGV AGSALDTMKN
151 HVSDSLHGLV LGLLPSLLPA GGSIDPEVIT AVMNVLASPM SGVLMGLVGP
201 VISPAVAVLN SGIAIAAAIQ AGNPDAVFSV VFSAPANVVG AVFNGATLDL
251 TALTPLINDS GLLGTTKLNS LDIAFGGLFT PGTVGRGSYD GPVDPDNPND
301 KIPAPGGSIF NSIGLGVDLN GIEIGIPGQA IGPIGALEGV SQTVGALLGD
351 GWDGKSGKPV PPLAGVEFPT ISDDAADNWA AAIQKLADTL LGKKDSETTT
401 PSPDPAKTAA AVAVTSVAPN SVDSAKVDAE KVDAEKAQSE KTAPVTESA
451 QAEVVETQSS SAPTGSSESEV QNSSEAKEST SSSSSTAPAS SSTGSSSDST
501 QSSTSSGSST SNSGTDAAHTT SSVNATGSAD AESSSSSDTS STSGDSSGAS
551 STSGNSTSSA STD

```

Figura 78. Secuencia de la proteína de *G. sputi* (NCBI gi|377529934). En rojo se marca el péptido identificado con MS/MS.

En rojo se muestra la secuencia del péptido identificada por MALDI-TOF. También quisimos comprobar si en esta proteína estaba presente la secuencia obtenida mediante degradación de EDMAN, y pudimos confirmar que existe una secuencia muy similar que tan solo difiere en un aminoácido, que es casualmente la leucina en tercera posición que nos habían informado que era dudosa en la secuenciación de Edman. Esta secuencia queda marcada con letras de color verde.

4.7.3. Estudio de la proteína c6/294

Al buscar las secuencias obtenidas por la degradación de EDMAN, así como las obtenidas por espectrometría de masas entre las proteínas anotadas tras la secuenciación del genoma de *G. jacobaea*, nos encontramos que todas las secuencias estaban en una sola proteína situada en el *contig* 6 en la posición 294, a la cual pasamos a denominar c6/294, y que casualmente se situaba muy próxima a las dos MspA localizadas en este mismo *contig*. Encontramos que con traductores de secuencias de DNA a proteína, las secuencias diferían en la posición de inicio amino terminal. Probamos con los traductores ofrecidos por el portal Expasy (web.expasy.org/translate), así como el utilizado por el European Bioinformatic Institute (www.ebi.ac.uk/Tools/st), y el del Attron Biosensor Corporation (www.attotron.com/cybertory/analysis/trans.htm), en estos casos proporcionaban secuencias de 608 aminoácidos. El traductor asociado al programa anotaciones PROKKA, proporcionaba una secuencia de 604 aminoácidos, y el sistema de anotación de PGAAP, 558 aminoácidos. Estas diferencias siempre se localizaban en la posición amino terminal, el resto de la secuencia era idéntica.

Estas diferencias posiblemente se deben al hecho de que las bacterias a menudo utilizan codones de inicio alternativos al tradicional ATG, como son el ATG, GTG, TTG, y a veces ATT, CTG y ATC (Yada et al. 2001). El sistema de anotación PGAAP ofrecido por NCBI como programa de anotación previo a la publicación de secuencias, tiene en cuenta estos distintos codones de inicio, por lo que finalmente decidimos tomar como secuencia de trabajo la propuesta por éste servicio (Angiuoli et al. 2008).

```
cctggctctttaatgatccaacaccgcgaaagacccttagttaatgcttcggttacaaa
P G S L M I D R R E R P L V N A S C T K
acaaaacttttcgaaaaagccctctctcagctccttctggctctacggttcagaccgcactc
T N F S K S P S L S S F W L Y V Q T A L
aagttcttgacatgccccgaggagagtccgtgcagcgttcagctccaatcgccctgcaa
K F L H M P R G E S V Q R S A P I A L Q
ggcgatatcgaagttccccaaaaaatcccccgctgctgggttgccggtggtgctccatc
G D I E V P K K S P R A W V A A G V A I
gcgggtgcgagcgtcatggcggctgcgcccggcggttcattccgaggtaccaccgcctac
```

Resultados y discusión

A G A S V M A V A P G V H S E V P T A Y
 aaggcaaccaccgagggcgaccgtccgtctcgccgccgactggaagccactcgagccgtac
 K A T T E A T V R L A **A D W K P L E P Y**
 atcgatgcttcaacgagggcgctgaaaaatgctgagactcttgccataactactctcty
 I D A F N E A S K N A A T L A H N Y F L
 gctccagggctgcccctgcagcagatcatttccaatcagtcgaagtatctcaacgacggt
 A P G L P L Q Q I I S N Q S K **Y L N D V**
 ctgaacgatccgctcacagggcgagatgtcttgaagaagatgcgggccaactcgaagcc
L N D P S Q A D D V L K K M R A N L E A
 gtgatcaccgggtgtcaccgggtatcggcgcgagcgacgagacgctcgcgcgagcgaagat
 V I T G V T G I G A S D E T L A Q T K D
 cacacggctcgacggcctgcacgggctgggtgctgcagctgctaccgcagtttcttctgag
 H T V D G L H G L V L Q L L P Q F L P E
 ggcggaccgatccggcgacgatcaccgcatcatgaacgtgttgccgctgcggcgtg
 G P I D P A T I T A I M N V L A S P M
 agtggcgctcatcggctctgtcgcccccgtgatcagcccggcggctcgccgactcaac
 S G V L I G L V G P V I S P A V A V L N
 agcggatcgccatcgccgagcgatccaagcggcgatcccgatgagctcttttccgat
 S G I A I A A I Q A G D P D A V F S D
 gtgttctcgcgctcggccaacgtcggtggagcgggttttcaacggtgcaacactcgatctc
 V F S A P A N V G A V F N G A T L D L
 accgctcgtactcggattatcaacgagaccggcctactcggtagcacgacactgaactca
 T A L T P I I N E T G L L G S T T L N S
 ctgcagatcgccctcggcgccgtgtcaccctgggtcggtcggacgcgggctcctacgac
 L D I A F G L G F T P G S V G R G Q P S
 ggcccccaacggcagctcgatcaccgcgccaggcgggtcgatcctgaacagcatcggcatg
 G P N G T S I T A P G G S I L N S I G M
 aatgtcactacagatgctgtgggtttccccctcaccctcgacattcctggccaagctgtc
 N V T T D A L G F P L T L D I P G Q S
 ggccccatcggcgcaatggagggtctgtcacagaccgtgggagtgctcctcggcgacggc
 G P I G A M E G L S Q T V G V L L G D G
 tgggatggcaagaacggcaagcgggttccgccccttgcgggtgaggtcccgacatc
 W D G K N G K P V P P L A G V E F P T I
 agcgacaaggcccgagacaattgggctcggccatccagaagctggccgacaccttgctg
 S D K A A D N W A A A I Q K L A D T L L
 ggcaagaaggattccgagacaaccccctcggcggttaccgccaagaccgagcccgctc
 G K K D S E T T P S P V T A K T A A A V
 gcgacaaccagcgtcgcgctgaactctgtggagtctgagctcgcgaaggctgagtcggcg
 A T T S V A L N S V E S E S A K A E S A
 aagaccgaagtcgcacagcggagtcgagctcgacgcccggcgggttcgctccaccgaaacc
 K T E V A Q T E S S S T P A G S S T E T
 aggacctcctcggcgggagggaatccacctcggcgagcccagaccgcccagccctcgagc
 R T S S A A E E S T S A S P T A A Q P S
 agtcaaccctcgagttcggcgaccgcccggcatcgctgctaccgatgagccctctgac
 S Q P S S S A T A P A S S S T D A P S D
 tcttcggatcgacgcagggctcggcgtcgagcggatcgtcgagctcgaacgcccggcacc
 S S D S T Q G S A S S G S S T S N A G T
 gacgggacaccagagctctgcgagacccaagggctcagcgggcccgggaccagttcgc
 D A D T T S S A D T K G S A G A G T S S
 tcctcggacactcgagcaaatcgagcgaatcgagtgccgagcggcagctcgagttcgagcgt
 S S D T S S K S S E S S G A A S S S D
 tcgagctcgtccagtagtaccgactgacctgactgagcgcatacacggcggagcggc
S T S S A S T D - P V T E R I H G G G A P
 gatccggtagcagggctcggcgctccgctcggttgcggtccggtaggggggctcgaag
 D P V Q G P A L R S L S F R R R R V A K

Figura 79. Secuencia del gen c6/294. En verde se marca la pauta de inicio sugerida por ExPASy, AttoTron y EBI, en rojo la sugerida por PROKKA, y en rosa la sugerida por PGAAP. En amarillo se marca la secuencia obtenida por la degradación de EDMAN, que debería corresponder a la secuencia amino terminal de la proteína y en lila se marca la secuencia obtenida por

espectrometría de masas. Subrayada al final de la secuencia se marca la posición carboxilo terminal.

	Longitud de la proteína c6/294
PROKKA	604
Expasy	608
Attotron	608
EBI	608
PGAAP	558

Figura 80. Longitudes de la proteína c6/294 en función del programa de traducción.

4.7.3.1. Búsqueda de proteínas similares en Pfam

A continuación hicimos un alineamiento de la secuencia c6/294 en la base de datos Pfam. De los resultados obtenidos y ordenados decrecientemente por el porcentaje de identidad, pudimos ver, que sólo las tres primeras posiciones, las más similares a nuestra secuencia, eran ocupadas por miembros del género *Gordonia*, y se describían como proteínas putativas, sin identificar su función. Las siguientes posiciones, con porcentajes de identidad menores al 40%, los ocupaban proteínas de géneros tan diversos como *Clavispora*, *Ajellomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Mycobacterium*, etc., pero en estos casos los tamaños de las proteínas diferían en gran medida de nuestra secuencia problema, tan sólo la secuencia de *Mycobacterium* se aproximó ligeramente en cuanto a tamaño.

Organismo	Proteína	Longitud	E-value	score	Ident.
<i>Gordonia sputi</i>	Putative uncharacterized protein	563	0.0	2,101	76.1%
<i>Gordonia aichiensis</i>	Uncharacterized protein	575	0.0	1,764	63.3%
<i>Gordonia otiditis</i>	Putative uncharacterized protein	580	0.0	1,772	62.4%
<i>Clavispora lusitaniae</i>	Putative uncharacterized protein	288	5.7E-18	233	41.1%
<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Predicted protein	194	1.6E-18	233	41.0%

Organismo	Proteína	Long.	E-value	score	Ident.
<i>Mycobacterium arupense</i>	Uncharacterized protein	382	1,90E-67	600	41.0%
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Uncharacterized protein	617	9.7E-18	239	40.9%
<i>Haloquadratum walsbyi</i>	Uncharacterized protein	148	1,30E-19	238	40.3%
<i>Brugia malayi</i>	Protein Bm8321, isoform a	252	1,40E-19	244	40.3%
<i>Eimeria mitis</i>	Uncharacterized protein	128	4,00E-17	218	40.2%
<i>Mycobacterium</i> sp.	Uncharacterized protein	392	9.0E-69	610	40.1%
<i>Entamoeba histolytica</i>	Putative Serine-rich protein	175	2,30E-19	238	40.0%

Figura 81. Valores de alineamiento BLAST en Uniprot de la secuencia c6/294, contra 50.598.902 secuencias con un total de 16.815.223.308 letras. Alineamiento calculado con la matriz Blosum 62 (www.uniprot.org/blast).

Cuando revisamos las funciones de las proteínas publicadas, vimos que todas ellas aparecían sin caracterizar. Solo al revisar posiciones de identidad inferiores al 40% pudimos identificar proteínas con diferentes funciones, algunas como proteofosfoglicanos y proteínas flagelares, proteínas cuyas funciones en algunos casos estaban relacionadas con la pared bacteriana, pero todas ellas muy distintas en tamaño a nuestra proteína.

Organismo	Proteína	Longitud	E-value	score	Identid.
<i>Leishmania mexicana</i>	Proteophosphoglycan ppg1	1572	1,60E-19	256	33.8%
<i>Leishmania major</i>	Proteophosphoglycan (Fragment)	383	1,60E-20	256	34.7%
<i>Cucumis sativus</i> (Cucumber)	Photosystem II reaction center Psb28 protein	376	2.0E-21	263	35.7%
<i>Leishmania infantum</i>	Proteophosphoglycan ppg4	5967	2,90E-20	263	32.3%
<i>Leishmania infantum</i>	Putative proteophosphoglycan ppg3	4238	3,80E-20	262	38.8%
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Putative membrane protein (Fragment)	1965	5,80E-20	260	33.9%

Organismo	Proteína	Longitud	E-value	score	Ident.
<i>Leishmania major</i>	Proteophosphoglycan (Fragment)	873	6,90E-20	258	33.7%
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> str. CRT53-1	Putative membrane protein (Fragment)	3298	8,40E-20	259	35.0%
<i>Lactobacillus casei</i> UCD174	FliK family flagellar hook-length control protein	288	9,30E-20	247	32.6%

Figura 82. Valores de alineamiento BLAST en Uniprot de la secuencia c6/294, contra 50,598,902 secuencias con un total de 16,815,223,308 letras. Alineamiento calculado con la matriz Blosum 62 (www.uniprot.org/blast).

Estos resultados no permiten asignar una función a la proteína c6/294 a partir de la comparación de su secuencia con la de otras proteínas publicadas.

En un intento de localizar una zona de la proteína c6/294 con similitud a alguna proteína publicada, dividimos la proteína en tres fragmentos diferentes y analizamos las secuencias por separado en la base de datos del The European Bioinformatics Institute – Part of the European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI) (pfam.xfam.org/search).

Encontramos que entre la posición 161 y 231 con un *bit score* de 17.5 y un *E-value* de 0.0011, identificábamos un dominio reconocido como parte de la familia RTX, que es una familia de toxinas bacterianas de tipo citolisina y citotoxina, que se caracteriza por presentar unas secuencias repetitivas de glicinas y aminoácido apártico en posición carboxilo terminal. En esta familia encontramos toxinas, la mayoría de ellas con actividad formadora de poros (Pfam02382) (Makino et al. 1998; Linhartov 2010). Frente a esta similitud, es interesante destacar que la proteína c6/294 entre las posiciones 276 al 392 encontramos 22 glicinas, 4 de ellas emparejadas de un modo similar a como se describen en la familia RTX (Linhartov 2010).

Un segundo dominio reconocido entre las posiciones 3 y 45, con un *score* de 11.4 y un *E-value* de 0.15, con una familia de alcohol

deshidrogenasa con una secuencia consenso de unos 250 aminoácidos (Pfam13685).

Y un tercer dominio reconocido que correspondía a la familia CRCB que es una familia de proteínas integrales de membrana bacterianas cuya expresión confiere resistencia de alcanfor (Pfam02537).

a) Familia RTX

```

sllaeFYRtGtId.aavttintvlaaiaaGvgaaaaGslvgaPvallvsaitglistildaskqavfehV
+ll +f e G id a++t+i vla+ +Gv G +++ va+l s+i+ + ++i avf v
6999*****9788*****95.66667666778888776
QLLPQFLPEGGPIDpATITAIMNVLASPMSGVLIgLVGPVISPAVAVLNSGT A -ITAAA IQAGDPDAVFSQV
    
```

b) Alcohol deshidrogenasa

```

aklPialiaDldiikAPkrliasGfGD1lgkitaladwklae
+Pia+ D+++ kk+P++ +a+G++ + + a+a +e
568*****9999999988544333
RSAPIALQGDIEVPKKSPRAWVAAGVAIAGASVMAVAPGVHSE
    
```

c) CRBC

```

ayNvlGsfl1g1lla.....llttGf1Gg1T
+Nv+G+++ g+ l+ + tG+lG++T
367777777776665555544679****988
PAVVGAVFNGATLD1taltpiINETGLLGSTI
    
```

Descripción	Cobertura		Alineamiento		score	E-value
	Inicio	Final	Inicio	Final		
RTX N-terminal domain	160	242	161	232	17.5	0.0011
Iron-containing alcohol dehydrogenase	1	90	3	45	11.4	0.15
CRCB	161	271	235	267	6.6	8.8

Figura 83. Alineamiento con Pfam de la proteína c6/294. a) Comparación con la secuencia consenso de la familia RTX. b) Comparación con la secuencia consenso de una familia de enzimas alcohol deshidrogenasa. c) Comparación con la secuencia consenso la familia CRBC.

Los resultados obtenidos no son significativos. Los valores de *scores* son demasiado bajos y el *E-value* demasiado alto, sobre todo teniendo en cuenta que no alineamos toda la proteína, sino solo los 300 aminoácidos más próximos a la posición amino terminal. Aun y así la proximidad de longitud de la cadena y los valores de alineamiento con la familia de toxinas RTX, que son algo mejores, podrían estar sugiriéndonos que la proteína c6/294 comparte una estructura en la zona amino terminal susceptible de integrarse en membranas, siendo ésta una característica coincidente con las proteínas con función porina.

4.7.3.2. Comparación de la secuencia con otras porinas del grupo

Por último intentamos buscar similitudes en alguna zona de la proteína c6/294 con respecto a alguna de las porinas pertenecientes a las familias MspA, PorB o OmpA.

Obtuvimos de la base de datos Pfam las secuencias de las porinas con las que comparamos nuestra secuencia problema. En el caso de la familia MspA, Pfam recoge 1.101 secuencias, de modo que optamos por escoger las secuencias RP55, que fueron 109 secuencias. En el caso de OmpA, Pfam recoge 61.046 secuencias, y las RP seguían siendo muy altas, de modo que optamos por coger el conjunto *seed*. Y por último de la familia Por B, Pfam sólo recoge 35 secuencias, de modo que estas las seleccionamos todas.

A continuación se procedió a realizar las alineaciones. Inicialmente hicimos un alineamiento global con BLAST que realiza alineamientos que abarcan toda la longitud de las secuencias, aunque éramos conscientes de que las secuencias de las que partíamos no eran homogéneas ni compartían similitud en cuanto a la longitud. Como matriz de sustitución utilizamos BLOSUM45 y BLOSUM62.

Matriz	Valor	Familia	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Blosum45	máx.	MspA	21.0	123	20%	0.025	50%
	min.	MspA	14.3	41.6	10%	3.6	31%
Blosum45	máx.	OmpA	20.4	102	17%	0.015	53%
	min.	OmpA	12.2	12.2	4%	9.7	26%
Blosum45	máx.	PorB	21.3	83.1	26%	0.007	38%
	min.	PorB	14.9	82.1	16%	1.4	50%
Blosum62	máx.	MspA	20.4	20.4	2%	0.045	50%
	min.	MspA	13.5	13.5	2%	9.0	43%
Blosum62	máx.	OmpA	20.0	47.3	9%	0.024	41%
	min.	OmpA	12.3	12.3	1%	9.5	67%
Blosum62	máx.	PorB	20.4	37.0	14%	0.018	38%
	min.	PorB	13.1	13.1	6%	5.1	33%

Figura 84. Valores de alineamiento de la proteína c6/294 con las secuencias consenso de las proteínas de las familia de porinas MspA, OmpA y Por B. Se anota los valores tras aplicar las matrices Blosum45 menos restrictiva y Blosum 62 más restrictiva. Se consideran como máx. los valores con *E-values* más pequeños, y min. los alineamientos con *E-values* más grandes .

Las alineaciones que obtuvimos con BLASTP tanto con la matriz Blosum45 como con la más restrictiva Blosum62, fueron muy poco significativas, ya que aunque aparentemente obteníamos identidades relativamente altas, los porcentajes de cobertura eran muy bajos y los *E-value* demasiado altos, lo que nos indica que estas identidades podrían ser debido al azar. Aun y así es con la familia PorB con la que muestra mayor similitud.

Con estos datos podemos acabar de confirmar que la proteína c6/294 no mantiene homología con ninguna de las tres familias mayoritarias de porinas descritas para el grupo CNM.

4.7.3.1. Estudio bioinformático en la proteína c6/294

Dado que por homología no podíamos identificar la proteína c6/294, decidimos analizar su estructura primaria y secundaria, así como los motivos y dominios estructurales y funcionales que pudieran expli-

carse a raíz de su secuencia de aminoácidos. Para ello utilizamos herramientas bioinformáticas de libre acceso, muchas de ellas ofrecidas por el portal Expsy y utilizables *on line* (Artimo et al. 2012).

4.7.3.1.1. Peso molecular, punto isoeléctrico e hidrofobicidad

Para calcular los parámetros iniciales de la proteína c6/294 utilizamos la herramienta bioinformática GPMAW ofrecida por Alphalyse (www.alphalyse.com/gpmaw_lite.html). Los resultados obtenidos con esta aplicación fueron:

Propiedad	c6/294	unidades
Masa media	55,306	Dalton
Molar absorbance	0.53	cm ⁻¹
Molar ext. coeff. (280nm)	29,160	cm ⁻¹ m ⁻¹
Isoelectric point	3,96	
Hydrophobicity index	-0.02	

Figura 85. Valores bioquímicos de la proteína c6/294

Con estos datos pudimos establecer la proteína c6/294 pesa 55 kDa. Respecto al punto isoeléctrico este fue de 3.96, lo que indicaría que a pH 7 esta proteína sería ligeramente ácida y el índice de hidrofobicidad de -0.02, lo que sugeriría una ligera tendencia a ser hidrófoba.

También obtuvimos el porcentaje de aparición de cada aminoácido en la secuencia, así como un mapa de la misma donde aparecen coloreadas las posiciones de los aminoácidos más representativos.



Figura 86. Esquema lineal de la proteína c6/294 obtenido en www.alphalyse.com donde se diferencian los aminoácidos con distintas características bioquímicas.

Aminoácido	Total	Porcentaje
Alanina	82	14.70%
Cisteina	0	0.00%
Ácido aspártico	34	6.09%
Ácido glutámico	21	3.76%
Fenilalanina	10	1.79%
Glicina	51	9.14%
Histidina	4	0.72%
Isoleucina	26	4.66%
Lisina	20	3.58%
Leucina	42	7.53%
Metionina	7	1.25%
Asparagina	20	3.58%
Prolina	38	6.81%
Glutamina	17	3.05%
Arginina	6	1.08%
Serina	81	14.52%
Treonina	53	9.50%
Valina	37	6.63%
Triptófano	4	0.72%
Tirosina	5	0.90%

Figura 87. Tabla con el porcentaje y el número total de cada uno de los distintos aminoácidos que constituyen la proteína c6/294.

A nivel estructural, los aminoácidos alanina, glutamina, leucina y metionina favorecen la formación de hélices alfa, mientras que la prolina, glicina, tirosina y serina no. Y respecto a las láminas beta, al quedar más próximas las cadenas laterales de los aminoácidos que las constituyen, sólo aquellos aminoácidos poco voluminosos como la glicina, alanina y serina, suelen propiciarlas.

Al revisar el porcentaje de aminoácidos podemos comprobar que entre los aminoácidos mayoritarios se encuentra la serina y la glicina, pero al estudiar la secuencia de la proteína podemos comprobar que estos aminoácidos se sitúan mayoritariamente en la mitad carboxilo terminal de la secuencia. En cuanto a los aminoácidos que tienden a formar láminas beta, la glicina, alanina y serina, se encuentran entre los mayoritarios de la secuencia.

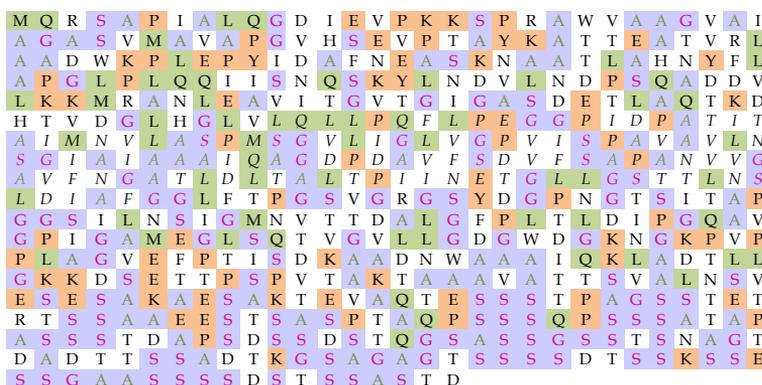


Figura 88. Representación esquemática de la tendencia a formar estructuras secundarias según el tipo de aminoácido. En verde se marcan los aminoácidos glutamina (Q), leucina (L) y metionina (M) y con letra verde la alanina (A), presentes habitualmente en hélices alfa. En naranja se marcan los aminoácidos prolina (P), tirosina (Y), lisina (K) y glutámico (E) y en lila y con letra rosa la glicina (G) y serina (S), que no suelen formar parte de hélices alfa o la desestructura debido a su carga como en el caso de la lisina y el glutámico. En lila se marca los aminoácidos que suelen estar presentes en láminas beta, glicina (G), alanina (A) y serina (S).

Estos datos parecen estar indicando que nuestra secuencia podría tener tendencia a formar láminas beta en la zona más carboxilo terminal, algo habitual en las porinas de grupo CNM, como en el caso de la porina MspA en cuyo núcleo se ha identificado una estructura de láminas beta muy estable (Heinz et al. 2003).

4.7.3.1.2. Estructura secundaria

Para analizar la estructura secundaria de c6/294 las herramientas bioinformáticas que se utilizaron fueron CFSSP, JPRED y GOR4. Los dos primeros predicen la estructura secundaria de las proteínas en función de la frecuencia de aparición de cada aminoácido en las distintas estructuras secundarias. El tercero se basa en el alineamiento contra proteínas con estructuras secundarias conocidas. Tras analizar nuestra proteína, pudimos comprobar que los resultados variaban en función del programa utilizado.

Según CFSSP la mayoría de los aminoácidos que constituía la proteína 61.3% podrían dar lugar a estructuras hélice alfa, un 53.3% pueden construir láminas beta y un 12.4% en giros.

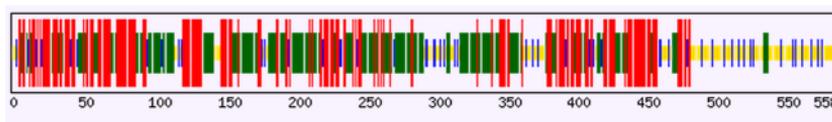


Figura 89. Diagrama de predicción donde se identifican los posibles motivos con estructura secundaria en la secuencia de la proteína c6/294. En rojo se marcan las hélices alfa, en verde las lámina beta, en azul los giros y en amarillo el *coiled coil* (súper enrollamiento).

Al ver esta disposición podemos comprobar que según el programa de predicción CFSSP, las hélices alfa se concentrarían en posición amino terminal, las láminas beta se situarían en la zona central de la secuencia y al final, en posición carboxilo terminal se localizaría una zona de *coiled coil*.

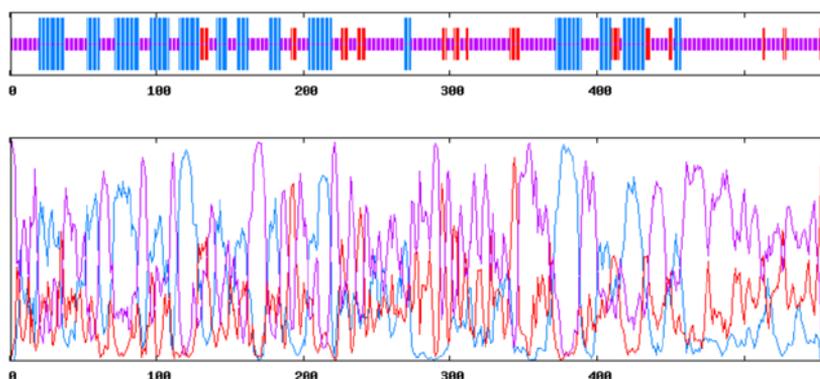


Figura 91. Representación esquemática obtenida con GOR4, de las diferentes estructuras secundarias predichas junto con un gráfico que representa la probabilidad de formación de cada tipo de estructura secundaria. En color azul se marcan las hélices alfa, en rojo las láminas beta, en verde los giros y en naranja las secuencias sin ordenación.

	GOR4		CFSSP	
	Núm. de residuos	Porcentaje	Núm.de residuos	Porcentaje
Alfa hélice	162	29.03%	342	61,30%
Hélice ₃₁₀	0	0.00%		
Hélice Pi	0	0.00%		
Puente β	0	0.00%		
Lamina β	59	10.57%	298	53,40%
Giro beta	0	0.00%		
Giros	0	0.00%	69	12,40%
Al azar	337	60.39%		
Ambiguo	0	0.00%		

Figura 92. Tabla resumen donde se recoge los resultados obtenidos con los programas GOR4 y CFSSP, y donde se indica el número y porcentaje de aparición de los aminoácidos susceptibles de formar estructuras secundarias.

Por último obtuvimos un resultado de predicción con JPRED, el cual fue bastante coincidente con lo obtenido por GOR4, en cuanto a que la mayor cantidad de hélices alfa se localizaban en la región más amino terminal de la proteína. El programa JPRED utiliza algoritmos de

comparación que trabajan con bases de datos de proteínas cuya secuencia han sido experimentalmente estudiadas.



Figura 93. Diagrama proporcionado por el programa JPRED y donde se recogen las predicciones sobre la estructura secundaria de la proteína c6/294.

El índice Lupas, marca la identificación de regiones con estructura coiled coil, con probabilidades del 21, 14 y 28. JNETSOL, indica las propiedades de solvatación de las regiones con una predicción binaria de accesibilidad al solvente del 25, 5 y 0%. JNetPRED indica la predicción consenso de la aparición de estructuras secundarias, indicando las hélices alfa como tubos rojos y las láminas beta como flechas verdes. JNetCONF indica el coeficiente de confianza de la anterior predicción, valores altos son indicativos de mayor probabilidad de la predicción. JNetALIGN marca la predicción de estructuras secundarias en base a alineamientos y JNetHMM lo marca gráficamente. JPRED, marca las estructuras secundarias en base a la predicción del programa igualmente llamado. JNETPSSM, señala la predicción en base a PSSM. JNETFREQ indica la estructura secundaria en base a la predicción según la frecuencia de aparición de cada aminoácido en cada tipo de frecuencia. Un "*" en JNETJURY indica que se invocó para racionalizar significativamente diferentes predicciones primarias.

Estas previsiones permiten obtener una visión global de la estructura secundaria de c6/294 y podemos confirmar la presencia de varios fragmentos de hélices alfa (marcadas en rojo) sobre todo al inicio de la proteína, y una baja proporción de láminas betas (flechas verdes) más abundantemente en posición carboxilo terminal.

La existencia de estas hélices alfa en posición amino terminal, difiere de lo que sucede en general entre las porinas bacterianas, las cuales en su gran mayoría poseen estructuras de láminas beta antiparalelas que les permiten quedar estabilizadas en el interior de la pared (Mahfoud, Sukumaran, Grieger, et al. 2006; Mahfoud, Sukumaran, Hülsmann, et al. 2006; Schulz 2002; Faller et al. 2004). Así mismo, es también este tipo de estructura secundaria, en láminas beta antiparalelas la que da estabilidad a la porina MspA (Heinz et al. 2003). Sin embargo, no todas las porinas bacterianas basan su estabilidad en este tipo de estructuras. Las porinas PorH y PorA de *Corinebacterium efficiens* y *C. calunae*, así como la porina PorACj de *C. jeikeium* basan su estabilidad en estructuras hélice alfa (Abdali et al. 2013; Hüntten, Schiffler, et al. 2005). Y también tenemos el caso de la porina PorATB (rv0899) de *M. tuberculosis* que presenta en la zona amino una estructura mixta entre láminas beta y hélices alfa (Yang et al. 2011; Teriete et al. 2010)

Estos datos parecen apoyar que nuestra proteína podría insertarse en la pared y formar poros gracias a sus estructuras de hélice alfa. Tomando como modelo la porina OmpATB, esta porina tiene dos dominios, el más amino terminal presenta hélices alfa, y el más carboxilo terminal hélices alfas alternadas con láminas beta antiparalelas. De estas estructuras, las de la zona carboxilo terminal mantiene una mayor homología con otras porinas de la familia OmpA. En cambio la zona amino terminal, a la que se parece la proteína c6/294, algunos estudios postulan que resulta esencial para la inserción de la porina OmpATB en la membrana (Yang et al. 2011).

4.7.3.1.3. Zonas de inserción transmembrana

La topología y la ubicación de los segmentos de secuencias transmembranas se evaluó utilizando los programas TMpred, TMMHMM, PHOBIUS y PROTTER. Los resultados que obtuvimos fueron:

El programa TMpred predijo la presencia de 5 hélices alfa que estarían orientadas de dentro de la célula hacia fuera, y de las cuales solo 3 serían significativas, y 7 hélices alfas orientadas en la dirección contraria, y de las cuales solo 3 serían significativas.

De dentro hacia fuera			De fuera hacia dentro		
De la posición	hasta	score	De la posición	hasta	score
22	42	1960	24	40	1746
182	209	1507	185	209	1877
231	253	491	228	246	511
266	285	979	270	289	384
307	336	457	294	312	393
			325	348	152
			402	420	304

Figura 94. Tabla resumen donde se indican las posiciones de las regiones susceptible de ser transmembrana, en rojo se marcan las significativas según el programa TMpred.

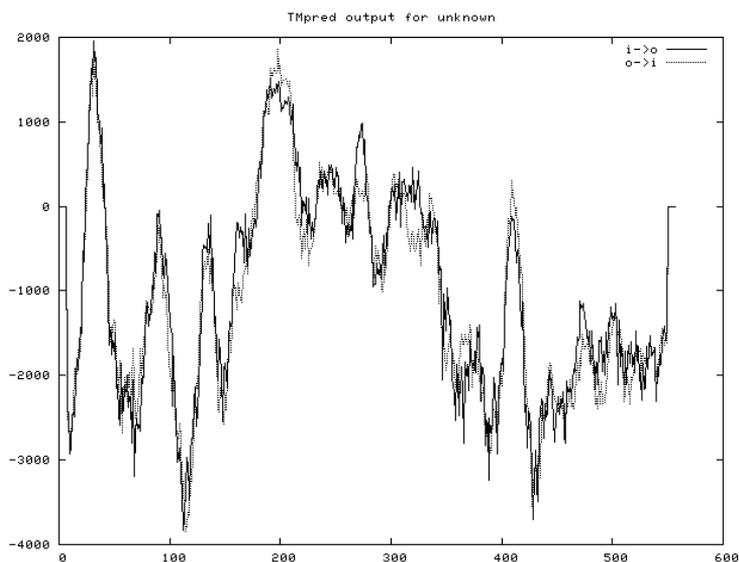


Figura 95. Predicción gráfica de la probabilidad de formación de estructuras transmembranas, obtenida con el programa TMpred.

Este programa también predice cual de las orientaciones es más probable y sugiere dos modelos. El de mayor *score* (4816) propone que sería el de una proteína con 3 hélices transmembranas, con unas longitudes de 20 a 25 aminoácidos, dos de ellas orientadas de dentro a fuera y la tercera de fuera a dentro. El segundo modelo consistiría en una proteína con 4 hélices transmembrana de entre 17 y 28 aminoácidos de longitud.

De la posición	hasta	longitud	score	Orientación
22	42	21	1960	i-o
185	209	25	1877	o-i
266	285	20	979	i-o
score total			4816	

De la posición	hasta	score	score	Orientación
24	40	17	1746	o-i
182	209	28	1507	i-o
228	246	19	511	o-i
266	285	20	979	i-o
score total			4743	

Figura 96. Tabla con las dos predicciones más significativas de Jpred, donde se indican las posiciones, orientaciones y longitudes de las posibles hélices alfa transmembrana.

El programa PHOBIUS, identifica una sola hélice transmembrana situada entre los aminoácidos 21 y 42 y que estaría orientada de dentro a fuera de la bacteria. Esta hélice coincidiría con una de las propuestas por el programa TMpred.

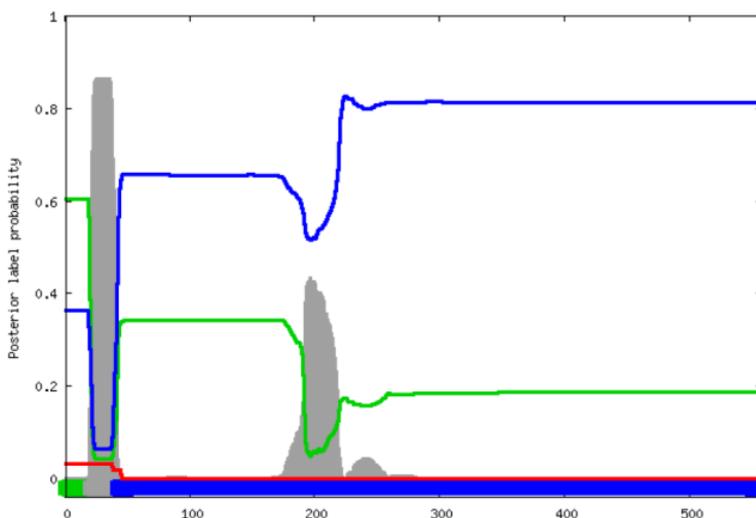


Figura 97. Representación gráfica de las probabilidades de formación de estructuras secundarias en la proteína c6/294 obtenida con el programa PHOBIUS. Las áreas grises marcan la probabilidad de regiones transmembranas debida a los aminoácidos con mayor tendencia a formar este tipo de estructuras, la roja la probabilidad de péptido señal, la azul los aminoácidos no citoplasmáticos y la verde los aminoácidos citoplasmáticos.

Según estos datos del gráfico, la proteína c6/294 tendría entre los aminoácidos 20 y 70 una hélice transmembrana, que confirmaría los resultados obtenidos con el programa TMpred.

Por último introdujimos la secuencia de nuestra proteína en el programa PROTTTER, y obtuvimos una imagen esquemática de la secuencia, en la que pudimos comprobar que aparecía una zona transmembrana que abarcaba del aminoácido 21 a 42. Estos datos confirman la existencia de una hélice transmembrana en estas posiciones.

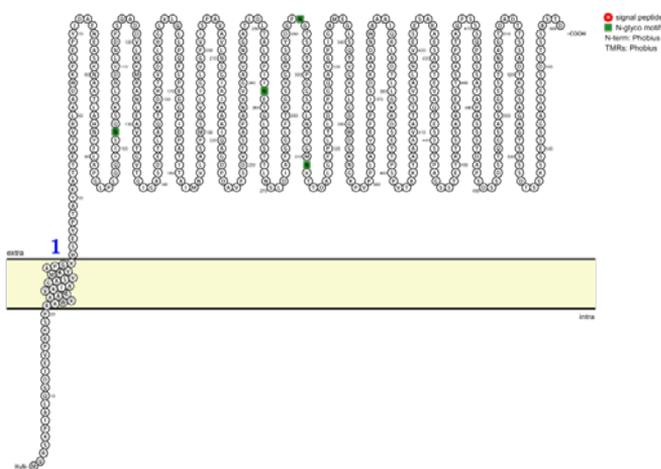


Figura 98. Representación esquemática la proteína c6/294, localizándose tres regiones, una exterior de 21 aminoácidos, una transmembrana de 21 aminoácidos y una intracelular de 516 aminoácidos.

En base a los resultados obtenidos a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína c6/294, y mediante el uso de programas informáticos de predicción de estructuras secundarias y regiones transmembrana, podemos notar que esta proteína comparte muchas similitudes con la proteína OmpATB de *M. tuberculosis*.

Al igual que esta, la proteína c6/294, tendría un dominio transmembrana en posición amino terminal, dentro de los primeros 70 aminoácidos, en concreto entre las posiciones 28 y 50, al igual que la

OmpATB. Es interesante remarcar que en el caso de la porina OmpATB se ha podido observar que la falta de ésta región amino terminal causa que la proteína quede en el citosol y no se integre en la pared bacteriana, y en experimentos de conductancia, que pierda la capacidad de formar poros (Alahari et al. 2007).

En la región central de la c6/294, entre las posiciones 160 y 276, encontramos una región con alta homología con tres dominios publicados en el Pfam. El de mayor similitud, que como se observa en la figura 79 a, abarca entre los aminoácidos 161 y 232 y corresponde al dominio de la familia de toxinas bacterianas RTX, que son un grupo de citolisinas y citotoxinas producidas por una gran variedad de bacterias y que se caracterizan por un nonapéptido repetido rico en glicinas y residuos de apartico localizados cerca de la posición C-terminal. Dentro de este grupo encontramos toxinas, la mayoría de ellas con actividad formadora de poros (Pfam02382) (Linhartov 2010). Frente a esta similitud, es interesante destacar que la proteína c6/294 entre las posiciones 276 al 392, fuera de la zona reconocida por Pfam, encontramos 22 glicinas, 3 de ellas emparejadas, de un modo aparentemente muy similar a como sucede en la familia RTX.

Otro dominio reconocido en la proteína c6/294 por parte de Pfam, correspondía a la familia CRCB que es una familia de proteínas integrales de membrana bacterianas cuya expresión confiere resistencia al alcanfor (Pfam02537).

Y por último al ampliar la secuencia de búsqueda entre el residuo 1 y el 334, nos aparece un tercer dominio reconocido que corresponde a una familia de enzimas alcohol deshidrogenasa que contienen hierro (Pfam13685).

Los dos primeros dominios reconocidos remarcan que en la arquitectura de la proteína c6/294 se podrían encontrar los elementos necesarios para que la proteína se pudiera integrar en la pared, algo necesario para que pueda formar poros.

Volviendo a la comparación con la proteína OmpATB, en su secuencia, entre los residuos 81 a 195, hay una región de alta homología con la familia BON (Bacteriana y Osmo Nodulación) (pfam04972) (Marassi 2011). Dentro de esta familia de proteínas se encuentran proteínas de protección ante choque osmótico, secretinas, hemolisinas, canales y proteínas de agregación.

En este caso podemos comprobar que tanto c6/294 como OmpATB poseen una región central que muestra similitudes significativas con otras familias de proteínas con función relacionada con su inserción en la pared.

La proteína c6/294 también comparte una mayor proporción de estructuras hélice alfa en el dominio amino terminal y una proporción de menos hélices alfa y algunas láminas beta en el dominio carboxilo terminal, algo que también muestra la porina OmpATB (Teriete et al. 2010).

Respecto a su asociación, la porina OmpATB presente en *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis*, es una proteína dimérica que pesa unos 70 kDa y da lugar a subunidades de unos 35 kDa (Alahari et al. 2007). En el caso de la proteína c6/294, habíamos comprobado que al ser analizada en geles de acrilamida, mostraba una banda proteica de unos 100 kDa aparentes y al ser hervida, conseguíamos una disociación de la que obteníamos dos bandas de unos 35 y 40 kDa, por lo que podríamos determinar que también se trata de un dímero.

Respecto a la actividad formadora de canal. La proteína OmpATB presenta una conductancia de 0.7 nS (Senaratne et al. 1998) en soluciones de KCl 1M, y la conductancia de la c6/294 es de 0.8 nS, asumiendo que esta es la proteína responsable de la formación de poros en los extractos obtenidos mediante elución de las bandas de 100 kDa. En ambos casos se trata de porinas secundarias con baja conductividad y que dentro del microorganismo, acompañarían a porinas con mayor conductancia, algo que se ha observado tanto en *M. tuberculosis*, como en el caso de *M. bovis*. En estos casos la porina de

baja conductividad muestra selectividad aniónica, como es el caso de la proteína c6/294, acompañan a una porina con mayor conductividad y selectividad por los cationes, al igual que sucede en nuestro caso donde hemos podido detectar dos porinas más con mayor conductancia, 1 y 2 nS, y selectividad por los cationes (Lichtinger et al. 1999; Riess et al. 2003).

A pesar de estas similitudes, también encontramos diferencias como la dependencia al voltaje o la conductancia selectiva. Respecto al voltaje, la proteína de 100 kDa, que postulamos corresponde a la proteína c6/294, es independiente de voltaje mientras que la OmpATB sí que lo es, pudiendo cerrarse reversiblemente al ser sometida a altos voltajes (Senaratne et al. 1998).

La OmpATB parece ser que muestra cambios de actividad debido al pH, postulándose que es el cambio de éste lo que propicia un cambio de conformación en la proteína que la vuelve activa (Song et al. 2012) y pudiendo presentar, por tanto, isoformas no activas. En nuestro caso no hemos observado estas diferencias.

También se debe tener en cuenta que el último estudio publicado sobre la proteína OmpATB, se destaca que no es la hélice transmembrana situada en posición amino terminal la responsable de la formación del poro, por lo que tanto en el caso de la OmpATB como de nuestra proteína tendríamos que considerar esa hélice transmembrana, más como un punto de anclaje de la proteína a la pared, siendo el resto de la estructura el que debería dar lugar a la formación del poro (Li et al. 2012).

5. CONCLUSIONES

6. Conclusiones

Las proteínas de pared de *Gordonia jacobaea*, pueden ser extraídas tanto con detergentes (Genapol), como mediante solventes orgánicos (cloroformo y metanol) obteniéndose perfiles proteicos en geles de acrilamida donde se visualizan bandas de 100, 60, 40, 35, 27, 25, 15 y 10 kDa de peso molecular aparente, perfiles que apenas variaron tras someter las proteínas a ebullición con SDS y betamercaptoetanol, tan sólo se observó una menor intensidad de la banda de 100 kDa y una mayor intensidad en la banda de 35 kDa aparentes.

Las electroforesis de SDS-PAGE realizadas con tricina en lugar de glicina, son más resolutivas para separar las proteínas de pared de *G. jacobaea*, obtenidas mediante extracción con solventes orgánicos, que las realizadas con glicina.

Es posible obtener extractos purificados de las proteínas de 100 y 60 kDa de *G. jacobaea* mediante purificación con electroforesis preparativas y eluciones pasivas de los geles.

Los extractos de proteínas de *G. jacobaea* purificados mediante electroforesis preparativas, mostraron actividad formadora de poro en los rangos entre 10 y 20 kDa, y entre 35 y 100 kDa. Se detectó actividad formadora de poro tanto en la cepa MV1 como la MV26.

Se identifica una proteína de pared de 100 kDa aparentes en *G. jacobaea*, que al ser hervida muestra dos bandas de 40 y 35 kDa aparentes. Los datos muestra que forma canales llenos de agua, con una conductancia de 0.8 nS en soluciones de 1M KCl pH7, con selectividad para los aniones, no dependiente de voltaje y con especificidad por los fosfatos.

Se identifica una proteína de pared de 60 kDa aparentes que forma canales llenos de agua con selectividad por los cationes, una conductancia mayoritaria de 1 nS en 1M KCl, y conductancias

Conclusiones

minoritarias de 2 y 3 nS, lo que parece indicar una conformación trimérica.

Se identifica una proteína de pared de 20 kDa aparentes que muestra una conductancia de 2 nS en solución de 1M KCl pH7.

G. jacobaea posee un genoma muy similar al del *G. sputi*. De las 4451 secuencias codificantes que hemos obtenido, el 94% muestra máxima similitud con miembros del genero *Gordonia*, y de estos el 74% de ellas con *G. sputi*.

Dentro del genoma se identifican 4 secuencias anotadas manualmente y automáticamente, como pertenecientes a la familia de porinas MspA. Las dos secuencias localizadas en el *contig* 6 darían lugar a proteínas de 228 y 229 aminoácidos. Las dos secuencias localizadas en el *contig* 2 darían lugar a proteínas de 214 y 239 aminoácidos. Los alineamientos, así como las longitudes de las proteínas parecen indicar que forman parte de la familia MspA. Dado que una de las proteínas formadoras de canal estudiadas en esta tesis, de unos 20 kDa tiene un peso molecular que se ajustaría a las dimensiones de las cuatro secuencias identificadas como MspA, y que además muestra ser una porina con selectividad para los cationes y con una conductancia similar a las descrita en otras porinas MspA, podemos esperar la porina de 20 kDa estudiada en esta tesis corresponda a los genes de las porinas MspA localizadas en los *contigs* 2 y 6. Esta multiplicidad también se ha identificado en *M. smegmatis*.

En el extracto de la banda de 100 kDa, activo para la formación de poros, se identificó una proteína de 558 aminoácidos. La proteína identificada muestra una hélice transmembrana entre los aminoácidos 22 y 42, posibles secuencias de hélice alfa más abundantes en la zona amino terminal y láminas beta distribuidas a lo largo de toda la proteína, pero más abundantes en la región carboxilo terminal. Así mismo también se identificó una región entre los aminoácidos 160 y 276 con similitud a secuencias conservadas de proteínas integrales de

membrana (familia CRBC) y una familia de toxinas que forma poros (RTX).

Esta proteína no muestra homología con ninguna de las porinas publicadas, ni con otras proteínas con funciones conocidas. Sin embargo se ha hallado cierta similitud estructural con la porina de *M. tuberculosis*, OmpATB. Esta similitud se debe a la presencia en ambas de un dominio transmembrana, la existencia de regiones internas con homología con otras proteínas cuya función se sitúa en la pared microbiana, el que ambas sean dímeros, y presuponiendo que la proteína identificada en el genoma de *G. jacobaea* sea responsable de la actividad formadora de poro del extracto, también comparten similitud en cuanto a presentar una conductancia relativamente baja, de unos 0.8 nS.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdali, N. et al., 2013. Corynebacterium jeikeium jk0268 Constitutes for the 40 Amino Acid Long PorACj, Which Forms a Homooligomeric and Anion-Selective Cell Wall Channel. *PLoS ONE*, 8 (10).
- Alahari, A. et al., 2007. The N-terminal domain of OmpATb is required for membrane translocation and pore-forming activity in mycobacteria. *Journal of bacteriology*, 189 (17), pp.6351–6358. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1951930&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 16, 2013].
- Altschul, S.F. et al., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215 (3), pp.403–410.
- Ames, G.F., Spudich, E.N. & Nikaido, H., 1974. Protein Composition of the Outer Membrane of Salmonella typhimurium □ Effect of Lipopolysaccharide Mutations'. , 117 (2), pp.406–416.
- Angiuoli, S. V et al., 2008. Toward an online repository of Standard Operating Procedures (SOPs) for (meta)genomic annotation. *Omics : a journal of integrative biology*, 12 (2), pp.137–141.
- Arenskötter M, Baumeister D, Berekaa MM, Pötter G, Kroppenstedt RM, Linos A, S.A., 2001. Taxonomic characterization of two rubber degrading bacteria belonging to the species Gordonia polyisoprenivorans and analysis of hyper variable regions of 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiol Lett*, 18 (205), pp.277–288.
- Arenskötter, M. et al., 2005. Gordonia nitida Yoon et al. 2000 is a later synonym of Gordonia alkanivorans Kummer et al. 1999. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55 (Pt 2), pp.695–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15774645> [Accessed December 27, 2013].
- Arenskotter, M., Bro, D. & Steinbu, A., 2004. Biology of the Metabolically Diverse Genus Gordonia. , 70 (6), pp.3195–3204.
- Artimo, P. et al., 2012. ExPASy □SIB bioinformatics resource portal. , 40 (May), pp.597–603.
- Baldermann, C. et al., 1998. The regulated outer membrane protein Omp21 from Comamonas acidovorans is identified as a member of a new family of eight-stranded beta-sheet proteins by its sequence and properties. *Journal of bacteriology*, 180 (15), pp.3741–9. Available at:

Bibliografía

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=107353&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 4, 2014].

Bayan, N. et al., 2003. Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications. *Journal of biotechnology*, 104 (1-3), pp.55-67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12948629> [Accessed December 30, 2013].

Bendinger, B. et al., 1993. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and environmental microbiology*, 59 (11), pp.3973-7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=182562&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 24, 2013].

Benson, D.A. et al., 2006. GenBank. , 34, pp.16-20.

Bentley, D.R. et al., 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456 (7218), pp.53-59.

Benz, R. et al., 1986. Pore formation by LamB of *Escherichia coli* in lipid bilayer membranes. *Journal of Bacteriology*, 165 (3), pp.978-986.

Benz, R., 1988. Structure and function of porins from gram-negative bacteria. *Annual review of microbiology*, 42, pp.359-393.

Benz, R., Janko, K. & Lauger, P., 1979. Ionic selectivity of pores formed by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta*, 551 (2), pp.238-247.

Benz, R., et al., 1978. Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 511 (3), pp.305-19.

Bernard, K., 2012. The Genus *Corynebacterium* and Other Medically Relevant Coryneform-Like Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (10), pp.3152-3158. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3457441&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 16, 2013].

Blaschke, A.J. et al., 2007. *Gordonia* species: emerging pathogens in pediatric patients that are identified by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Clinical infectious diseases* — an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 45 (4), pp.483-6. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17638199> [Accessed December 27, 2013].
- Branton, D. et al., 2008. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nature biotechnology*, 26 (10), pp.1146-1153.
- Braslavsky, I. et al., 2003. Sequence information can be obtained from single DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (7), pp.3960-3964.
- Brust, J.C.M. et al., 2009. Five cases of bacteraemia due to *Gordonia* species. *Journal of medical microbiology*, 58 (Pt 10), pp.1376-8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3192486&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 27, 2013].
- Buchman, A.L. et al., 1992. Central venous catheter sepsis caused by unusual *Gordonia* (Rhodococcus species: identification with a digoxigenin-labeled rDNA probe. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 15 (4), pp.694-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1420683> [Accessed December 27, 2013].
- Candiano, G. et al., 2004. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25 (9), pp.1327-1333. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15174055> [Accessed December 16, 2013].
- Chatterjee, S., Mallick, S. & Dutta, T.K., 2005. Pathways in the degradation of hydrolyzed alcohols of butyl benzyl phthalate in metabolically diverse *Gordonia* sp. strain MTCC 4818. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 9 (2), pp.110-20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319500> [Accessed December 27, 2013].
- Chen, C. et al., 2011. Representative Proteomes : A Stable , Scalable and Unbiased Proteome Set for Sequence Analysis and Functional Annotation. , 6 (4).
- Chou, P.Y. & Fasman, G.D., 1974. Prediction of protein conformation. *Biochemistry*, 13 (2), pp.222-245.
- Cole, C., Barber, J.D. & Barton, G.J., 2008. The Jpred 3 secondary structure prediction server. , 36 (May), pp.197-201.

- Cole, S.T. et al., 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393 (6685), pp.537-44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9634230> [Accessed January 15, 2014].
- Confer, A.W. & Ayalew, S., 2013. The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Veterinary microbiology*, 163 (3-4), pp.207-22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22986056> [Accessed January 4, 2014].
- Cook AM, H.R., 1984. Deethylsimazine: bacterial dechlorination, deamination, and complete degradation. *J Agric Food Chem*, 32, pp.581-85.
- Cook AM, H.R., 1986. Ring dechlorination of deethylsimazine by hydrolases from *Rhodococcus corallinus*. *FEMS Microbiol Lett*, 34, pp.335-38.
- Costa-Riu, N., Maier, E., et al., 2003. Identification of an anion-specific channel in the cell wall of the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular Microbiology*, 50 (4), pp.1295-1308. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2003.03754.x> [Accessed December 16, 2013].
- Costa-Riu, N., Burkovski, A., et al., 2003. PorA represents the major cell wall channel of the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of bacteriology*, 185 (16), pp.4779-4786.
- Derrington, I.M. et al., 2010. Nanopore DNA sequencing with MspA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (37), pp.16060-16065. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2941267&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 16, 2013].
- Dogan, I. et al., 2006. Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Gordonia amarae* enhances biosurfactant production. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 33 (8), pp.693-700. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16491354> [Accessed December 27, 2013].
- Domingos, D.F. et al., 2013. Draft Genome Sequence of the Biosurfactant-Producing Bacterium. *Genome Announcements*, 1 (6), pp.559-560.
- Dörner, U. et al., 2009. Identification of a cell-wall channel in the corynemycolic acid-free Gram-positive bacterium *Corynebacterium*

- amycolatium. *International microbiology* [the official journal of the Spanish Society for Microbiology, 12 (1), pp.29–38.
- Dörner, U., Maier, E. & Benz, R., 2004. Identification of a cation-specific channel (TipA) in the cell wall of the gram-positive mycolata *Tsukamurella inchonensis*: the gene of the channel-forming protein is identical to *mSPA* of *Mycobacterium smegmatis* and *mppA* of *Mycobacterium phlei*. *Biochimica et biophysica acta*, 1667 (1), pp.47–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15533305> [Accessed December 16, 2013].
- Drzyzga, O., 2012. : A review of an emerging genus with increasing biotechnological potential. *Critical Reviews in Microbiology*, 38 (4), pp.300–316. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22551505> [Accessed December 16, 2013].
- Drzyzga, O. et al., 2011. Cholesterol degradation by *Gordonia cholesterolivorans*. *Applied and environmental microbiology*, 77 (14), pp.4802–10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3147395&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 27, 2013].
- Drzyzga, O. et al., 2009. *Gordonia cholesterolivorans* sp. nov., a cholesterol-degrading actinomycete isolated from sewage sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59 (Pt 5), pp.1011–1015. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19406784> [Accessed December 16, 2013].
- Dyballa, N. & Metzger, S., 2009. Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *Journal of visualized experiments* [JoVE], (30), pp.2–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3149902&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 16, 2013].
- Eid, J. et al., 2009. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science (New York, N.Y.)*, 323 (5910), pp.133–138.
- Engelhardt, H., Heinz, C. & Niederweis, M., 2002. MEMBRANE TRANSPORT STRUCTURE FUNCTION AND BIOGENESIS □ A Tetrameric Porin Limits the Cell Wall Permeability of *Mycobacterium smegmatis* A Tetrameric Porin Limits the Cell Wall Permeability of *Mycobacterium smegmatis* *.
- Faller, M., Niederweis, M. & Schulz, G.E., 2004. The structure of a mycobacterial outer-membrane channel. *Science (New York, N.Y.)*, 303 (5661), pp.1189–1192. Available at:

Bibliografía

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14976314> [Accessed December 16, 2013].
- Finn, R.D. et al., 2014. Pfam – the protein families database. , 42 (November 2013), pp.222–230.
- Franzetti, A. et al., 2009. Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. *Chemosphere*, 75 (6), pp.801–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19181361> [Accessed December 27, 2013].
- Franzetti, A. et al., 2008. Surface-active compounds and their role in the access to hydrocarbons in *Gordonia* strains. *FEMS microbiology ecology*, 63 (2), pp.238–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18070077> [Accessed December 27, 2013].
- Fu, L.M., 2002. Is *Mycobacterium tuberculosis* a closer relative to Gram-positive or Gram - negative bacterial pathogens? *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 82 (April), pp.85–90.
- Fusconi R, Leal Godinho MJ, Cruz Hernández IL, S.B. & NR., 2006. *Gordonia* polyisoprenivorans from groundwater contaminated with landfill leachate in a subtropical area: characterization of the isolate and exopolysaccharide production. *Braz J Microbiol*, 37, pp.168–74.
- Fusconi, R. & Godinho, M.J.L., 2002. Screening for exopolysaccharide-producing bacteria from sub-tropical polluted groundwater. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia*, 62 (2), pp.363–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12489408> [Accessed December 27, 2013].
- Ge, F. et al., 2011. Draft genome sequence of *Gordonia neofelifaecis* NRRL B-59395, a cholesterol-degrading actinomycete. *Journal of Bacteriology*, 193 (18), pp.5045–5046.
- Goodfellow, M. et al., 1974. A co-operative numerical analysis of cultures considered to belong to the “rhodochrous” taxon. *Journal of general microbiology*, 85 (2), pp.291–302. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4217356> [Accessed December 27, 2013].
- Goodfellow, M. & Alderson, G., 1977. The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the “rhodochrous” complex. *Journal of general microbiology*, 100

- (1), pp.99-122. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/874450> [Accessed December 27, 2013].
- Goodfellow, M. & Maldonado, L.A., 2006. *The Families Dietziaceae, Gordoniaceae, Nocardiaceae and Tsukamurellaceae*,
- Grizot, S. & Buchanan, S.K., 2004. Structure of the OmpA-like domain of RmpM from *Neisseria meningitidis*. *Molecular microbiology*, 51 (4), pp.1027-37. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14763978> [Accessed January 4, 2014].
- Gupta, M. et al., 2010. A rubber-degrading organism growing from a human body. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 14 (1), pp.e75-6. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501006> [Accessed December 27, 2013].
- Han, X., Aslanian, A. & Yates, J., 2008. NIH Public Access. *Curr Opin Chem Biol.*, 12 (5), pp.483-490.
- Harris, T.D. et al., 2008. Single-molecule DNA sequencing of a viral genome. *Science (New York, N.Y.)*, 320 (5872), pp.106-109.
- Hart, D.H. et al., 1988. Lung infection caused by *Rhodococcus*. *Australian and New Zealand journal of medicine*, 18 (6), pp.790-1. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3242467> [Accessed December 27, 2013].
- Heinz, C. et al., 2003. The Core of the Tetrameric Mycobacterial Porin MspA Is an Extremely Stable β -Sheet Domain. *J Biol Chem*, 278 (10), pp.8678-8685.
- Heinz, C. & Niederweis, M., 2000. Selective extraction and purification of a mycobacterial outer membrane protein. *Analytical biochemistry*, 285 (1), pp.113-120. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10998270> [Accessed December 16, 2013].
- Hernandez-Perez, G., Fayolle, F. & Vandecasteele, J.P., 2001. Biodegradation of ethyl t-butyl ether (ETBE), methyl t-butyl ether (MTBE) and t-amyl methyl ether (TAME) by *Gordonia terrae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 55 (1), pp.117-21. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11234952> [Accessed December 27, 2013].

- Hoffmann, C. et al., 2008. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (10), pp.3963–3967.
- Hofmann, H. & Stoffel, W., TMbase, a database of membrane spanning proteins segments. *Biological chemistry*, (374), p.166.
- Hung, W.-L. et al., 2011. Facultative methylotrophs from the human oral cavity and methylotrophy in strains of *Gordonia*, *Leifsonia*, and *Microbacterium*. *Archives of microbiology*, 193 (6), pp.407–417. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21374057> [Accessed December 16, 2013].
- Hüntten, P., Costa-Riu, N., et al., 2005. Identification and characterization of PorH, a new cell wall channel of *Corynebacterium glutamicum*. *Biochimica et biophysica acta*, 1715 (1), pp.25–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16112217> [Accessed December 16, 2013].
- Hüntten, P., Schiffler, B., et al., 2005. PorH, a new channel-forming protein present in the cell wall of *Corynebacterium efficiens* and *Corynebacterium callunae*. *Microbiology*, 151 (Pt 7), pp.2429–2438. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16000733> [Accessed December 16, 2013].
- Hyman, E.D., 1988. A new method of sequencing DNA. *Analytical biochemistry*, 174 (2), pp.423–436.
- Ibrahim, D. a et al., 2012. Design, synthesis, and X-ray analysis of a glycoconjugate bound to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85C. *Bioconjugate chemistry*, 23 (12), pp.2403–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23190459>.
- Iida, S. et al., 2005. *Gordonia* otitidis sp. nov., isolated from a patient with external otitis. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55 (Pt 5), pp.1871–1876. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16166681> [Accessed December 16, 2013].
- Ivanova, N. et al., 2010. Complete genome sequence of *Gordonia bronchialis* type strain (3410). *Standards in genomic sciences*, 2 (1), pp.19–28.
- Iwahori, K. et al., 2001. Formation of stable foam by the cells and culture supernatant of *Gordonia* (*Nocardia*) *amarae*. *Journal of bioscience and*

- bioengineering*, 92 (1), pp.77-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16233062> [Accessed December 27, 2013].
- Jannat-Khah, D.P. et al., 2009. *Gordonia araii* infection associated with an orthopedic device and review of the literature on medical device-associated *Gordonia* infections. *Journal of clinical microbiology*, 47 (2), pp.499-502. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2643695&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 16, 2013].
- Johnson, J. a et al., 2011. *Gordonia bronchialis* bacteremia and pleural infection: case report and review of the literature. *Journal of clinical microbiology*, 49 (4), pp.1662-1666. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3122797&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 16, 2013].
- Kageyama, A. et al., 2006. *Gordonia araii* sp. nov. and *Gordonia effusa* sp. nov., isolated from patients in Japan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56 (Pt 8), pp.1817-21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16902014> [Accessed December 27, 2013].
- Kall, L., Krogh, A. & Sonnhammer, E.L.L., 2004. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of molecular biology*, 338 (5), pp.1027-1036.
- Kampfer, P., Martin, K. & Dott, W., 2012. *Gordonia phosphorivorans* sp. nov., isolated from a wastewater bioreactor with phosphorus removal. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63 (Pt 1), pp.230-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22389287> [Accessed December 16, 2013].
- Kanavarioti, A. et al., 2012. Capillary electrophoretic separation-based approach to determine the labeling kinetics of oligodeoxynucleotides. *Electrophoresis*, 33 (23), pp.3529-3543.
- Kang, D. et al., 2002. Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. , 23 (11), pp.1511-1512.
- Kartmann, B., Stengler, S. & Niederweis, M., 1999. Porins in the Cell Wall of *Mycobacterium tuberculosis* Porins in the Cell Wall of *Mycobacterium tuberculosis*. , 181 (20).

- Kästner, M., Breuer-Jammali, M. & Mahro, B., 1998. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. *Applied and environmental microbiology*, 64 (1), pp.359–62. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=124719&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 27, 2013].
- Kempf, V.A.J. et al., 2004. *Gordonia polyisoprenivorans* septicemia in a bone marrow transplant patient. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 23 (3), pp.226–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14760540> [Accessed December 27, 2013].
- Kessel, M. et al., 1988. Naturally crystalline porin in the outer membrane of *Bordetella pertussis*. *Journal of molecular biology*, 203 (1), pp.275–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2903251> [Accessed January 4, 2014].
- Kim, S.B. et al., 2000. *Gordonia amicalis* sp. nov., a novel dibenzothiophene-desulphurizing actinomycete. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50 Pt 6, pp.2031–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11155977> [Accessed December 27, 2013].
- Kim, S.B. et al., 1999. *Gordonia desulfuricans* sp. nov., a benzothiophene-desulphurizing actinomycete. *International journal of systematic bacteriology*, 49 Pt 4, pp.1845–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555368> [Accessed December 27, 2013].
- Kläckta, C. et al., 2011. Hetero-oligomeric cell wall channels (porins) of *Nocardia farcinica*. *Biochimica et biophysica acta*, 1808 (6), pp.1601–1610. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21092733> [Accessed December 16, 2013].
- Koebnik, R., Locher, K.P. & Van Gelder, P., 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular microbiology*, 37 (2), pp.239–253.
- Kofteridis, D.P. et al., Case Report Hickman catheter-related bacteremia caused by *Gordonia sputi* in a patient with breast cancer.
- Kofteridis, D.P. et al., 2012. Hickman catheter-related bacteremia caused by *Gordonia sputi* in a patient with breast cancer. *Journal of infection in*

- developing countries*, 6 (2), pp.188–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22337850> [Accessed December 30, 2013].
- Kondo, T. et al., 2000. Gordonan, an acidic polysaccharide with cell aggregation-inducing activity in insect BM-N4 cells, produced by *Gordonia* sp. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64 (11), pp.2388–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11193406> [Accessed December 27, 2013].
- Kuwabara, M. et al., 1999. Mediastinitis due to *Gordonia* sputi after CABG. *The Journal of cardiovascular surgery*, 40 (5), pp.675–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10597001> [Accessed December 28, 2013].
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), pp.680–685.
- Lai, C.C. et al., 2010a. Infections caused by *Gordonia* species at a medical centre in Taiwan, 1997 to 2008. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16 (9), pp.1448–1453.
- Lai, C.C. et al., 2010b. Infections caused by *Gordonia* species at a medical centre in Taiwan, 1997 to 2008. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16 (9), pp.1448–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19832703> [Accessed December 27, 2013].
- Lai, C.-C. et al., 2012. Cutaneous infection caused by *Gordonia* amicalis after a traumatic injury. *Journal of clinical microbiology*, 50 (5), pp.1821–2. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3347127&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 27, 2013].
- Lambert, P. a, 2002. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-positive bacteria and mycobacteria. *Symposium series (Society for Applied Microbiology)*, (31), p.46S–54S.
- Lechevalier MP, L.H., 1974. *Nocardia amarae* sp. nov., an actinomycete common in foaming activated sludge. *Int J Syst Bacteriol*, 24, pp.278–88.
- Lee, I.S. et al., 2005. Biocatalytic desulfurization of diesel oil in an air-lift reactor with immobilized *Gordonia nitida* CYKS1 cells. *Biotechnology*

Bibliografía

- progress*, 21 (3), pp.781–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15932256> [Accessed December 27, 2013].
- Lee, J.J., Rhee, S.K. & Lee, S.T., 2001. Degradation of 3-methylpyridine and 3-ethylpyridine by *Gordonia nitida* LE31. *Applied and environmental microbiology*, 67 (9), pp.4342–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=93167&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 27, 2013].
- Li, J. et al., 2012. Structural Studies of *Mycobacterium tuberculosis* Rv0899 Reveal a Monomeric Membrane-Anchoring Protein with Two Separate Domains. *Journal of Molecular Biology*, 415 (2), pp.382–392. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22108166> [Accessed December 16, 2013].
- Lichtinger, T. et al., 1998. Biochemical and biophysical characterization of the cell wall porin of *Corynebacterium glutamicum*: the channel is formed by a low molecular mass polypeptide. *Biochemistry*, 37 (43), pp.15024–15032.
- Lichtinger, T. et al., 1999. Evidence for a small anion-selective channel in the cell wall of *Mycobacterium bovis* BCG besides a wide cation-selective pore. *FEBS letters*, 454 (3), pp.349–355.
- Lichtinger, T., Reiss, G. & Benz, R., 2000. Biochemical identification and biophysical characterization of a channel-forming protein from *Rhodococcus erythropolis*. *Journal of bacteriology*, 182 (3), pp.764–770.
- Liebl, W., 2006. –Nonmed i cal. In *Prokaryotes*. pp. 796–818.
- Linhartov, I., 2010. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. , 34, pp.1076–1112.
- Linós, A. et al., 1999. *Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. *International journal of systematic bacteriology*, 49 Pt 4, pp.1785–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555361> [Accessed December 27, 2013].
- Linós, A. et al., 2002. *Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52 (Pt 4), pp.1133–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12148617> [Accessed December 27, 2013].

- Liu, Y. et al., 2011. *Gordonia neofelifaecis* sp. nov., a cholesterol side-chain-cleaving actinomycete isolated from the faeces of *Neofelis nebulosa*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61 (Pt 1), pp.165–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190025> [Accessed December 16, 2013].
- Mafakheri, S. et al., 2014. Discovery of a cell wall porin in the mycolic-acid-containing actinomycete *Dietzia maris* DSM 43672. *FEBS Journal*, 281 (8), pp.2030–2041.
- Mahfoud, M., Sukumaran, S., Grieger, K., et al., 2006. Topology of the Porin MspA in the Outer Membrane of.
- Mahfoud, M., Sukumaran, S., Hülsmann, P., et al., 2006. Topology of the porin MspA in the outer membrane of *Mycobacterium smegmatis*. *The Journal of biological chemistry*, 281 (9), pp.5908–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16352610> [Accessed December 24, 2013].
- Mailaender, C. et al., 2004. The MspA porin promotes growth and increases antibiotic susceptibility of both *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*, 150 (Pt 4), pp.853–864. Available at: <http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.26902-0> [Accessed December 16, 2013].
- Makino, K. et al., 1998. Complete nucleotide sequences of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak. *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 5 (1), pp.1–9.
- Marassi, F.M., 2011. NIH Public Access. , 49 (13), pp.2768–2777.
- Marchler-Bauer, A. et al., 2011. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic acids research*, 39 (Database issue), pp.D225–D229. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3013737&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 13, 2013].
- Margulies, M. et al., 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437 (7057), pp.376–380.
- Matsui, T. et al., 2001. Benzo[b]thiophene desulfurization by *Gordonia rubropertinctus* strain T08. *Applied microbiology and biotechnology*, 57 (1-2), pp.212–5. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11693923> [Accessed December 27, 2013].
- De Miguel, T. et al., 2001. Analysis of canthaxanthin and related pigments from *Gordonia jacobaea* mutants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49 (3), pp.1200-1202.
- De Miguel, T. et al., 2000. Isolation and taxonomic study of a new canthaxanthin-containing bacterium, *Gordonia jacobaea* MV-1 sp. nov. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 3 (2), pp.107-111.
- Mikolasch, A., Hammer, E. & Schauer, F., 2003. Synthesis of imidazol-2-yl amino acids by using cells from alkane-oxidizing bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 69 (3), pp.1670-9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=150088&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 27, 2013].
- Mohebbi, G. et al., 2008. Dimethyl sulfoxide (DMSO) as the sulfur source for the production of desulfurizing resting cells of *Gordonia alkanivorans* RPI90A. *Microbiology (Reading, England)*, 154 (Pt 3), pp.878-85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18310033> [Accessed December 27, 2013].
- Molle, V. et al., 2006. pH-dependent pore-forming activity of OmpATb from *Mycobacterium tuberculosis* and characterization of the channel by peptidic dissection. *Molecular microbiology*, 61 (3), pp.826-837. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16803587> [Accessed December 16, 2013].
- Moormann, M. et al., 1997. A new glycosylated lipopeptide incorporated into the cell wall of a smooth variant of *Gordonia hydrophobica*. *The Journal of biological chemistry*, 272 (16), pp.10729-10738. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.272.16.10729> [Accessed December 16, 2013].
- Nakae, T., 1976. Outer membrane of *Salmonella*. Isolation of protein complex that produces transmembrane channels. *The Journal of biological chemistry*, 251 (7), pp.2176-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/773934> [Accessed December 30, 2013].
- National Center for Biotechnology Information, National Center for Biotechnology Information. Available at: www.ncbi.nlm.nih.gov.

- Nazina, T.N. et al., [Production of oil-processing compounds by microorganisms from the Daqing oil field, China]. *Mikrobiologiya*, 72 (2), pp.206–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12751245> [Accessed December 27, 2013].
- Niederweis, M. et al., 1999. Cloning of the mspA gene encoding a porin from *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular microbiology*, 33 (5), pp.933–945.
- Niederweis, M. et al., 1995. Identification of channel-forming activity in the cell wall of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of bacteriology*, 177 (19), pp.5716–5718.
- Niederweis, M., 2003. Mycobacterial porins--new channel proteins in unique outer membranes. *Molecular microbiology*, 49 (5), pp.1167–1177. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2003.03662.x> [Accessed December 16, 2013].
- Nikaido, H., 2003. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. , 67 (4), pp.593–656.
- Nishioka, T. et al., 2006. A mono-2-ethylhexyl phthalate hydrolase from a *Gordonia* sp. that is able to dissimilate di-2-ethylhexyl phthalate. *Applied and environmental microbiology*, 72 (4), pp.2394–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1449075&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 27, 2013].
- Omasits, U. et al., 2013. Protter : interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. , 2, pp.3–5.
- Omasits, U. et al., 2014. Sequence analysis Protter : interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. , 30 (6), pp.884–886.
- Pagilla, K.R., Sood, A. & Kim, H., 2002. *Gordonia* (nocardia) *amarae* foaming due to biosurfactant production. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 46 (1-2), pp.519–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12216680> [Accessed December 27, 2013].
- Park, S. & Bendelac, A., 2000. CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. , 406 (August), pp.15–19.
- Pavlenok, M. et al., 2012. MspA Nanopores from Subunit Dimers. *PLoS ONE*, 7 (6), p.e38726. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3377714&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 16, 2013].

Pfultz, R.F. et al., 2000. Characterization of passage-selected vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of diverse parental backgrounds. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44 (2), pp.294-303. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=89674&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 31, 2013].

Pham, A.S. et al., 2003. Catheter-related bacteremia caused by the nocardioform actinomycete *Gordonia terrae*. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 36 (4), pp.524-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12567313> [Accessed December 27, 2013].

Piñeiro, Á., Bond, P.J. & Khalid, S., 2011. Exploring the conformational dynamics and membrane interactions of PorB from *C. glutamicum*: A multi-scale molecular dynamics simulation study. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808 (6), pp.1746-1752. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.02.015>.

Poetsch, A., Haussmann, U. & Burkovski, A., 2011. Proteomics of corynebacteria: From biotechnology workhorses to pathogens. *Proteomics*, 11 (15), pp.3244-3255. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21674800> [Accessed December 16, 2013].

Poonwan, N. et al., 2005. Characterization of clinical isolates of pathogenic *Nocardia* strains and related actinomycetes in Thailand from 1996 to 2003. *Mycopathologia*, 159 (3), pp.361-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15883719> [Accessed December 27, 2013].

Prasanna, A.N. & Mehra, S., 2013. Comparative Phylogenomics of Pathogenic and Non-Pathogenic *Mycobacterium*. *PLoS ONE*, 8 (8).

Raynaud, C. et al., 2002. The functions of OmpATb, a pore-forming protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology*, 46 (1), pp.191-201.

Remmert, M. et al., 2010. Evolution of Outer Membrane b-Barrels from an Ancestral bb Hairpin Research article. , 27 (6), pp.1348-1358.

Renvoise, A. et al., 2009. *Gordonia sputi* bacteremia. *Emerging infectious diseases*, 15 (9), pp.1535-7. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2819866&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 27, 2013].

- Richet HM, Craven PC, Brown JM, Lasker BA, Cox CD, McNeil MM, Tice AD, Jarvis WR, T.O., 1991. A cluster of *Rhodococcus* (Gordona) Bronchialis sternal-wound infections after coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med*, 10 (324), pp.104-9.
- Ridgeway, T. & Nw, L., 2000. T-Coffee : A Novel Method for Fast and Accurate Multiple Sequence Alignment.
- Riess, F. & Benz, R., 2000. Discovery of a novel channel-forming protein in the cell wall of the non-pathogenic *Nocardia corynebacteroides*. , 1509, pp.485-495.
- Riess, F.G. et al., 2001a. Study of the properties of a channel-forming protein of the cell wall of the gram-positive bacterium *Mycobacterium phlei*. *The Journal of membrane biology*, 182 (2), pp.147-157. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00232-001-0037-x> [Accessed December 16, 2013].
- Riess, F.G. et al., 2001b. Study of the properties of a channel-forming protein of the cell wall of the gram-positive bacterium *Mycobacterium phlei*. *The Journal of membrane biology*, 182 (2), pp.147-57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11447506> [Accessed January 4, 2014].
- Riess, F.G. et al., 2003. The cell wall of the pathogenic bacterium *Rhodococcus equi* contains two channel-forming proteins with different properties. *Journal of bacteriology*, 185 (9), pp.2952-2960.
- Riess, F.G. et al., 1998. The cell wall porin of *Nocardia farcinica*: biochemical identification of the channel-forming protein and biophysical characterization of the channel properties. *Molecular microbiology*, 29 (1), pp.139-150.
- Riess, F.G. et al., 1999. The cell wall porin of the gram-positive bacterium *Nocardia asteroides* forms cation-selective channels that exhibit asymmetric voltage dependence. *Archives of microbiology*, 171 (3), pp.173-182.
- Roche, 2010. 454 Sequencing System Software Manual , v 2 . 5p1 August 2010. *System*, (August), pp.1-45.

- Ronaghi, M. et al., 1999. Analyses of secondary structures in DNA by pyrosequencing. *Analytical biochemistry*, 267 (1), pp.65-71.
- Saeki, H. et al., 2009. Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058. *Bioresource technology*, 100 (2), pp.572-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18692393> [Accessed December 21, 2013].
- Sambrook J., 2001. *Molecular cloning a laboratory manual* Third Edit., CSHL PRESS.
- Schägger, H., 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols*, 1 (1), pp.16-22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406207> [Accessed December 13, 2013].
- Schägger, H. & Jagow, G. Von, 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 1 (166), pp.368-79. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269787905872> [Accessed May 10, 2014].
- Schiffler, B. et al., 2007. *Corynebacterium diphtheriae*: identification and characterization of a channel-forming protein in the cell wall. *Journal of bacteriology*, 189 (21), pp.7709-19. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2168714&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 16, 2013].
- Schneider, K. et al., 2008. Bendigoles A approximately C, new steroids from *Gordonia australis* Acta 2299. *The Journal of antibiotics*, 61 (6), pp.356-364.
- Schulein, K., Schmid, K. & Benzl, R., 1991. The sugar-specific outer membrane channel ScrY contains functional characteristics of general diffusion pores and substrate-specific porins. *Molecular microbiology*, 5 (9), pp.2233-2241.
- Schulz, G.E., 2002. The structure of bacterial outer membrane proteins. , 1565, pp.308-317.
- Seemann, T., 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30 (14), pp.2068-2069.
- Sen, T.Z. et al., 2005. GOR V server for protein secondary structure prediction. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21 (11), pp.2787-2788.

- Senaratne, R.H. et al., 1998. Expression of a Gene for a Porin-Like Protein of the OmpA Family from Mycobacterium Expression of a Gene for a Porin-Like Protein of the OmpA Family from Mycobacterium tuberculosis H37Rv.
- Shavandi, M. et al., 2009. Biodesulfurization of dibenzothiophene by recombinant *Gordonia alkanivorans* RIPI90A. *Bioresource technology*, 100 (1), pp.475-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18653330> [Accessed December 27, 2013].
- Shavandi, M. & Sadeghizadeh, M., 2010. Genomic structure and promoter analysis of the dsz operon for dibenzothiophene biodesulfurization from *Gordonia alkanivorans* RIPI90A. , pp.1455-1461.
- Siddiqui, N., Toumeh, a. & Georgescu, C., 2012. Tibial Osteomyelitis Caused by *Gordonia bronchialis* in an Immunocompetent Patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (9), pp.3119-3121. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3421797&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 16, 2013].
- Sievers, F. & Higgins, D.G., 2014. Clustal omega. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]*, 48, pp.3.13.1-3.13.16.
- Singh, J.P.N. & Verma, R., 2008. Cloning and molecular characterization of outer membrane protein A (ompA) gene from *Mycobacterium bovis*. *Microbiology and immunology*, 52 (8), pp.410-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18667040> [Accessed December 16, 2013].
- Singh, P.R. et al., 2012. Pulling peptides across nanochannels: resolving peptide binding and translocation through the hetero-oligomeric channel from *Nocardia farcinica*. *ACS nano*, 6 (12), pp.10699-707. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23121560>.
- Siroy, A. et al., 2008. Rv1698 of *Mycobacterium tuberculosis* represents a new class of channel-forming outer membrane proteins. *The Journal of biological chemistry*, 283 (26), pp.17827-17837. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2440620&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 16, 2013].
- Smit, J. & Nikaido, H., 1978. Electron microscopic studies on porin insertion sites and growth of cell surface of Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria XVIII . Electron Microscopic Studies on Porin Insertion Sites and Growth of Cell Surface of *Salmonella typhimurium*.

Bibliografía

- Sng, L.-H. et al., 2004. Bacteremia caused by *Gordonia bronchialis* in a patient with sequestrated lung. *Journal of clinical microbiology*, 42 (6), pp.2870-1. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=427817&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 27, 2013].
- Soltan Mohammadi, N. et al., 2013. Identification and characterization of the channel-forming protein in the cell wall of *Corynebacterium amycolatum*. *Biochimica et biophysica acta*, 1828 (11), pp.2574-2582. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23811360> [Accessed December 16, 2013].
- Somalinga, V. & Mohn, W.W., 2013. Rhodococcus jostii porin A (RjpA) functions in cholate uptake. *Applied and environmental microbiology*, 79 (19), pp.6191-3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23892747> [Accessed December 16, 2013].
- Song, H. et al., 2012. acidic environments. , 80 (4), pp.900-918.
- Song, H. et al., 2008. Identification of outer membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 88 (6), pp.526-544. Available at: [file://localhost/Volumes/Files/Papers/Tuberculosis \(Edinb\) 2008 Song.pdf](file://localhost/Volumes/Files/Papers/Tuberculosis%20(Edinb)%202008/Song.pdf) \npapers://7a5266c5-23b9-4a12-9ce0-f2ea564cee0d/Paper/p1053 [Accessed December 16, 2013].
- Stackebrandt E, Rainey FA, W.-R.N., 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int J Syst Bacteriol*, 47, pp.479-91.
- Stackebrandt, E., 1988. Phylogenetic relationships vs. phenotypic diversity: how to achieve a phylogenetic classification system of the eubacteria. *Canadian journal of microbiology*, 34 (4), pp.552-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3052761> [Accessed December 24, 2013].
- Stahl, C. et al., 2001. MspA provides the main hydrophilic pathway through the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular microbiology*, 40 (2), pp.451-464.
- Stephan, J. et al., 2005. The growth rate of *Mycobacterium smegmatis* depends on sufficient porin-mediated influx of nutrients. *Molecular microbiology*, 58 (3), pp.714-30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16238622> [Accessed December 24, 2013].

- Stobdan, T. et al., 2008. Degradation of pyridine and 4-methylpyridine by *Gordonia terre* IIPN1. *Biodegradation*, 19 (4), pp.481-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17922211> [Accessed December 27, 2013].
- Svetlíková, Z. et al., 2009. Role of porins in the susceptibility of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium chelonae* to aldehyde-based disinfectants and drugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53 (9), pp.4015-4018. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2737867&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 16, 2013].
- Ta-Chen, L., Chang, J.-S. & Young, C.-C., 2008. Exopolysaccharides produced by *Gordonia alkanivorans* enhance bacterial degradation activity for diesel. *Biotechnology letters*, 30 (7), pp.1201-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18286235> [Accessed December 27, 2013].
- Takaichi, S. et al., 2008. Carotenoids in a *Corynebacterineae*, *Gordonia terrae* AIST-1: carotenoid glucosyl mycoloyl esters. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72 (10), pp.2615-22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18838810> [Accessed December 27, 2013].
- Teriete, P. et al., 2010. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0899 adopts a mixed alpha/beta-structure and does not form a transmembrane beta-barrel. *Biochemistry*, 49 (13), pp.2768-2777.
- Trias, J. & Benz, R., 1993. Characterization of the Channel Formed by the *Mycobacterial* Porin in Lipid Bilayer Membranes. , (5), pp.6234-6240.
- Trias, J., Jarlier, V. & Benz, R., 1992. Porins in the cell wall of mycobacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 258 (5087), pp.1479-1481.
- Tsukamura, M. & Mizuno, S., 1971. [A new species *Gordonia aurantiaca* occurring in sputa of patients with pulmonary disease]. *Kekkaku : [Tuberculosis]*, 46 (4), pp.93-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5572851> [Accessed December 24, 2013].
- Valouev, A. et al., 2008. A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome research*, 18 (7), pp.1051-1063.

- Veiga-Crespo, P. et al., 2005. Influence of culture conditions of *Gordonia jacobaea* MV-26 on canthaxanthin production. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 8 (1), pp.55–58.
- Verma, P. et al., 2006. Native valve endocarditis due to *Gordonia polyisoprenivorans*: case report and review of literature of bloodstream infections caused by *Gordonia* species. *Journal of clinical microbiology*, 44 (5), pp.1905–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1479208&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 27, 2013].
- Veyron-Churlet, R. et al., 2011. Expression of OmpATb is dependent on small membrane proteins in *Mycobacterium bovis* BCG. *Tuberculosis*, 91 (6), pp.544–548. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21802366> [Accessed December 16, 2013].
- Wang, D. et al., 2014. Regulating the Transport of DNA through Biofriendly Nanochannels in a Thin Solid Membrane. *Scientific reports*, 4, p.3985. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3914175&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wang, L., Liu, Y. & Shao, Z., 2009. [Isolation and identification of a hydrocarbon-degrading bacterium *Gordonia* sp. S14-10 from the surface water of Atlantic Ocean and analysis on its related characteristics]. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica*, 49 (12), pp.1634–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20222450> [Accessed December 27, 2013].
- Wang, X., Li, X. & Li, Y., 2007. A modified Coomassie Brilliant Blue staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis. *Biotechnology letters*, 29 (10), pp.1599–1603. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17563857> [Accessed December 16, 2013].
- Werno, A.M. et al., 2005. Recurrent breast abscess caused by *Gordonia bronchialis* in an immunocompetent patient. *Journal of clinical microbiology*, 43 (6), pp.3009–10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1151891&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 27, 2013].
- Woese, C.R. et al., 2000. Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 64 (1), pp.202–36. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=98992&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 31, 2013].

- Woese, C.R., 1987. Bacterial Evolution. , 51 (2), pp.221–271.
- Van der Woude, A.D. et al., 2013. Differential detergent extraction of mycobacterium marinum cell envelope proteins identifies an extensively modified threonine-rich outer membrane protein with channel activity. *Journal of bacteriology*, 195 (9), pp.2050–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23457249> [Accessed December 16, 2013].
- Xu, L. et al., 2011. [Isolation and identification of a pyrene-degrading bacterial strain from contaminated soil]. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica*, 51 (3), pp.313–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21604545> [Accessed December 27, 2013].
- Xue, Y. et al., 2003. *Gordonia paraffinivorans* sp. nov., a hydrocarbon-degrading actinomycete isolated from an oil-producing well. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53 (Pt 5), pp.1643–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13130063> [Accessed December 27, 2013].
- Yada, T. et al., 2001. A Novel Bacterial Gene-Finding System with Improved Accuracy in Locating Start Codons. , 106, pp.97–106.
- Yang, Y. et al., 2011. Structure of the Mycobacterium tuberculosis OmpATb protein: a model of an oligomeric channel in the mycobacterial cell wall. *Proteins*, 79 (2), pp.645–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21117233> [Accessed December 16, 2013].
- Yeo, Z.X. et al., 2012. Improving indel detection specificity of the Ion Torrent PGM benchtop sequencer. *PloS one*, 7 (9), p.e45798.

El periodo de duración del trabajo experimental de esta tesis ha permitido la participación en varios proyectos de investigación, cuya producción se puede ver en los siguientes documentos:

