

**Purificación e cristalización da proteína de membrana
FrpA, de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*,
e o seu sideróforo piscibactina**

Purificación y cristalización de la proteína de membrana FrpA, de
Photobacterium damsela subsp. *piscicida*, y su sideróforo
piscibactina

Purification and crystallization of the FrpA membrane protein, from
Photobacterium damsela subsp. *piscicida*, and its siderophore
piscibactine

Traballo de fin de máster presentado por:

Óscar Ousinde Suárez

A Coruña, xaneiro 2017

PRONAMAR
Productos Naturales Marinos



CICA

ADVANCED SCIENTIFIC
RESEARCH CENTER





AUTORIZACIÓN DOS TITORES

Dr. Carlos Jiménez González e Dr. Antón Vila Sanjurjo, en calidade de titores do presente traballo titulado:

“Purificación e cristalización da proteína de membrana FrpA, de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, e o seu sideróforo piscibactina”

“Purificación y cristalización de la proteína de membrana FrpA, de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, y su sideróforo piscibactina”

“Purification and crystallization of the FrpA membrane protein, from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, and its siderophore piscibactine”

autorizan a súa presentación ante o Tribunal Avaliador.

A Coruña 30 de xaneiro de 2017. Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña.

Fdo. Dr. Carlos Jiménez González

Fdo. Dr. Antón Vila Sanjurjo

Traballo realizado por **Óscar Ousinde Suárez**, no grupo de Química de Produtos Naturales Marinos, **PRONAMAR**. Centro de Investigacións Científicas Avanzadas, **CICA**.



PRONAMAR
Productos Naturales Marinos

AGRADECIMENTOS

Aos meus titores Dr. Carlos Jiménez González e Dr. Antón Vila Sanjurjo, por dar-me a oportunidade de realizar este traballo.

Á Dra. Andrea Katherine Valderrama Pereira, por instruírme no tema do traballo, ensinarme e estar sempre dispoñible para min.

Ao Dr. Alberto Núñez Cardezo, pola súa amabilidade e cooperación no traballo realizado na Unidade de Análise Estructural do SAI, da cal é responsable.

Ao Dr. Gerardo Fernández Martínez, polas análises de espectrometría de masas realizados.

Por último, pero non menos importante, a todos os que formades parte do grupo PRONAMAR, Dr. Jaime Rodríguez González, Dra. Rosa María Nieto Prieto, Juan Carlos, Javier e en especial a Diana, sempre presente para calquera dúbida que me puidese xurdir ao longo deste traballo.

Só podo dicir, GRACIAS

Óscar Ousinde Suárez

RESUMO

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* é una bacteria Gram negativa e axente causante da pasteurelosis en peixes. Esta enfermidade causa a morte do individuo que a sofre en etapas iniciais do desenvolvemento animal, causando importantes perdas económicas en sistemas de acuicultura. A bacteria patóxena obxecto de estudo neste traballo posúe un sistema de captación de ferro (fundamental para o proceso de infección) a través da emisión ao exterior celular do sideróforo piscibactina, onde quelata fortemente ao Fe(III) ao formar o complexo sideróforo-Fe(III). O complexo é introducido ao interior celular, gracias ao receptor de membrana externa FrpA e aos sistemas ABC integrados na membrana interna. O obxectivo deste traballo é a purificación da proteína de interese FrpA e do complexo piscibactina-Fe(III), para poder realizar os primeiros ensaios de cristalización da combinación de ambos. O estudo dos cristais por raios X, permitirá a observación das interaccións proteína-sideróforo para poder elaborar conxugados de sondas fluorescentes e o deseño de estratexias tipo “Cabalo de Troia”, onde un fármaco coñecido pode ser unido ao sideróforo, e así chegar a loitar contra a bacteria dunha forma máis efectiva, aumentando o rendemento, os procesos de produción e o benestar animal no sector da acuicultura.

RESUMEN

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* es una bacteria Gram negativa y agente causante de la pasteurelosis en peces. Esta enfermedad causa la muerte del individuo que la sufre en etapas iniciales del desarrollo animal, causando importantes pérdidas económicas en sistemas de acuicultura. La bacteria patógena objeto de estudio en este trabajo posee un sistema de captación de hierro (fundamental para el proceso de infección) a través de la emisión al exterior celular del sideróforo piscibactina, donde quelata fuertemente al Fe(III) al formar el complejo sideróforo-Fe(III). El complejo es introducido al interior celular, gracias al receptor de membrana externa FrpA y a los sistemas ABC integrados en la membrana interna. El objetivo de este trabajo es la purificación de la proteína de interés FrpA y del complejo piscibactina-Fe(III), para poder realizar los primeros ensayos de cristalización de la combinación de ambos. El estudio de los cristales por rayos X, permitirá la observación de las interacciones proteína-sideróforo, para poder elaborar conjugados de sondas moleculares fluorescentes y el diseño de estrategias tipo “Caballo de Troya”, donde un fármaco conocido puede ser unido al sideróforo, y así llegar a luchar contra la bacteria de una forma más efectiva, aumentando el rendimiento, los procesos de producción y el bienestar animal en el sector de la acuicultura.

ABSTRACT

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* is a gram negative bacterium and causative agent of pasteurellosis in fish. This disease causes the death of the individual who suffers it at initial stages of animal development, causing important economic losses in aquaculture systems. The pathogenic bacterium studied in this work has a system of iron uptake (fundamental for the infection process) through the emission to the extracellular medium of the piscibactin siderophore, where it chelates strongly to Fe (III) when forming the siderophore- Fe(III) complex. The complex is introduced into the cell, thanks to the outer membrane receptor FrpA and to the ABC systems integrated in the inner membrane. The objective of this work is the purification of the protein of interest FrpA and of the complex piscibactine-Fe(III), to be able to realize the first crystallization tests of the combination of both. The study of crystals by X-rays, will allow the observation of protein-siderophore interactions, to be able to elaborate conjugates of fluorescent molecular probes and the design of strategies “Trojan horse” type, where a known drug can be attached to the siderophore, and thus, to combat the bacteria more effectively, increasing yield, production processes and animal welfare in the aquaculture sector.

ÍNDICE DE CONTIDOS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Introdución	1
A Acuicultura no mundo e en Galicia	1
<i>Photobacterium damsela</i> e subespecie <i>piscicida</i> e pasteurelosis	6
Cristalización	13
Difracción de Raios X.....	15
Obxectivos	16
Material e métodos	17
Material.....	17
Purificación da proteína de membrana rFrpA.....	17
Illamento da proteína de membrana rFrpA mediante FPLC.....	19
Cristalización da proteína de membrana rFrpA.....	20
Purificación do sideróforo piscibactina	22
Resultados	24
Purificación e illamento da proteína rFrpA	24
Xeles de poliacrilamida SDS-PAGE.....	24
Cromatografía líquida rápida de proteínas, <i>FPLC</i>	26
Cristalización da proteína rFrpA.....	27
Difracción de Raios X.....	29
Purificación do sideróforo piscibactina	30
Discusión	32
A proteína rFrpA.....	32
O sideróforo piscibactina	33
Conclusións	35
Bibliografía	36

ANEXO I

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABC	<i>ATP Binding Cassette</i> (Dominio de unión a ATP)
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
ATP	Trifosfato de adenosina
Da	Dalton
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Ionización por electrospray)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida rápida de proteínas)
KDa	KiloDalton
LB	<i>Luria Bertani</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía líquida-espectrometría de masas)
LDAO	N-óxido de N,N-Dimetildodecilamina
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MPD	2-metil-2,4-pentanodiol
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
NRPS	<i>Non Ribosomal Peptide Synthetase</i> (Sintetasas peptídicas non ribosomais)
PAI	<i>Pathogenicity Island</i> (Illa patoxénica)
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (Banco de datos de proteínas)
PEG	Polietilenglicol
PKS	<i>Polyketide Synthases</i> (Policétido sintetasa)
rFrpA	<i>Recombinant FrpA protein</i> (Proteína FrpA recombinante)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SAI	Servicios de Apoio á Investigación
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extracción en fase sólida)
TB	<i>Terrific Broth</i>
TBDTs	<i>TonB Dependant Transporters</i> (Transportadores dependentes de TonB)
UDC	Universidade da Coruña
USD	<i>United States Dollars</i>
UV	Ultravioleta

Introdución

A Acuicultura no mundo e en Galicia

O acceso a unha alimentación equilibrada é algo que todo organismo debe de suplir de forma axeitada. Deste xeito faise posible a obtención da enerxía necesaria para desenvolver, con maior ou menor capacidade, as actividades fisiolóxicas necesarias para a vida. Ao longo da historia evolutiva da Terra, millóns de especies de organismos adaptan a súa bioloxía condicionados polo ambiente no que viven para obter alimento (Wiley, 2015).

Sistemas de inxestión de alimentos, capacidade de dixestión, sistemas de distribución de nutrientes, miles de enzimas traballando sen cesar nos distintos órganos do corpo para tratar de metabolizar todos os compostos que levan ao mantemento da vida. Todo isto gracias á evolución de milleiros de anos. A xoia da coroa da evolución no ser humano seguramente sexa un dos órganos que representa a nosa condición como tal; o cerebro.

O cerebro emprega como principal fonte de enerxía a glucosa. No *Homo sapiens* antigo esta enerxía era aportada por todos os vexetais que eran inxeridos na dieta, xa que os animais non almacenan glucosa en grandes cantidades (Milton, 2003). Outra alternativa é que, dado o carácter omnívoro do ser humano, a proteína e a graxa animal fose necesaria para o crecemento do cerebro adulto segundo demostran certos estudos (Kuipers et al. 2010). O cerebro fetal consume arredor do 70 % da enerxía aportada pola nai, sendo clave a incorporación de ácido docosahexanoico, un ácido graxo omega-3 esencial para o correcto desenvolvemento do cerebro. É por isto polo que o *Homo sapiens* antigo, tivo que recorrer a alimentos coma o peixe e os crustáceos na súa dieta (Broadhurst et al. 2002).

Na actualidade, o consumo de peixe forma parte da dieta diaria. É un produto rico en ácidos omega-3 e omega-6, vitaminas e minerais coma calcio, fósforo e ferro. Constitúe un alimento equilibrado e moi nutritivo, moi útil na prevención e tamén na recuperación fronte a enfermidades cardiovasculares (De Berrazueta e De Berrazueta, 2007). O precursor desta idea, actualmente un feito, foi Hugh Sinclair na década de 1940, quen analizou a dieta do pobo Inuit (habitantes da tundra ártica do norte de Alaska, Canadá e Groenlandia). Sinclair observou que aínda que estes individuos consumían enormes cantidades de graxa de foca e peixe cru, apenas presentaban enfermidades cardiovasculares (Sinclair, 1956). Decatouse de que isto era debido a algún tipo de graxa beneficiosa para o organismo. Foi ese o primeiro momento no que se asociou o consumo de peixe a unha dieta equilibrada e protectora contra enfermidades cardiovasculares debido aos ácidos graxos que contén.

Estes ácidos graxos insaturábeis poderían ser a clave para a protección do organismo fronte a numerosas enfermidades. Os aceites de peixe subministrados a ratos de laboratorio con dano renal debido a unha dieta con alto contido en graxas, reducen e incluso alteran positivamente a patoloxía (Coelho et al. 2016). Isto abre unha nova vía para o tratamento de enfermidades asociadas á obesidade.

Dados os antecedentes históricos sobre o consumo de peixe e as súas beneficiosas propiedades sobre a saúde, non é de estrañar que este produto sexa clave na nosa dieta diaria. De feito, no ano 2014 acadouse un novo máximo histórico da oferta mundial de peixe situándose nos 20 quilogramos por persoa. Nos países industrializados a taxa de consumo aparente de peixe por persoa sitúase nos 26,8 quilogramos e no ano 2013 o peixe representou arredor do 17 % da inxestión de proteínas animais da poboación mundial. Todo posible gracias a pesca e a acuicultura que son importantes fontes de alimentos, nutrición, ingresos e medios de vida para centos de millóns de persoas en todo o mundo. Un dos grandes desafíos de futuro será o de alimentar a crecente poboación mundial -máis de 9000 millóns de persoas para o ano 2050- dentro dun contexto de cambio climático, incerteza económica e financeira e aumento da competencia polos recursos naturais cada vez máis explotados e escasos. Tras milenios de produción alimentaria terrestre baseada na caza e na recolección, esta pasou a unha forma de produción de alimentos máis sostible como é a agricultura. De tal xeito, a produción de alimentos acuáticos deixou de basearse de forma principal na captura de peixes salvaxes para evolucionar cara un sistema de cría controlada. En 2014 a produción do sector acuícola para o consumo humano superou por primeira vez a contribución do peixe capturado no medio natural (**Figura 1**). A acuicultura proporcionou o 7 % do peixe para o consumo humano no ano 1974, porcentaxe que aumentou ao 26 % en 1994 e ao 39 % en 2004, sendo China un dos países que máis contribúe a este crecemento con máis do 60 % da produción mundial acuícola. (FAO, 2016). Deste xeito a acuicultura convértese no sector de maior crecemento a nivel mundial na produción de alimentos animais, sendo tamén a principal fonte de consumo de animais acuáticos para o ser humano, contribuindo de forma global a demanda deste alimento (Ottinger et al. 2015).

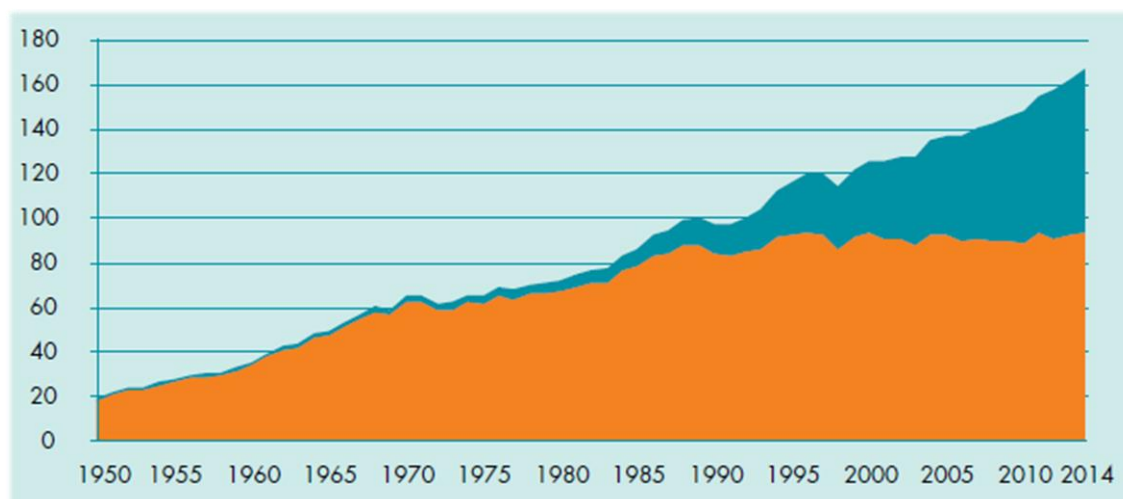


Figura 1. Eixo X: anos, Eixo Y: millóns de toneladas de peixe. En cor amarela a produción da pesca de captura. En cor azul a produción da acuicultura. Fonte: FAO, 2016.

Para a acuicultura e a pesca o comercio internacional representa un papel moi importante xa que crea emprego, provee alimentos, xera ingresos e contribúe de forma xeral ao crecemento e ao desenvolvemento económicos. Isto gracias a que o peixe consolídase coma un dos alimentos máis comercializados dentro do sector alimentario mundial. Estímase que arredor do 78 % dos produtos pesqueiros están expostos a competencia comercial internacional. Para as economías de moitos países e rexións costeiras as exportacións de peixe e produtos pesqueiros (tanto de orixe pesqueiro coma de acuicultura) representan máis do 40 % do valor total dos produtos comercializados, máis do 9 % das exportacións agrícolas totais e o 1 % do valor de comercio mundial de mercadorías.

En 2014 o peixe recollido pola acuicultura ascendeu a 73,8 millóns de toneladas, o que se estimou cun valor de primeira venda de 160.200 millóns de USD, compostos por 49,8 millóns de toneladas de peixe de escama (99.200 millóns de USD), 16,1 millóns de toneladas de moluscos (19.000 millóns de USD), 6,9 millóns de toneladas de crustáceos (36.200 millóns de USD) e 7,3 millóns de toneladas de outros animais acuáticos coma as ras (3.700 millóns de USD) (FAO. 2016). A interacción socio-económica entre a pesca e a acuicultura como forma de obter peixe para a alimentación humana é cada vez máis evidente. O relevante da interacción entre estes dous sectores é que está amosando de forma evidente o proceso de transición da pesca cara a acuicultura (Natale et al. 2012). Á cabeza da produción acuícola sitúase China, seguida pola India e Indonesia. España ocupa un lugar destacado con 266.477 toneladas de peixe producido polo sector da acuicultura situándose nun nivel comparativo con Estados Unidos, Noruega ou Brasil (web: <http://www.fao.org/fishery/naso-maps/naso-maps/en/>) (**Figura 2**).

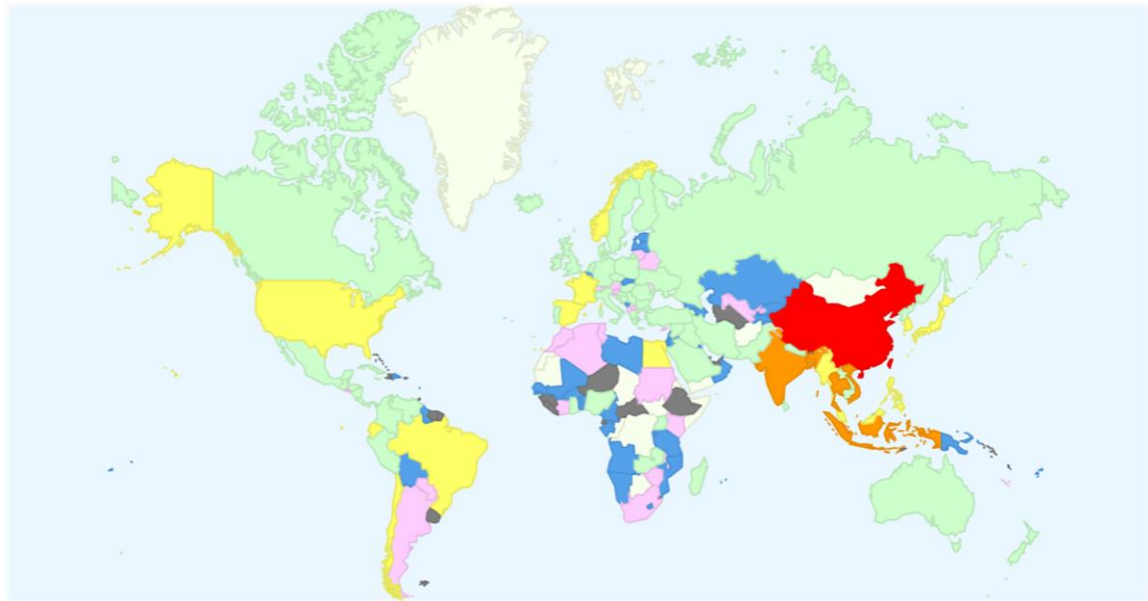


Figura 2. Mapa mundial sobre a produción en toneladas de peixe no sector da acuicultura. **Vermello:** >30.000.000. **Laranxa:** 1.000001-5.000.000. **Amarelo:** 200.001-1.000.000. **Verde:** 5.001-200.000. **Rosa:** 1.001-5.000. **Azul:** 101-1.000. **Gris:** 0-100. **Branco:** sen datos. Fonte: FAO: <http://www.fao.org/fishery/naso-maps/naso-maps/en/>.

España sitúase coma o estado membro da Unión Europea con un maior volume de produción en acuicultura, con 282.242 toneladas en 2014 (22,0 % do total da Unión Europea), seguida polo Reino Unido con 204.617 toneladas (15,9 % do total da Unión) e Francia con 204.300 toneladas (15,9 % do total da Unión). Sen embargo, o valor da produción de Reino Unido supera en máis do dobre ao valor da produción española, situando neste ámbito económico a España no cuarto posto por detrás de Reino Unido, Francia e Grecia.

A pesar da cuarta posición do valor de produción en acuicultura que España ocupa a nivel da Unión Europea, este sector supón unha importante fonte de ingresos para a economía do país. En isto xoga un papel moi importante a nosa comunidade autónoma; Galicia. Toma especial importancia a produción de rodaballo, *Psetta maxima*. No 2015 a produción de rodaballo en España foi de 7.715 toneladas, sendo Galicia a principal Comunidade Autónoma cun 98,6 % da produción (**Figura 3**). A nivel europeo, calcúlase que no 2015 se produciron unhas 11.555 toneladas de rodaballo, das cales 7.815 toneladas as aportou España, ou dito doutra forma, Galicia aportou á produción europea de rodaballo o 67,6 % do total da Unión Europea.

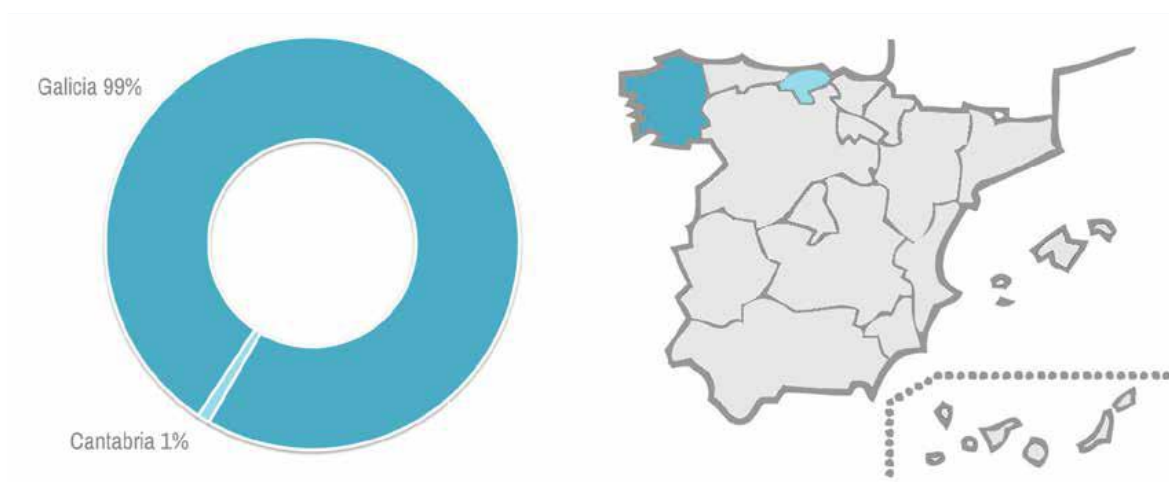


Figura 3. Mapa de distribución da produción de rodaballo en España no ano 2015 (cifras redondeadas, o valor real da produción en Galicia no ano 2014 foi de 98,6 % e 1,4 % en Cantabria). Fonte: La acuicultura en España, 2016 (APROMAR)

Toda esta produción provén nos últimos anos de forma exclusiva da acuicultura (**Figura 4**). A pesca extractiva de rodaballo só se produce noutros países de Europa coma nos Países Baixos, o cal aportou 5.990 toneladas en 2014. Isto fai destacar aínda máis a importancia da produción acuícola desta especie, xa que máis da metade do rodaballo de acuicultura que circula pola Unión Europea provén de Galicia.

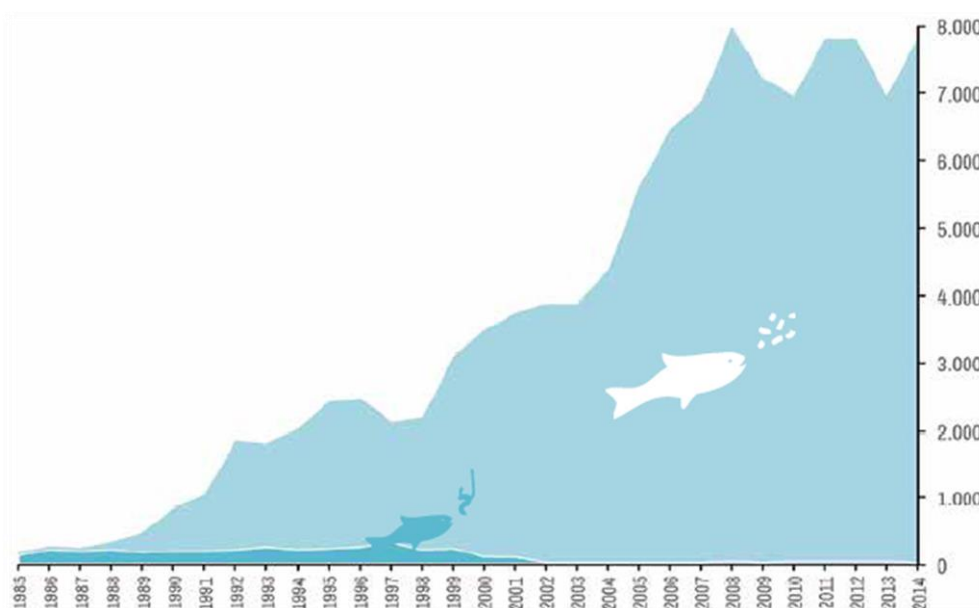


Figura 4. Evolución das fontes de obtención de rodaballo en España: acuicultura (azul claro) e pesca (azul escuro). Eixo X: período en anos de 1985-2014. Eixo Y: toneladas de produción de rodaballo en España. Fonte: La acuicultura en España, 2016 (APROMAR)

Existen tamén outras especies de peixes cultivadas en Galicia ademais do rodaballo que posúen gran importancia para o sector da acuicultura. O linguado, *Solea senegalensis*, é unha especie incorporada recentemente a produción de acuicultura a gran escala. Galicia aporta o 58,4 % da produción en España situándose como produtor principal do país. O prago (máis

coñecido coma pargo ou besugo), *Pagellus bogaraveo* (Figura 5), é unha especie de peixe con produción exclusiva en Galicia. En 2015 puxéronse no mercado 104 toneladas deste peixe, representando o 100 % da produción en acuicultura da Unión Europea (La acuicultura en España, 2016).

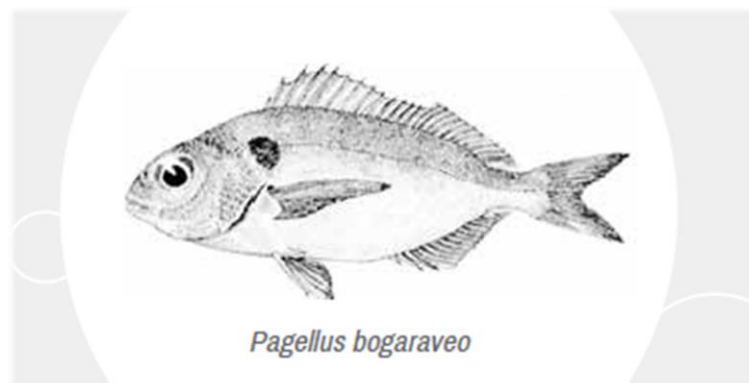


Figura 5. Representación da especie *Pagaellus bogaraveo*. Especie cultivada de forma exclusiva en Galicia. Fonte: La acuicultura en España, 2016 (APROMAR)

Dados os antecedentes sobre a importancia tanto económica como nutricional do consumo de peixe, a acuicultura convértese nun sector clave para o desenvolvemento de Galicia. É por isto polo que os sistemas de cultivo de peixe deben de ser mellorados, incrementando a súa produtividade e calidade, ofrecendo un produto que satisfaga as expectativas da sociedade de consumo.

*Photobacterium damsela*e subespecie *piscicida* e pasteurelosis

Unha das causas que máis perda económicas está a causar no sector da acuicultura son as enfermidades provocadas por bacterias patóxenas en peixes que na maior parte dos casos causan a morte do animal. Unha das máis frecuentes e perigosas é a pasteurelosis, pedra angular deste traballo. Trátase dunha enfermidade emerxente no sector da acuicultura provocada por bacterias das especies *Photobacterium damsela*e. Actualmente é a subespecie *Photobacterium damsela*e subespecie *piscicida* a máis agresiva e a que maior mortalidade está a causar no sector da acuicultura (Martins et al. 2015).

A primeira vez que a pasteurelosis ou pseudotuberculosis se detectou en España foi no ano 1991 en xuvenís de dourada, *Sparus aurata*, na rexión noroeste de España, máis concretamente en Galicia (Toranzo et al. 1991; Magariños et al. 1996).

Os síntomas que provoca a enfermidade son en moitas ocasións inapreciables debido a que as lesións son na maioría dos casos internas. Sen embargo, obsérvase un aumento da

frecuencia respiratoria, hemorraxias na base das aletas, agrandamento do fígado e dos riles e aparición de gránulos formados por bacterias, células epiteliais e fibroblastos, os cales ao romperse diseminan as bacterias por todo o corpo do animal producindo septicemia hemorráxica (**Figura 6**) (Magariños et al. 1996).

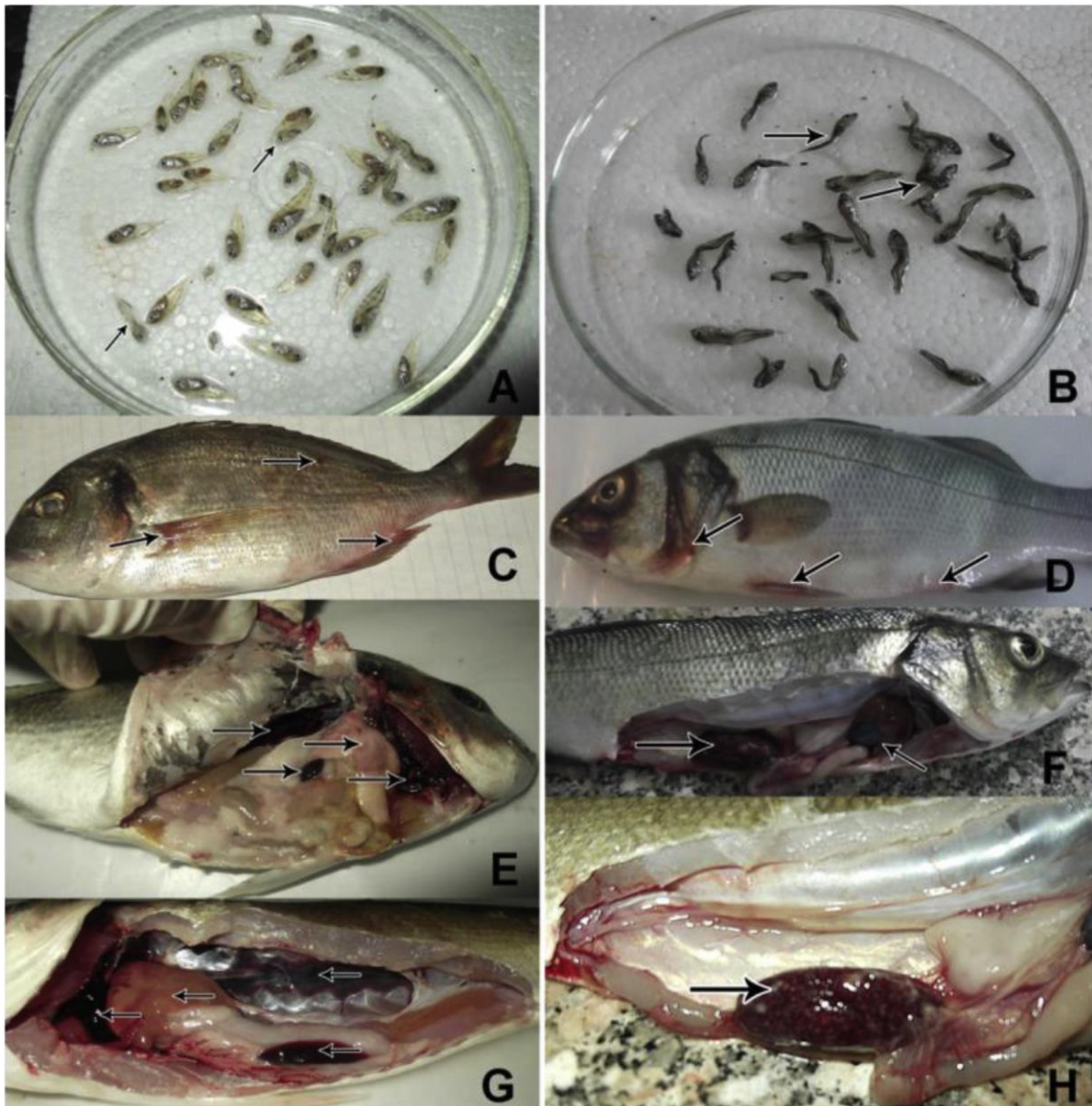


Figura 6. Signos clínicos de pasteurellosis en prago (*Pagaellus bogaraveo*) e robaliza (*Dicentrarchus labrax*). A e B: xuvenís de prago e robaliza que amosan alta mortalidade con ulceracións na pel e deformidades óseas. C e D: signos típicos da enfermidade en prago (C) e robaliza (D) amosando pigmentación escura, branquias pálidas e hemorraxias na base das aletas e erosións na cabeza e laterais do corpo. Dende E a H: lesións internas en prago (E e G) e en robaliza (F e H), amosando agrandamento do fígado e do ril cos típicos depósitos granulosos de cor cincenta, hemorraxia arredor do corazón e acumulación graxa. Fonte: Imaxe extraída de Essam et al. 2016.

A pasteurellosis vese influenciada pola temperatura da auga, sendo un dos factores fundamentais para a supervivencia da bacteria e o desenvolvemento da enfermidade. En peixes expostos a infección por *Photobacterium damsela* piscicida a mortalidade vese

reducida ao manter as larvas de peixe a unha temperatura próxima aos 15 °C. Sen embargo, cando a temperatura aumenta a un rango entre 18 °C e 20 °C, a mortalidade animal incrementábase considerablemente, disto que se suxira a posibilidade de controlar a enfermidade (pasteurelisis) ao controlar a temperatura ambiente da auga onde se desenvolven os primeiros estadios do animal (**Figura 7**) (Magariños et al. 2001).

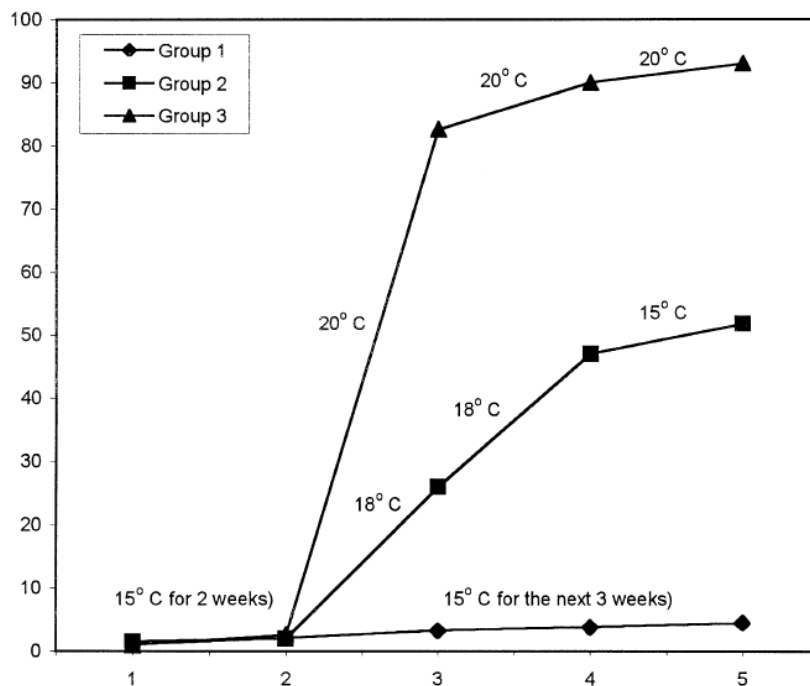


Figura 7. Nesta figura represéntase o tempo en semanas (Eixo X) e o porcentaxe (%) de mortalidade acumulado (Eixo Y) en tres grupos larvas de dourada (*Sparus aurata*) identificados como **Group 1, 2, 3** sometidos a rangos de temperatura diferentes. Apréciase claramente, a baixa mortalidade a unha temperatura de 15°C, aumentando considerablemente entre os 18°C e os 20°C por mor da infección previamente inducida por *Photobacterium damselaepiscicida*. Fonte: Imaxe extraída de Magariños et al. 2001.

A importancia de combater esta enfermidade é tal que a AEMPS, fixo público un informe en xaneiro de 2016 sobre a dispoñibilidade de medicamentos veterinarios no baleiro terapéutico. Este informe inclúe distintas propostas sobre a necesidade de medicamentos animais. No sector da acuicultura, indícase coma medicamentos necesarios de primeira prioridade as vacinas contra a bacteria *Photobacterium damselaepiscicida*, xa nomeado antes coma o axente causante da pasteurelisis en peixes (CODI-VET, 2016).

A bacteria *Photobacterium damselaepiscicida* é unha bacteria Gram negativa, as cales posúen un sistema de dobre membrana cunha capa composta de liposacáridos que rodea a membrana externa. Esta capa actúa en moitas ocasións coma unha primeira barreira contra moitos fármacos, unha das razóns polas cales se están a atopar cada vez máis bacterias Gram negativas superesistentes a antibióticos (Nobre et al. 2013). Para as bacterias existe un elemento que é esencial e que lles axuda a desenvolver as posibles infeccións que poidan

provocar. Ese elemento é o ferro, o cal é un nutriente escaso no medio. Sen embargo o ferro é un compoñente crítico para os procesos celulares. Durante a infección, o ferro é requirido tanto polas células do hospede como polo patóxico que habita nel (Collins, 2003). Por isto moitos patóxicos evolucionaron os seus mecanismos para obter ferro dos seus hospedes e así provocar a infección (Osorio et al. 2006). Para acceder ao ferro, os microorganismos producen e liberan ao medio pequenas moléculas quelantes chamadas sideróforos e ao mesmo tempo producen transportadores de membrana (TBDTs). Estes transportadores son proteínas embebidas na membrana externa, as cales reabsorben de forma activa os sideróforos cargados co ferro captado do medio extracelular (**Figura 8**). Esta toma activa do sideróforo require a forza motora dos protóns transferidos dende a membrana interna a externa a través do complexo TonB. Existe unha gran diversidade de sideróforos en canto á súa estrutura e peso molecular (150-2000 Da), sen embargo, a toma de ferro cara o interior celular gracias aos complexos sideróforo-ferro está condicionada pola alta selectividade de cada sideróforo cun TBDT específico. Dada esta alta selectividade, poderíase pensar que os transportadores TBDT son moi distintos entre si, sen embargo, todos posúen estruturas similares e pertencen a superfamilia de proteínas barril- β de membrana externa (Schalk et al, 2012).

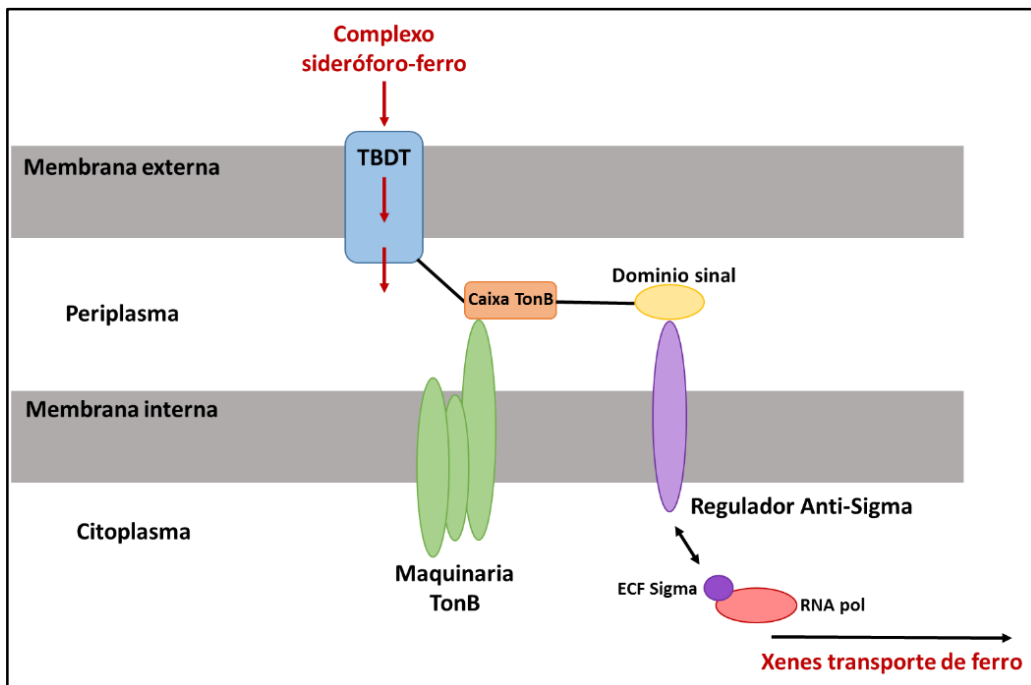


Figura 8. Estructura dos TBDT na membrana celular bacteriana e o seu papel na toma de complexos sideróforo-ferro. Estes complexos son recoñecidos por un TBDT específico que serve para transportar o complexo sideróforo-ferro ao periplasma. Algúns TBDT están implicados na sinalización de cascadas moleculares que levan a transcripción de xenes involucrados na produción de máis proteínas captadoras de ferro. Neste procesos interveñen diferentes compoñentes coma o dominio sinal N-terminal do TBDT ou o regulador sigma. Fonte: deseño propio baseado en Schalk et al. 2012.

Moitos sideróforos son pequenos péptidos que son sintetizados por sintetases peptídicas non ribosomais (NRPSs). A bacteria *P. damsela* subsp. *piscicida* posúe un sistema de captación de ferro de alta afinidade. Nela un cluster de xenes de 35 kilobases foi identificado coma o responsable da síntese dun sideróforo descoñecido ata o momento. Estes xenes están estruturados nunha conformación típica de illa patoxénica (PAI) moi similar a illa de alta patoxenicidade descrita para a bacteria *Yersinia* spp. que codifica para a síntese do sideróforo yersiniabactina (Osorio et al. 2006). A síntese deste sideróforo é un recoñecido factor de alta virulencia coma o da bacteria *Yersinia pestis*, o axente causante da peste bubónica ou peste negra, e coma o de *Yersinia enterocolitica*, a cal causa desordes entéricos graves en humanos. O sideróforo producido pola bacteria *P. damsela* subsp. *piscicida* é sintetizado por un híbrido de sintetasa peptídica non ribosomal (NRPS) e un policétido sintasa (PKS). Un mecanismo moi similar ao descrito para a produción de yersiniabactina. Dacordo coa secuencia aminoacídica atopada no cluster de xenes de *P. damsela* subsp. *piscicida* tomando como modelo a síntese da yersiniabactina, logrouse predicir a estrutura do novo sideróforo descrito como piscibactina (Figura 9), predición que coincidiu co composto illado dun cultivo deficiente en ferro da bacteria e coa descrición que aportan os datos obtidos por métodos espectrométricos como resonancia magnética nuclear (RMN) e espectrometría de masas (MS) (Souto et al. 2012).

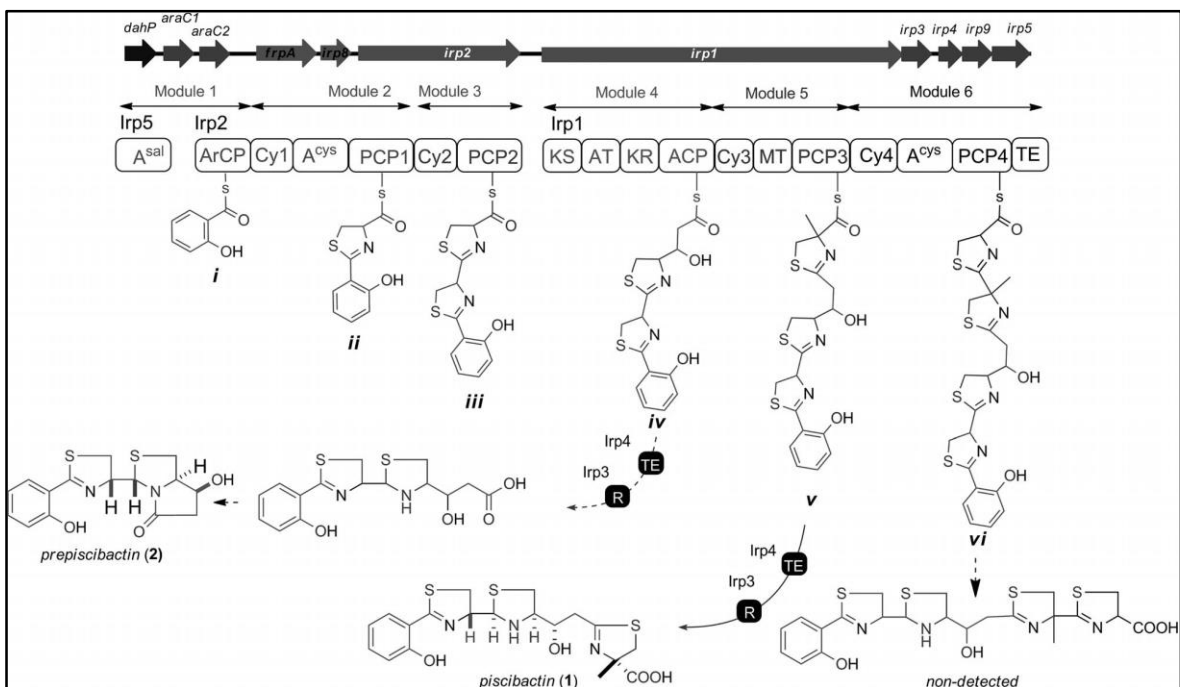


Figura 9. Modelo proposto para a ruta biosintética da piscibactina. Fonte: Souto et al. 2012.

As proteínas de membrana receptoras de sideróforos caracterízanse por ser altamente selectivas. Recoñecen só a estrutura do complexo con Fe(III) formado polo sideróforo. Os receptores proteicos TBDT comparten entre un 20 e un 40 % de identidade mais todos posúen estruturas similares. Están formados por un barril beta con 22 láminas beta anti paralelas, 10 loops periplasmáticos, 11 loops externos e un dominio globular na zona N-terminal que se atopa pregado dentro do barril (**Figura 10**). Son os loops extracelulares e o dominio globular os que regulan a unión do sideróforo e a proteína (Schalk et al, 2012).

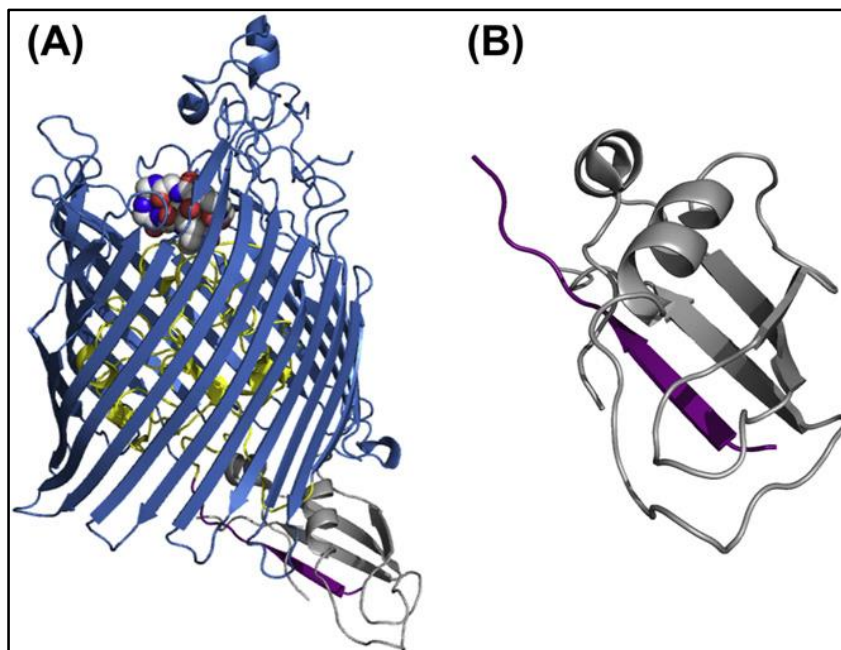


Figura 10. Exemplo de estrutura da proteína de membrana FhuA en complexo coa parte periplásmica de TonB. A: complexo TonB (cor gris)-FhuA (cor azul)-ferricromo (sideróforo en esferas de van der Waals). B: vista da interacción entre a caixa Ton (cor violeta) de FhuA e TonB (cor gris). Fonte: Pawelek et al. (2006).

O poro do barril dos TBDTs está completamente pechado e non permite a difusión de ligandos sen a enerxía necesaria para abrir o poro. A forza motora dos protóns da membrana interna é a fonte de enerxía para o transporte dos complexos sideróforo-Fe(III), a cal é levada aos TBDTs da membrana externa a través dun complexo de tres proteínas de membrana interna: TonB, ExbB e ExbD (Maquinaria TonB en **Figura 8**). A zona final N-terminal de TonB está insertada na membrana citoplasmática e o seu extremo C-proximal interaccionan coa rexión Caixa TonB (**Figura 8**). A interacción entre o sideróforo e a proteína produce un cambio conformacional na mesma. Para que o sideróforo se libere ao periplasma é necesario reverter o cambio conformacional, para o cal se precisa de enerxía proporcionada polo complexo TonB. Disto que os receptores de membrana externa sexan coñecidos tamén coma transportadores dependentes de TonB (TBDTs) (Schalk et al, 2012).

Unha vez o complexo sideróforo-Fe(III) se libera ao periplasma, asóciase coas proteínas periplásmicas de unión (PBPs). Tras isto o complexo é levado aos transportadores da

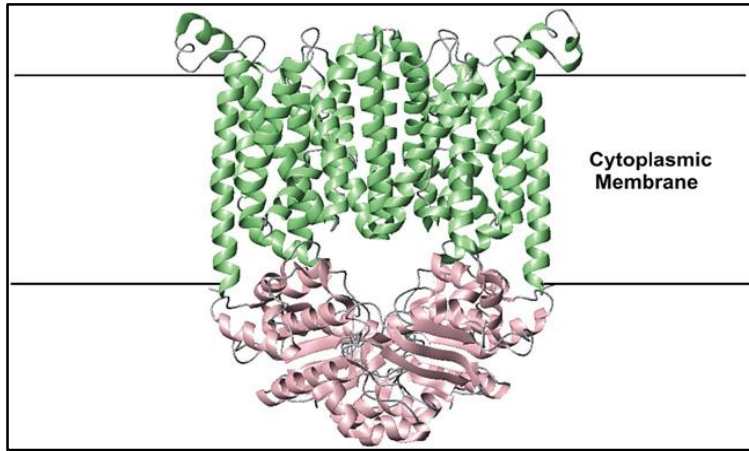


Figura 11. Representación do transportador ABC BtuC₂D₂ de E. coli. BtuC₂D₂ é unha proteína tetramérica composta de dúas hélices α transmembrana (cor verde) e dúas proteínas citoplásmicas ABC (cor rosa). Fonte: imaxe extraída de Krewulak e Vogel, 2008.

membrana interna tipo ABC (Figura 12) para ser transportado ao interior celular. Outro modo de transporte é que o complexo sideróforo-Fe(III) libere a molécula de ferro en forma Fe(II) no periplasma para despois ser transportado directamente ao interior celular por medio dun

transportador tipo ABC, aínda que este método é o menos común. Estes transportadores están amplamente conservados tanto en Bacteria como en Archaea. Tan só unhas poucas especies que non utilizan sideróforos como forma de captación de ferro carecen deste sistema de transporte (Köster, 2001), (Valderrama, 2016). Cando o complexo sideróforo-Fe(III) se asocia coas proteínas PBPs (a forma máis habitual), é levado aos transportadores ABC situados na membrana interna da bacteria. Os transportadores ABC están formados comunmente por catro dominios: dous de transmembrana que constitúen o poro ou canal que atravesa o complexo sideróforo-Fe(III) e dous dominios que hidrolizan o ATP necesario para promover o transporte cara o interior celular (Figura 11) (Krewulak e Vogel, 2008).

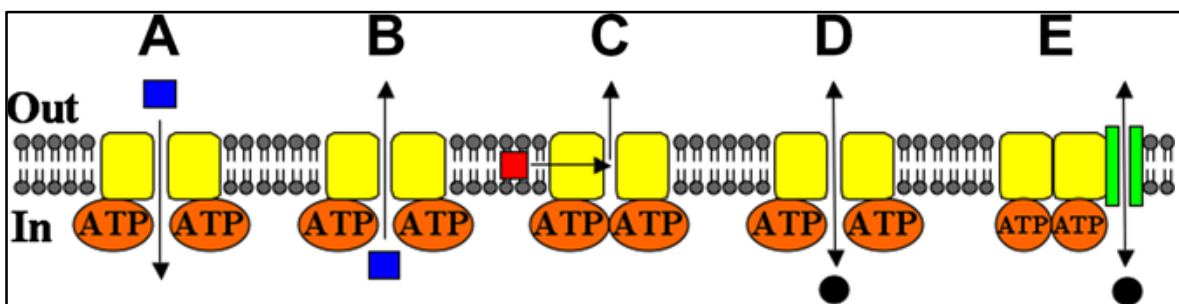


Figura 12. Representación dos distintos tipos de transportadores ABC situados na membrana interna de bacterias Gram - e en células eucariotas de mamíferos. A: importación de substancias. B: exportación de substancias. C: transporte de substancias fora da bicapa lipídica. D: canal iónico. E: reguladores de canal. Fonte: Loo e Clarke, 2008

Para chegar a comprender como as proteínas de membrana funcionan e como os sideróforos interactúan con elas faise necesario coñecer a estrutura molecular de ámbolos dous compoñentes. Unha das formas máis robustas para determinar a estrutura dunha

proteína é a cristalografía de raios X. Sen embargo, con isto aparecen en moitas ocasións as grandes dificultades da purificación e da cristalización proteica. Actualmente preto de 100.000 estruturas proteicas foron depositadas no Banco de Datos de Proteínas (PDB). De todas estas aproximadamente o 90 % foron resoltas por raios X e apenas o 1 % desas estruturas representan as proteínas de membrana (Delmar et al. 2015).

Dunha rápida busca no Banco de Datos de Proteínas observamos 510 estruturas que corresponden a proteínas de membrana, das cales só 40 son receptores de sideróforos. Estas 40 proteínas corresponden a 12 receptores distintos que están asociados ou non a un ligando (Valderrama, 2016). Disto podemos extraer a conclusión da dificultade que implica a obtención de proteínas de membrana, e moito máis a súa cristalización para a resolución por raios X.

A pesar disto, faise necesaria a resolución estrutural de proteínas de membrana e neste caso concreto, o obxectivo último, sería a resolución estrutural da interacción proteína-sideróforo que permitirán o deseño de conxugados que poden ser moi útiles para loitar contra a enfermidade da pasteurelosis. Os conxugados poden ser empregados no mecanismo de captación de ferro co deseño de sondas fluorescentes, para coñecer a vía de entrada dos complexos sideróforo-Fe(III) ao patóxeno, e incluso sintetizar conxugados sideróforo-proteína para o desenvolvemento de vacinas bacterianas (Ji et al. 2012). Da mesma forma pódese empregar a técnica do cabalo de Troia, onde un fármaco coñecido contra o patóxeno en cuestión, sería unido ao sideróforo co fin de atravesar as barreiras primarias de defensa (a parede e a membrana celular da bacteria en caso de ser Gram – como é *P. damsela* subsp. *piscicida*) dunha forma máis efectiva, podendo desta forma diminuír a concentración de fármaco utilizado. Neste caso o sideróforo é a piscibactina, e o seu camiño cara o interior celular é a proteína de membrana FrpA.

Cristalización

Existen variados métodos de cristalización proteica. Un dos máis empregados, e con maior éxito é a difusión por vapor. Nun experimento de cristalización, unha solución precipitante que contén tampón, precipitante e compoñentes salinos é mesturada coa solución proteica, a cal contén a proteína purificada e tamén complexos de proteína con deterxente, elemento necesario para a purificación da proteína pola súa función de imitar a membrana celular. Doutro xeito, non sería posible a purificación, pois estes deterxentes actúan a modo de micela rodeando a proteína, actuando como substitutos do entorno no que

a proteína se atopa de forma natural, a membrana celular. A mestura da solución precipitante coa solución proteica, forza a proteína en solución a entrar nun estado de supersaturación. Para escapar disto, o complexo proteína-deterxente ten dúas opcións: agregación ou cristalización. A técnica de difusión por vapor consiste na mestura de relativamente baixas concentracións de precipitante, sal e tampón cun pequeno volume da solución proteica nunha proporción normalmente 1:1 (aínda que isto pode ser variable en función das condicións que queiramos someter o noso experimento de cristalización). Esta pingueira metade precipitante e metade solución proteica é situada na placa de cristalización no pocillo que conteña a mesma solución precipitante que a do reservorio). Existen diferentes técnicas de difusión por vapor, dúas das máis habituais son a pingueira sentada e a pingueira colgada (**Figura 13**) (Delmar et al. 2015).

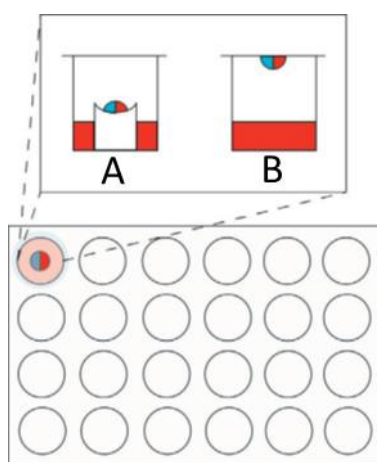


Figura 13. Representación dunha placa de cristalización de 24 pocillos onde podemos observar dúas das máis comúns técnicas de difusión por vapor para a cristalización de proteínas. A: pingueira sentada, onde a cor vermella indica a solución precipitante e reservorio e a azul a solución proteica. B: pingueira colgada. Fonte: imaxe extraída de Delmar et al. 2015.

A cristalización de calquera molécula require de dúas etapas inseparables que son a nucleación e o crecemento. A primeira delas é a máis complexa de acadar xa que representa a primeira fase onde as moléculas (neste caso de proteína) pasan dun estado de desorde total a un estado ordenado, necesario para a formación dos cristais. Para que isto ocorra é imprescindible a creación dun estado de supersaturación, o cal se consegue grazas as diferentes concentracións de precipitantes, tampóns e sales que debe de haber entre o reservorio e o pocillo (onde se atopa a solución de proteína a cristalizar), pola evaporación que ocorre entre eles ao ser un sistema pechado que busca o equilibrio. Esta busca do equilibrio é o que propicia en última estancia o desenvolvemento dun estado sólido (McPherson, 2004).

Difracción de Raios X

Tras obter un cristal de boas características, a difracción por raios X é unha das técnicas de elucidación estrutural máis empregada e máis robusta. Os raios X interactúan co cristal e dispérsanse de forma elástica, amplificándose por interferencia construtiva e xerando un patrón de difracción (**Figura 14**). Os raios X poden ser producidos por un tubo de alto baleiro ao acelerar un feixe de electróns producidos polo cátodo. Estes chocan co ánodo producindo os raios X cunha lonxitude de onda que depende do metal que o forma. Outro método é o sincrotrón, onde se desvían cun potente campo magnético un feixe de electróns que viaxan a unha velocidade preto da velocidade da luz. Cabe imaxinar que esta fonte de radiación é moito máis potente que a que se pode obter cun tubo de baleiro. Disto que os tempos para a adquisición dos datos cristalográficos sexan moito menores cunha resolución moito maior. Debido a intensidade dos raios X nesta fonte, precísanse de axentes protectores para os cristais. Unha vez obtidos os datos de difracción procédeuse a procesalos para a resolución estrutural e o refinamento do modelo 3D da molécula a resolver (Valderrama, 2016).

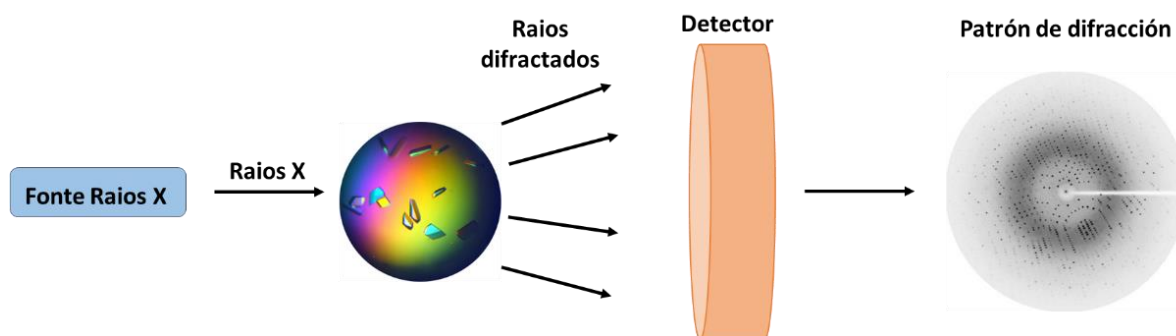


Figura 14. Representación esquemática do proceso de difracción de raios X sobre un cristal para a súa resolución estrutural. Fonte: deseño propio baseado en Valderrama, 2016.

Obxectivos

O obxectivo principal deste traballo, é o de establecer unha liña de produción de cristais de proteínas de membrana de patóxenos bacterianos dentro do grupo PRONAMAR da Universidade da Coruña. Esta é unha meta importantísima para o grupo PRONAMAR, dado que pode levar ao deseño de produtos antibacterianos de nova xeración. Para isto, e seguindo os traballos pioneiros da doutora Andrea Katherine Valderrama Pereira, propóñense os seguintes obxectivos:

- I. Purificación da proteína de membrana externa rFrpA de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, a partir da bacteria recombinante *Escherichia coli*.
- II. Cristalización da proteína de membrana externa rFrpA de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.
- III. Posta a punto da unidade de Cristalografía do SAI (Servicios de Apoio á Investigación) para o análise preliminar de cristais de proteína.
- IV. Purificación do sideróforo piscibactina no seu complexo piscibactina-Fe(III) a partir de cultivos de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

O fin futuro é a co-cristalización da proteína de membrana rFrpA xunto co complexo piscibactina-Fe(III) coa finalidade de comprender a interacción que se produce entre estas dúas estruturas. O coñecemento de dita interacción, permitirá o desenvolvemento de conxugados de piscibactina, que poden ser moi útiles na preparación de sondas moleculares fluorescentes e no deseño de estratexias tipo “Cabalo de Troia”, para a loita contra a enfermidade da pasteurelosis, que *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* causa en criadeiros de peixes no sector da acuicultura.

Estes estudos, establecerán as bases dunha liña de produción de cristais de proteínas de membrana de patóxenos bacterianos. Os cristais servirán para a realización de estudos estruturais, que permitan o deseño de antibacterianos de nova xeración. Constitúe isto un obxectivo esencial para completar a actividade do grupo PRONAMAR, nunha nova liña de investigación, no campo da bioloxía molecular e estrutural.

Material e métodos

Material

Purificación proteína rFrpA

Escherichia coli BL21(DE3) transformada con pET20b(+)
 Medio de cultivo *Luria Bertani* e *Terrific Broth*
 Antibiótico ampicilina *Nzytech genes & enzymes*
 Marcador de proteínas *NZYColour Protein Marker II* da casa comercial *Nzytech genes & enzymes*
 Columnas *GE Healthcare His Trap™ HP* e *GE Healthcare Size exclusion 26/60 s200HR*
 Tubos de filtración por centrifugación *Amicon Ultra centrifugal filter units*, 30 kDa
 Sonicador *Hielscher Ultrasound Technology UP200S*
 Centrífuga refrixerada *Hitachi CR22N* con rotor *R10A5*
 Ultracentrífuga refrixerada *Hitachi CP100NX* con rotor *P70AT2*
 Centrífuga refrixerada *Eppendorf 5430R* con rotor *F-35-6-30*
 Equipo de Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas (FPLC) *NGC Discover™ 100 Chromatography System*
 Equipo espectrofotómetro de microvolume, *mySPEC*

Cristalización da proteína rFrpA

Lisozima *Lysozyme from chicken egg white* da casa comercial *Sigma-Aldrich*
 Kits de cristalización *SG1™ Screen HT-96*, *PACT premier™ HT-96*, *PGA Screen™ HT-96* e *Morpheus HT-96* da casa comercial *Molecular Dimensions*
 Cinta adhesiva *Crystal Clear Sealing Tape* da casa comercial *Hampton Research*
 Placas de cristalización *MRC 2 Well Crystallization Plate (Swissci) UVP* da casa comercial *Hampton Research*

Purificación e illamento do complexo Piscibactina-Fe(III)

Cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) *Oasis HLB* da casa comercial *Waters*
 Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), *Agilent Technologies 1200 Infinity Series* con columna *Discovery HS F5*

Purificación da proteína de membrana rFrpA

Para a purificación de rFrpA realizase un cultivo en medio líquido coa bacteria *Escherichia coli* BL21(DE3) pET20b(+) (Valderrama, 2016). Esta cepa de *E. coli* BL21(DE3) está transformada co constructo pET-N10His-FrpA a partir do plásmido pET20b(+), o cal contén a secuencia pelB, con 22 residuos aminoacídicos que se unen á posición N-terminal da proteína e teñen a capacidade de direccionala ao periplasma da bacteria. A secuencia 10His, correspondente a 10 residuos de histidinas na posición N-terminal da proteína para facilitar a purificación de rFrpA. A secuencia FrpA, correspondente a proteína que queremos purificar. O plásmido posúe ademáis secuencias de resistencia ao antibiótico ampicilina para así poder realizar cultivos selectivos para a bacteria de interese.

Incúbanse durante unha noite a 37 °C en axitación a 200 rpm, 30 mL de medio líquido LB (Luria Bertani, concentración 25 g/l) inoculados coa bacteria transformada *E. coli* BL21(DE3), suplementado con 30 µl de ampicilina cunha concentración de 1 mg/mL. Tras isto, 2 l de medio *Terrific Broth* (TB) en fraccións de 0,5 l son inoculados co cultivo anterior a razón de 10 mL/l, suplementando o cultivo con ampicilina (1 mg/mL) a concentración final de 1 mg/l. Este cultivo incúbase durante 30 h, a 25 °C en axitación a 200 rpm.

Posteriormente, realízase a centrifugación do cultivo celular a 4000 rpm e 4 °C durante 30 min. Os *pellet* obtidos son resuspendidos en tampón Tris-HCl EDTA (Tris 1 M + EDTA 0,5 M) ata obter un volume final duns 30 mL. O resuspendido é agora centrifugado en tubos *Falcon* a 4000 rpm e 4 °C durante 30 min. Ao rematar a centrifugación é posible retirar o sobrenadante e conxelar o *pellet* ata estar preparados para continuar coa purificación.

A partir deste momento é importante traballar sempre en xeo para a correcta conservación da proteína, a cal posúe un carácter moi inestable.

Se no paso anterior se decide conxelar os *pellet*, agora desconxélanse en auga temperada e resuspéndense en 20 mL de TRIS-HCl EDTA. Unha vez resuspendido, débese de sonicar ata chegar a un punto onde se aprecie o cambio de viscosidade indicativo da rotura celular e logo centrifugase a 7500 rpm e 4°C durante 15 min. Neste paso sepáranse as células rotas e consérvase o sobrenadante onde se atopan as membranas celulares externas e internas, lugar de residencia da proteína de interese, rFrpA. Péasase o sobrenadante e engádesse o deterxente *N-Laurysarcosine salt* (Sarcosy) a concentración final do 1 %. Sonícase nun baño durante 2 min para a total disolución do deterxente.

Tras o anterior, lévase a ultracentrifugación a 40.000 rpm a 4 °C durante 1 h. Débense de apreciar uns pequenos precipitados que corresponden coas membranas externas, xa que o deterxente anterior dissolve as membranas internas que non son de interese. Resuspender o precipitado anterior en 1 mL de Tris-HCl EDTA e romper as membranas coa axuda dun *Potter*. Ao realizar isto, asegurarse de lavar ben os instrumentos empregados para evitar perdas do produto de interese. Completamos con Tris-HCl EDTA ata os 15 mL e co deterxente *Elugent* ao 10 % ata os 30 mL, obtendo unha concentración final de deterxente do 5 %. Esta disolución que contén as membranas externas deberá quedar en axitación suave toda a noite a 4 °C para lograr a súa solubilización.

Ao día seguinte levamos a ultracentrifugación a 40.000 rpm a 4 °C durante 1 h. Neste paso o interesante é quedarse co sobrenadante onde estarán disolvidas as membranas externas e polo tanto a proteína de interese, rFrpA.

Illamento da proteína de membrana rFrpA mediante FPLC

A continuación utilízase un equipo de FPLC, co cal é posible separar proteínas de forma rápida e efectiva a través dunha columna cromatográfica específica para His, facendo posible o illamento da proteína rFrpA. Empregando unha columna His-Trap Ni e dous tampóns que conteñen imidazol a diferentes concentracións como fase móbil. Neste caso o tampón “A” é o de menor concentración de imidazol (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 50 mM, *Elugent* 25 %). Este é o tampón empregado para a purga e a introdución do sobrenadante que contén as proteínas na columna e no equipo de FPLC. O tampón “B”, con maior concentración de imidazol (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, *Elugent* 25 %), é a fase móbil encargada da correcta separación da proteína. Ao alcanzar o 40 % de porcentaxe do tampón “B” a un fluxo de 1 mL/min debemos de observar como a absorbancia a 280 nm comeza a ascender, indicándonos a saída da columna da proteína a separar.

Un segundo paso consiste na utilización dunha columna de exclusión por tamaño. Concretamente utilízase a columna *Healthcare, Size exclusion 26/60 s200HR*. A fase móbil empregada nesta columna serán como tampón “A” H₂O milliQ e o tampón “B” LDAO (Tris 25 mM, NaCl 350 mM, LDAO 0,1 %). Aproximadamente observamos a saída da proteína xa totalmente purificada aos 45 min do comezo da fase móbil “B” nunha concentración do 100 % a un fluxo de 1 mL/min. Ocasionalmente este fluxo foi diminuído ata 0,8 mL/min por problemas de sobrepresión que podían danar a columna. Isto tan só repercute no tempo de operación o cal se verá incrementado. A razón da utilización dunha segunda columna de cromatografía é para realizar unha purificación por tamaño, xa que no paso anterior se consegue illar todo o que ten a capacidade de unirse á columna His-Trap Ni, que é a proteína de interese pero tamén outros produtos non desexados. Todos os tampóns que se introducen no equipo de FPLC deben de ser filtrados a través de filtros de membrana de 0,45 µm e desgasificados completamente cunha corrente de N₂ gas.

Para comprobar a presenza da proteína e o éxito da purificación empréganse xeles de poliacrilamida SDS-PAGE 5-10 % empregando como referencia o marcador de proteínas *NZYColour Protein Marker II*. A concentración da proteína mídese coa axuda dun espectrofotómetro de microvolume *mySPEC*.

Cristalización da proteína de membrana rFrpA

Unha vez purificada a proteína, faise necesario comezar canto antes o proceso de cristalización. Previamente realízase un último proceso de purificación coa axuda de tubos de filtración por centrifugación (*Amicon Ultra centrifugal filter units*, 30 kDa), os cales permiten illar toda proteína por enriba dos 30 kDa onde se atopa a nosa proteína de interese rFrpA (71,5 kDa). Unha vez purificada a proteína, iníciase o proceso de cristalización, empregándose diferentes *Kits* de cribado co fin de buscar condicións nas que a proteína poida cristalizar.

Empréganse os *Kits* de cristalización: *SG1TM Screen HT-96*, *PACT premierTM HT-96*, *PGA ScreenTM HT-96* e *Morpheus HT-96*. As placas de cristalización empregadas son as *MRC 2 Well Crystallization Plate (Swissci) UVP* da casa comercial. Estas placas posúen un reservorio e dous pocillos por cada un. De tal forma que para cada condición introducida no reservorio pódense probar dúas condicións de cristalización ao poder variar o volume de solución proteica ou de solución de cristalización que introducimos en cada pocillo (**Figura 15**). Neta ocasión empregouse o método da pingueira sentada.



Figura 15. Placa de cristalización *MRC 2 Well Crystallization Plate (Swissci) UVP* coas dúas condicións probadas para cada solución comercial cristalizante. Fonte: imaxe extraída de *Hampton Researh*.

Dadas as características das placas de cristalización e os 4 *Kits* para o cribado de condicións de cristalización, foron escaneadas un total de 768 condicións distintas (96 solucións de cristalización/*Kit* * 2 pocillos/reservorio * 4 *Kits* de condicións de cristalización; $96 \cdot 2 \cdot 4 = 768$ condicións).

O medio de cristalización debe de estar completamente pechado e illado para a correcta difusión entre o reservorio e o pocillo coa proteína. De tal xeito, ao instante de realizar o plaqueo emprégase a cinta adhesiva *Crystal Clear Sealing Tape* para selar as placas. En total

empréganse 8 placas de cristalización (2 de cada *Kit* de cristalización), das que 4 delas son depositadas a 4 °C e outras 4 a 20 °C, nun medio que posúe as con mínimas perturbacións acústicas e vibracionais que poidan afectar negativamente ao proceso de cristalización. Deste xeito, unha vez que se obteñen cristais nalgunha das condicións, pódese profundar na optimización da mesma para obter máis cristais. Para isto, emprégase un método descrito e deseñado por Ridgeway, 2003. O proceso consiste na creación dunha matriz tridimensional, onde cada unha das tres variables (“A”, “B” e “C”), é un produto empregado na cristalización. Tómase unha placa de cristalización de 96 pocillos, e divídese en 4 cuadrantes. A variable “A” aumenta de concentración no eixo vertical do cuadrante, conseguindo 4 condición diferentes. A variable “B” aumenta de concentración no eixo horizontal do cuadrante, conseguindo 6 condicións diferentes. Por último a variable “C”, aumenta de concentración nos distintos cuadrantes, sendo constante en cada un deles, conseguindo 4 condicións diferentes (Figura 16) (Anexo I). Esta é unha forma rápida e efectiva para a preparación de placas para a cristalización, pois o método está enfocado á preparación da “placa nai”, a partir da cal se preparan as demais placas de cristalización. O método descrito, foi deseñado por Ridgeway, 2003 na Universidade de California-Berkeley. O cal foi empregado para importantes descubrimentos e publicacións científicas pola súa efectividade (Schuwirth et al. 2005).

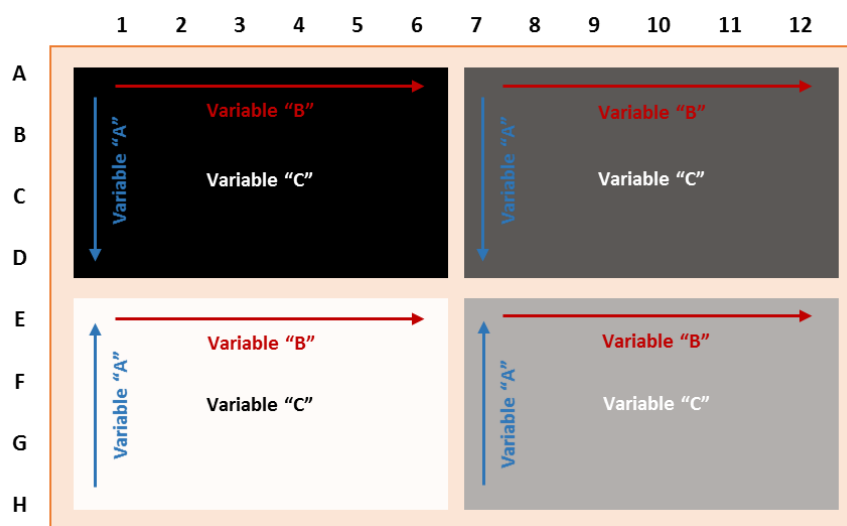


Figura 16. Diagrama do método deseñado por Ridgeway, 2003, empregado para os intentos de cristalización arredor das condicións comerciais satisfactorias. **Flecha azul:** variable “A”, a dirección da flecha indica o aumento na concentración do produto de cristalización. **Flecha vermella:** variable “B”, a dirección da flecha indica o aumento na concentración do produto de cristalización. Os cuadrantes de tonalidade cincenta indican o aumento da concentración da variable “C”, dende a cor negra (a maior concentración) á cor branca (a menor concentración), pasando por dous tons cincentos intermedios. Fonte: deseño de imaxe propio baseado en Ridgeway, 2003.

Cada período de 20 días débese de realizar unha busca de posibles cristais coa axuda dun microscopio, intentando perturbar ao mínimo as placas e o medio de cristalización.

Purificación do sideróforo piscibactina

Seguindo o método de Souto et al. 2012, un litro de cultivo da bacteria *P. damsela* subsp. *piscicida* foi reducido ata un volume de 300 mL coa axuda dun rotaevaporador. Tras isto, 10 mg de FeCl_3 en disolución foron engadidos durante 5 min en axitación. Deixando repousar en axitación a mestura durante 10 min e logo incúbase a 4 °C durante 24 h. Desta forma o sideróforo piscibactina acompléxase co ferro e vólvese máis estable.

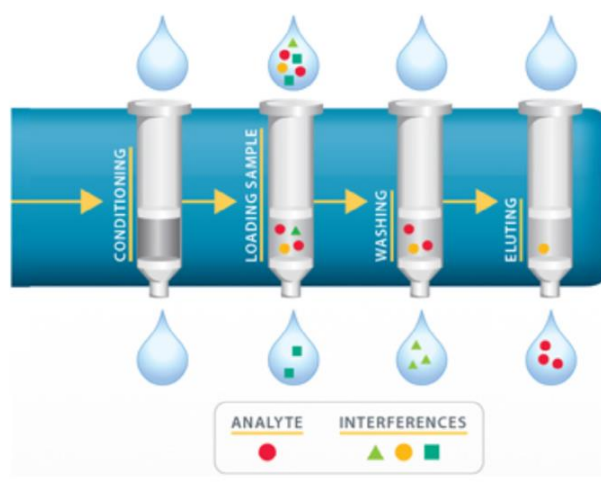


Figura 17. Método de extracción en fase sólida. *Conditioning*: acondicionamento. *Loading sample*: carga de mostra. *Washing*: lavado. *Eluting*: eluindo. *Analyte*: analito. *Interferences*: interferencias. Fonte: imaxe extraída de Andrade-Eiroa et al. 2016.

A continuación realízase unha extracción en fase sólida (SPE) cos cartuchos *Oasis HLB*. Esta técnica baséase na retención dun analito que posteriormente lógrase eluír ao romper as interaccións entre a fase sólida do cartucho e a mostra, recuperando así os analitos de interese, obténdose unha mostra enriquecida dos mesmos (Andrade-Eiroa et al. 2016) (Figura 17). Este proceso de illamento da piscibactina (Figura 18) comprende varias etapas. Por

orde son, o acondicionamento do cartucho empregado, a carga da mostra, o lavado e a elución. Utilízanse 3 cartuchos para procesar os 300 mL de mostra, 100 mL por cartucho. O procedemento de elución realízase de acordo á Táboa 1 unha vez cargada a mostra.

O acondicionamento inicial dos cartuchos realízase con 60 mL de CH_3CN e 60 mL de H_2O milliQ. A limpeza final, unha vez realizada a elución, realízase con 120 mL de CH_3CN e 60 mL de H_2O .

Táboa 1. Procedemento de elución empregado para a extracción en fase sólida da piscibactina empregando os cartuchos *OASIS HLB*. Fonte: procedemento baseado en Souto et al. 2012

Fracción		H_2O milliQ (mL)	CH_3CN (mL)
L1	1:0	30	0
L2	7:3	21	9
L3	1:1	15	15
L4	0:1	0	30

A fracción na que se debe de atopar o sideróforo piscibactina conxugado con ferro (Fe III) debe de ser a fracción 3 denominada L3. A fracción L3 é levada a sequidade coa axuda dun rotaevaporador. Antes de evaporala completamente, extráese unha alícuota para as análises por espectrometría de masas, coa finalidade de ter a certeza da presenza/ausencia da piscibactina na mostra. Coa finalidade de confirmar a súa presenza a mostra sométese a análise por LC-MS.

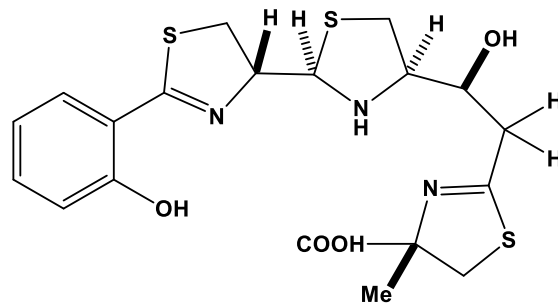


Figura 18. Estructura do sideróforo piscibactina. Fonte: deseño propio baseado en Souto et al. 2012, utilizando o programa de deseño *ChemDraw Professional*

Resultados

Purificación e illamento da proteína rFrpA

Previamente a este traballo conseguíuse cristalizar a proteína rFrpA en colaboración co grupo de investigación do Dr. Pedro Pereira da Universidade de Oporto, Portugal (Valderrama, 2016). Posto que se retende introducir esta tecnoloxía na UDC (Universidade da Coruña) e debido a que nestes momentos se dispón dos *Kits* de cristalización para facelo, estableceuse esta meta coma un dos obxectivos prioritarios neste proxecto. As condicións de cristalización son tipicamente moi sensibles ao entorno experimental. Por isto, a recristalización da proteína rFrpA dentro das instalacións da UDC, supón un reto moi importante para o grupo de investigación. Os resultados desta parte do proxecto serán a semente dunha futura actividade de cristalización de proteínas de membrana de patóxenos bacterianos a desenvolver polo grupo.

Seguindo o método de purificación descrito en material e métodos, conséguese illar con éxito a proteína de interese. O método implica a dificultade de traballar de forma continua a baixa temperatura, xa que a proteína pode verse afectada gravemente en condicións adversas á súa natureza.

Xeles de poliacrilamida SDS-PAGE

Para comprobar a pureza e o éxito do proceso de purificación realízanse xeles de poliacrilamida. Deste xeito pódese saber se a proteína rFrpA se atopa illada e lista para o seguinte proceso, a cristalización.

Ao longo de toda a purificación, tómanse alícuotas nas distintas etapas intermedias do proceso. Deste xeito pódese ir seguindo o proceso de purificación, tendo en todo momento o control do que está pasando coa proteína (**Figura 19**). Así, en caso de obter resultados non satisfactorios, existe un rexistro de tódolos pasos anteriores, tendo a posibilidade de volver atrás e analizar en que paso da purificación se está errando. Tras completar o proceso de purificación, que implica varias centrifugacións e o emprego de dous deterxentes encargados da disolución das membranas celulares, procédese a realizar o illamento proteico co equipo de FPLC. Tras isto, realízanse varios xeles das diferentes fraccións obtidas. Así, pódese observar a proteína de interese rFrpA totalmente illada, sen outras interferencias que poidan afectar aos seguintes procesos de cara á cristalización (**Figura 20**).

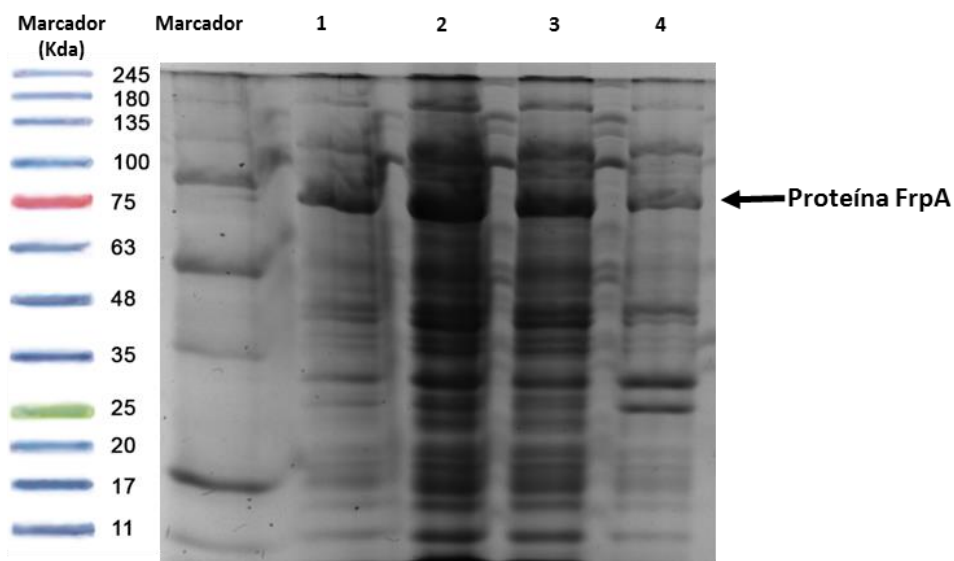


Figura 19. Xel de poliácridamida SDS-PAGE 5-10 %. O peso molecular da proteína rFrpA é de 71549,4 Da (71,5 kDa). Durante o proceso de purificación pode ser observada, aínda que non con claridade. 1: lisado celular. 2: sobrenadante antes de engadir o deterxente Sarkosyl. 3: sobrenadante tras engadir o deterxente Sarkosyl e centrifugar. 4: membranas tras rotura en *Potter*.

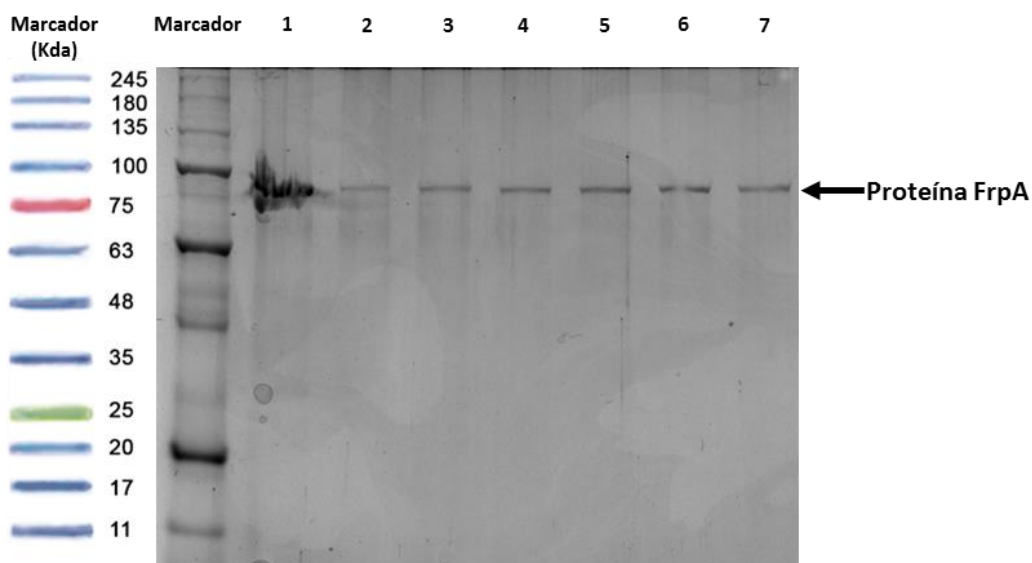


Figura 20. Xel de poliácridamida SDS-PAGE 5-10 %. Obsérvanse as bandas correspondentes á proteína rFrpA totalmente purificada e illada de interferencias non desexables. 1: marcador de proteína rFrpA externo. 2-7: diferentes fraccións illadas por FPLC que corresponden a proteína rFrpA cun peso molecular de 71,5 kDa.

Tal e como se aprecia na **Figura 20**, a proteína é totalmente purificada gracias aos dous procesos de purificación e illamento realizados. Para levar a cabo este proceso, vese necesaria a utilización do equipo de FPLC para a obtención dun produto puro, empregando en primeiro lugar unha columna de afinidade His-Trap Ni e tras iso, outra columna máis específica de exclusión por tamaño.

Cromatografía líquida rápida de proteínas, FPLC

Columna de afinidade His-Trap Ni

Ao usar a columna de afinidade His-Trap Ni para un primeiro illamento da proteína, obtense unha mestura de todo aquilo que pode ter afinidade polo Ni. Aquí pódense atopar diferentes proteínas e outras moléculas que non favorecerían os procesos posteriores de cristalización. Ao usar o equipo de FPLC, obtense un cromatograma que indica de forma moi visual en que momento está eluíndo o produto desexado (**Figura 21**).

O equipo de FPLC permite incluír unha serie de lecturas de absorbancia á saída da columna para ver en que momento comeza a eluir a proteína de interese. Neste caso establécese que o detector de UV faga lecturas a 280 nm que é o valor ó que se detecta a proteína. (**Figura 21**). Débese de confirmar e illar totalmente a proteína rFrpA coa posterior utilización dunha columna cromatográfica de exclusión por tamaño.

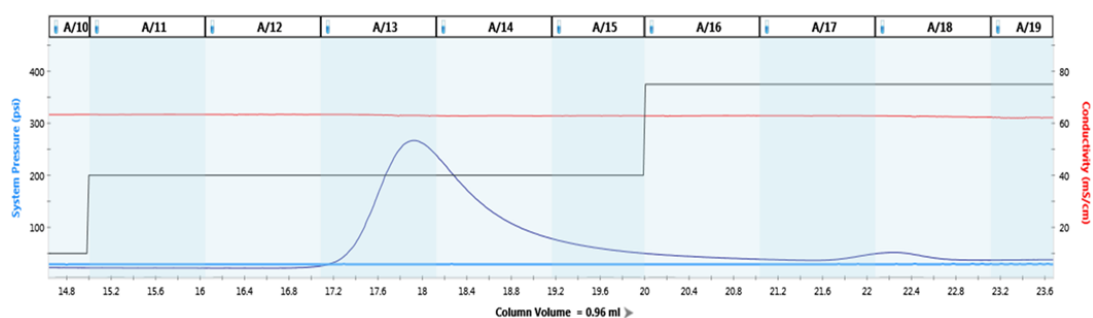


Figura 21. Cromatograma FPLC, columna His-Trap Ni. **Liña vermella:** condutividade (mS/cm). **Liña negra:** % tampón B. **Liña azul:** presión do sistema. **Liña violeta:** absorbancia a 280 nm que indica a presenza de proteínas a purificar.

Columna de exclusión por tamaño

Coa columna de exclusión por tamaño obtense a proteína desexada. Na **Figura 22** pódese observar o cromatograma proporcionado polo equipo de FPLC no momento da separación.

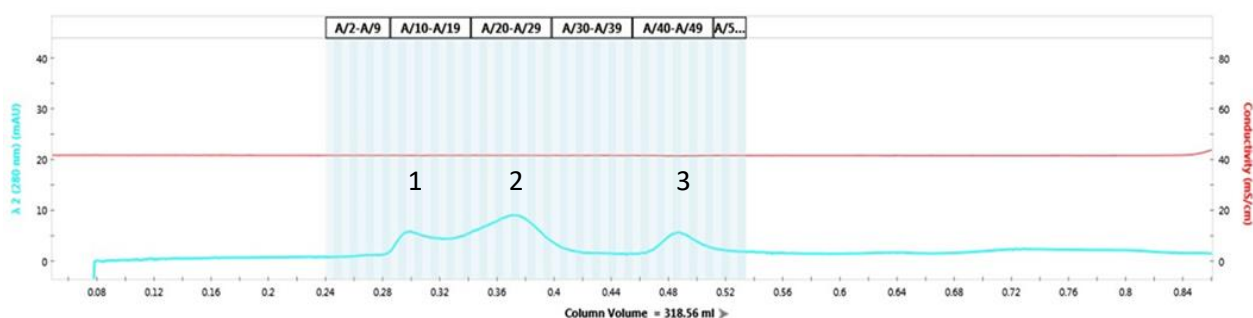


Figura 22. Cromatograma FPLC, columna de exclusión por tamaño *Healthcare, Size exclusion 26/60 s200HR*. **Liña vermella:** condutividade. **Liña turquesa:** absorbancia a 280 nm que indica a presenza de proteínas purificadas.

Nesta separación, tal e como podemos ver no cromatograma da **Figura 22**, obsérvase a presenza de tres picos. Dos tres picos obtidos, tan só o segundo deles (2) que é o máis

abundante, corresponde co produto de interese; a proteína rFrpA. Os picos 1 e 3 corresponden con agregados proteicos (dímeros, trímeros...), tal e como se confirmou por técnicas electroforéticas, que non son de interese, pois precísase da proteína no seu estado máis puro e nunha conformación o máis similar posible ó seu estado natural (Valderrama, 2016).

Cristalización da proteína rFrpA

Ao cabo dos 23 días do comezo da cristalización, obsérvase o crecemento de varios cristais nas placas a 20 °C e a 4 °C (**Figura 23**). Pasados 60 días, aprécianse unhas pequenas estruturas que corresponden de novo a cristais. Neste último caso, tan só a 20 °C (**Figura 24**). Dado que as condicións de cristalización dos cristais atopados coinciden coas condicións de Valderrama 2016, optouse por purificar máis proteína e iniciar un proceso de cribado en torno as dúas condicións que máis éxito acadaron, de tal forma que se poida optimizar o proceso de cristalización:

-NaCl 0.2 M, PEG 3350 20 % (w/v).

-Imidazol e MES monohidrato 0.1 M, alcois 0.12 M (1,6-hexanodiol; 1-butanol; 1,2-propanodiol; 2-propano; 1,4-butanodiol e 1,3-propanodiol), MPD 12.5 % (v/v), PEG 1000 12.5 % (w/v) e PEG 3350 12.5 % (w/v).

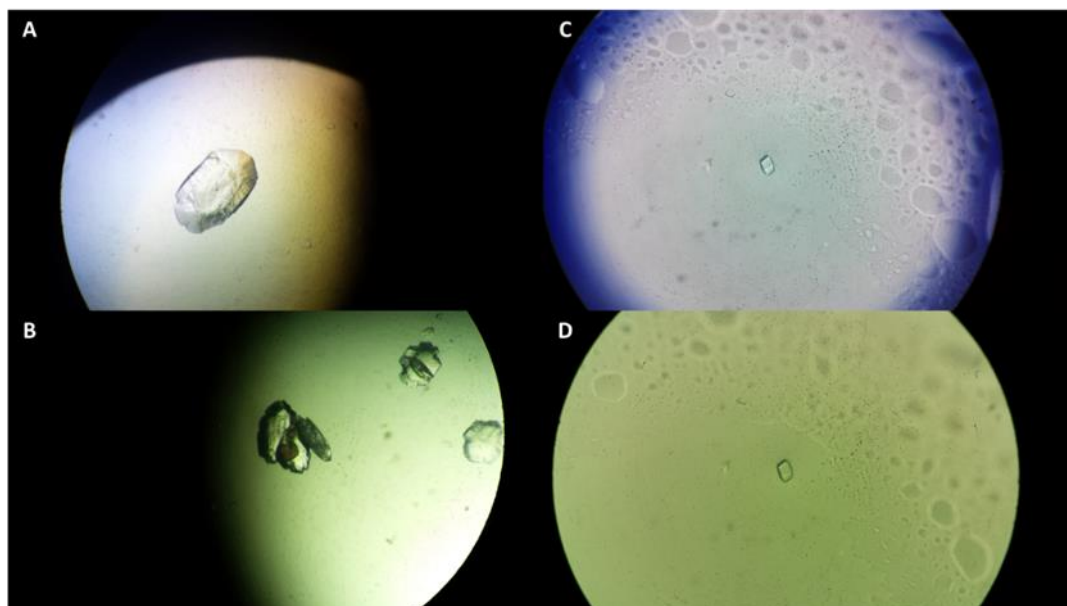


Figura 23. Cristais a atopados aos 23 días de iniciar o proceso de cristalización. *Kit de cristalización SG1™ Screen HT-96*, condición 5B: NaCl 0,2 M, PEG 3350 20 % (w/v). A e B: cristais atopados a 20 °C. C e D: cristais atopados a 4 °C. Concentración de proteína rFrpA: 0,96 mg/mL.

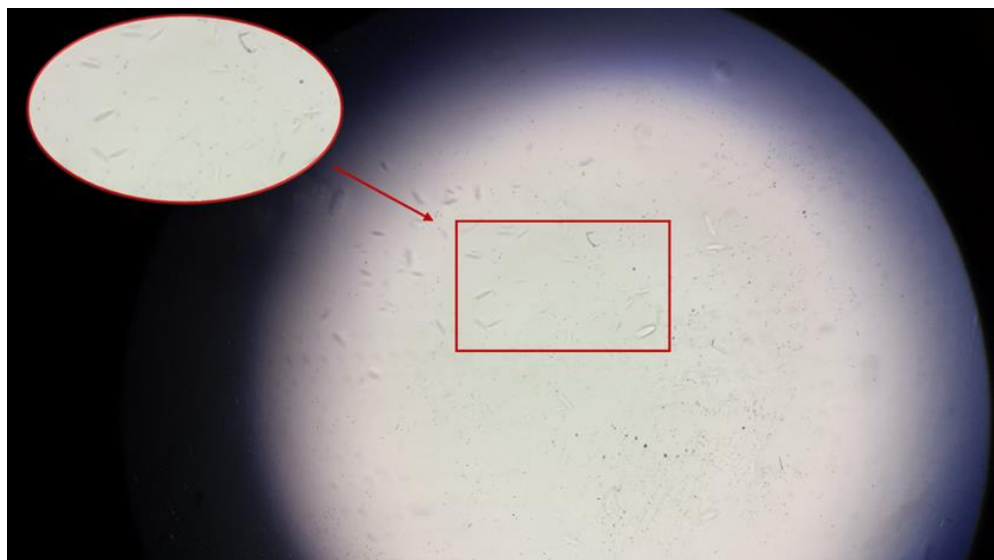


Figura 24. Cristais atopados aos 60 días de iniciar o proceso de cristalización a 20 °C. *Kit de cristalización Morpheus HT-96*, condición 4D: Imidazol e MES monohidrato 0.1 M, alcois 0.12 M (1,6-hexanodiol; 1-butanol; 1,2-propanodiol; 2-propano; 1,4-butanodiol e 1,3-propanodiol), MPD 12.5 % (v/v), PEG 1000 12.5 % (w/v) e PEG 3350 12.5 % (w/v). Concentración de proteína rFrpA: 0,96 mg/mL.

Seguindo as condicións citadas anteriormente, e o método deseñado por Ridgway, 2003, deseñase un cribado de condicións que xiren en torno a elas. Así, realízanse pequenas variacións nas concentracións dos diferentes reactivos que as compoñen para poder axustar ao máximo as condicións idóneas para a cristalización. Deste xeito, ao cabo de 23 días obtéñense unhas estruturas cristalinas de forma estrelada (Figura 25).

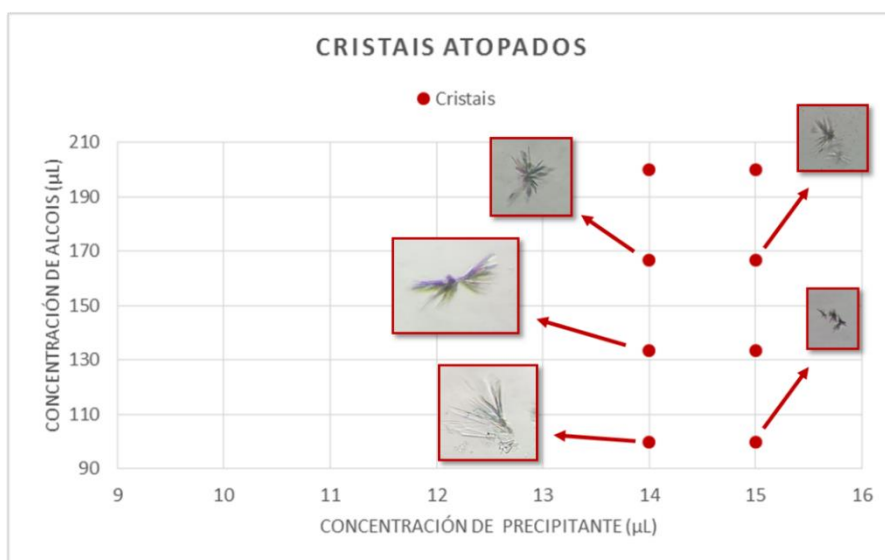


Figura 25. Cristais atopados aos 23 días de iniciar o proceso de cristalización a 4 °C. *Kit de cristalización deseñado en torno a condición 4D, Morpheus HT-96*: Imidazol e MES monohidrato 0.1 M, alcois 0.12 M (1,6-hexanodiol; 1-butanol; 1,2-propanodiol; 2-propano; 1,4-butanodiol e 1,3-propanodiol), MPD 12.5 % (v/v), PEG 1000 12.5 % (w/v) e PEG 3350 12.5 % (w/v). Concentración da proteína rFrpA: 1,6 mg/mL. A gráfica mostra os puntos nos cales se atoparon as estruturas cristalinas en función da concentración da solución precipitante (µL) e da concentración dos alcois empregados (µL).

Difracción de Raios X

Antes de comezar cos experimentos de difracción, estimouse necesario a posta a punto do método e o equipo empregado para tal fin. Para este cometido, contouse coa axuda do Dr. Alberto Núñez Cardezo, responsable da Unidade de Análise Estructural dos Servicios de Apoio á Investigación (SAI). Realizouse unha primeira proba coa difracción de cristais de lisozima. Esta é unha proteína comercial de sinxela cristalización. Así, a partir dunha mostra comercial de lisozima, conséguense cristais válidos para realizar as primeiras probas de difracción aos dous días do inicio da cristalización, seguindo os pasos de Dessau e Modis, 2011. Tras os primeiros experimentos, conséguense algúns difractogramas de proteína (**Figura 26**). As condicións finais coas que se traballa así coma o equipo de difracción empregado son:

- Diffractómetro Bruker modelo X8 APEX
- Tubo de raios X de Cu
- Condicións de operación do tubo: 50 kV, 30 mA
- Distancia do detector: 120 mm
- Tempo de adquisición: 7200 s
- Temperatura de adquisición: 100 K

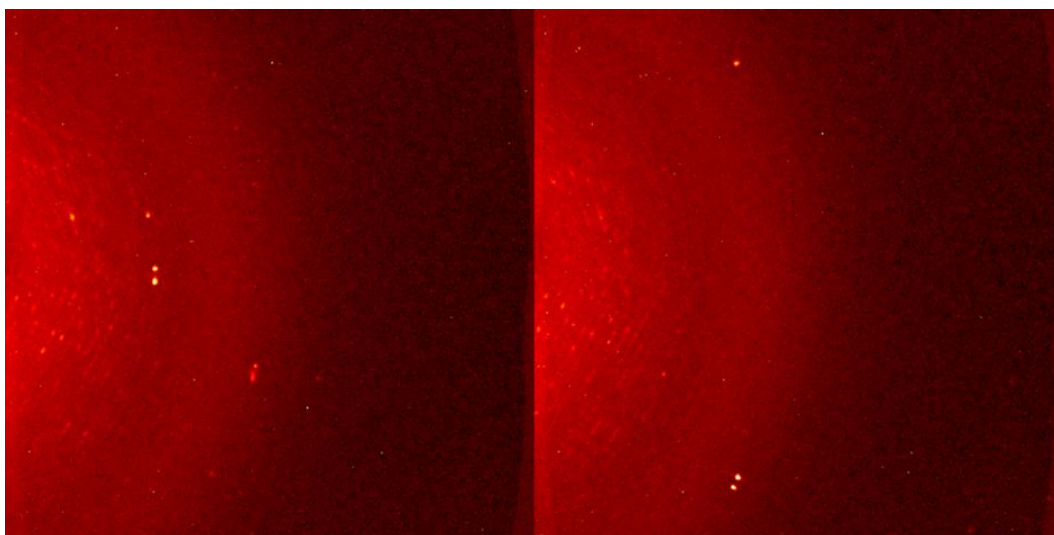


Figura 26. Patróns de difracción obtidos a partir de cristais de lisozima. Proceso de optimización dos equipos de difracción para a difracción de cristais de proteína no SAI.

Os cristais de rFrpA obtidos a 20 e 4 °C, na condición 5B, *SGITM Screen HT-96*, foron levados á Unidade de Análise Estructural do SAI, coa finalidade de comprobar a súa natureza cristalina, xa que unha vez obtidos, poden tratarse de sales e non de cristais de proteína. Unha vez realizadas estas probas, determinouse que se trataban de sales pola extremadamente alta resolución á cal difractaban (aproximadamente 1 Angstrom tras 2 horas

de exposición) (**Figura 27**). Esta resolución é altamente improbable para unha proteína de membrana. Isto, xunto coas escasas manchas de difracción obtidas, en comparación coa difracción obtida a partir dos cristais de lisozima, indica que o patrón de difracción corresponde a o de unha sal. Aínda que resulta imposible de obter un patrón de difracción para unha proteína de membrana co equipo do que se dispón, pódense resolver outro tipo de estruturas cristalinas coma sales ou minerais. Os cristais das **Figuras 24 e 25** son polo momento, demasiado pequenos para intentar sometelos a probas de difracción. Aínda así, son estruturas prometedoras que aparecen nas condicións máis óptimas para a proteína rFrpA.

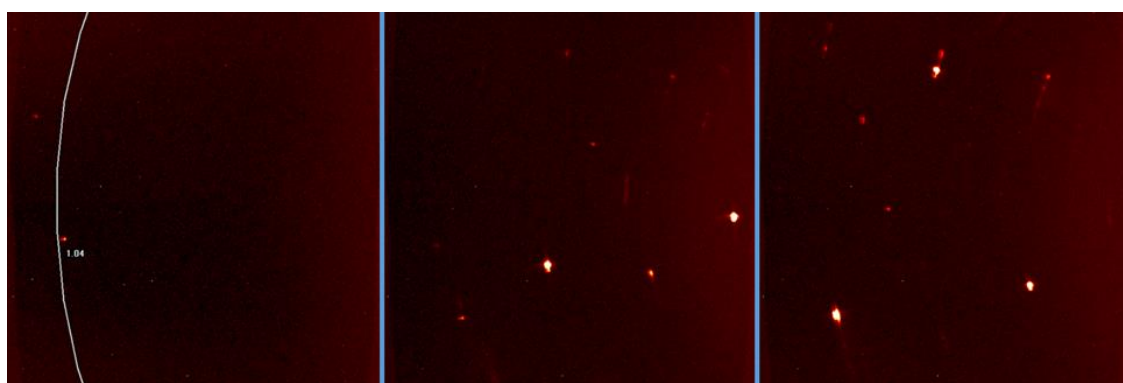


Figura 27. Fotografías obtidas dos cristais da condición 5B, SG1™ Screen HT-96 tras dúas horas de exposición aos raios X. Localízanse en cor laranxa intenso dous spots ben definidos a unha distancia de 1.04 Å, indicando a natureza propia dunha sal.

Purificación do sideróforo piscibactina

O cultivo de *P. damsela* subsp. *piscicida*, foi reducido ata un volume de 300 mL, e o sideróforo piscibactina contido nel, quelatado con FeCl₃. Tras isto, procédeuse a realizar o procedemento de SPE. As fraccións eluidas dos cartuchos *Oasis HLB*, seguindo o procedemento indicado no apartado de material e métodos, son estudadas a nivel analítico por espectrometría de masas con ionización ESI positiva. O complexo piscibactina-Fe(III) localízase na fracción nomeada como L3. Realízase a continuación sobre a fracción L3, unha proba de separación por LC-MS. O espectro de masas de alta resolución obtido, localiza o complexo piscibactina-Fe(III) no pico de tempo de retención de 8.64 min, cunha masa exacta de 508.00940 (**Figura 28**).

Unha vez localizada a fracción que contén o complexo, a fracción L3 é sometida a un proceso a nivel semipreparativo mediante HPLC. Dada a pouca abundancia do complexo, que dificulta a labor separativa, non foi posible o illamento. É necesario a mellora do procedemento de purificación do complexo piscibactina-Fe(III). Para isto plantéxanse varias opcións, como engadir o FeCl₃ ao medio de cultivo bacteriano no momento en que este

alcance a fase estacionaria. Desta forma, a formación do complexo piscibactina-Fe(III), sería inmediata á produción do sideróforo piscibactina por parte da bacteria, evitando perdas do mesmo en procesos posteriores. Outra mellora, sería realizar todo o procedemento de purificación en condicións de penumbra, por existir antecedentes de sideróforos fotosensibles, estruturalmente moi similares á piscibactina.

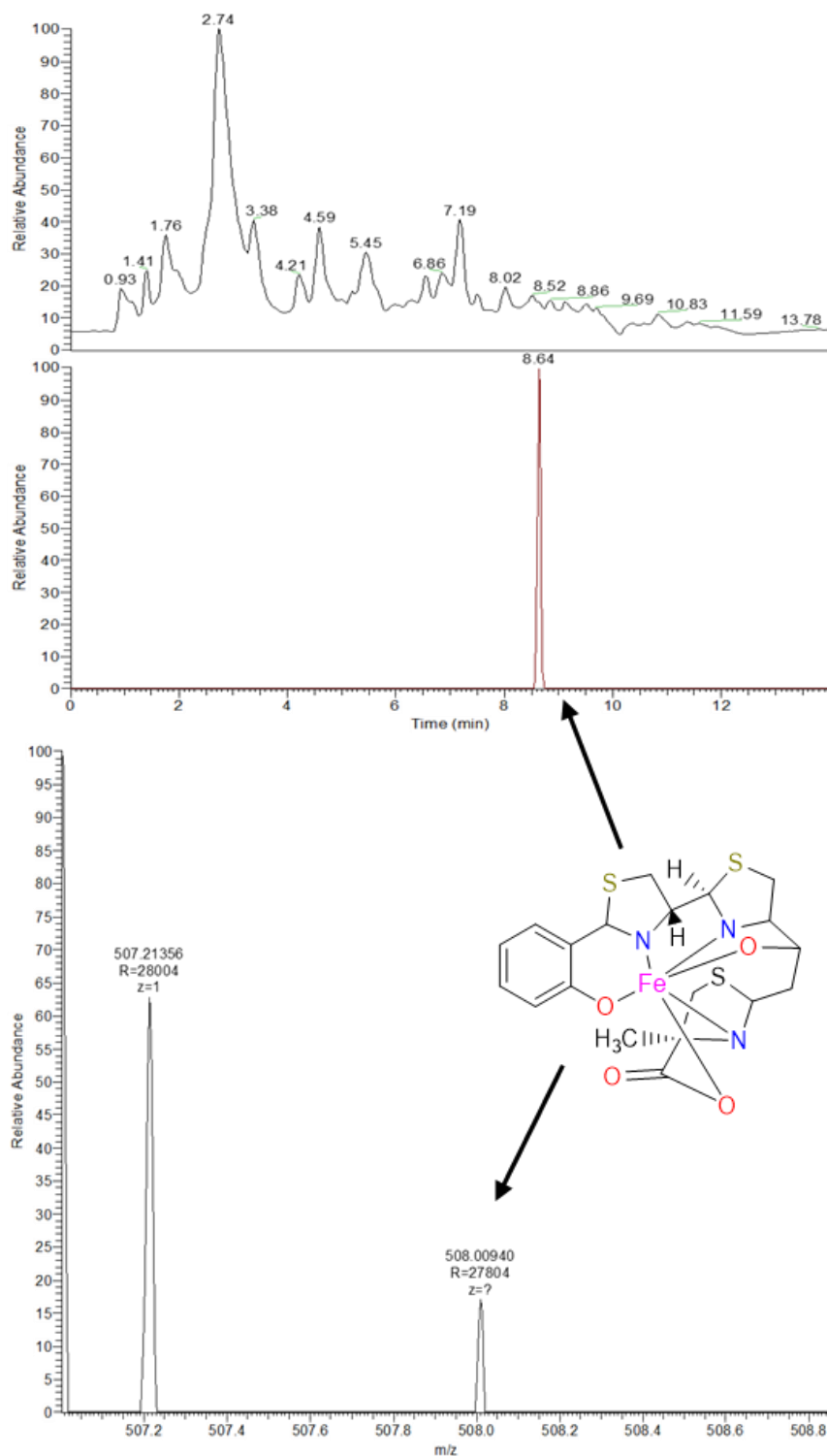


Figura 28. Espectro de LC-MS, onde se observa un pico cun tempo de retención de 8.64 min e cunha masa de 508.00940, correspondente co complexo piscibactina-Fe(III). Na mesma imaxe a estrutura do complexo localizado.

Discusión

A proteína rFrpA

A obtención de cristais de complexos macromoleculares, como pode ser unha proteína, é un proceso que require de paciencia, perseveranza e intuición. Actualmente, a separación e a purificación de proteínas está a ser un importante campo de investigación. A separación dunha proteína concreta no seu medio biolóxico natural para a súa cristalización e posterior resolución estrutural, é o aspecto máis complexo da purificación de proteínas. Non existe un protocolo determinado que guíe o proceso. A cristalización de proteínas pode verse afectada por moitos parámetros que se deben de controlar, como son o pH, a temperatura, a presión, as vibracións mecánicas/sonoras e outras perturbacións, o tipo e a concentración do axente precipitante, a forza iónica entre os compostos, o grado de supersaturación, concentración das macromoléculas a cristalizar, as forzas electroestáticas e magnéticas, as propiedades dieléctricas e a viscosidade do medio. Moitos destes parámetros son incontrolables e incuantificables (Navarro et al. 2009). Por exemplo, a mesma forza da gravidade é un factor que pode afectar moito aos procesos de cristalización. Durante as expedicións 2 e 4 á ISS foron realizados varios experimentos de cristalización proteica. O 65 % das probas finalizaron con éxito, producindo cristais de complexos macromoleculares co tamaño axeitado para a difracción por raios-X (https://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/experiments/252.html). Cos cristais proteicos obtidos en microgravidade, conseguíronse resolver moitas estruturas que na Terra, que debido á forza da gravidade resultaba moi complexo pola deficiente calidade da difracción obtida. Incluso nalgúns casos, coma o que describe Miele et al. 2003, conséguese unha reproducibilidade exacta dos patróns de difracción dos cristais ao cambiar o método de purificación da proteína.

Isto aporta unha idea do complexo que en moitas ocasión pode ser a obtención de bos cristais proteicos que proporcionen unha boa difracción coa consecuente elucidación estrutural.

Conseguido ata o momento (Valderrama, 2016), a condición de maior éxito cristalográfico para a proteína rFrpA é a composta por: Imidazol e MES monohidrato 0.1 M, alcois 0.12 M (1,6-hexanodiol; 1-butanol; 1,2-propanodiol; 2-propano; 1,4-butanodiol e 1,3-propanodiol), MPD 12.5 % (v/v), PEG 1000 12.5 % (w/v) e PEG 3350 12.5 % (w/v). Esta condición coincide coa dun *Kit* de cristalización, o *Morpheus HT-96*. En torno a esta condición xiran os intentos por conseguir cristais da proteína rFrpA por primeira vez na

Universidade da Coruña. As estruturas conseguidas ata o momento constitúen unha boa experiencia do que é un primeiro contacto coa cristalización da proteína, lográndose resultados prometedores.

En moitas ocasión é necesario a utilización de miles de condicións e a proba de diferentes técnicas de cristalización ata dar coa axeitada. Unha das técnicas que máis se está utilizando nos últimos anos, e con maior taxa de éxito para a cristalización, é o emprego de membranas permeables entre as dúas fases do proceso (Chabanon et al. 2016). Isto é quizais unha das formas nas que se podería incrementar o éxito da obtención dos cristais da proteína rFrpA. A proba de diferentes técnicas, en moitas ocasións, abre as portas a resultados sorprendentes.

O sideróforo piscibactina

A purificación do sideróforo piscibactina realízase de acordo ao descrito por Souto et al. 2012. En ese traballo logrouse illar en primeiro lugar o sideróforo como complexo de galio, debido a que se lograba estabilizar e se facilitaba a súa elucidación por técnicas de RMN e despois como complexo de ferro directamente. Este complexo, ademais de ser a forma na que a bacteria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* capta o ferro necesario para o seu crecemento, é a forma en que se atopa na natureza. No noso caso, aínda que o complexo piscibactina-Fe(III) se logrou detectar gracias a LC-MS, non foi posible de illar de forma pura debido á pequena cantidade obtida e a gran inestabilidade do complexo. Isto presenta a necesidade de estudar outras vías de procesamento do medio de cultivo antes de comezar coa purificación do sideróforo. Unha vez cultivado o medio de cultivo, segundo Souto et al. 2012, coa inoculación da bacteria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, este é centrifugado e filtrado para eliminar calquera corpo que poida interferir nos procesos posteriores. Existe a sospeita fundamentada de que nesta operación se está a perder unha parte importante do sideróforo de interese, xa que a cantidade do complexo piscibactina-Fe(III) recuperada está en torno a 1 mg/L no mellor dos casos.

A piscibactina é un sideróforo cunha estrutura moi similar á do sideróforo yersiniabactina, de bacterias do xénero *Yersinia* coa a famosa *Yersinia pestis*, axente causante da peste bubónica (**Figura 29**). O método de purificación da yersiniabactina practicado por Miller e DeMoll, 2011, mostra importantes similitudes co noso método (Souto et al. 2012). Atendendo ao artigo de Miller e DeMoll, 2011, obsérvase un punto quizais clave na purificación; a fotodegradación. O sideróforo yersiniabactina é sensible a fotodegradación. Sendo importante protexer o material de traballo da luz en todas as etapas do proceso de

purificación. Precaucións, como realizar as extraccións nun lugar con luz atenuada ou cubrir recipientes, contedores e incluso o baño de auga do rotaevaporador durante a concentración dos extractos, son necesarias para o correcto illamento do sideróforo. Deste xeito poderíase mellorar o proceso de illamento e finalmente, obter suficiente cantidade do complexo piscibactina-Fe(III) para realizar os ensaios de co-cristalización coa proteína rFrpA.

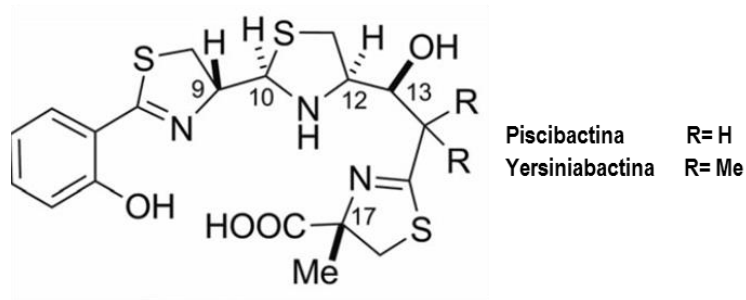


Figura 29. Estrutura molecular dos sideróforos piscibactina de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e yersiniabactina de *Yersinia pestis*. Fonte: Souto et al. 2012

Conclusiones

O obxectivo principal deste traballo, era o de establecer unha liña de produción de cristais de proteínas de membrana de patóxenos bacterianos dentro do grupo PRONAMAR da UDC. Para isto, e seguindo os traballos pioneiros da doutora Andrea Katherine Valderrama Pereira, cumpríronse os seguintes obxectivos:

- I. Conseguiuse reproducir o método desenvolto pola doutora Andrea Katherine Valderrama Pereira, para a purificación da proteína de membrana FrpA da bacteria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* a partir da bacteria *Escherichia coli* BL21(DE3) pET20b(+).
- II. A cristalización da proteína de membrana rFrpA resultou en resultados prometedores, tendo en conta que se trata dunha experiencia realizada por primeira vez na Universidade da Coruña. A pesar da dificultade asociada á sensibilidade do proceso de cristalización, e que algúns dos cristais obtidos resultaron ser finalmente sales, existen actualmente cristais en crecemento, os cales se espera que nun futuro próximo, adquiren unha estrutura e tamaño o suficientemente importante como para realizar sobre eles probas de difracción.
- III. A partir dos cristais de lisozima comercial, lograronse establecer as condicións de operación para as probas de difracción de raios X de proteínas na Unidade de Análise Estructural do SAI. Traballo pioneiro e fundamental para o futuro da resolución estrutural de proteínas de membrana na Universidade da Coruña.
- IV. O método de purificación do complexo piscibactina-Fe(III), precisa de revisión. Neste traballo, achéganse algunhas posibles melloras e aspectos a ter en conta no proceso de purificación, coma a característica da fotosensibilidade do sideróforo yersiniabactina, de estrutura similar á piscibactina.

Bibliografía

Artigos

- Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancelliere, V. e Cerdà, V. (2016). *Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I)*. Trends in Analytical Chemistry 80: 641-654.
- Broadhurst, C. L., Wang, Y., Crawford, M. A., Cunnane, S. C., Parkington, J. E. e Schmidt, W. F. (2002). *Brain-specific lipids from marine, lacustrine, or terrestrial food resources: potencial impact on early African Homo sapiens*. Comparative Biochemistry and Physiology 131: 653-673.
- Chabanon, E., Mangin, D. e Charcosset, C. (2016). *Membranes and crystallization processes: state of the art and prospects*. Journal of Membrane Science 509: 57-67.
- Coelho, I., Pequito, D. C. T., Borghetti, G., Aikawa, J., Yamaguchi, A. A., Brito, G. A. P., Yamazaki, R. K., Scorsato, A. P., Fernandes, L. C., Coimbra, T. M. e Fernandez, R. (2016). *Chronic fish oil supplementation partially reverses renal alterations in mice fed with a high-fat diet*. Journal of Functional Foods 26: 196-207.
- Collins, H.L. (2003). *The role of iron infections with intracellular bacteria*. Immunology Letters 85: 193-195.
- De Berrazueta, J. M. G. e De Berrazueta, J. R. (2007). *Consumo de pesacado, omega-3 y factores de riesgo cardiovascular*. Revista Med. 15: 218-224.
- Dessau, M.A. e Modis, Y. *Protein crystallization for X-ray crystallography*. Journal of Visualizar Experiments <http://www.jove.com/details.php?id=2285>.
- Essam, H.M., Abdellrazeq, G.S., Tayel, S.I., Torky, H.A. e Fadel, A.H. (2016). *Pathogenesis of Photobacterium damsela subspecies infections in sea bass and sea bream*. Microbial Pathogenesis 99: 41-50.
- Ji, C., Juárez-Hernández, R.E. e Miller, M.J. (2012). *Exploiting bacterial iron acquisition: siderophore conjugates*. Future Medical Chemistry 4(3): 297-313.
- Köster, W. (2001). *ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12*. Research in Microbiology 152: 291-301.
- Krewulak, K.D. e Vogel, H.J. (2008). *Structural biology of bacterial iron uptake*. Biochimia et Biophysica 1778: 1781-1804.
- Kuipers, R. S., Luxwolda, M. F., Dijck-Brouwer, D. A., Eaton, S. B., Crawford, M. A., Cordain, L. e Muskiet, A. J. (2010). *Estimated macronutrient and fatty acids intakes from an East African Paleolithic diet*. British Journal of Nutrition 104: 1666-1687.
- Loo, T.W. e Clarke, D.M. (2008). *Mutational analysis of ABC proteins*. Archives of Biochemistry and Biophysics 476: 51-64.
- Magariños, B., Toranzo, A.E. e Romalde, J.L. (1996). *Phenotypic and pathobiological characteristics of Pasteurella piscicida*. Annual review of Fish Diseases 6: 41-46.
- Magariños, B., Couso, N., Noya, M., Merino, P., Toranzo, A.E. e Lamas, J. (2001). *Effect of temperature on the development of pasteurellosis in carrier gilthead seabream (Sparus aurata)*. Aquaculture 195: 17-21.
- Martins, P., Navarro, R.V.V., Coelho, F.J.R.C. e Gomes, N.C.M. (2015). *Development of a molecular methodology for fast detection of Photobacterium damsela subspecies in water samples*. Aquaculture 435: 137-142.
- Miele, A. E., Federici, L., Sciara, G., Draghi, F., Brunori, M. e Vallone, B. (2003). *Analysis of the effect of microgravity on protein crystal quality: the case of a myoglobin triple mutant*. Acta Crystallographica D59: 982-988.
- Miller, M.C. e DeMoll, E. (2011). *Extraction, purification, and identification of yersiniabactin, the siderophore of Yersinia pestis*. Current Protocols in Microbiology 5B.3.1-5B.3.22.
- McPherson, A. (2004). *Introduction to protein crystallization*. Methods 34: 254-265.

- Milton, K. (2003). *The critical role played by animal source foods in human (Homo) evolution*. The Journal of Nutrition 133: 3886S–3892S.
- Natale, F., Hofherr, J., Fiore, G. e Virtanen, J. (2012). *Interactions between aquaculture and fisheries*. Marine Policy 38: 205-213.
- Navarro, A., Wu, H-S. e Wang, S.S. (2009). *Engineering problems in protein crystallization*. Separation and Purification Technology 68: 129-137.
- Nobre, T. M., Zuckermann, R. N., Kuhl, T. e Nikaido, H. (2013). *Langmuir monolayers of bacterial outer membranes*. Biophysical Journal 104: 251a.
- Osorio, C. R., Juiz-Río, S. e Lemos, M. L. (2006). *A siderophore biosynthesis gene cluster from the fish pathogen Photobacterium damsela subsp. piscicida is structurally and functionally related to the Yersinia high-pathogenicity island*. Microbiology 152: 3327-3341.
- Ottinger, M., Clauss, K. e Kuenzer, C. (2015). *Aquaculture: Relevance, distribution, impacts and spatial assessments - A review*. Ocean & Coastal Management 119: 244-266.
- Pawelek, P.D., Croteau, N., Ng-Thow-Hing, C., Khursigara, C.M., Moiseeva, N., Allaire, M. e Coulton, J.W. (2006). *Structure of TonB in complex with FhuA, E. coli outer membrane receptor*. Science 312: 1399-1402.
- Schuwirth, B.S., Borovinskaya, M.A., Hau, C.W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J.M. e Cate, J.H.D. (2005). *Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution*. Science 310: 827-834.
- Schalk, I.J., Mislin, G.L.A. e Brilllet, K. (2012). *Structure and binding selectivity and stereoselectivity of siderophore-iron outer membrane transporters*. Current Topics in Membranes 69: 37-66.
- Sinclair, H. M. (1956). *Deficiency of essential fatty acids and atherosclerosis, etcetera*. The Lancet, Letters to the Editor 382.
- Souto, A., Montaós, M.A., Rivas, A.J., Balado, M., Osorio, C.R., Rodríguez, J., Lemos, M.L. e Jiménez, C. (2012). *Structure and biosynthetic assembly of piscibactin, a siderophore from Photobacterium damsela subsp. piscicida, predicted from genome analysis*. European Journal of Organic Chemistry 5693-5700.
- Toranzo, A.E., Barreiro, S., Casal, J.F., Figueras, A., Magariños, B. e Barja, J.L. (1991). *Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (Sparus aurata): first report in Spain*. Aquaculture 99: 1-15.

Capítulos de libros

- Delmar, J.A., Bolla, J.R., Su, C.C. e Yu, E.W. (2015). *Crystallization of membrane proteins by vapor diffusion*. En: Spies, M. e Chemla, Y.R. (Eds.). Methods in Enzymology. Elsevier, pp. 363-392.
- Wiley, A. (2015). *Modern Human Diet*. En: Muehlenbein, M. (Ed.). Basics in Human Evolution. Elsevier, pp. 393-394.

Teses

- Ridgeway, W.K. (2003). *Techniques for the Crystallization of 70S Ribosomes from E. Coli*. UC Berkeley. Tese de Grado
- Valderrama-Pereira, A. K. (2016). *Estudio de los sideróforos y de las proteínas receptoras producidas por las bacterias patógenas de peces: Photobacterium damsela subsp. piscicida y Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*. Universidade da Coruña, A Coruña. Tese de Doutoramento.

Informes

- El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*. Roma. 224 pp.
- Informe del comité de disponibilidad de medicamentos veterinarios (CODI-VET) sobre vacíos terapéuticos y otras necesidades prioritarias*. (2016). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.
- La acuicultura en España, 2016*. (2016). Informe realizado por la Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España (APROMAR). 89 pp.

Recursos Web

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2009). Aquaculture production of aquatic animals for human consumption (tonnes) in 2009. Recuperado o 7 de novembro do 2016 de <http://www.fao.org/fishery/naso-maps/naso-maps/en/>

National Aeronautics and Space Administration (NASA). (2016). Commercial Protein Crystal Growth – High Density (CPCG) – 11.22.16. Recuperado o 9 de xaneiro de 2017 de https://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/experiments/252.html

ANEXO I

Concentraciones dos produtos de cristalización empregados e método utilizado, deseñado por Ridgeway, 2003.

	Variables	C0 (μL)	C1 (μL)	Stock (mM)
Variable A	Alcois	100	200	1200
Variable B	Precip. 4	10	15	25
Variable C	Imidazol	80	130	1000

	Dimensión	Variacións
Dim. 1	A-D / E-H	4
Dim. 2	1-6 / 7-12	6
Dim. 3	cuadrante	4

Volumen dos diferentes reactivos empregados, expresado en μL

	H	G	F	E	D	C	B	A
1	100	133	167	200	200	167	133	100
	10	10	10	10	10	10	10	10
	80	80	80	80	130	130	130	130
2	100	133	167	200	200	167	133	100
	11	11	11	11	11	11	11	11
	80	80	80	80	130	130	130	130
3	100	133	167	200	200	167	133	100
	12	12	12	12	12	12	12	12
	80	80	80	80	130	130	130	130
4	100	133	167	200	200	167	133	100
	13	13	13	13	13	13	13	13
	80	80	80	80	130	130	130	130
5	100	133	167	200	200	167	133	100
	14	14	14	14	14	14	14	14
	80	80	80	80	130	130	130	130
6	100	133	167	200	200	167	133	100
	15	15	15	15	15	15	15	15
	80	80	80	80	130	130	130	130
7	100	133	167	200	200	167	133	100
	10	10	10	10	10	10	10	10
	97	97	97	97	113	113	113	113
8	100	133	167	200	200	167	133	100
	11	11	11	11	11	11	11	11
	97	97	97	97	113	113	113	113
9	100	133	167	200	200	167	133	100
	12	12	12	12	12	12	12	12
	97	97	97	97	113	113	113	113
10	100	133	167	200	200	167	133	100
	13	13	13	13	13	13	13	13
	97	97	97	97	113	113	113	113
11	100	133	167	200	200	167	133	100
	14	14	14	14	14	14	14	14
	97	97	97	97	113	113	113	113
12	100	133	167	200	200	167	133	100
	15	15	15	15	15	15	15	15
	97	97	97	97	113	113	113	113

	mM	Stock (mM)	mL
MES	100	1000	0,09

Volume dos diferentes reactivos empregados, expresado en μ

	H	G	F	E	D	C	B	A
1	75	100	125	150	150	125	100	75
	360	360	360	360	360	360	360	360
	72	72	72	72	117	117	117	117

6	75	100	125	150	150	125	100	75
	540	540	540	540	540	540	540	540
	72	72	72	72	117	117	117	117

H2O Vol. 1	303	278	253	228	183	208	233	258
H2O Vol. 2	123	98	73	48	3	28	53	78