



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

Posgrado en Ciencias Bioquímicas.  
Facultad de Química

“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS  
GLICOPROTEÍNAS EN EL FILTRADO DE CULTIVO DE  
*Mycobacterium tuberculosis*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

Q.F.B MARGARITA GONZÁLEZ ZAMORANO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CLARA I. ESPITIA PINZÓN.





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO DE EXAMEN.**

PRESIDENTE. Dra. Rosario A. Muñoz Clares.

VOCAL. Dr. Edgar Zenteno Galindo.

SECRETARIO. Dra. Yolanda López Vidal.

SUPLENTE. Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros.

SUPLENTE. Dra. María del Carmen Wachter Rodarte.

.

**Lugar de realización.**

Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM.

## DEDICATORIAS

*En especial a mi padre, me sorprendía tu tenacidad y disciplina, gracias por dejar un poco de ello en mí. Fuimos cómplices en silencio.*

*A mi madre, para ti no hay nada imposible, me enseñaste a luchar siempre, a despertar y enfrentar al día con una sonrisa para seguir adelante, no importando que tan difícil se viera el panorama tu lo coloreabas con una habilidad maravillosa. Admiro tus pinceles y agradezco que me los prestes de vez en cuando.*

*A mi pequeño Emiliano, trabajaste a lado mío, haciéndome compañía en momentos de adversidad y bastó sentir tu corazón y mirar tus ojos para saber cual era el pincel que debía usar ese día.*

*Mis pies encontraron un camino suave y cálido, decidimos caminarlo juntos y te agradezco cada momento compartido. Tus pinceladas fueron hermosas y el paisaje que dibujaste maravilloso, finalmente este camino término. Muy cerca encuentro uno nuevo, no se como sea ni quién ira conmigo, pero espero verte ahí Luis.*

*A mis hermanos y hermanas quienes sin duda son mi mejor ejemplo, ellos me enseñaron que pinceles debía adquirir, me ayudaron a usarlos, algunos me hacían interesantes préstamos, en el mejor de los casos me regalaron pinceles únicos y valiosos por lo tanto. Y aquí estoy, terminando de dibujar esta parte de mi vida, vaya que tengo los mejores pinceles en mis manos y gracias a ellos la vista a mi paso es realmente hermosa.*

*A mi incondicional angelito, un gracias parece poco cuando quiero agradecerte tanto. Los pinceles mas delicados provienen de ti. Cambiaste el rumbo de mi vida aquella tarde cuando te encontré en casa de papá, ¿te acuerdas? Has sido pilar en mi vida y en verdad que sin tu compañía los colores de este paisaje serían menos brillantes, este logro es tanto tuyo como mío, a mi hermanita Adis.*

## AGRADECIMIENTOS

*Mi más sincero y profundo agradecimiento a la Dra. Clara Espita Pinzón por su enseñanza, confianza, paciencia y calidad humana que me brindo durante mi estancia en su laboratorio, fue una experiencia muy valiosa en mi vida. Gracias por el aprendizaje académico que fue enriquecedor pero también por su calidez humana que permite la armonía en sus estudiantes.*

*A mis compañeros y amigos de laboratorio, sus enseñanzas fueron indispensables para concluir este sueño. Gracias Toño por tu excelente disponibilidad hacia los demás, por tus maravillosas enseñanzas, porque compartimos momentos hermosos y por ser un guía extraordinario, sin duda ha sido enriquecedor haberte conocido.*

*A Wendy, siempre estuviste ahí para mí, fuiste mi maestra, dispuesta en cada momento a compartir conmigo tu conocimiento. Me animaste a ser mejor persona, mejor alumna y mejor amiga.*

*A Ingrid por tus consejos y tu sonrisa. Aprendí de ti que no hay día malo si volteas y le regalas una sincera carcajada.*

*A Edén por tu apoyo, amistad y compañía.*

*A Martha por los momentos compartidos y consejos, gracias por escuchar.*

*A Cristina Parada por el apoyo técnico otorgado para la realización de esta tesis.*

*Porque todos de alguna forma contribuyeron al logro de este trabajo.*

*Gracias a todos porque hicieron de mi estancia en el laboratorio algo que siempre quiero recordar.*

*Porque jamás seremos un número de cuenta para ti, por tu extraordinaria y hermosa calidad humana. Mil gracias Lety.*

*Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.*

*A CONACYT por el financiamiento a los proyectos de la Dra. Clara Espita y por la beca otorgada.*

*Me permitiste graduarme como profesional y hoy me regalas la oportunidad de subir un escalón más. Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México.*



## RESUMEN

Hasta hace relativamente poco tiempo, se creía que las glicoproteínas eran exclusivas de eucariontes. Actualmente, se han encontrado glicoproteínas en patógenos asociados a mucosas, en donde los azúcares se encuentran unidos a través del grupo amida de la Asn o por el grupo hidroxilo de la Ser o Thr como ocurre en los eucariontes. La función de un gran número de las glicoproteínas bacterianas es aún desconocida, sin embargo algunos trabajos revelan que la importancia de estas moléculas parece radicar principalmente en la interacción patógeno-hospedero, así la glicosilación puede tener una participación en la adhesión, en la protección contra la proteólisis y la variación antigénica. Proteínas glicosiladas han sido también identificadas en *Mycobacterium tuberculosis* el agente causal de la tuberculosis en humanos. No obstante que en el genoma de *M. tuberculosis* existen numerosos genes que potencialmente podrían estar involucrados en la biosíntesis y activación de azúcares, hasta la fecha sólo se han identificado 8 glicoproteínas: Mpt32, Mpb83, PstS1, LpqH, Sod C, LppN, LppQ y GlnH, y sólo en los dos primeros casos se ha definido la estructura glicosídica (O-manosilación). En este trabajo se identificaron 41 glicoproteínas (incluyendo las ya identificadas) por su capacidad de interactuar con la lectina Concanavalina A. Interesantemente, de las 35 nuevas glicoproteínas putativas encontradas, 19 son lipoproteínas por predicción (Lpql, LpqN, PstS3, PstS2, LpqT, LpqW, LprA, OppA, LprF, LprG, LppC, LppL, GgtB, Proteasa secretada, LppX, LppZ, FecB, LpqB, LpqF). El hecho de que todas ellas probablemente contengan manosas, sugiere que podrían tener un papel en uno de los eventos iniciales en la patogénesis de la tuberculosis, como la adherencia e internalización del bacilo a los macrófagos alveolares y células dendríticas a través de receptores como el de manosa, y el DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intracellular molecule-3-Grabbing Non-integrin), como se ha demostrado para algunas de las glicoproteínas reportadas, en este patógeno, que son principales adhesinas de DC-SIGN y el receptor de manosa. Este estudio, pionero en el análisis del glicoproteoma de *M. tuberculosis*, dará paso a investigaciones que lleven a caracterizar la estructura glicosídica y determinar cual podría ser el papel de estas macromoléculas en la patogenicidad del bacilo.

PALABRAS CLAVE: Glicoproteína, manosa, tuberculosis, concanavalina A, proteómica.



## SUMMARY

Until relatively recently it was believed that the glycoproteins were unique to eukaryotes. Currently, glycoproteins found in mucosa-associated pathogens, indicating that the importance of these molecules could lie mainly in the host pathogen interaction, so the glycosylation could play a role in adhesion, protection against proteolysis and antigenic variation. Glycosylated proteins have also been identified in *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis in humans. Although in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* there are many genes that could potentially be involved in the biosynthesis and activation of sugars, so far only 8 glycoproteins have been identified: Mpt32, Mpb83, PstS1, LpqH, Sod C LppN, LppQ and GlnH and only in the 2 first the glycosidic linkage structure have been defined (O-mannosylation). In this study, 41 glycoproteins were identified (including those already known) for their ability to interact with the lectin Concanavalin A. Interestingly, among the 35 new putative glycoproteins found, 19 are lipoproteins by prediction (Lpql, LpqN, PstS3, PstS2, LpqT, LpqW, LprA, OppA, LprF, LprG, LppC, LppL, GgtB, Proteasa secretada, LppX, LppZ, FecB, LpqB, LpqF). The fact that all of them seem to contain mannose, suggest that they could have a role in the initial events in the pathogenesis of tuberculosis, such as the adherence and internalization of the bacilli in alveolar macrophages and dendritic cells through mannose receptors and DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intracellular molecule-3-Grabbing Non-integrin). In fact, it has been shown that some of the bacillus glycoproteins are the major adhesins of DC-SIGN and mannose receptor. This study, pioneered in the *M. tuberculosis* glycoproteome, will open a way for investigations to characterize the glycosidic structure and determine which might be the role of these macromolecules in the pathogenicity of the bacillus.

**KEYWORDS:** Glycoprotein, mannose, tuberculosis, concanavalin A, proteomics.



## Índice General

Resumen .....	4
Summary .....	5
Lista de figuras .....	7
Lista de tablas .....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Glicosilación de proteínas en bacterias.....	10
1.2 Glicoproteínas y glicosilación en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	15
1.3 Posibles funciones biológicas atribuidas a glicoproteínas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVOS.....	28
2. MÉTODOS.....	29
2.1 Obtención del filtrado de cultivo .....	30
2.2 Ligand-blot (ConA-HRP) e Inmuno-reactividad.....	30
2.3 Isoelectroenfoque y SDS-PAGE.....	32
2.4 Cromatografía de afinidad a Concanavalina A.....	33
2.5 Espectrometría de masas.....	33
3.RESULTADOS .....	36
3.1 Análisis de las proteínas por SDS-PAGE.....	37
3.2 Ligand-blot (ConA- HRP).....	38
3.3 Isoelectroenfoque y SDS-PAGE.....	39
3.4 Cromatografía de afinidad.....	44
3.5 Ensayos de ligand-blot de FC-FG y F1-FG resueltas en 2D SDS-PAGE..	46
3.6 Espectrometría de masas (LC/ESI-MS/MS) y predicción de O-glicosilación con NetO-Glyc.....	49
3.7 Análisis Bioinformático .....	55



4. DISCUSIÓN.....	58
5. CONCLUSIONES.....	64
6. BIBLIOGRAFÍA.....	65
Abreviaturas .....	72

## Lista de Figuras

Figura 1. Representación del tipo de uniones glicosídicas.....	11
Figura 2. Esquema de las vías de glicosilación en células eucarióticas.....	12
Figura 3. Esquema de las vías de glicosilación en <i>Campylobacter jejuni</i> .....	13
Figura 4. Estructura de las manosas unidas a Mpt32 .....	18
Figura 5. Proteínas de filtrado de cultivo de <i>M. tuberculosis</i> .....	37
Figura 6. Ensayo de ligand-blot (ConA-HRP) de las fracciones obtenidas del filtrado de cultivo (FC y F1).....	38
Figura 7. Ensayo de ligand-blot (ConA-HRP) de FC .....	40
Figura 8. Ensayo de ligand-blot (ConA-HRP) de F1 .....	41
Figura 9. Inmuno-reactividad contra LprG en F1 .....	42
Figura 10. Ensayo de ligand-blot de proteínas nativas y recombinantes (PstS1 y LprG).....	43
Figura 11. Secuencia de LprG y su predicción de O-glicosilación .....	44
Figura 12. Purificación por afinidad a la columna de Con A de la fracción FC.....	45
Figura 13. Purificación por afinidad a la columna de Con A de la fracción F1....	46
Figura 14. Ensayo de ligand-blot de FC-FG.....	47
Figura 15. Ensayo de ligand-blot de F1-FG.....	48



---

## Lista de Tablas

Tabla 1. Genes potencialmente involucrados en la glicosilación de macromoléculas en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	16
Tabla 2. Secuencias glicosiladas en Mpt32 y Mpb83 .....	21
Tabla 3. Péptidos predichos por Herrmann en el 2000 .....	22
Tabla 4. Predicción de O-glicosilación en NetOglyc para LprG.....	44
Tabla 5. Identificación por LC/ESI-MS/MS de las proteínas en la fracción enriquecida FC-FG .....	49
Tabla 6. Predicción de sitios de O-glicosilación, lipidación y péptido señal en las proteínas identificadas.....	56



# Introducción

1.1 Glicosilación de proteínas en bacterias

1.2 Glicoproteínas y glicosilación en *M. tuberculosis*

1.3 Posibles funciones biológicas atribuidas a glicoproteínas de *M. tuberculosis*



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS EN BACTERIAS

La glicosilación proteica es el proceso en el que un oligosacárido o monosacárido se une covalentemente a una proteína. Esta unión ocurre entre el grupo hidroxilo libre de la Ser o Thr y el hidroxilo del carbono uno del azúcar. Si en el enlace covalente participa un oxígeno ( $O_2$ ), esta unión se denomina **O**-glicosilación. El azúcar también puede unirse al grupo amida de una Asn y en este caso es el nitrógeno (**N**) el que está involucrado en el enlace, de ahí el término **N**-glicosilación (**Fig. 1**). Hasta hace poco se creía que las glicoproteínas eran exclusivas de organismos eucariontes debido a que las bacterias carecen de retículo endoplásmico (RE) y de aparato de Golgi (AG), organelos altamente especializados en donde se llevan a cabo los procesos de N y O-glicosilación, respectivamente. Sin embargo, ha sido posible identificar varias glicoproteínas en las bacterias, principalmente por su capacidad de unirse a determinadas lectinas. Estas observaciones fueron poco aceptadas entre la comunidad científica debido al alto contenido de lipopolisacáridos bacterianos que podrían contaminar las preparaciones, siendo necesaria la demostración de que los azúcares se encontraban covalentemente unidos a las proteínas, así como la caracterización estructural de los mismos para confirmar su existencia en estos microorganismos. En los últimos años, gracias a los avances en los métodos analíticos y la secuenciación de los genomas bacterianos, se han encontrado glicoproteínas en



patógenos asociados a mucosas, en donde los azúcares se encuentran unidos a través del grupo amida de la Asn o por el grupo hidroxilo de la Ser o Thr, tal como ocurre en organismos eucariontes.

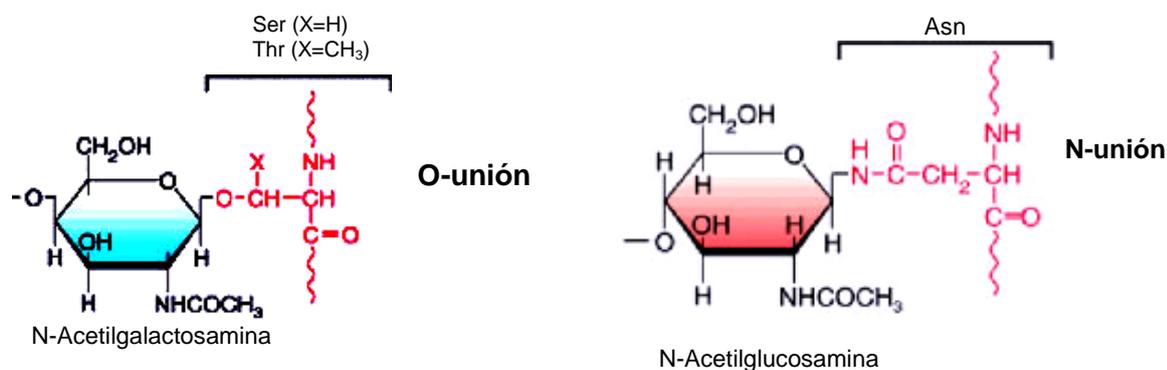
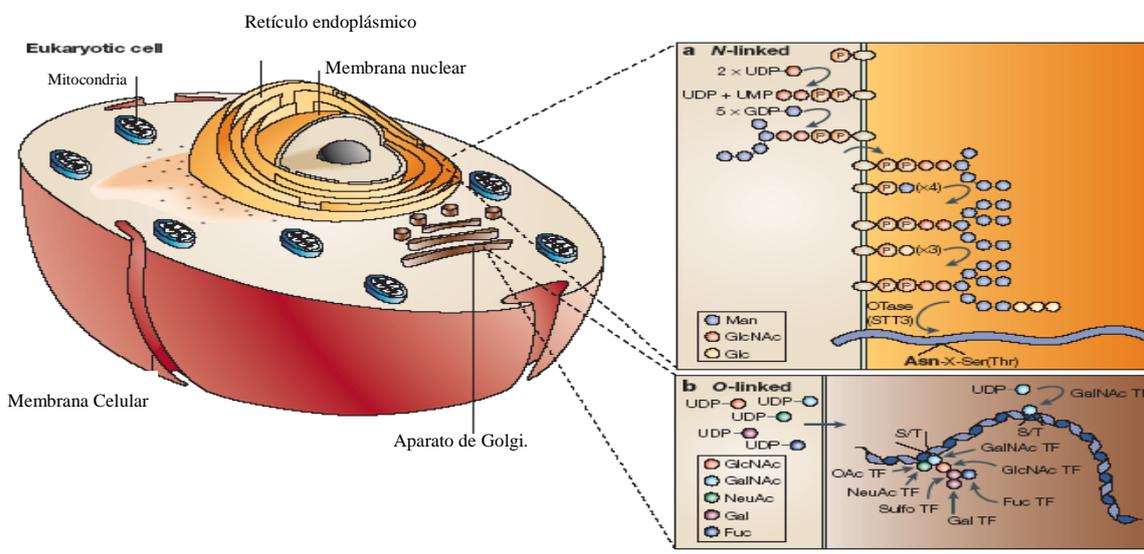


Fig. 1. Representación del tipo de uniones glicosídicas.

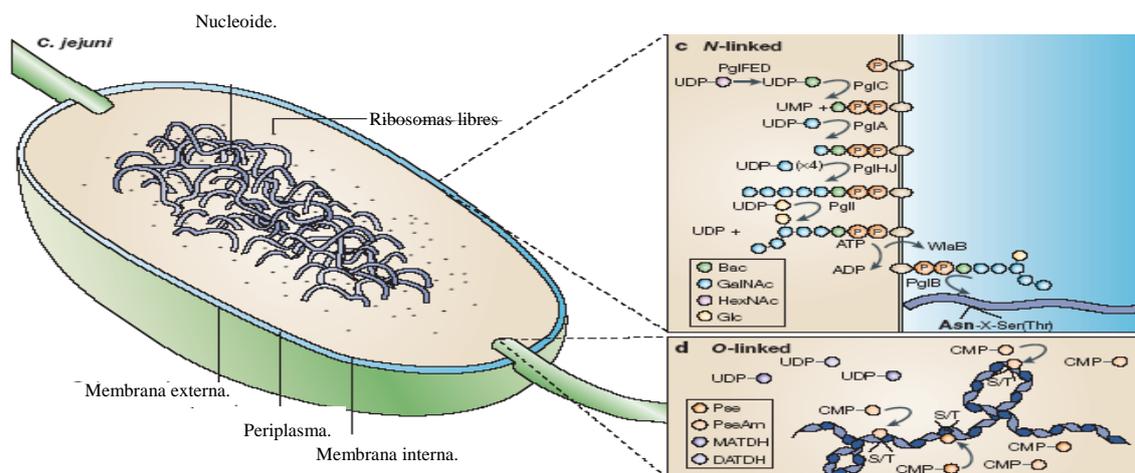
La glicosilación proteica ha sido relativamente bien caracterizada en eucariontes, en donde se ha descrito que la N-glicosilación requiere de un lípido intermediario anclado a la membrana del RE; los monosacáridos son unidos secuencialmente a esta molécula por glicosiltransferasas específicas, el lípido es translocado a la luz del RE en donde el oligosacárido se completa y finalmente se transfiere, por una oligosacariltransferasa, a la Asn de una proteína en proceso de síntesis. En tanto que la O-glicosilación ocurre en el AG y sólo requiere del lípido intermediario para transferir el primer monosacárido, los siguientes azúcares son unidos directamente a la proteína (**Fig. 2**).



**Figura 2.** Esquema de las vías de glicosilación en células eucarióticas (Szymanski et al., 2003).

Algunas investigaciones sugieren que los procesos de glicosilación podrían ser similares entre eucariontes y procariontes, aunque difieren en la localización subcelular y el tipo de azúcares involucrados. Recientemente se han identificado y caracterizado parcialmente en *Campylobacter jejuni*, principal agente causal de la gastroenteritis en humanos, ambas vías de glicosilación (N y O-glicosilación). Se ha propuesto que la N-glicosilación en esta bacteria ocurre en el periplasma, donde el lípido intermediario se encuentra anclado a la membrana interna del patógeno, de esta manera los azúcares activados del citoplasma son secuencialmente ensamblados sobre éste para ser translocados al espacio periplásmico, el cual simularía el espacio reticular en donde finalmente se transfiere el oligosacárido a la proteína (Wacker et al., 2002; Young et al., 2000; Thibault et al.,

2001; Logan et al., 2002). Por otro lado se ha sugerido que la O-glicosilación en esta bacteria se lleva a cabo en el citoplasma o en la interfase del citoplasma y la superficie del pili o flagelo (**Fig.3**) (Szymanski et al., 2003; Weerapana y Imperiali, 2006).



**Figura 3.** Esquema de las vías de glicosilación en *Campylobacter jejuni* (Szymanski et al., 2003).

Se ha demostrado además que el motivo (Asn-X-Ser/Thr) de la N-glicosilación eucariótica se conserva en bacterias. En algunos casos se requiere, pero no es condición suficiente, un aminoácido cargado negativamente en la posición -2 con respecto a la Asn, (Asp/Glu-X-Asn-X-Ser/Thr), en donde X es cualquier aminoácido excepto Pro (Kowarik et al., 2006; Lazar-Nita et al., 2005).

Por otro lado, es muy común que la O-glicosilación ocurra en motivos ricos en Pro en donde la probabilidad de glicosilación parece incrementarse significativamente si uno de los residuos de Pro está localizado en la posición -1 y/o +3 (Herscovics y Orlean, 1993). Se propone que estos residuos de Pro cercanos al sitio de O-glicosilación favorecen la exposición del residuo de Thr para la



glicosiltransferasa (Gooley et al., 1991), ya que la Pro al ser un aminoácido cuya  $\alpha$ -amina es una amina secundaria, deja al enlace peptídico parcialmente impedido en su rotación natural, por lo que generalmente se les asocia o se encuentran al final de estructuras secundarias formando parte de los “loops” o vueltas que se encuentran en la parte externa de la molécula, favoreciendo que los residuos de Thr se encuentren expuestos (Hill et al.1977). Sin embargo, otros factores podrían estar favoreciendo la glicosilación de las Thr, puesto que se ha encontrado en algunas glicoproteínas como la leucosialina de rata que posee 11 Thr-O-glicosiladas, que solo 5 de ellas están relacionadas con Pro (Killeen N, et al 1987).

La función de muchas de las glicoproteínas bacterianas es aún desconocida. Sin embargo, algunos trabajos revelan que la importancia de estas moléculas parece radicar principalmente en la interacción patógeno-hospedero. Recientes estudios demuestran que la glicosilación puede tener una función en la adhesión (Kuo et al., 1996; Lindenthal y Elsinghorst, 1999), protección contra la proteólisis (Herrmann et al., 1996) y variación antigénica (Doig et al., 1996). Por ejemplo, la modificación de los azúcares en la flagelina de *Pseudomonas syringae* determina la especificidad a la planta hospedera (Takeuchi et al., 2003). También se sabe que mutaciones en los genes involucrados en la N-glicosilación de *Campylobacter jejuni* generan una reducción en la adherencia e invasividad *in vitro* y la colonización intestinal en pollos y ratones (Szymanski et al., 2002; Hendrixson y DiRita., 2004; Jones et al., 2004). La glicosilación de la pilina de *Neisseria meningitidis* afecta la adherencia de estos organismos a las células endoteliales (Virji et al., 1993). Muchas de las



glicoproteínas bacterianas se encuentran en la superficie, aunque se han identificado varias glicoproteínas secretadas en *Cellulomonas fimi* (Ong et al., 1994), *Streptococcus faecium* (Kawamura and Shockman, 1983) y *Streptomyces spp* (Kluepfel et al., 1990).

## **1.2. GLICOPROTEÍNAS Y GLICOSILACIÓN EN *Mycobacterium tuberculosis***

**D**entro de los patógenos en los que se han identificado glicoproteínas se encuentra *M. tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis en humanos. Esta enfermedad continúa siendo uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. En términos globales se estima que anualmente ocurren 8 millones de nuevos casos de tuberculosis y alrededor de 3 millones de muertes. La sinergia mortal con el VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) y un aumento de casos fármaco-resistentes contribuyen al resurgimiento de la enfermedad. En un intento por controlar esta situación se han iniciado diversas investigaciones para la obtención de mejores técnicas de diagnóstico, vacunas y quimioterapias, junto con el desarrollo de investigación básica que contribuya a entender mejor la biología y patogenia de este bacilo. Dentro de este contexto el presente trabajo pretende establecer antecedentes en el conocimiento de las glicoproteínas micobacterianas que permitan el avance de la investigación sobre la naturaleza de su estructura glicosídica, su papel biológico y su posible interacción con el hospedero.



Es importante reconocer primeramente que el genoma de *M. tuberculosis* contiene genes potencialmente involucrados en la biosíntesis y activación de azúcares, varias glicosiltransferasas y algunas oligosacariltransferasas que pudieran intervenir en la glicosilación de macromoléculas como lípidos y/o proteínas (Cole et al., 1998). En el caso de la N-glicosilación, las glicosiltransferasas transfieren los azúcares al lípido intermediario (Dolicol-P, que en levaduras es un poli-isoprenoide que contiene de 14 a 18 unidades de isopreno). La presencia de genes que potencialmente codifican enzimas que intervienen en la síntesis de Dol-P o que están involucradas en la transferencia de azúcares a este lípido (**Tabla 1**), sugiere que la micobacteria podría llevar acabo procesos de N-glicosilación y no solo de O-glicosilación, como se ha descrito hasta el momento.

Interesantemente, según nuestros análisis del genoma, parece existir un locus de glicosilación (Rv1500-Rv1526) (**Tabla 1**). Sin embargo es necesario el trabajo experimental para comprobar y definir si los genes presentes en esta región podrían estar involucrados en la glicosilación de una o varias proteínas de la micobacteria.

Gen	Nombre de la proteína
Rv0320	Posible UDP-Glucosa 6 deshidrogenasa
Rv0334	$\alpha$ -D-glucosa-1-P-timidiltransferasa
Rv0363	Posible fructosa-bifosfato aldolasa
Rv0486	Probable Manosiltransferasa
Rv0539	Probable Dol-P-Glicosil-transferasa
Rv0557	Probable Manosiltransferasa
Rv0696	Probable glicosiltransferasa
Rv0112	Posible GDP-Manosa 4,6-Dehidratasa
Rv0113	Probable Sedoheptulosa-7-fosfato isomerasa.
Rv0536	Probable UDP-Glucosa 4-Epimerasa
Rv0562	Probable poliprenil-difosfato sintasa
Rv0619	Probable Galactosa-1-P-Uridiltransferasa
Rv0727	Posible L-Fucolasa-P-aldolasa
Rv0728	Posible D-Xilulosa cinasa
Rv0993	Posible UTP-Glucosa-1-P-Uridiltransferasa
Rv1002c	Probable Dol-P-manosil transferasa
Rv1018	UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa
Rv1208	Probable glicosiltransferasa
Rv1213	Glucosa-1-fosfato adeniltransferasa



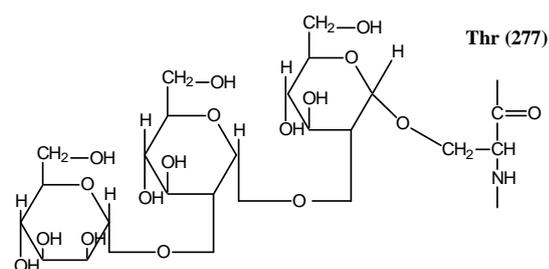
Rv1248	Probable Transportador de azúcar ATP-uni3n a prote3na ABC
Rv1327	Probable glucanasa
Rv1328	Probable Gluc3geno fosforilasa
Rv1500	Dol-P-manosil transferasa
Rv1503	Bios3ntesis de lipopolisac3rido
Rv1504	Bios3ntesis de lipopolisac3rido
Rv1508	Probable GDP-D-manosa dehidratasa
Rv1511	GDP-D-manosa dehidratasa
Rv1512	Probable nucle3tido-az3car epimerasa epiA fucosa sintasa
Rv1514c	Probable Glicosil transferasa
Rv1515c	Probable Glicosil transferasa
Rv1516c	Probable Glicosil transferasa
Rv1518	Probable O- uni3n-N-acetilglucosamina transferasa
Rv1520	Probable Glicosil transferasa
Rv1523	Probable Metiltransferasa
Rv1524	Probable Glicosiltransferasa
Rv1525	Probable Ramnosiltransferasa
Rv1526	Probable Ramnosiltransferasa
Rv2051c	Poliprenol-monofosfomanosa sintasa
Rv2188c	Probable glicosil transferasa
Rv2739c	Probable N-glicosil transferasa
Rv2958	Probable Glicosil transferasa
Rv2962	Probable Glicosil transferasa
RV3401	Probable Glicosil transferasa

**Tabla 1.** Genes potencialmente involucrados en la glicosilaci3n de macromol3culas en *M. tuberculosis*.

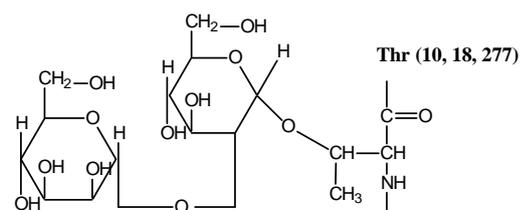
En 1989, Espitia y Mancilla por primera vez reportaron dos prote3nas en filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv con capacidad de unir concanavalina A (ConA), que es una lectina de uni3n a manosa y glucosa. Sus observaciones suger3an que estas mol3culas pudieran ser glicoprote3nas (Espitia y Mancilla, 1989). Tiempo despu3s esas prote3nas fueron identificadas como Mpt32 una prote3na rica en prolina y PstS1, esta 3ltima involucrada en el transporte de fosfato en la micobacteria. A partir de ah3 se intensificaron los estudios para determinar si estas prote3nas se encontraban unidas covalentemente a los az3cares (Dobos et al., 1995), hasta que en 1996, Mpt32 fue caracterizada como verdadera glicoprote3na (Dobos et al., 1996). Mpt32 contiene manosas unidas  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 2 de la misma forma que se une el oligomanosil presente en el lipoarabinomanan (LAM) uno de los l3pidos m3s abundantes en la membrana de este bacilo. Esto ha llevado a especular si el



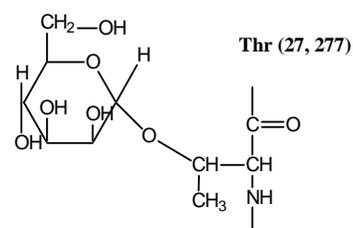
oligomanosil presente en Mpt32 pudiese tener un papel en la fagocitosis del bacilo, como lo hace el LAM a través de sus azúcares (Schlesinger et al., 1994). Específicamente, las Thr en la posición 10 y 18 de esta proteína se encuentran unidas a manobiosas en su forma piranosa (Manp) con enlaces  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -D-Manp, la Thr en la posición 27 esta ligada a una manosa en su forma  $\alpha$ -D-Manp, mientras que en el extremo C-Terminal, la Thr 277 puede estar unida a una manosa, manobiosa o manotriosa en las siguientes formas:  $\alpha$ -D-Manp,  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -D-Manp ó  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -D-Manp (Dobos et al., 1996), como se muestra en la **Fig. 4**.



$\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -D-Manp



$\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -D-Manp



$\alpha$ -D-Manp

**Figura 4.** Estructura de las manosas unidas a las Thr de Mpt32 y el tipo de enlaces presentes.



En 1993 Garbe y colaboradores determinaron que LpqH, una lipoproteína muy inmunogénica de *M. tuberculosis*, es una glicoproteína. Demostraron que la proteína recombinante expresada en *Mycobacterium smegmatis* tuvo la capacidad de unirse a ConA (Garbe et al., 1993).

En el 2000, Herrman y colaboradores en un intento por identificar nuevas glicoproteínas utilizaron el programa predictivo NetOGlyc: (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) que predice sitios de O-glicosilación en proteínas eucarióticas. Las proteínas objeto del análisis fueron exclusivamente lipoproteínas hipotéticas reportadas en el genoma de *M. tuberculosis*. Mediante la expresión recombinante de las regiones potencialmente glicosiladas de algunas de estas moléculas en *M. smegmatis*, fue posible determinar que los péptidos predichos tenían capacidad de unir ConA, unión que fue inhibida por  $\alpha$ -metil-D-manopiranosido ( $\alpha$ -Met-D-Manp). De esta forma se determinó que LppN, LppQ, SodC y GlnH podrían ser glicoproteínas (Herrmann et al., 2000).

Posteriormente, fue otra lipoproteína, Mpb83, la que se confirmó como glicoproteína, al determinarse los sitios de glicosilación y la estructura de los azúcares involucrados (Michell et al., 2003). En Mpb83 las uniones entre las manosas presentes es (1 $\rightarrow$ 3) en la Thr 48 y/o 49. La glicofoma más abundante identificada está sustituida por manosas en su forma  $\alpha$ -D-Manp en la Thr 48 y  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 3)  $\alpha$ -D-Manp en la Thr 49. Sin embargo se ha reportado la existencia de otros arreglos como manotriosas  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 3)  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 3)  $\alpha$ -D-Manp unidas



a la Thr 48 y la ausencia del azúcar en la Thr 49, o de manera inversa, el trimanósido en la posición 49 y la Thr 48 libre (Michell et al., 2003).

Interesantemente, todas las moléculas de *M. tuberculosis* reportadas como glicoproteínas y posibles glicoproteínas tienen la capacidad de unir Con A y esta interacción es inhibida por  $\alpha$ -Met-D-Manp. En algunos casos se reporta que la digestión con  $\alpha$ -manosidasa, la oxidación con metaperiodato de sodio y el tratamiento con ácido trifluorometanosulfónico (TFMS) inhiben la unión a la lectina, sugiriendo que la interacción está específicamente mediada por azúcares. El tipo y estructura de los azúcares, así como los sitios de glicosilación, se desconocen para la mayoría de estas moléculas. Sin embargo, los antecedentes demuestran que *M. tuberculosis* contiene un sistema de O-glicosilación. Los azúcares involucrados son oligomanósidos simples unidos a través de Thr. Interesantemente las glicoproteínas reportadas hasta el momento son lipoproteínas excepto Mpt32. Estas moléculas son proteínas bacterianas con diversas funciones que se caracterizan por un motivo lipídico en el extremo N-terminal, el cual sirve como anclaje a la superficie celular (Rezwan M et al; 2007). De acuerdo a la estimación basada en métodos bioinformáticos *M. tuberculosis* contiene 99 lipoproteínas putativas (Sutcliffe et al; 2004).

Por otro lado, como se menciona anteriormente, se sabe que para la O-glicosilación no existe un motivo estricto, pero es muy común que la Thr glicosilada se encuentre en dominios ricos de Pro. La posibilidad de glicosilación parece incrementarse significativamente si uno de los residuos de Pro está localizado en la posición -1 y +3 con respecto al aminoácido glicosilado (Herscovics y Orlean, 1993).



Se ha propuesto que estos residuos de Pro ayudan a una óptima exposición del residuo de Thr a la glicosiltransferasa (Gooley et al., 1991). Interesantemente las Thr de Mpt32 y Mpb83 se encuentran cercanas a Pro y en algunos casos están en la posición -1 y +3 respecto a la Thr glicosilada (**Tabla 2**).

Más recientemente se ha determinado que las Val cercanas pudieran también ser importantes (Cooper et al., 2002).

Proteína	Secuencia
<b>Mpt32</b>	PPV <u>P</u> T <sub>10</sub> TAA
	PPST <sub>18</sub> AAAPP
	PAT <sub>27</sub> PVAPPPP
	PTT <sub>277</sub> <sup>+3</sup> <u>P</u> T <u>P</u>
<b>Mpb83</b>	PVT <sub>48</sub> T <sub>49</sub> AA

**Tabla 2.** Secuencias glicosiladas en Mpt32 y Mpb83.

Únicamente se han caracterizado estructuralmente los oligosacáridos de estas dos moléculas. Sin embargo, del análisis predictivo (NetOglyc) de Herrmann en el 2000 y la unión a ConA de los péptidos predichos, se ha sugerido una secuencia de aminoácidos que pudiese ser el blanco de glicosilación para el resto de las posibles glicoproteínas reportadas hasta el momento en *M. tuberculosis* (**Tabla**



3). Cabe mencionar que la proteína Mpt32, utilizada como control positivo en el trabajo de Herrmann, obtuvo una buena predicción. Nuevamente, en la mayoría de estas secuencias se encuentra presente una Pro en posición +3 y/o -1 con respecto a las Thr posiblemente glicosiladas (**Tabla 3**).

Proteína	Secuencia
LpqH	ETT <u>T</u> AAGTTASP <sup>+3</sup>
PstS1	VATTPASSPVTL
LppN	<sup>-1</sup> PTNPP <sup>+3</sup> ATAETATV <sup>-1</sup> SPT <sup>+3</sup> PA <u>P</u>
LppQ	<sup>-1</sup> KTSE <sup>-1</sup> PTCPT <sup>+3</sup> EPIDAADSSTTPD <u>P</u>
Sod C	STVPGTTPSIWTGSP <sup>+3</sup>
GlnH	<sup>-1</sup> ATP <u>T</u> LP

**Tabla 3.** Péptidos predichos por Herrmann en el 2000. Con superíndice se indica la posición de la Pro con respecto a la Thr posiblemente glicosilada.



Por otro lado, se sabe que la mayoría de las micobacterias sintetizan diferentes formas de manolípidos en la pared celular (fosfatidilinositol, manósido, lipoarabinomanan). Una de las enzimas involucradas en la biosíntesis de los azúcares presentes en los lípidos es la fosfomanosa isomerasa (PMI). Se ha determinado que esta enzima cataliza la interconversión de fructosa 6-fosfato a manosa 6-fosfato, siendo la única vía para la síntesis de novo para manosa. La delección de PMI disminuye la capacidad de *M. smegmatis* para sintetizar moléculas que contienen manosas en ausencia exógena de este azúcar. Estos estudios determinaron que el metabolismo de manosa es esencial para el crecimiento de la bacteria, por lo que los autores han propuesto que algunas moléculas que contienen manosa podrían directa o indirectamente tener un papel importante en la regulación de la división celular (Patterson et al., 2003). Estos y otros estudios han determinado la importancia del metabolismo de manosa para la micobacteria.

En contraste con *Campylobacter jejuni*, se conoce muy poco sobre las vías de glicosilación proteica en *M. tuberculosis*. En el 2002 Cooper y colaboradores utilizaron péptidos glicosilados derivados de Mpt32 en la búsqueda de actividad de glicosiltransferasa *in vitro* en diferentes fracciones celulares. La incorporación de GDP-[14 C] manosa se inhibió por la adición de amfomicina (la cual inhibe la formación del poliprenol) indicando que el donador del azúcar al péptido aceptor es un miembro de la familia del poliprenol-P-manosa (lípidos intermediarios). Este proceso recuerda lo que sucede con la actividad dependiente de dolicol-P-manosa



en la síntesis de glicoproteínas en mamíferos. De esta forma se demostraron similitudes entre la O-manosilación proteica de *M. tuberculosis* y la O-manosilación de *Saccharomyces cerevisiae*. La actividad de O-manosiltransferasa de ambos microorganismos está asociada a la membrana y requieren un lípido intermediario como donador de manosa (Cooper et al., 2002). Estas similitudes entre dos organismos totalmente alejados filogenéticamente sugieren que la maquinaria enzimática para la O-manosilación podría estar conservada (Herscovics y Orlean, 1993). También surgió la hipótesis de que la glicosilación en LpqH fuese iniciada por un azúcar diferente a manosa, debido a que el péptido derivado de dicha proteína no fue susceptible a la acción de la manosiltransferasa (Herscovics y Orlean, 1993).

### **1.3. POSIBLES FUNCIONES BIOLÓGICAS ATRIBUIDAS A LAS GLICOPROTEÍNAS DE *M. tuberculosis***

**S**e sabe que *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular no obligado que infecta preferencialmente el pulmón. El evento inicial en la patogénesis de la tuberculosis es la adherencia del bacilo a los macrófagos alveolares, para lo cual la bacteria interactúa con una variedad de receptores de superficie en macrófagos, que incluyen al receptor de manosa, a la proteína A surfactante del pulmón y a DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intracellular molecule-3-Grabbing Non-integrin), a través de sus glico-conjugados lipídicos para dar lugar a la fagocitosis del bacilo. Recientemente se demostró que LpqH es una de las principales adhesinas para el receptor de manosas y de DC-SIGN (Díaz-Silvestre et al., 2005; Pitarque et al., 2005). Por otro lado Mpt32 es la adhesina de la proteína A surfactante y se sugiere que también del DC-SIGN (Pitarque et al., 2005; Ragas et al., 2007).



Asimismo se ha demostrado que el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) restringido a células T CD4+ es crucial para el control de la infección con *M. tuberculosis*. Sin embargo, este patógeno es capaz de persistir paradójicamente dentro de los macrófagos evadiendo la respuesta inmune. El mecanismo de este proceso no se conoce por completo, sin embargo se ha propuesto que el bacilo provoca una disminución del procesamiento antigénico y la expresión de moléculas MHC, evitando el reconocimiento de los macrófagos infectados por los linfocitos T CD4+. En este contexto, se ha descrito que LpqH a través de TLR-2 es capaz de inhibir la expresión de MHC-II y el procesamiento antigénico (Fulton et al., 2004; Noss et al., 2001). De igual modo, se ha especulado que Mpt32 podría inducir un efecto similar (Romain et al., 1999). Además, se ha reportado que la glicosilación del péptido puede modular negativamente la interacción de los receptores de los linfocitos T con el péptido unido al MHC (Deck et al., 1995, Haurum et al., 1994). Además se sabe que Mpt32 nativa induce una respuesta de hipersensibilidad retardada y la estimulación de células T in vitro. En contraste la proteína no glicosilada, recombinante en *Escherichia coli*, no produce estos efectos. (Horn et al., 1999, Romain et al., 1999). Así mismo, los anticuerpos de pacientes con tuberculosis reconocen la proteína glicosilada pero no la forma deglicosilada. (Lara et al., 2004)

En el caso de PstS1, se sabe que es un antígeno inmunodominante que contiene epítopes dependientes de carbohidratos (Espitia et al., 1989); además forma parte de un operón de transporte de fosfatos (Andersen et al., 1990, Espitia et al., 1992).



---

En resumen, aunque es poco lo que se conoce acerca de las glicoproteínas micobacterianas, la información disponible se inclina a asignarles un papel importante y determinante en la patogenicidad de la bacteria, por lo que es necesario ampliar las investigaciones en este aspecto y determinar las posibles funciones biológicas de estas macromoléculas junto con la caracterización estructural de dichas modificaciones post-traduccionales, así como la dilucidación de la vía o vías de glicosilación. Aunque este trabajo aporta una fracción de este conocimiento, es fundamental establecer antecedentes relevantes para realizar una investigación más amplia y completa.



---

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que *M. tuberculosis* es un patógeno que contiene al menos una vía de glicosilación (O-glicosilación). Hasta el momento se ha determinado que son manosas los azúcares unidos covalentemente a Thr y que todas las glicoproteínas identificadas en esta bacteria tienen la capacidad de unir ConA. Interesantemente, con excepción de Mpt32, todas son lipoproteínas. Dentro del genoma de esta bacteria se han predicho cerca de 99 lipoproteínas con funciones muy variadas (Sutcliffe y Harrington, 2004) que podrían ser también blancos potenciales de O-manosilación.

Por otro lado las investigaciones sobre glicoproteínas micobacterianas revelan que su función biológica está muy ligada a la patogenicidad de la bacteria, sugiriendo que los azúcares tengan un papel importante. El conocimiento sobre estas macromoléculas, se convierte en herramienta útil para dilucidar la posible vía por la cual se lleva a cabo esta modificación postraducciona. Dentro de este contexto creemos que la identificación y caracterización de nuevas glicoproteínas, en esta bacteria, podría contribuir al entendimiento de su patogenia.

Esta investigación puede ser abordada considerando la capacidad resolutive de la electroforesis de doble dimensión, aunada a la especificidad del uso de lectinas. Ambas constituyen herramientas útiles para la identificación y caracterización de nuevas glicoproteínas en este patógeno.



## **HIPÓTESIS**

La presencia, en el genoma de *M. tuberculosis*, de genes que podrían intervenir en la glicosilación de macromoléculas, así como la predicción de secuencias potencialmente blanco de glicosilación en micobacterias; hace suponer que este bacilo posee un glicoproteoma más complejo de lo determinado hasta el momento.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

1.- Identificar y caracterizar proteínas secretadas por *M. tuberculosis* con capacidad de unir ConA.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1.- Obtener fracciones de las proteínas secretadas por *M. tuberculosis* por precipitación y cromatografía de afinidad.

2.- Resolución de las posibles glicoproteínas en geles bidimensionales.

3.- Determinar la capacidad de estas moléculas para unir ConA

4.- Identificar las glicoproteínas por espectrometría de masas.



# Métodos

- 2.1 Obtención del filtrado de cultivo
- 2.2 Ligand-blot (ConA-HRP) e Inmuno-reactividad
- 2.3 Isoelectroenfoco y SDS-PAGE
- 2.4 Cromatografía por afinidad a ConA
- 2.5 Espectrometría de masas



## 2. MÉTODOS

### 2.1 OBTENCIÓN DEL FILTRADO DE CULTIVO

**M***ycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC No. 27294) cepa de referencia (colección del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) se cultivo en medio Youman modificado Proskauer y Beck (PBY) durante 4-6 semanas en condiciones estáticas a 37°C. Al término de este periodo el bacilo se eliminó por filtración.

Las proteínas del sobrenadante se precipitaron con 0.5 g/ml de sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 4 °C y colectadas por centrifugación a 10300 g por 30 minutos a 4 °C. El precipitado se resuspendió en el mínimo volumen posible de  $\text{H}_2\text{O}$  dd y dializado (membrana de diálisis corte 10,000 kDa) exhaustivamente en PBS, pH 7.4. El dializado se recolectó, cuantificó (Método de Lowry) y almacenó a -70°C hasta su uso. Esta fracción proteica se denominó filtrado de cultivo (FC). Por otro lado el sobrenadante se saturó con sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y las proteínas se centrifugaron y dializaron en las condiciones anteriormente descritas. Esta fracción proteica se denominó F1.

### 2.2 LIGAND-BLOT E INMUNO-REACTIVIDAD

Las proteínas de 2D-SDS-PAGE y las proteínas recombinantes PstS1 y LprG (resueltas en SDS-PAGE) se transfirieron a membrana PVDF e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente con 1.25  $\mu\text{g/ml}$  de ConA-HRP (Concanavalina A acoplada a peroxidasa, Sigma) en PBS con Tween 20 (0.05%) y BSA (3%) (PBS-



TB) en presencia o no de 0.3 M de  $\alpha$ -Met-D-Manp o  $\alpha$ -D-glucosa (SIGMA) como azúcares competidores de la unión. Después de la incubación las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos en PBS con Tween 20 (0.05%) (PBS-T). La reactividad a ConA se reveló con 3 mg/ml de 3,3-diaminobencidina (Sigma) en PBS-T y 30% de peróxido de hidrógeno (Merck) diluido 1:1000.

Las membranas de 2D-SDS-PAGE de la fracción FC se incubaron individualmente por una hora a temperatura ambiente (TA) con anticuerpos policlonales de conejo contra PstS1 y Mpt32 diluido 1:1000 en PBS-TB. Las membranas de 2D-SDS-PAGE de la fracción F1 se incubaron por una hora a TA con anticuerpo policlonal contra LprG diluido 1:1000 en PBS-TB. Por otro lado las membranas de F1-FG se incubaron individualmente por una hora a temperatura ambiente (TA) con anticuerpos policlonales de conejo contra PstS1, LprG y mAb IT-19 contra LpqH diluido 1:1000 en PBS-TB (mAb IT-19 fue donado por la Universidad de Colorado). Después de la incubación, las membranas se lavaron con PBS-T e incubadas nuevamente por 30 minutos con Proteína A-HRP (Zymed) diluido 1:2000 en PBS-TB. Después de un lavado exhaustivo, la inmuno-reactividad se reveló con 3mg/ml de 3,3-diaminobencidina en PBS-T y 30% de peróxido de hidrógeno en una dilución 1:1000. También fue determinada la inmuno-reactividad en las membranas que contienen las proteínas recombinantes LprG y PstS1 con los anticuerpos policlonales correspondientes como se describió anteriormente.



### **2.3 ISOELECTROENFOQUE Y SDS-PAGE.**

Las fracciones proteicas se desalaron mediante una columna Sephadex G25 (NAP-5, GE Healthcare), para permitir un isoelectroenfoque óptimo. Las proteínas se concentraron por ultra-filtración para cuantificarlas. Finalmente ambas fracciones se sometieron al tratamiento con 2D-clean Up kit (Amersham Biosciences) lo que permitió mejorar la calidad de la muestra, el precipitado resultado de este procedimiento se resuspendió y se ajustó a un volumen final de 125  $\mu$ l con amortiguador de rehidratación (8 M Urea, 2 % CHAPS, 0.5 % de amortiguador IPG pH 4-7 y 20 mM DTT), volumen necesario para hidratar tiras de 7 cm con gradiente de pH de 4 a 7 (Immobiline DryStrips GE Healthcare). Estas tiras se hidrataron por 16 hrs a temperatura ambiente siguiendo las instrucciones del fabricante. La focalización inicio en 300 V (1 hr.), el voltaje fue incrementándose a 1000V (0.5 hrs.) y finalmente 5000 V (2 hrs.) en la unidad de electroforesis Ettan IPGphor III (GE Healthcare). Después de la focalización, las tiras se equilibraron durante 20 minutos en amortiguador de equilibrio (2 % SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30 % glicerol, 0.002 %, azul de bromofenol y 0.5 % DTT). Se realizó la electroforesis desnaturizante en geles de acrilamida 12 %. Después, las proteínas se transfirieron a membranas Immobilon-P PVDF (Millipore, Co). Las membranas se tiñeron con azul de Coomassie R-250 y se usaron para espectrometría de masas (MS) o ligand-blot.



## **2.4 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A CONCANAVALINA A**

Una columna de 1 ml de ConA (ConA Sepharose™ Amersham Biosciences), se equilibro con amortiguador catiónico pH 6.0 (0.1 M Acetato de sodio, 1 M NaCl, 1mM MnCl<sub>2</sub> .4 H<sub>2</sub>O, 0.1mM MgCl<sub>2</sub> .6H<sub>2</sub>O, 1 mM CaCl<sub>2</sub>). Se aplicaron 3 mg de la fracción FC ó F1. Después de varios lavados con amortiguador catiónico las proteínas se eluyeron con 0.1 M de  $\alpha$ -Met-D-Manp (Sigma) disuelto en amortiguador catiónico. Se colectaron fracciones de 1 ml y se monitorearon en espectrofotómetro a 280nm (Espectrofotómetro Jenway 6305). Las proteínas eluidas se etiquetaron como FC-FG y F1-FG según el filtrado inicial del que se partió. Ambas fracciones se dializaron contra PBS y se almacenaron a -70 °C hasta su uso. Las proteínas obtenidas se analizaron como se indica en el inciso 2.3 de este apartado.

## **2.5 ESPECTROMETRÍA DE MASAS.**

Para la identificación por espectrometría de masas, las proteínas se cortaron cuidadosamente de la membrana 2D-SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie; los cortes se destiñeron, lavaron y digirieron con tripsina porcina (Promega, Madison, WI) para finalmente extraer las proteínas como se describe en González-Zamorano et al., (2009). El volumen de los extractos se redujeron por evaporación a TA en centrifuga al vacío. Se ajusto el volumen a 20 $\mu$ l con ácido fórmico 1%.

Se utilizó un espectrómetro de masas en tandem 3200 Q TRAP (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canada) equipado con una fuente iónica en nano electroespray (NanoSpray II) y un MicolonSpray II. El instrumento fue acoplado



en línea a un sistema LC (Waters Corporations, Milford, MA). Las muestras se desalaron sobre una columna Symmetry C18 UPLC (5 $\mu$ m, 180 $\mu$ m X 20mm, Waters Corporations) lavando las mismas con 0.1% de ácido fórmico en 100% de agua MilliQ con un flujo de 15  $\mu$ L/min. Los péptidos se separaron en una columna C18 UPLC (1.7 $\mu$ m, 75 $\mu$ m X 100mm, Waters Corporations) equilibrada con 2% de acetonitrilo y 0.1% de ácido fórmico, utilizando un gradiente lineal de 2-70% de acetonitrilo y 0.1% de ácido fórmico por un periodo de 60 minutos, con un flujo de 0.25  $\mu$ L/min. El procedimiento se describe en González-Zamorano et al., 2009. La interpretación de los datos y la identificación de las proteínas se represento como un grupo de espectros MS/MS utilizando el algoritmo MASCOT (Versión 1.6b9, Matriz Science, London, U. K., Disponible en <http://www.matrixscience.com>). La búsqueda se condujo utilizando un subgrupo del complejo *M. tuberculosis* del Centro Nacional de Biotecnología. Base de datos con información no redundante (NCBIInr, <http://www.ncbi.nih.gov>). Un “hit” de proteína se acepto como una identificación valida cuando por lo menos un espectro MS/MS se emparejo al 95% de confianza ( $p < 0.05$ ).

## 2.6 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Todas las secuencias identificadas en este trabajo fueron analizadas con el software de <http://www.expasy.org/tools:LipoP> (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>) para predecir Lpps, NetOGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) para predecir O-glicosilación y SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.d/servuces/SugbakP>) para determinar sitios de corte en el péptido señal. Las secuencias de las proteínas se obtuvieron de la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>).



---

# Resultados

3.1 Análisis de las proteínas por SDS-PAGE

3.2 Ligand-blot (ConA-HRP)

3.3 Isoelectroenfoco y SDS-PAGE

3.4 Cromatografía de afinidad

3.5 Ensayo de ligand-blot de FC-FG y F1-FG resueltas en 2D-SDS-PAGE

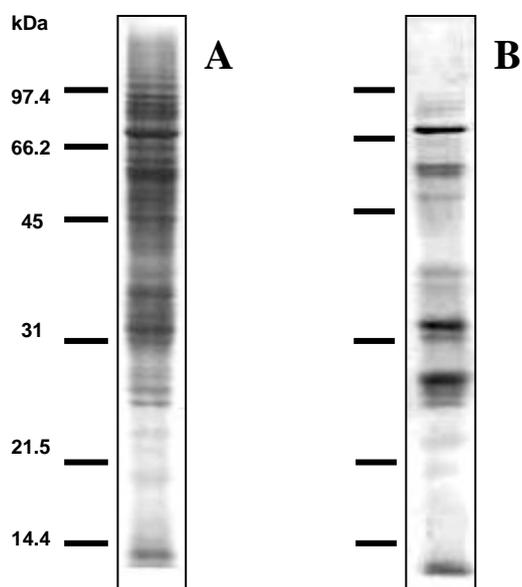
3.6 Análisis por espectrometría de masas y predicción de O-glicosilación  
con NetOGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>)



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 ANALISIS DE LAS PROTEÍNAS POR SDS-PAGE

La comparación de las fracciones obtenidas, FC y F1, permitió observar que la segunda contiene menos proteínas que FC. Sin embargo se mantiene un patrón similar en algunas proteínas, probablemente por su abundancia o por la presencia de isoformas más solubles. Una observación importante fue la presencia de una banda relativamente abundante alrededor de los 27 kDa en F1, que además no parece encontrarse en FC ó su concentración es considerablemente menor (**Fig. 5**). Estos resultados sugieren que esta o estas proteínas son altamente solubles y no son fácilmente precipitables con 70 % de sulfato de amonio.

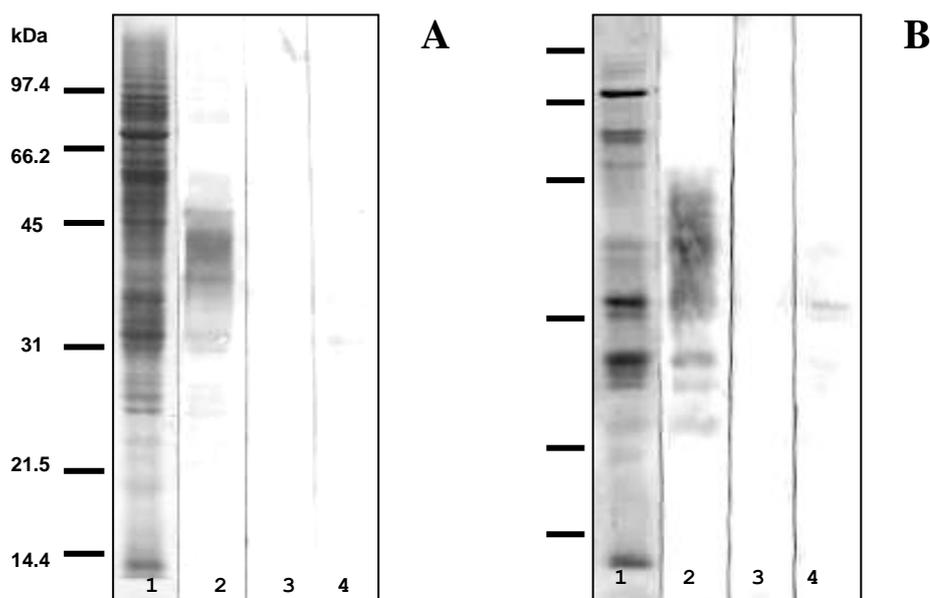


**Figura 5.-** Proteínas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*. SDS-PAGE 12%. Tinción con azul de Coomassie. **A** Fracción FC y **B** Fracción F1.



### 3.2 LIGAND-BLOT (ConA-HRP)

**S**e analizó la reactividad de estas fracciones proteicas a ConA-HRP utilizando  $\alpha$ -Met-D-Manp y glucosa como azúcares competidores. Los resultados mostrarán una fuerte interacción de la lectina con el lipoarabinomanan (un glicolípido muy abundante de pared que contiene manosas); de tal forma que no se observan bandas definidas reactivas a ConA. La interacción entre lectina y proteína fue totalmente inhibida por  $\alpha$ -Met-D-Manp y parcialmente por D-glucosa, sugiriendo una unión mediada por estos azúcares. Interesantemente la proteína de aproximadamente 27 kDa presente en F1 reacciona con dicha lectina (**Fig. 6**). Partiendo de estos datos se decidió analizar dichas fracciones en 2D SDS-PAGE, técnica que evitó la interferencia del lípido glicosilado, además de separar posibles isoformas.



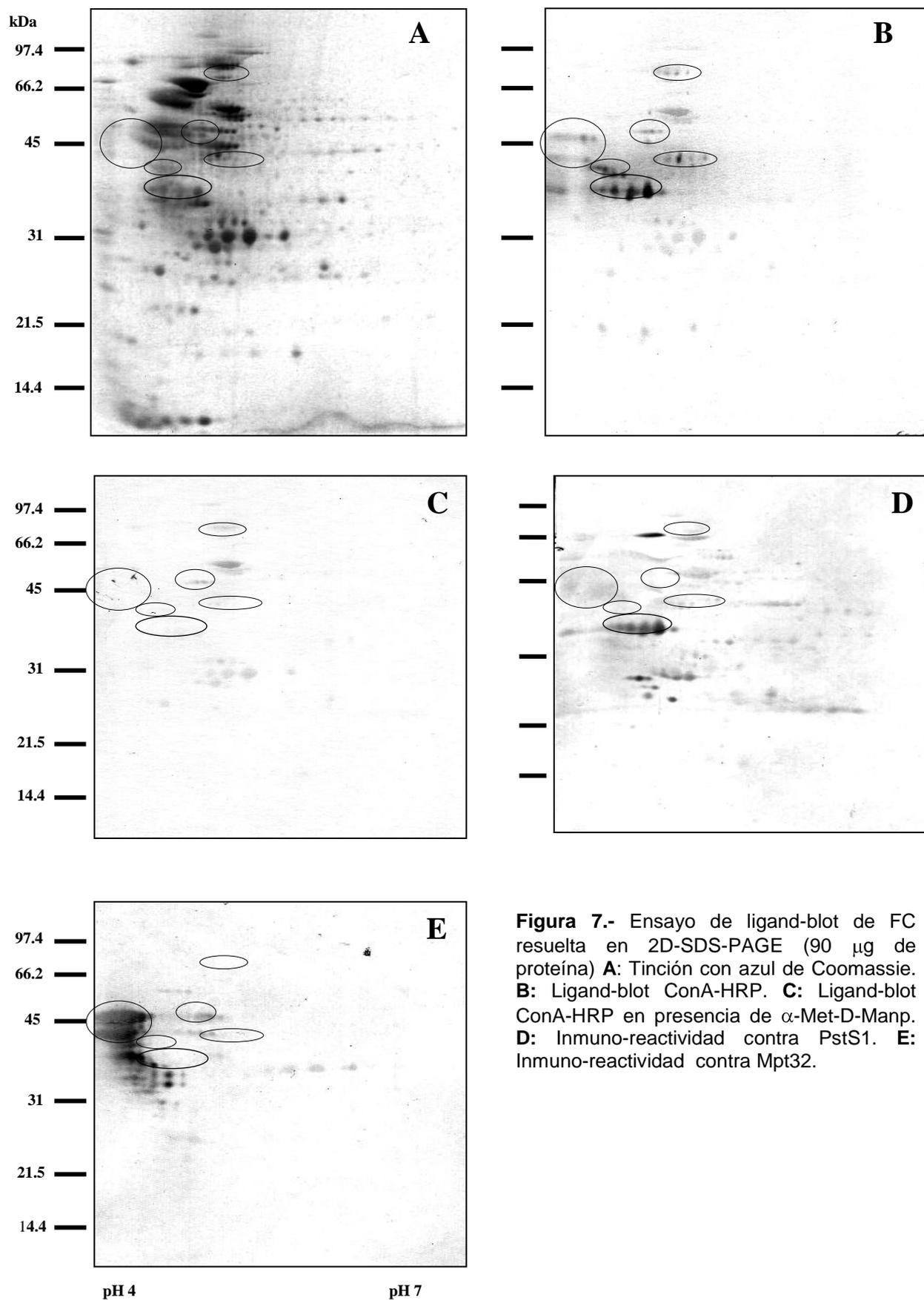
**Figura 6.-** Ensayo de ligand blot (ConA-HRP) **A:** Fracción FC y **B:** Fracción F1. **(1)** Tinción con azul de Coomassie, **(2)** Ligand-blot 1.25  $\mu$ g/ml de ConA-HRP, **(3)**  $\alpha$ -Met-D-Manp y **(4)** D-glucosa.



### 3.3 ISOELECTROENFOQUE Y SDS-PAGE

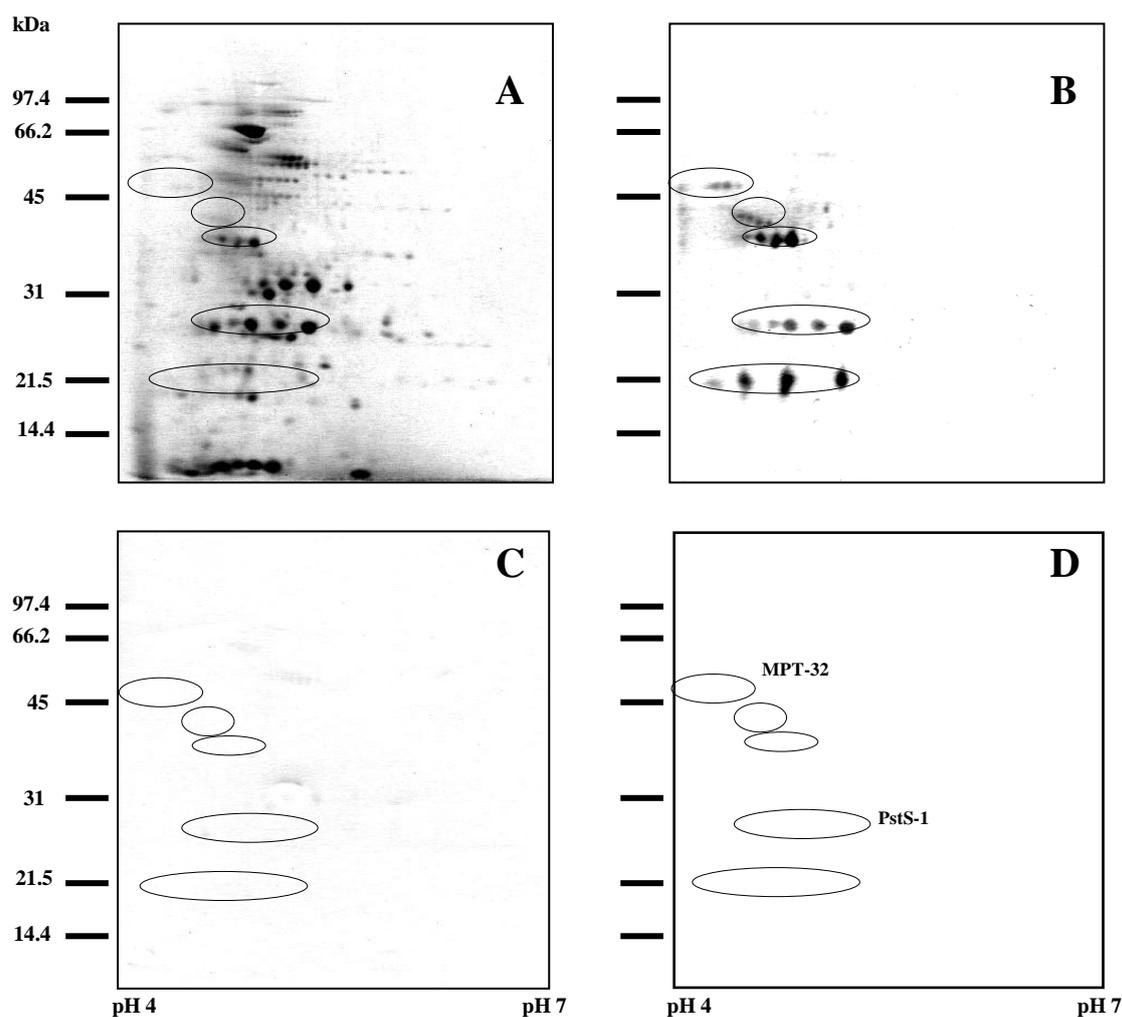
**P**ara analizar con mayor detalle la reactividad, de FC y F1 a ConA-HRP, se utilizó la calidad resolutive de 2D-SDS-PAGE. Esta metodología permitió observar claramente algunas proteínas que unen a ConA-HRP (**Fig. 7B**). Aunque es evidente la reactividad en la zona de 38 kDa, se observan además otras posibles glicoproteínas de diferentes masas moleculares nunca antes descritas. Algunas de ellas en concentraciones mínimas, lo que hace difícil identificarlas en la membrana teñida con de azul de Coomassie (**Fig. 7A**). La semi-purificación de las diferentes fracciones con cromatografía de afinidad, permitió enriquecer estas con proteínas que unen ConA.

El uso de anticuerpos policlonales permitió identificar isoformas de PstS1 y Mpt32 (**Fig. 7D y E**). La interacción lectina-proteína se inhibió con  $\alpha$ -Metil-D-Manp (**Fig. 7C**).





La fracción F1 contiene también a Mpt32 y PstS1, sin embargo sobresalen algunas proteínas de 21 y 27 kDa y algunas otras proteínas que se encuentran mínimamente representadas pero que unen fuertemente la lectina (**Fig. 8B**). La unión a la lectina se inhibe con  $\alpha$ -Met-D-Manp como azúcar competidor (**Fig. 8C**).

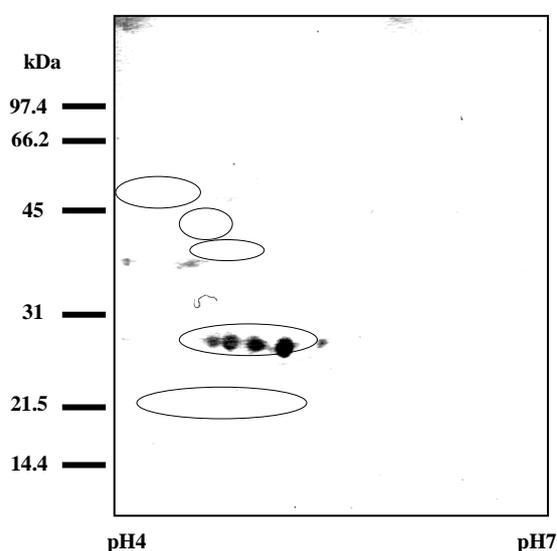


**Figura 8.-** Ensayo de ligand-blot de F1 resuelta en 2D-SDS-PAGE (90  $\mu$ g de proteína) **A:** Tinción con azul de Coomassie. **B:** Ligand-blot (ConA-HRP). **C:** Ligand-blot (ConA-HRP) en presencia de  $\alpha$ -Met-D-Manp. **D:** Diagrama de identificación.



Las proteínas encontradas en 21 y 27 kDa fueron analizadas por espectrometría de masas de acuerdo con lo descrito en González-Zamorano et al., 2009. Los resultados determinaron que son isoformas de LpqH y LprG respectivamente. Este último es un antígeno lipoproteico que cuenta con péptido señal, cuya masa molecular teórica una vez procesada la proteína es de 21.7 kDa. Se ha sugerido que la alta masa molecular observada podría deberse a una modificación postraduccional (Bigi et al., 1997). Interesantemente, esta proteína parece encontrarse únicamente en las especies del complejo *M. tb*.

Estas proteínas fueron reconocidas por el anticuerpo policlonal contra LprG, donado por la Dra. F. Bigi del Instituto de Biotecnología Argentina, quien ha trabajado en la caracterización del homólogo en *Mycobacterium bovis* (**Fig. 9**).



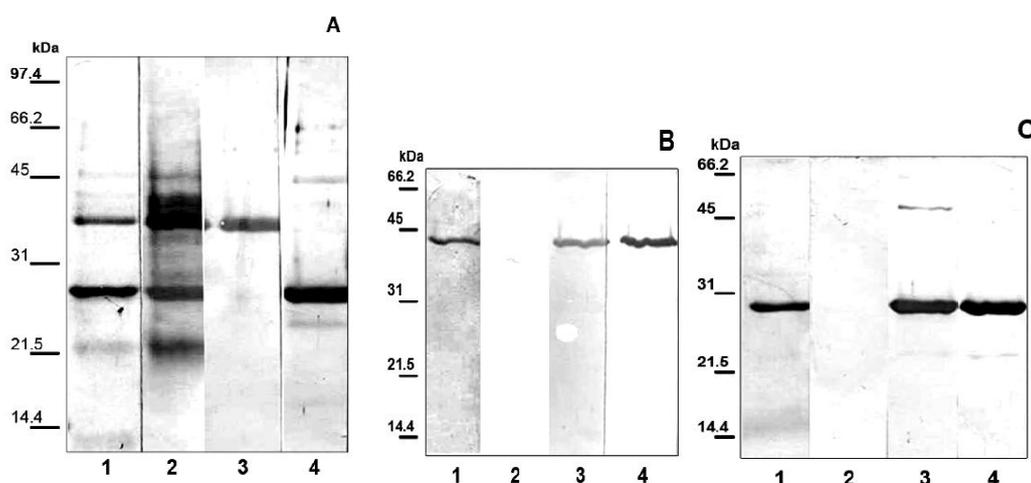
**Figura 9.-** Inmuno-reactividad de F1 (90 µg de proteína total) resuelta en 2D-SDS-PAGE. Anticuerpo policlonal contra LprG.

La especificidad de la interacción con los azúcares de las proteínas nativas se confirmó cuando se comparó la reactividad de PstS1 y LprG, las proteínas más abundantes de F1, con las respectivas proteínas recombinantes en *E.coli*.



Fue claro que las proteínas no glicosiladas, recombinantes en *E coli*, no mantienen la reactividad a ConA-HRP. La inmuno-reactividad, con los anticuerpos correspondientes, fue positiva en ambos casos (**Fig. 10**).

Estos experimentos demuestran que la unión a ConA está mediada por los azúcares presentes. Y que esta modificación ocurre solo en la micobacteria.



**Figura 10.-** Ensayo de ligand-blot de las proteínas nativas y recombinantes de PstS1 y LprG **A:** Fracción F1-FG (Fracción enriquecida por cromatografía de afinidad a Con-A, ver 3.4). (1).-Tinción con azul de Coomassie. (2).-Ligand-blot (ConA-HRP) (3).-Inmuno-reactividad con el anticuerpo policlonal contra PstS1. (4).- Inmuno-reactividad con el anticuerpo policlonal contra LprG. **B:** PstS-1 recombinante en *E. coli*. (1).-Tinción con azul de Coomassie. (2).-Ligand-blot (ConA-HRP). (3).- Inmuno-reactividad con el anticuerpo policlonal contra PstS1. (4).-Inmuno-reactividad contra histidina. **C:** LprG recombinante en *E. coli*. (1).-Tinción con azul de Coomassie. (2).-Ligand-blot (ConA-HRP). (3).- Inmuno-reactividad con el anticuerpo policlonal contra LprG. (4).-Inmuno-reactividad contra histidina.

Para conocer cuál o cuáles pudieran ser los sitios de glicosilación en LprG se analizó su secuencia con el programa utilizado por Herrman (Herrmann et al., 2000) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>). La predicción señaló tres Thr y dos Ser con probabilidad de ser O-glicosiladas. La última Thr en el extremo carboxi-terminal mostró el “score” más alto (**Fig.11**).



Name: LprG Length: 236

MRTPRRHCRRIAVLAAVSI AATVVAGCSSGSKPSGGPLPDAKPLVEEATAQTKALKSAHMVLTVNGKIPGLSLKTLSGDL  
 TTNPATAATGNVKLTLGGSDIDADFVVF<sup>**D**</sup>GIYATLTPNQWSDFGPAADIYDPAQVLNPD<sup>**T**</sup>TGLANVLANFADAKAEGRDTI  
 NGQNTIRISGKVSQAQAVNQIAPPFNATQ<sup>**P**</sup>VPATVWIQETGDHQLAQAQLDRGSGNSVQMTLSKWGEKV<sup>**V**</sup>TKPPVS  
 .....S.....T.....  
 .....T.....T.....S

**Figura 11.-** Secuencia de LprG y su predicción de O-glicosilación. En negrita se muestra la Thr con más alto “score”

El análisis de los aminoácidos cercanos a las Thr o Ser reportadas mostró que se encuentran Pro muy cercanas, en algunos casos estas se encuentran en las posiciones -1 y +3 (aminoácidos subrayados en la Tabla 3).

No. de a.a	Secuencia
34	<u>P</u> SGG <u>P</u> LP
49	EATAQTK
187	NATQPVP
231	VTKPP <u>V</u> S
236	VTKPP <u>V</u> S

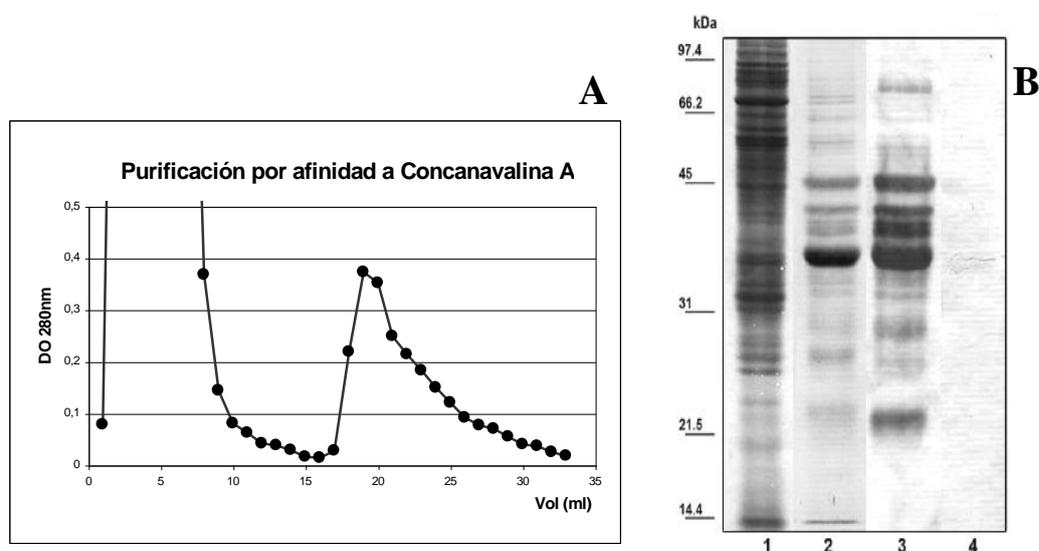
**Tabla 4.-** Predicción de O-glicosilación en NetOGlyc para LprG. En negritas se muestran los aminoácidos potenciales sitios de O-glicosilación. Las Pro subrayadas se encuentran en la posición -1 y +3 con respecto a la Ser o Thr predicha por el algoritmo. La Thr 231 obtuvo el “score” más alto.

### 3.4 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.

**E**l uso de una columna de afinidad a la lectina permitió la semi-purificación de posibles glicoproteínas contenidas en las fracciones FC y F1. Esta metodología resulto bastante útil para obtener una fracción enriquecida en proteínas que se unen

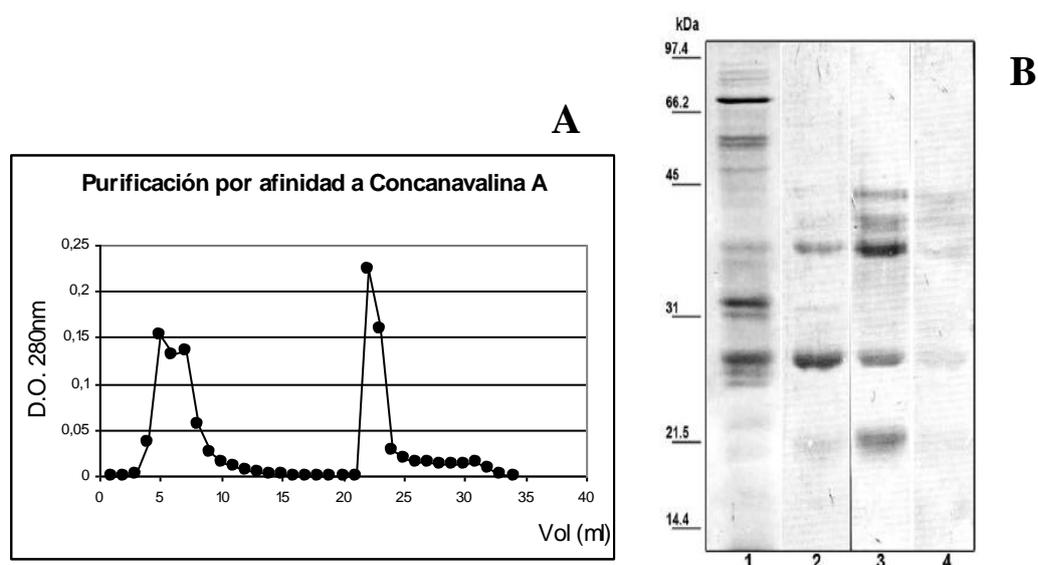


a ConA. Estas fracciones se denominaron FC-FG y F1-FG según el filtrado del cual se haya partido. Ambas se trataron como se describe en métodos 2.3 para resolverse en 2D-SDS-PAGE. En el cromatograma de la fracción FC se observa un pico bien definido de las proteínas que unieron la lectina en columna (**Fig. 12A**). La fracción FC-FG está principalmente representada por PstS1 (38kDa) y Mpt32 (45kDa). Parecen estar presentes LpqH y LprG en menor concentración. Interesantemente por encima de PstS1 se observa el enriquecimiento de algunas proteínas con masas moleculares nunca antes descritas para glicoproteínas de *M. tuberculosis* (**Fig. 12B**).



**Figura 12.-** Purificación por afinidad a la columna de ConA de la fracción FC. **A:** Cromatograma. Elución en la fracción 18. **B:** Ensayo de ligand-blot (ConA-HRP). (1).- Fracción FC antes de pasar por la columna (tinción con azul de Coomassie). (2).- Fracción que une a la columna y eluida con  $\alpha$ -Met-D-Manp (tinción con azul de Coomassie). (3).- Ligand-blot (ConA-HRP) de la fracción eluida. (4): Ligand-blot en presencia de  $\alpha$ -Met-D-Manp.

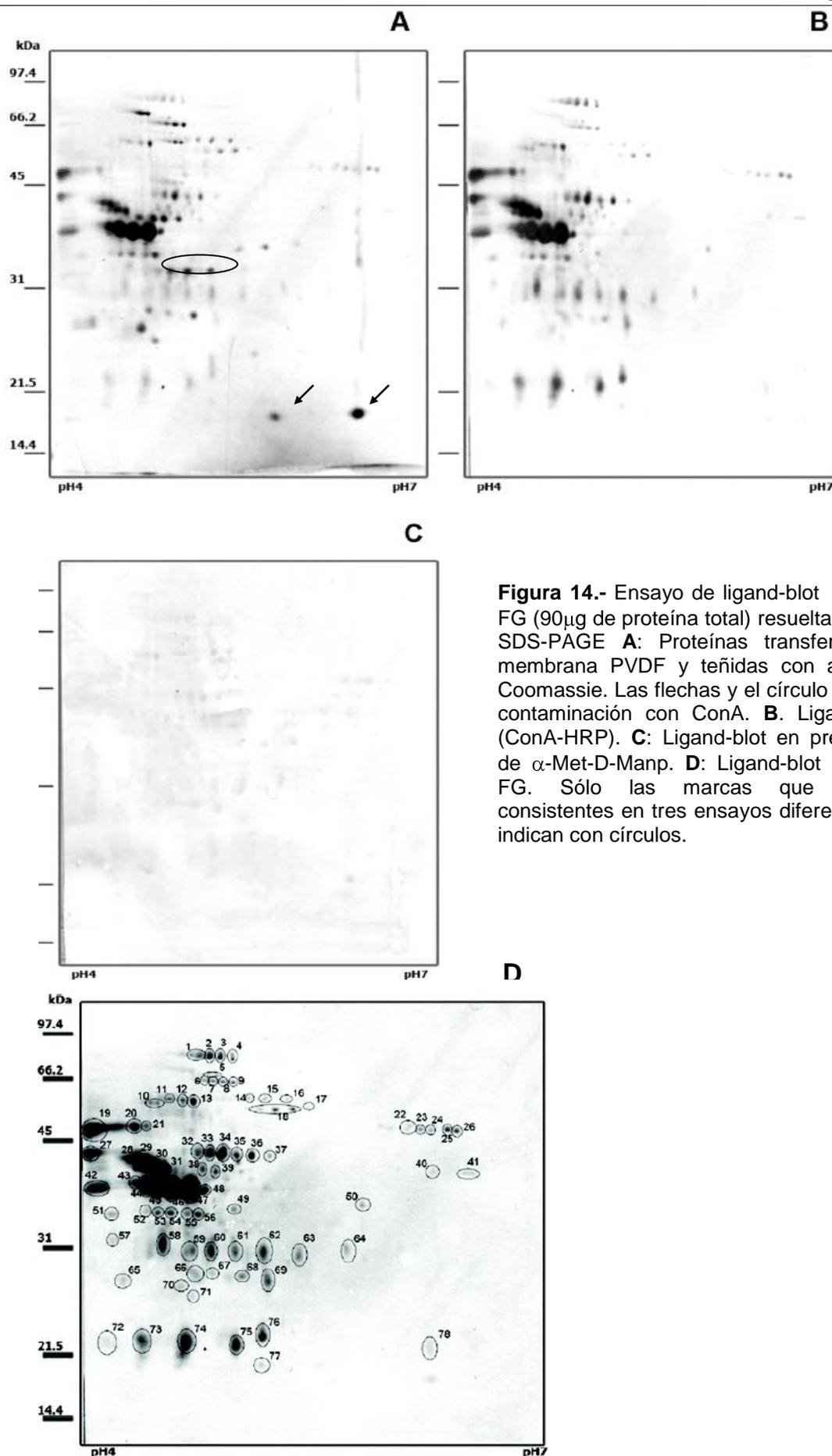
Por otro lado, la fracción F1 también mostró unión a la columna de afinidad a la lectina. PstS1 sigue presente, probablemente por la presencia de isoformas más solubles o a su abundancia. Además se enriquecieron LprG y LpqH (**Fig. 13**).

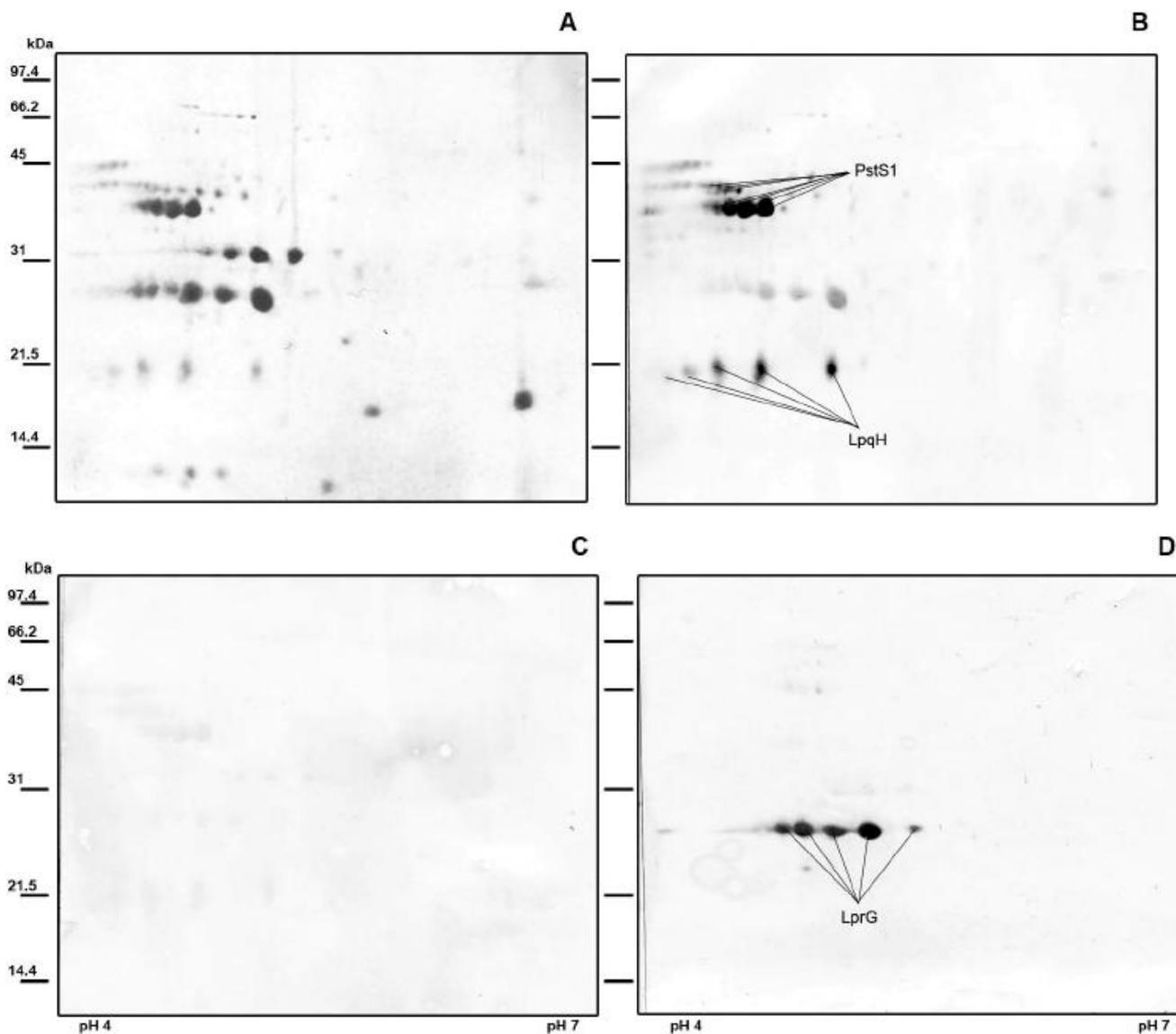


**Figura 13.-** Purificación por afinidad a la columna de ConA de la fracción F1. **A:** Cromatograma. Elución en la fracción 22. **B:** Ensayo de ligand-blot (ConA-HRP). (1).- Fracción F1 antes de pasar por la columna (tinción con azul de Coomassie). (2).- Fracción unida a la columna y eluida con  $\alpha$ -Met-D-Manp (tinción con azul de Coomassie) (3).- Ligand-blot (ConA-HRP) de la fracción eluida. (4): Ligand-blot en presencia de  $\alpha$ -Met-D-Manp.

### 3.5 ENSAYOS DE LIGAND-BLOT DE FC-FG Y F1-FG RESUELTAS EN 2D-SDS-PAGE

Las fracciones enriquecidas (FC-FG y F1-FG) se resolvieron en SDS-PAGE 2D y se transfirieron a membranas PVDF (**Fig. 14 y 15**) para identificar las posibles glicoproteínas por MS (**Tabla 5**). El ensayo de ligand-blot mostró que algunas proteínas de FC-FG y F1-FG no unieron a la ConA-HRP como podría esperarse. Estos resultados sugirieron que probablemente existan algunas interacciones proteicas en solución.





**Figura 15.-** Ensayo de ligand-blot de F1-FG (70 $\mu$ g de proteína total) resuelta en 2D-SDS-PAGE. **A:** Proteínas transferidas a membrana PVDF y teñidas con azul de Coomassie. **B:** Ligand-blot (ConA-HRP). **C:** Ligand-blot en presencia de  $\alpha$ -Met-D-Manp. **D:** Inmuno-reactividad con el anticuerpo policlonal contra LprG. En el panel B, las flechas indican los puntos reconocidos por anticuerpos contra PstS1 y LpqH en experimentos paralelos.

Como puede apreciarse en FC-FG existen varias proteínas que unen ConA tanto en columna como en blot; sin embargo, F1-FG no contiene proteínas diferentes a las ya vistas en FC-FG o F1.



### 3.6 ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC/ESI-MS/MS) Y PREDICCIÓN DE O-GLICOSILACIÓN CON [NetOGlyc](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/). (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>)

Varios puntos que unen ConA se identificaron en la membrana de la fracción FC-FG. En algunos casos cada punto corresponde a más de una proteína (**Tabla 5**). Ya que las proteínas fueron capturadas en columna de afinidad a ConA, podría esperarse que muchos de estos puntos correspondan a glicopéptidos, sin embargo esto necesita ser probado experimentalmente.

Por otro lado, es importante mencionar que la identificación de GroEL por MS en FC, plantea el hecho de que en el cultivo estático de 4-6 semanas de *M. tuberculosis* se encuentran proteínas citoplasmáticas y no solo las proteínas secretadas.

**Tabla 5. Identificación por LC/ESI-MS/MS de las proteínas en FC-FG**

No. "Spot" <sup>a</sup>	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	H37Rv gen	No. de acceso NCBI	$M_r$ Teórico <sup>c</sup>	pI Teórico <sup>c</sup>	MOWSE "Score"	Péptidos emparejados	% de Secuencia cubierta
1	No identificada							
2	Lipoproteína LpqW	<i>Rv1166</i>	gi/15608306	66.1	5.34	38	5	9
3	Lipoproteína LpqW	<i>Rv1166</i>	gi/15608306	66.1	5.34	47	2	3
4	No identificada							
1-4	Lipoproteína LpqW	<i>Rv1166</i>	gi/15608306	66.1	5.34	229	11	17
1-4	Lipoproteína LpqB	<i>Rv3244c</i>	gi/15610380	61.1	5.19	95	4	8
1-4	Proteína asociada a membrana de unión a penicilina 1A/1B PonA2	<i>Rv3682</i>	gi/57117145	84.5	5.34	66	5	7
5	No identificada							
6	Lipoproteína LpqB	<i>Rv3244c</i>	gi/15610380	61.1	5.19	223	12	27
7	Lipoproteína LpqB	<i>Rv3244c</i>	gi/15610380	61.1	5.19	202	12	25
8	Lipoproteína LpqB	<i>Rv3244c</i>	gi/15610380	61.1	5.19	216	11	23
9	Lipoproteína LpqB	<i>Rv3244c</i>	gi/15610380	61.1	5.19	255	15	34
6-9	Lipoproteína LpqB	<i>Rv3244c</i>	gi/15610380	61.1	5.19	353	13	20
6-9	Lipoproteína LpqF	<i>Rv3593</i>	gi/15610729	48.4	6.49	27	1	2
10	No identificada							
11	No identificada							
12	Proteasa secretada	<i>Rv2672</i>	gi/15609809	53.9	4.88	70	1	2
13	Proteasa secretada	<i>Rv2672</i>	gi/15609809	53.9	4.88	195	5	10



No. "Spot" <sup>a</sup>	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	H37Rv gen	No. de acceso NCBI	$M_r$ Teórico <sup>c</sup>	p/ Teórico <sup>c</sup>	MOWSE "Score"	Péptidos emparejados	% de Secuencia cubierta
14	No identificada							
15	Lipoproteína periplásmica de unión al oligopéptido OppA	<i>Rv1280c</i>	gi/15608420	63.5	6.56	51	2	6
16	Lipoproteína periplásmica de unión al oligopéptido OppA	<i>Rv1280c</i>	gi/15608420	63.5	6.56	45	1	2
14-16	Lipoproteína periplásmica de unión al oligopéptido OppA	<i>Rv1280c</i>	gi/15608420	63.5	6.56	228	5	12
14-16	Proteína hipotética Rv0907	<i>Rv0907</i>	gi/15608047	56.8	5.43	119	3	7
14-16	Precursor gama-glutamyltranspeptidasa GgtB	<i>Rv2394</i>	gi/15609531	66.5	5.66	86	2	4
14-16	Proteína hipotética Rv0988	<i>Rv0988</i>	gi/15608128	42.7	5.26	44	1	2
17	No identificada							
18	Proteína hipotética Rv0907	<i>Rv0907</i>	gi/15608047	56.8	5.43	172	7	13
18	Precursor gama-glutamyltranspeptidasa GgtB	<i>Rv2394</i>	gi/15609531	66.5	5.66	64	2	3
19	Proteína hipotética Rv1860 Apa	<i>Rv1860</i>	gi/57116926	32.7	4.52	97	4	34
20	Proteína hipotética Rv1860 Apa	<i>Rv1860</i>	gi/57116926	32.7	4.52	67	2	12
21	No identificada							
22	Precursor gama-glutamyltranspeptidasa GgtB	<i>Rv2394</i>	gi/15609531	66.5	5.66	31	3	7
23	Precursor gama-glutamyltranspeptidasa GgtB	<i>Rv2394</i>	gi/15609531	66.5	5.66	32	2	3
24	Precursor gama-glutamyltranspeptidasa GgtB	<i>Rv2394</i>	gi/15609531	66.5	5.66	50	3	7
25	Precursor gama-glutamyltranspeptidasa GgtB	<i>Rv2394</i>	gi/15609531	66.5	5.66	74	3	5
26	Precursor gama-glutamyltranspeptidasa GgtB	<i>Rv2394</i>	gi/15609531	66.5	5.66	121	3	5
22-26	Precursor gama-glutamyltranspeptidasa GgtB	<i>Rv2394</i>	gi/15609531	66.5	5.66	198	7	10
27	Proteína hipotética Rv1860 Apa	<i>Rv1860</i>	gi/57116926	32.7	4.52	60	4	33
28	Lipoproteína LppZ	<i>Rv3006</i>	gi/15610143	38.7	4.85	296	16	37
28	Lipoproteína periplásmica de unión a fosfato PSTS1 (PBP-1) (PSTS1)	<i>Rv0934</i>	gi/57116801	38.4	5.14	100	1	4
28	Proteína hipotética Rv2813	<i>Rv2813</i>	gi/15609950	29.1	8.6	38	1	1
29	Lipoproteína LppZ	<i>Rv3006</i>	gi/15610143	38.7	4.85	414	16	35
29	Lipoproteína periplásmica de unión a fosfato PSTS1 (PBP-1) (PSTS1)	<i>Rv0934</i>	gi/57116801	38.4	5.14	103	3	10
30	Lipoproteína LppZ	<i>Rv3006</i>	gi/15610143	38.7	4.85	333	12	33
30	Lipoproteína periplásmica de unión a fosfato PSTS1 (PBP-1) (PSTS1)	<i>Rv0934</i>	gi/57116801	38.4	5.14	132	6	24



No. "Spot" <sup>a</sup>	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	H37Rv gen	No. de acceso NCBI	$M_r$ Teórico <sup>c</sup>	pI Teórico <sup>c</sup>	MOWSE "Score"	Péptidos emparejados	% de Secuencia cubierta
31	Lipoproteína LppZ	<i>Rv3006</i>	gi/15610143	38.7	4.85	326	10	26
31	Lipoproteína periplásmica de unión a fosfato PSTS1 (PBP-1) (PSTS1)	<i>Rv0934</i>	gi/57116801	38.4	5.14	243	5	15
31	Proteína hipotética Rv1860 Apa	<i>Rv1860</i>	gi/57116926	32.7	4.52	58	1	3
31	Lipoproteína periplásmica de unión a fosfato PSTS3	<i>Rv0928</i>	gi/57116798	38.4	5.14	40	3	7
32	Lipoproteína Lpql	<i>Rv0237</i>	gi/57116706	39.3	5.4	141	5	10
32	Lipoproteína de unión a glutamina	<i>Rv0411c</i>	gi/15607552	35.66	5.39	86	3	8
32	Lipoproteína LppZ	<i>Rv3006</i>	gi/15610143	38.7	4.85	48	2	7
33	Lipoproteína Lpql	<i>Rv0237</i>	gi/57116706	39.3	5.4	194	9	19
33	Lipoproteína de unión a glutamina GlnH	<i>Rv0411c</i>	gi/15607552	35.4	5.39	185	6	19
33	Lipoproteína LppZ	<i>Rv3006</i>	gi/15610143	38.7	4.85	119	6	8
34	Lipoproteína de unión a glutamina GlnH	<i>Rv0411c</i>	gi/15607552	35.4	5.39	411	10	29
34	Lipoproteína Lpql	<i>Rv0237</i>	gi/57116706	39.3	5.4	290	10	23
34	Lipoproteína LppZ	<i>Rv3006</i>	gi/15610143	38.7	4.85	52	2	6
35	Lipoproteína Lpql	<i>Rv0237</i>	gi/57116706	39.3	5.4	172	8	14
35	Lipoproteína LppZ	<i>Rv3006</i>	gi/15610143	38.7	4.85	79	3	10
35	Lipoproteína de unión a glutamina GlnH	<i>Rv0411c</i>	gi/15607552	35.4	5.39	33	1	2
36	Lipoproteína Lpql	<i>Rv0237</i>	gi/57116706	39.3	5.4	255	9	22
36	Lipoproteína LppZ	<i>Rv3006</i>	gi/15610143	38.7	4.85	173	5	17
36	Lipoproteína periplásmica de unión a fosfato PSTS1 (PBP-1) (PSTS1)	<i>Rv0934</i>	gi/57116801	38.4	5.14	40	2	9
37	No identificada							
38	Lipoproteína periplásmica de unión a dicitrato-FEIII FecB	<i>Rv3044</i>	gi/15610181	36.8	5.2	142	3	8
39	Lipoproteína periplásmica de unión a dicitrato-FEIII FecB	<i>Rv3044</i>	gi/15610181	36.8	5.2	85	2	5
40	Lipoproteína LppL	<i>Rv2138</i>	gi/15609275	36.8	7.07	65	2	8
41	Lipoproteína LppL	<i>Rv2138</i>	gi/15609275	36.8	7.07	171	4	17
42	Proteína hipotética Rv1860 Apa	<i>Rv1860</i>	gi/57116926	32.7	4.52	28	1	6
43	Lipoproteína periplásmica de unión a fosfato PSTS1 (PBP-1) (PSTS1)	<i>Rv0934</i>	gi/57116801	38.4	5.14	213	5	18
43	Proteína hipotética Rv1860 Apa	<i>Rv1860</i>	gi/57116926	32.7	4.52	71	1	3
43	Lipoproteína periplásmica de unión a fosfato PSTS2 (PBP-2) (PSTS2)	<i>Rv0932c</i>	gi/57116800	38.1	4.97	58	1	2
44	Lipoproteína periplásmica de unión a fosfato PSTS1 (PBP-1) (PSTS1)	<i>Rv0934</i>	gi/57116801	38.4	5.14	347	11	51
44	Lipoproteína periplásmica de unión a fosfato PSTS2 (PBP-2) (PSTS2)	<i>Rv0932c</i>	gi/57116800	38.1	4.97	124	2	6



No. "Spot" <sup>a</sup>	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	H37Rv gen	No. de acceso NCBI	$M_r$ Teórico <sup>c</sup>	pI Teórico <sup>c</sup>	MOWSE "Score"	Péptidos emparejados	% de Secuencia cubierta
44	Lipoproteína LppZ	<i>Rv3006</i>	gi/15610143	38.7	4.85	41	1	2
44	Lipoproteína LpqN	<i>Rv0583c</i>	gi/15607723	23.6	4.57	31	1	4
45	Lipoproteína periplásmica de unión a fosfato PSTS1 (PBP-1) (PSTS1)	<i>Rv0934</i>	gi/57116801	38.4	5.14	588	21	57
45	Lipoproteína periplásmica de unión a fosfato PSTS2 (PBP-2) (PSTS2)	<i>Rv0932c</i>	gi/57116800	38.1	4.97	108	4	13
46	Lipoproteína periplásmica de unión a fosfato PSTS1 (PBP-1) (PSTS1)	<i>Rv0934</i>	gi/57116801	38.4	5.14	471	24	53
46	Lipoproteína LppZ	<i>Rv3006</i>	gi/15610143	38.7	4.85	111	2	6
47	Lipoproteína periplásmica de unión a fosfato PSTS1 (PBP-1) (PSTS1)	<i>Rv0934</i>	gi/57116801	38.4	5.02	538	22	50
47	Proteína hipotética Rv0281	<i>Rv0281</i>	gi/15607422	33	4.88	53	1	3
47	Tioredoxina	<i>Rv1324</i>	gi/15608464	32.2	4.63	34	1	1
48	Lipoproteína periplásmica de unión a fosfato PSTS1 (PBP-1) (PSTS1)	<i>Rv0934</i>	gi/57116801	38.4	5.14	116	7	21
48	Proteína hipotética Rv1084	<i>Rv1084</i>	gi/15608224	71	5.37	40	4	6
49	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa B	<i>Rv2582</i>	gi/15609719	32.63	9.45	79	1	2
49	Glicosil hidrolasa	<i>Rv1096</i>	gi/15608236	31.1	6.51	52	1	3
50	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa B PpiB	<i>Rv2582</i>	gi/15609719	32.6	9.45	64	1	2
51	No identificada							
52	Lipoproteína periplásmica de unión a fosfato PSTS1 (PBP-1) (PSTS1)	<i>Rv0934</i>	gi/57116801	38.4	5.14	81	1	4
52	Lipoproteína LpqN	<i>Rv0583c</i>	gi/15607723	23.7	4.57	62	3	19
52	Glicosil hidrolasa	<i>Rv1096</i>	gi/15608236	31.1	6.51	51	1	3
53	Lipoproteína periplásmica de unión a fosfato PSTS1 (PBP-1) (PSTS1)	<i>Rv0934</i>	gi/57116801	38.4	5.1	187	7	18
53	Glicosil hidrolasa	<i>Rv1096</i>	gi/15608236	31.1	6.51	99	3	10
53	Lipoproteína LpqN	<i>Rv0583c</i>	gi/15607723	23.7	4.57	89	4	14
53	Lipoproteína LppZ	<i>Rv3006</i>	gi/15610143	38.7	4.85	42	3	5
54	Lipoproteína periplásmica de unión a fosfato PSTS1 (PBP-1) (PSTS1)	<i>Rv0934</i>	gi/57116801	38.4	5.1	115	1	4
54	Glicosil hidrolasa	<i>Rv1096</i>	gi/15608236	31.1	6.51	47	1	3
54	Precursor beta-1,3-glucanasa	<i>Rv0315</i>	gi/15607456	32.2	4.91	44	3	11
55	Precursor beta-1,3-glucanasa	<i>Rv0315</i>	gi/15607456	32.2	4.91	154	7	20
55	Glicosil hidrolasa	<i>Rv1096</i>	gi/15608236	31.1	6.51	96	2	6
56	Precursor beta-1,3-glucanase	<i>Rv0315</i>	gi/15607456	32.2	4.91	134	7	21
56	Glicosil hidrolasa	<i>Rv1096</i>	gi/15608236	31.1	6.51	80	1	3



No. "Spot" <sup>a</sup>	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	H37Rv gen	No. de acceso NCBI	$M_r$ Teórico <sup>c</sup>	pI Teórico <sup>c</sup>	MOWSE "Score"	Péptidos emparejados	% de Secuencia cubierta
56	Lipoproteína LpqN	Rv0583c	gi/15607723	23.7	4.57	45	1	4
57	No identificada							
58	Lipoproteína de superficie celular Mpt83	Rv2873	gi/15610010	22.5	4.86	92	3	18
58	Lipoproteína LpqN	Rv0583c	gi/15607723	23.6	4.57	45	1	4
59	No identificada							
60	Beta-Lactamasa clase A Blas	Rv2068c	gi/15609205	32.4	5.77	138	4	10
60	Proteína de membrana externa A OMPA	Rv0899	gi/15608039	33.66	6.84	89	1	5
60	Superoxido dismutasa periplásmica [Cu-Zn] SodC	Rv0432	gi/15607573	23.8	5.94	60	1	9
60	Lipoproteína periplásmica de unión a fosfato PSTS3 (PBP-3) (PSTS3) (PHOS1)	Rv0928	gi/57116798	37.8	5.27	35	1	2
61	Superoxido dismutasa periplásmica [Cu-Zn] SodC	Rv0432	gi/15607573	23.8	5.94	44	4	19
61	Beta-lactamasa clase A Blas	Rv2068c	gi/15609205	32.7	5.77	42	2	4
62	Superoxido dismutasa periplásmica [Cu-Zn] SodC	Rv0432	gi/15607573	23.8	5.94	86	3	18
62	Lipoproteína LprF	Rv1368	gi/15608508	26.9	8.89	61	1	3
63	Lipoproteína LpqT	Rv1016c	gi/15608156	24.6	6.51	68	2	8
64	Lipoproteína LpqT	Rv1016c	gi/15608156	24.6	6.51	70	4	15
65	Lipoproteína LprA	Rv1270c	gi/15608410	24.8	5.26	165	13	54
65	Lipoproteína de superficie celular Mpt83	Rv2873	gi/15610010	22.5	4.86	53	1	8
66	Lipoproteína LprG	Rv1411c	gi/15608549	24.6	7.77	203	8	31
67	Lipoproteína LprG	Rv1411c	gi/15608549	24.6	7.77	241	9	31
68	Lipoproteína LprG	Rv1411c	gi/15608549	24.6	7.77	159	10	30
69	Lipoproteína LprG	Rv1411c	gi/15608549	24.6	7.77	43	2	6
69	Lipoproteína LppC	Rv1911c	gi/15609048	19.9	5.76	30	2	7
70	Lipoproteína LppX	Rv2945c	gi/15610082	24.1	5.03	58	7	34
71	Lipoproteína LppX	Rv2945c	gi/15610082	24.1	5.03	38	1	4
72	19 kDa lipoproteína LpqH	Rv3763	gi/15610899	15.1	6.54	54	4	47
73	19 kDa lipoproteína LpqH	Rv3763	gi/15610899	15.1	6.54	36	2	28
73	Lipoproteína LppC	Rv1911c	gi/15609048	19.8	5.76	32	1	3
74	19 kDa lipoproteína LpqH	Rv3763	gi/15610899	15.1	6.54	175	7	47
74	Bacterioferritina BfrB	Rv3841	gi/15610977	20.4	4.73	58	1	5
74	Proteína hipotética Rv0020c	Rv0020c	gi/15607162	56.8	4.89	48	2	5
74	Proteína hipotética Rv3491	Rv3491	gi/15610627	20.3	6.23	40	1	3
74	Lipoproteína LppC	Rv1911c	gi/15609048	19.8	5.76	34	1	3
75	19 kDa lipoproteína antígeno LPQH	Rv3763	gi/15610899	15.1	6.54	98	2	22
76	19 kDa lipoproteína antígeno LPQH	Rv3763	gi/15610899	15.1	6.54	63	2	22
76	Proteína hipotética Rv2799	Rv2799	gi/15609936	22.8	6.81	41	1	4



No. "Spot" <sup>a</sup>	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	H37Rv gen	No. de acceso NCBI	<i>M<sub>r</sub></i> Teórico <sup>c</sup>	<i>pI</i> Teórico <sup>c</sup>	MOWSE "Score"	Péptidos emparejados	% de Secuencia cubierta
77	No identificada							
78	No identificada							

<sup>a</sup> Número de "spot" corresponde al número en la Figura 14D. <sup>b</sup> El nombre de la proteína corresponde a la base de datos de NCBI. <sup>c</sup> Valores teóricos de *pI* and *M<sub>r</sub>* se obtuvieron de Mascot (Matriz Science, London, U. K., disponible en <http://www.matrixscience.com>).

De acuerdo a la caracterización funcional reportada para Lpps (Sutcliffe et al; 2004) y la base de datos TubercuList (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>), la identificación de este trabajo incluye 41 proteínas que entran en difentes categorías: Proteínas de función desconocida (LpqT, LpqW, LprF, LprG, LppC, LpqB, LppZ, LpqF, LpqN, LppL, Rv0907, Rv0988, Rv1084, Rv2799, Rv2813, and Rv3491); proteínas que por predicción parecen estar involucradas en la degradación (glicosilhidrolasas, Lpql y Rv1096, un precursor putativo de 1-3 glucanasa, Rv0315 y una proteasa secretada, Rv2672); proteínas involucradas en sistemas de transporte de diversos sustratos (para peptidos, una lipoproteína putativa de unión a glutamina, GlnH y OppA; de fosfato, PstS1, PstS2 y PstS3 y de hierro, FecB); enzimas involucradas en el metabolismo y detoxificación ( $\gamma$ -glutamyl transferasa GgtB, superoxido dismutasa SodC, una transpeptidasa PonA2, una putativa S-adenosilmetionina-dependiente,metiltransferasa, Rv0281, una tiorredoxina, Rv1324 una peptidilpropil isomerasa PpiB; proteínas con función de adhesión e invasión celular (Mpt32, LpqH, Mpt83); una posible bacterioferritina, BfrB y una presunta beta lactamasa BlacC; proteínas con una posible función en la señalización y funciones relacionadas ( LprA, LppX, LprG).

Es importante mencionar que 11 de las proteínas identificadas por MS, OmpA, LprF, GgtB, LpqF, LppL, Rv0281, Rv0988, Rv1084, Rv1096, Rv1234 y



Rv2582, corresponden a proteínas que han sido reportadas previamente en proteomas publicados de *M. tuberculosis* (**Tabla 6**).

### 3.7 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.

Las proteínas identificadas en este trabajo por MS se analizaron con diferentes algoritmos para determinar si tienen péptido señal, si pueden ser potenciales lipoproteínas y si tienen posibles sitios de O-glicosilación. (**Tabla 6**); con negritas se indican las 28 proteínas (68% del total de proteínas identificadas) con péptido señal y que además tienen sitios probables de glicosilación. Estas incluyen LpqH, PstS1, SodC, GlnH, Mpt83 y Mpt32, glicoproteínas anteriormente descritas. Dado que hasta el momento todas las glicoproteínas descritas para *M. tuberculosis* son lipoproteínas, con excepción de Mpt32, un dato importante es que se predice que 19 de las proteínas identificadas son lipoproteínas.

**Tabla 6. Predicción de sitios de O-glicosilación, lipidación y péptido señal en las proteínas identificadas.**

	H37Rv gen	Proteína	No. de "Spot" <sup>a</sup>	Péptido Señal <sup>b</sup>	NetOglyc hits <sup>c</sup>	Predicción Lpp <sup>d</sup>	Proteoma de referencia
1	Rv0020c	Rv0020c	74	0.00	0		(Planck, ; Rosenkrands et al., 2000a; Rosenkrands et al., 2000b),
2	<b>Rv0237</b>	<b>LpqI</b>	<b>32-36</b>	<b>1.00</b>	<b>12</b>	<b>Si</b>	<b>(Malen et al., 2007; Mattow et al., 2007)</b>
3	Rv0281	Rv0281	47	0.07	2		Este trabajo.
4	<b>Rv0315</b>	<b>BGlu</b>	<b>54-56</b>	<b>1.00</b>	<b>4</b>		<b>(Malen et al., 2007)</b>
5	<b>Rv0411c</b>	<b>GlnH</b>	<b>32-35</b>	<b>0.99</b>	<b>10</b>	<b>Si</b>	<b>(Malen et al., 2007)</b>
6	<b>Rv0432</b>	<b>SodC</b>	<b>60-62</b>	<b>1.00</b>	<b>19</b>	<b>Si</b>	<b>(Mattow et al., 2007)</b>
7	<b>Rv0583c</b>	<b>LpqN</b>	<b>44, 52, 53, 56, 58</b>	<b>1.00</b>	<b>27</b>	<b>Si</b>	<b>(Malen et al., 2007)</b>
8	Rv0899	OmpA	60	0.00	8		Este trabajo
9	Rv0907	Rv0907	14-16, 18	0.00	0		(Mattow et al., 2007)
10	Rv0928	PstS3	31, 60	1.00	0	si	(Malen et al., 2007)
11	<b>Rv0932c</b>	<b>PstS2</b>	<b>43-45</b>	<b>1.00</b>	<b>2</b>	<b>si</b>	<b>(Malen et al., 2007; Mattow et al., 2007; Planck)</b>



	H37Rv gen	Proteína	No. de "Spot" <sup>a</sup>	Péptido Señal <sup>b</sup>	NetOglyc hits <sup>c</sup>	Predicción Lpp <sup>d</sup>	Proteoma de referencia
12	<i>Rv0934</i>	PstS1	28-31, 36, 43-48, 52-54	1.00	9	si	(Planck, ; Rosenkrands et al., 2000a; Rosenkrands et al., 2000b; Sinha et al., 2002)
13	<i>Rv0988</i>	Rv0988	14-16	1.00	0		Este trabajo
14	<i>Rv1016c</i>	LpqT	63, 64	0.99	20	si	Este trabajo
15	<i>Rv1084</i>	Rv1084	48	0.00	1		Este trabajo
16	<i>Rv1096</i>	Glicosil hidrolasa	49, 52-56	0.74	3		Este trabajo
17	<i>Rv1166</i>	LpqW	1-4, 2, 3	1.00	27	si	(Malen et al., 2007)
18	<i>Rv1270c</i>	LprA	65	0.99	7	si	(Mattow et al., 2007)
19	<i>Rv1280c</i>	OppA	14-16	0.03	1	si	(Mattow et al., 2007)
20	<i>Rv1324</i>	Tiorredoxina	47	0.46	4		(Mattow et al., 2007; Rosenkrands et al., 2000a)
21	<i>Rv1368</i>	LprF	62	0.99	9	si	(Sinha et al., 2002)
22	<i>Rv1411c</i>	LprG	66-69	1.00	4	si	(Mattow et al., 2007)
23	<i>Rv1860</i>	Apa	19, 20, 27, 31, 42, 43	1.00	14		(Planck, ; Rosenkrands et al., 2000a; Rosenkrands et al., 2000b)
24	<i>Rv1911c</i>	LppC	69, 73,74	0.97	11	si	(Malen et al., 2007)
25	<i>Rv2068c</i>	BlaC	60, 61	1.00	0		(Malen et al., 2007)
26	<i>Rv2138</i>	LppL	40, 41	1.00	5	si	Este trabajo
27	<i>Rv2394</i>	GgtB	14-16, 18, 22-26	0.99	9	si	Este trabajo
28	<i>Rv2582</i>	PpiB	49, 50	0.16	16		Este trabajo
29	<i>Rv2672</i>	Proteasa secretada	12, 13	0.99	6	si	(Malen et al., 2007)
30	<i>Rv2799</i>	Rv2799	76	0.57	9		(Malen et al., 2007)
31	<i>Rv2813</i>	Rv2813	28	0.00	2		Este trabajo
32	<i>Rv2873</i>	Mpt83	58, 65	1.00	9	si	(Malen et al., 2007)
33	<i>Rv2945c</i>	LppX	70, 71	0.99	3	si	(Mattow et al., 2007)
34	<i>Rv3006</i>	LppZ	28-36, 44, 46, 53	0.99	3	si	(Malen et al., 2007; Mattow et al., 2007)
35	<i>Rv3044</i>	FecB	38, 39	0.99	3	si	(Malen et al., 2007)
36	<i>Rv3244c</i>	LpqB	1-4, 6-9	1.00	3	si	(Malen et al., 2007)
37	<i>Rv3491</i>	Rv3491	74	0.96	5		(Malen et al., 2007)
38	<i>Rv3593</i>	LpqF	6-9	1.00	2	si	Este trabajo
39	<i>Rv3682</i>	PonA2	1-4	0.98	4		(Malen et al., 2007)
40	<i>Rv3763</i>	LpqH	72-76	1.00	13	si	(Mattow et al., 2007; Rosenkrands et al., 2000a; Rosenkrands et al., 2000b)
41	<i>Rv3841</i>	BfrB	74	0.00	1		(Malen et al., 2007)

<sup>a</sup> Numeración de "spot" correspondiente en la Fig. 14D. <sup>b</sup> Predicción de acuerdo a (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). <sup>c</sup> De acuerdo a la predicción NetOGlyc prediction (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>). <sup>d</sup> De acuerdo al algoritmo LipoP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>).



#### 4. DISCUSIÓN

La cromatografía de afinidad a ConA combinada con 2D-SDS-PAGE y MS se utilizó en este trabajo para la búsqueda de nuevas proteínas manosiladas en el proteoma de *M. tuberculosis*. Los resultados demuestran que esta bacteria posee un gran número de posibles glicoproteínas manosiladas con funciones muy variadas. Esta diversidad de funciones vinculada con manosilación, sugiere que esta modificación postraduccional sea común en proteínas exportadas a la pared celular o al medio extracelular. La glicosilación proteica ligada a vías de secreción ha sido establecida en la levadura *Sacharomyces cerevisiae* (Herscovics et al., 1993).

Recientemente se ha determinado que procesos específicos de translocación requieren de O-manosilación proteica en la micobacteria (VanderVen et al., 2005). La O-manosilación es una modificación postraduccional muy importante en levaduras, determina la estructura e integridad de la pared celular, así como la diferenciación celular y la virulencia (Lengeler et al., 2008, Proszynski et al., 2004, Willer et al., 2005). Interesantemente la mayoría de las proteínas posiblemente glicosiladas identificadas en este trabajo corresponden a Lpps, un grupo de moléculas micobacterianas involucradas en virulencia. Se demostró la atenuación de la virulencia en *M. tuberculosis* mutante para *lpsA*. *lpsA* codifica para una peptidasa involucrada en el procesamiento de Lpps (Sander et al., 2004). Estas macromoléculas están caracterizadas por una "lipobox" localizada en el carboxi-terminal que consiste en cuatro aminoácidos LVI / ASTVI / GAS / C (Babu et al., 2006). La modificación está dada por la actividad consecutiva de tres enzimas. El



“knock-out” *lpsA* muestra una reducción en la multiplicación del bacilo en macrófagos de ratón (J774), ausencia total de la patología característica en el pulmón, y una reducción de 3 a 4 órdenes de magnitud en el número de células formadoras de colonia en un modelo murino de tuberculosis (Sander et al., 2004).

Algunas proteínas que se han identificado como glicoproteínas son potentes antígenos como PstS1, LpqH, Mpt32 y Mpt83 (Espitia et al., 1989, Hewinson et al., 1996, Noss et al., 2001). Aunque sus funciones biológicas no han sido claramente dilucidadas se sabe que PstS1 y Mpt83 forman parte de operones, PstS1 del operón de transporte de fosfato y Mpt83 se contrascribe con Mpt70 (Braibant et al., 1996, Torres et al., 2001, Juárez et al., 2001). El papel de los azúcares en las proteínas O-manosiladas es aún desconocida, sin embargo las manosas unidas a estas moléculas podrían ser importantes en la respuesta inmune. Mpt32, purificada, produce una potente respuesta de hipersensibilidad retardada, además estimula células T *in vitro*. En contraste la proteína deglicosilada recombinante en *E. coli* no produce dichos efectos (Horn et al., 1999, Romain et al., 1999). Del mismo modo los anticuerpos de pacientes enfermos reconocen la proteína glicosilada pero no la forma no glicosilada (Lara et al., 2004). Además las glicoproteínas micobacterianas han sido relacionadas con la capacidad de interactuar con el hospedero a través de sus azúcares. Recientemente se ha demostrado que LpqH es una de las principales adhesinas del receptor de manosas en el macrófago y de DC-SIGN (Silvestre et al., 2005, Pitarque et al., 2005). Mpt32 también interacciona con DC-SIGN y proteína surfactante, interacciones que podrían facilitar la colonización y la invasión de las células hospederas (Pitarque et al., 2005, Ragas et al., 2007).



Se sabe que algunas de las lipoproteínas micobacterianas como PstS1 y LpqH interaccionan con los receptores Toll. Sin embargo mientras la interacción de LpqH con TLR-2 inhibe  $\text{INF}\gamma$  regulando la expresión de MHC-II en macrófagos alveolares (Fulton et al., 2004; Noss et al., 2001), PstS1 actúa a través de TLR-2 y TLR-4 induciendo la activación de vías, en donde  $\text{TNF}\alpha$  y la expresión de IL-6 tienen un papel esencial durante la infección (Jung et al., 2006).

Por otro lado es importante recordar que los sitios posibles de O-glicosilación están evaluados con un programa para eucariontes totalmente predictivo hasta cierto punto. Habrá que contar con los resultados experimentales. Sin embargo, es importante mencionar que dicho programa ha resultado ser una herramienta útil dado que algunas de las proteínas que Herrman reportó como posibles glicoproteínas, reaccionan positivamente a la ConA, hecho que se reafirma en este trabajo.

Varios factores de virulencia bacterianos como toxinas, adhesinas, invasinas, lipasas y proteasas están asociadas a la superficie celular y algunas de ellas pueden ser secretadas (Finlay y Falkow, 1997). Estas proteínas se encuentran en una posición ideal para participar en la interacción patógeno-hospedero. La función de una proteína depende de su correcta localización. En las bacterias Gram-positivas las lipoproteínas asociadas a la célula quedan ancladas en la membrana plasmática. En las Gram-negativas, la gran mayoría son liberadas de las membranas plasmáticas y ancladas a la membrana externa (Tokuda y Matsuyama, 2004). A pesar de los recientes progresos en el fraccionamiento subcelular (Mawuenyega et al., 2005; Rezwan et al., 2006) la localización de las lipoproteínas micobacterianas ha sido poco analizada. En los extractos fraccionados de *M. tuberculosis* reportados



por Mawuenyega et al (2005), se identificaron y localizaron 28 probables lipoproteínas, 6 de ellas se encontraron en la pared celular, 10 en la membrana plasmática, 7 en el citosol, y 5 se observaron en dos o en las tres fracciones. La localización de lipoproteínas maduras en el citosol es cuestionable; éstas podrían representar las recientemente sintetizadas. Sin embargo no se sabe si esto aplica también para las glicolipoproteínas.

Finalmente entre las proteínas identificadas en este trabajo se encuentra LprG (Bigi et al., 1997). Esta proteína es considerada un factor de virulencia ya que *M. tuberculosis* carente de *LprG* atenua su virulencia en un modelo de ratón (Bigi et al., 2004). LprG disminuye la protección dada por la vacuna BCG, sugiriendo que la Lpp podría modular el curso de la infección experimental y posiblemente tener un papel en la infección, induciendo un incremento en la supresión de la respuesta inmune (Hovav et al., 2003, Hovav et al., 2006). El efecto anti-protector de LprG podría deberse a su capacidad para modular la respuesta inmune a través de la activación de TLR-2, una actividad también encontrada en LprA (Pecora et al., 2006). Interesantemente, LprG también requiere de la glicosilación para la activación de células T, *in vivo*, restringidas a MHC-II (Gehring et al., 2004, Sieling et al., 2008).

Estos resultados sugieren que muchas de las posibles glicoproteínas, identificadas en este trabajo, podrían representar potenciales adhesinas para DC-SIGN y el receptor de manosa. Estas moléculas también podrían estar involucradas en la virulencia y la respuesta inmune contra la micobacteria.



LpqT (Rv1016c) también es importante para el crecimiento óptimo *in vivo* (Rengarajan et al., 2005, Sasseti y Rubin, 2003) Por otro lado, LpqB (Rv3244c) es una lipoproteína particularmente interesante: el gen *lpqB* está localizado inmediatamente corriente abajo del segundo componente del sistema de transducción de señales MtrAB. En este sistema, MtrB es el sensor-cinasa transmembranal y MtrA es un regulador citoplasmático. Podría suponerse que LpqB modula el sensor de señales por MtrB (Hoskisson y Hutchings, 2006). LprF (Rv1368) muestra interacción proteína-proteína con la histidina cinasa KdpD. La vía de transducción de señales aparece como una respuesta primaria al estrés osmótico en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*. Se ha sugerido que el dominio de la histidina cinasa forma un complejo con LprF (Boshoff et al., 2004). La investigación de LpqW revela que es clave en la síntesis y transporte de componentes de la envoltura celular micobacteriana. LpqW (Rv1166) es una lipoproteína esencial altamente conservada, involucrada en la síntesis de componentes de pared celular (Mandana R 2007). LppZ es una lipoproteína inmunogénica que reacciona con sueros de pacientes con tuberculosis activa; se ha propuesto junto con Rv3881c, PstS1, PstS2 como candidata para el desarrollo de serodiagnóstico (Malen H 2007).

Es importante notar que la estrategia del enriquecimiento de glicoproteínas con ConA, permitió la identificación de nuevas proteínas no reportadas en proteomas publicados para *M. tuberculosis*. Ya que las proteínas analizadas se obtuvieron por cromatografía de afinidad a ConA y su reactividad se confirmó en ligand-blot, es razonable creer que muchas de las glicoproteínas identificadas en este trabajo contienen manosas. Además, para varias, los sitios de glicosilación fueron predichos con NetOglyc, aunque es posible que algunas de las proteínas que no mostraron



---

sitios predichos de glicosilación sean realmente glicoproteínas, ya que el método predictivo no es 100% preciso. Este ha sido utilizado principalmente para proteínas eucarióticas.

Por otro lado se espera encontrar Lpps asociadas a la membrana celular (Rezwan et al., 2007, Sutcliffe et al., 2004, Mattow et al., 2007), inesperadamente encontramos varias posibles lipoglicoproteínas en el filtrado del cultivo estático de 4-6 semanas. Su presencia podría deberse a la lisis celular; sin embargo, algunas Lpps han sido encontradas en filtrado de cultivos de tiempos más cortos (Pheiffer et al., 2005, Rosenkrands et al., 2000a). Otra posible explicación podría ser que estas son liberadas por la proteólisis de su extremo amino terminal que es utilizado de anclaje (N-terminal), quizá por la peptidasa tipo I. Interesantemente sitios predichos para esta enzima fueron observados para muchas de las Lpps encontradas en este trabajo.

No obstante, la demostración de la unión covalente proteína-azúcar es necesaria, así como la caracterización de la estructura glicosídica. Este conocimiento es fundamental para entender y dilucidar la función de estas moléculas en la interacción con células del hospedero, y por supuesto su participación en la patogenia de la enfermedad.



---

## 5. CONCLUSIONES

**S**e encontró un gran número de proteínas posiblemente manosiladas; en su mayoría lipoproteínas. Ya que algunas glicolipoproteínas están involucradas en la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*, así como en la virulencia, es tentador creer que las lipoproteínas manosiladas encontradas en este trabajo puedan tener un papel similar.



## Abreviaturas

a.a	Aminoácido
Asn	Asparragina
AG	Aparato de Golgi
$\alpha$ -Met-D-Manp	alfa-Metil-D-Manopiranosido
BSA	Albumina sérica bovina
ConA	Concanavalina A
ConA-HRP	Concanavalina acoplada a peroxidasa
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intracellular molecule-3-Grabbing Non-integrin
Dol-P	Dolicol- fosfato
FC	Filtrado de cultivo
F1	Filtrado de cultivo secuencial
FC-FG	Filtrado de cultivo fracción glicoproteica
F1-FG	Filtrado de cultivo secuencial fracción glicoproteica
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Agua bidestilada
LAM	Lipoarabinomanan
Lpps	Lipoproteínas
Lpp	Lipoproteína
mAb	Anticuerpo monoclonal
Manp	Manopiranosido
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
Mr	Masa relativa
MS	Espectrometría de masas
-P-	Fosfato
PBS	Amortiguador salino se fosfatos
PBS-T	PBS con Tween
PBS-TB	PBS con Tween y BSA



---

PMI	Fosfomanosa isomerasa
pI	Punto isoeléctrico
Pro	Prolina
Proteína A-HRP	Proteína A acoplada a peroxidasa
PVDF	Polivinil-deno fluoruro
RE	Retículo endoplásmico
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de sodio
2D SDS-PAGE	Electróforesis de doble dimensión en Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de sodio
Ser	Serina
TA	Temperatura ambiente
TLR	Receptor tipo toll
Thr	Treonina
Val	Valina



## 6. BIBLIOGRAFIA.

**Andersen, A. B., Ljungwist, L. and Olsen, M.** (1990). Evidence that protein antigen b of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in phosphate metabolism. *Journal of General Microbiology* **136**, 477-480.

**Babu, M. M., Priya, M. L., Selvan, A. T., Madera, M., Gough, J., Aravind, L. and Sankaran, K.** (2006). A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predict lipoproteins. *The Journal of Bacteriology* **188**, 2761-2773.

**Bigi, F., Espitia, C., Alito, A., Zumarraga, M., Romano, M. I., Cravero, S. and Cataldi, A.** (1997). A novel 27 kDa lipoprotein antigen from *Mycobacterium bovis*. *Microbiology* **143**, 3599-3605.

**Bigi, F., Gioffré, A., Klepp, L., Santangelo, M. P., Alito, A., Caimi, K., Meikle, V., Zumarraga, M., Taboga, O., Rommano, M. I. et al.** (2004). The knockout of the *lprG-Rv1410* operon produces strong attenuation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection* **6**, 182-187.

**Boshoff, H. I., Myers, T. G., Copp, T. G., McNeil, M. R., Wilson, M. A. and Barry III, C. E.** (2004). The transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to inhibitors of metabolism: Novel insights into drug mechanisms of action. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 40174-40184.

**Braibant, M.; Lefeuvre, P.; De Wit, L.; Peirs, P.; Ooms, J.; Huygen, K.; Andersen, A. B.; Content, J.** (1996). A *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding protein of a phosphate transporter homologous to the *Escherichia coli* Pst system. *Gene* **176**, 171-176.

**Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry III, C. E. et al.** (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537-544.

**Cooper, H. N., Gurucha, S. S., Nigou, J., Brennan, P. J., Belisle, J. T., Besra, G. S. and Young, D.** (2002). Characterization of mycobacterial protein glycosyltransferase activity using synthetic peptide acceptors in a cell-free assay. *Glycobiology* **12**, 427-434.

**Deck, B., Elofsson, M., Kihlberg, J. and Unanue, E. R.** (1995). Specificity of glycopeptide-specific T cells. *The Journal of Immunology* **155**, 1074-1078.

**Diaz-Silvestre, H., Espinosa-Cueto, P., Sánchez-González, A., Esparza-Ceron, M. A., Pereira-Suarez, A. L., Bernal-Fernandez, G., Espitia, C. and Mancilla, R.** (2005). The 19 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesine that binds the mannose receptor of TPH-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria. *Microbial Pathogenesis* **39**, 97-107.

**Dobos, K. M., Khoo, H.-K., Swiderek, K. M., Brennan, P. J. and Belisle, J. T.** (1996). Definition of the full extent of Glycosylation of the 45-Kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* **178**, 2498-2506.

**Dobos, K. M., Swiderek, K., Khoo, H. K., Brennan, P. J. and Belisle, J. T.** (1995). Evidence for Glycosylation Sites on the 45-kilodalton Glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* **63**, 2846-2853.



**Doig, P., Kinsella, N., Guerry, P. and Trust, T. J.** (1996). Characterization of a post-transcriptional modification of *Campylobacter flagellin*: Identification of a sero-specific glycosyl moiety. *Molecular Microbiology* **19**, 379-387.

**Espitia, C., Cervera, I., González, R. and Mancilla, R.** (1989). A 38-kDa *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clinical and Experimental Immunology* **77**, 373-377.

**Espitia, C., Elinos, M., Hernández-Pando, R. and Mancilla, R.** (1992). Phosphate starvation enhances expression of the immunodominant 38-kilodalton protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis* demonstrated by immunogold electron microscopy. *Infection and Immunity* **60**, 2998-3001.

**Espitia, C. and Mancilla, R.** (1989). Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens. *Clinical and Experimental Immunology* **77**, 378-383.

**Finlay, B. B. and Falkow, S.** (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Molecular Biology Review* **61**, 136-169.

**Fulton, S. A., Reba, S. M., Pai, R. K., Pennini, M., Torres, M., Harding, C. V. and Boom, H. W.** (2004). Inhibition of Major Histocompatibility Complex II Expression and Antigen Processing in murine Alveolar Macrophages by *Mycobacterium bovis* BCG and the 19-kilodalton Mycobacterial lipoprotein. *Infection and Immunity* **72**, 2101-2110.

**Garbe, T., Harris, D., Vordermeier, M., Lathigra, R., Ivany, J. and Young, D.** (1993). Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* 19kDa antigen in *Mycobacterium smegmatis*: Immunological analysis and evidence of glycosylation. *Infection and Immunity* **61**, 260-267.

**Gehring, A. J.; Dobos, K. M.; Belisle, J. T.; Harding, C. V.; Boom, H. W.** (2004). *Mycobacterium tuberculosis* LprG (Rv1411c): A novel TLR-2 ligand that inhibits macrophage class II MHC antigen processing. *Journal of Immunology*. **173**, 2660-2668.

**Gooley, A., Classon, B., Marschalek, R. and Williams, K.** (1991). Glycosylation sites identified by detection of glycosylated aminoacids released from Edman degradation: the identification of Xaa-Pro-Xaa-Xaa as a motif for Thr O-glycosylation. *Biochemical Biophysical Research Communications* **178**, 1194-1201.

**González-Zamorano M, Mendoza-Hernández G, Xolalpa W, Parada C, Vallecillo AJ, Bigi F y Espitia C.** (2009). *Mycobacterium tuberculosis* Glycoproteomics Based on ConA-Lectin Affinity Capture of Mannosylated Proteins. *Journal Proteome Research* **8**, 721-733

**Haurum, J. S., Arsequell, G., Lellouch, A. C., Wong, S. Y., Dwek, R. A., McMichael, A. J. and Elliott, T.** (1994). Recognition of carbohydrate by major histocompatibility complex class I-restricted, glycopeptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine* **180**, 739-744.

**Hendrixson, D. R. and DiRita, V. J.** (2004). Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Molecular Microbiology* **52**, 471-484.

**Herrmann, J. L., Delahay, R., Gallagher, A., Robertson, D. and Young, D.** (2000). Analysis of post-translational modification of mycobacterial protein using a cassette expression system. *FEBS Lett.* **473**, 358-362.



**Herrmann, J. L., O'Gaora, P., Gallagher, A., Thole, J. E. and Young, D. B.** (1996). Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of European Molecular Biology Organization* **15**, 3547-3554.

**Herscovics, A. and Orlean, P.** (1993). Glycoprotein biosynthesis in yeast. *The Federation of American Societies for Experimental Biology* **7**, 540-550.

**Hewinson, R. G.; Michell, S. L.; Russell, W. P.; McAdam, R. A., Jr.** (1996). Molecular characterization of MPT83: a seroreactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPT70. *Immunology* **43**, 490-499.

**Horn, C.; Namane, A.; Pescher, P.; Rivie`re, M.; Romain, F.; Puzo, G.; Ba`rzu, O.; Marchal, G.** (1999) Decreased capacity of recombinant 45/47-kDa molecules (Apa) of *Mycobacterium tuberculosis* to stimulate T lymphocyte responses related to changes in their mannosylation pattern. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 32023-32030.

**Hoskisson, P. A. and Hutchings, M. I.** (2006). MtrAB-LpqB: a conserved three-component system in actinobacteria? *Trends in Microbiology* **14**, 444-449.

**Hovav, A-H.; Mullerad, J.; Davidovitch, L.; Fishman, Y.; Bigi, F.; Cataldi, A.; Cercovier, H.** (2003). The *Mycobacterium tuberculosis* recombinant 27-kilodalton lipoprotein induces a strong Th1-type immune response deleterious to protection. *Infection and Immunity* **71**, 3146-3154.

**Hovav, A.; Mullerad, J.; Maly, A.; Davidovitch, L.; Fishman, Y.; Bercovier, H.** (2006) Aggravated infection in mice co-administered with *Mycobacterium tuberculosis* and the 27-kDa lipoprotein. *Microbes Infection* **8**, 1750-1757.

**Jones, M. A., Marston, K. L., Woodall, C. A., Maskell, D. J., Linton, D., Karlyshev, A. V., Dorrell, N., Wren, B. W. and Barrow, P. A.** (2004). Adaptation of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 to High-Level Colonization of the Avian Gastrointestinal Tract. *Infection and Immunity* **72**, 3769-3776.

**Juárez, M. D.; Torres, A.; Espitia, C.** (2001). Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* region containing the *mpt83* and *mpt70* genes. *FEMS Microbiology Lett.* **203**, 95-102.

**Jung, S. B.; Yang, C. S.; Lee, J. S.; Shin, A. R.; Jung, S. S.; Son, J. W.; Harding, C. V.; Kim, H. J.; Park, J. K.; Paik, T. H.; Song, C. H.; Jo, E. K.** (2006). The mycobacterial 38-kilodalton glycolipoprotein antigen activates the mitogen-activated protein kinase pathway and release of proinflammatory cytokines through Toll-like receptors 2 and 4 in human monocytes. *Infection and Immunity* **74**, 2686-2696.

**Kawamura, T. and Shockman, G. D.** (1983). Purification and some properties of the endogenous, autolytic N-acetylmuramoylhydrolase of *Streptococcus faecium*, a bacterial glycoenzyme. *The Journal of Biological Chemistry* **258**, 9514-9521.

**Kluepfel, D., Vats-Mehta, S., Aumont, F., Shareck, F. and Morosoli, R.** (1990). Purification and characterization of a new sylanase (sylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66. *Biochemical Journal* **267**, 45-50.

**Kowarik, M., Young, N. M., Numao, S., Schulz, B. L., Hug, I., Callewaert, N., Mills, D. C., Watson, D. C., Hernandez, M., Kelly, J. F. et al.** (2006). Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence. *Journal of European Molecular Biology Organization* **25**, 1957-1966.

**Kuo, C., Takahashi, N., Swanson, A., Ozeki, Y. and Hakomori, S.** (1996). An N-linked high-mannose type oligosaccharide, expressed at the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*, mediates attachment and infectivity of the microorganism to HeLa cells. *The Journal of Clinical Investigation* **98**, 2813-2818.



Lara, M.; Servi'n-Gonzalez, L.; Singh, M.; Moreno, C.; Cohen, I.; Nimtz, M.; Espitia, C. (2004). Expression, Secretion, and Glycosylation of the 45- and 47-kDa Glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans*. *Appl. Environmental Microbiology* **70**, 679–685.

Lazar-Nita, M., Wacker, M., Schegg, S. A. and Markus, A. (2005). The N-X-S/T consensus sequence is required but not sufficient for bacterial N-linked protein glycosylation. *Glycobiology* **15**, 361-367.

Lengeler, K. B.; Tielker, D.; Ernst, J. F. (2008). Protein-O-mannosyltransferases in virulence and development. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 528–544.

Lindenthal, C. and Elsingerhorst, E. A. (1999). Identification of a Glycoprotein produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **67**, 4084-4091.

Logan, S. M., Kelly, J. F., Thibault, P., Ewing, C. P. and Guerry, P. (2002). Structural heterogeneity of carbohydrate modifications affects serospecificity of *Campylobacter flagellins*. *Molecular Microbiology* **46**, 587-597.

Malen, H., Berven, F. S., Fladmark, K. E. and Wiker, H. G. (2007). Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Proteomics* **7**, 1702-1718.

Mattow, J., Siejak, F., Hagens, K., Schmidt, F., Koehler, C., Treumann, A., Schaible, U. E. and Kaufmann, S. H. (2007). An Improved strategy for selective and efficient enrichment of integral plasma membrane proteins of mycobacteria. *Proteomics* **7**, 1687-1701.

Mawuenyega, K. G., Forst, C. V., Dobos, K. M., Belisle, J., Chen, J., Bradbury, E. M., Bradbury, A. R. M. and Chen, W. (2005). *Mycobacterium tuberculosis* functional network analysis by global subcellular protein profiling. *Molecular Biology Cell* **16**, 396-404.

Michell, S. L., Whelan, A. O., Wheeler, P. R., Panico, M., Easton, R. L., Etienne, A. T., Haslam, S. M., Dell, A., Morris, H. R., Reason, A. J. et al. (2003). The MPB83 antigen from *Mycobacterium bovis* contains O-linked mannose and (1-3) manobiose moieties. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 16423-16432.

Noss E. H., Pai, R. K., Sellati, T. J., Radolf, J. D., Belisle, J., Golenbock, D. T., Boom, W. H. and Harding. C. V. (2001). Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology* **167**, 910-918.

Ong, E., Kilburn, D. G., Miller, R. C. and Warren, R. A. (1994). *Streptomyces lividans* glycosylates the linker region of a beta-1,4-glycanase from *Cellulomonas fimi*. *Journal of Bacteriology* **176**, 999-1008.

Patterson, J. H., Waller, R., F., Jeevarajah, D., Billman-Jacobe, H. and McConville, J. M. (2003). Mannose metabolism is required for mycobacterial growth. *The Journal Biochemical Society* **372**, 77-86.

Pecora, N. D.; Gehring, A. J.; Canaday, D. H.; Boom, W. H.; Harding, C. V. (2006). *Mycobacterium tuberculosis* LprA is a lipoprotein agonist of TLR2 that regulates innate immunity and APC function. *The Journal of Immunology* **177**, 422–429.

Pheiffer, C.; Betts, J. C.; Flynn, H. R.; Lukey, P. T.; van Helden, P. (2005). Protein expression by a Beijing strain differs from that of another clinical isolate and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* **151**, 1139–1150.

Pitarque, S., Herrmann, J. L., Duteyrat, J. I., Jackson, M., Stewart, G. R., Lecointe, F., Payre, B., Schwartz, O., Young, D. B., Marchal, G. et al. (2005). Deciphering the molecular bases of *Mycobacterium tuberculosis* binding to the lectin DC-SIGN reveals an underestimated complexity. *Biochemical Society* **392**, 615-624.



**Proszynski, T. J.; Simons, K.; Bagnat, M.** (2004). *O*-glycosylation as a sorting determinant for cell surface delivery in yeast. *Molecular Biology Cell* **15**, 1533–1543.

**Ragas, A., Roussel, L., Puzo, G. and Rivière, M.** (2007). The *Mycobacterium tuberculosis* Cell-surface Glycoprotein Apa as a Potential Adhesin to Colonize Target Cells via the innate immune System Pulmonary C-type lectin surfactant protein A. *The Journal Biological Chemistry* **282**, 5133-5142.

**Rengarajan, J., Bloom, B. R. and Rubin, E. J.** (2005). Genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 8327-8332.

**Rezwan, M.; Grau, T.; Tschumi, A.; Sander, P.** (2007) Lipoprotein synthesis in mycobacteria. *Microbiology* **153**, 652–658.

**Rezwan, M., Laneelle, M. A., Sander, P. and Daffé, M.** (2007). Breaking down the wall: fractionation of mycobacteria. *Journal of Microbiology Methods* **68** 32-39.

**Romain, F., Horn, C., Pescher, P., Namane, A., Riviere, M., Puzo, G., Barzu, O. and Marchal, G.** (1999). Deglycosylation of the 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* decreases its capacity to elicit in vivo or in vitro cellular immune responses. *Infection and Immunity* **67**, 5567-5572.

**Rosenkrands, I., King, A., Welding, K., Moniatte, M., Moertz, E. and Andersen, P.** (2000a). Towards the proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Electrophoresis* **21**, 3740-3756.

**Rosenkrands, I., Welding, K., Jacobsen, S., Hansen, D. V., Florio, W., Gianetri, I. and Andersen, P.** (2000b). Mapping and identification of *Mycobacterium tuberculosis* proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection. *Electrophoresis* **21**, 935-948.

**Sander, P., Rezwan, M., Walker, B., Rampini, S. K., Kroppenstedt, R. M., Ehlers, S. C., Keller, C., Keeble, J. R., Hagemeyer, M., Colston, M. J. et al.** (2004). Lipoprotein processing is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* **52**, 1543-1552.

**Sassetti, C. M. and Rubin, E. J.** (2003). Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100**, 12989-12994.

**Schlesinger, L. S., Hull, S. R. and Kaufman, T. M.** (1994). Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *The Journal of Immunology* **152**, 4070-4079.

**Sieling, P. A.; Hill, P. J.; Dobos, K. M.; Brookman, K.; Kuhlman, A. M.; Fabri, M.; Krutzik, S. R.; Rea, T. H.; Heaslip, D. G.; Belisle, J. T.; Modlin, R. L.** (2008). Conserved mycobacterial lipoglycoproteins activate TLR2 but also require glycosylation for MHC class II-restricted T cell activation. *The Journal of Immunology* **180**, 5833–5842.

**Silvestre, H.; Espinosa, P.; Sánchez, A.; Esparza, M.; Pereira, A. L.; Bernal, G.; Espitia, C.; Mancilla, R.** (2005). The 19 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesine that binds the mannose receptor of TPH-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria. *Microbial Pathogenesis*. **39**, 97–107.

**Sinha, S., Arora, S., Kosalai, K., Namane, A., Pym, A. S. and Cole, S. T.** (2002). Proteome analysis of the plasma membrane of *Mycobacterium tuberculosis*. *Comparative and Functional Genomics* **3**, 470-483.



**Sutcliffe, I. C. and Harrington, D. J.** (2004). Lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components. *FEMS Microbiology Reviews* **28**, 645-659.

**Sutcliffe, I. C. and Rusell, R. R.** (1995). Lipoproteins of Gram-positive bacteria. *The Journal of Bacteriology* **177**, 1123-1128.

**Szymanski, C. M., Burr, D. H. and Guerry, P.** (2002). Campylobacter protein glycosylation affects host cell interactions. *Infection and Immunity* **70**, 2242-2244.

**Szymanski, C. M., Logan, S. M., Linton, D. and Wren, B. W.** (2003). Campylobacter a tale of two protein glycosylation Systems. *Trends in Microbiology* **11**, 233-238.

**Takeuchi, K., Taguchi, F., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Ichinose, Y.** (2003). Flagellin Glycosylation Island in *Pseudomonas syringae* pv. *glucinea* and Its Role in Host Specificity. *Journal of Bacteriology* **185**, 6658-6665.

**Thibault, P., Logan, S. M., Kelly, J. F., Brisson, J. R., Ewing, C. P., Trust, T. J. and Guerry, P.** (2001). Identification of the carbohydrate moieties and glycosylation motifs in *Campylobacter jejuni* flagellin. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 34862-34870.

**Tokuda, H. and Matsuyama, S.** (2004). Sorting of lipoproteins to the outer membrane in *E. coli*. *Biochemistry Biophysics Acta* **1693**, 5-13.

**Torres, A.; Jua´rez, M. D.; Cervantes, R.; Espitia, C.** (2001). Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* phosphate specific transport system in *Mycobacterium smegmatis*. Characterization of recombinant 38 kDa (PstS-1). *Microbial Pathogenesis* **30**, 289-297.

**VanderVen, B. C.; Harder, J. D.; Crick, D. C.; Belisle, J. T.** (2005). Export-mediated Assembly of mycobacterial glycoproteins parallels eucaryotic pathways. *Science* **309**, 941-943.

**Virji, M., Saunders, J. R., Sims, G., Makepeace, K., Maskell, D. and Ferguson, D., J.** (1993). Pilus-facilitated adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells: modulation of adherence phenotype occurs concurrently with changes in primary amino acid sequence and the glycosylation status of pilin. *Molecular Microbiology* **10**, 1013-1028.

**Wacker, M., Linton, D., Hitchen, P. G., Nita-Lazar, M., Haslam, S. M., North, J., Panica, M., Morris, H. R., Dell, A., Wren, B. W. et al.** (2002). N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science* **298**, 1790-1793.

**Weerapana, E. and Imperiali, B.** (2006). Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic system. *Glycobiology* **16**, 91R-101R.

**Willer, T.; Brandl, M.; Sipiczki, M.; Strahl, S.** (2005). Protein O-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission yeast. *Molecular Microbiology* **57**, 156-170.

**Young, N. M., Brisson, J. R., Kelly, J., Watson, D. C., Tessier, L., Lanthier, P. H., Jarrell, H. C., Cadotte, N., St Michael, F., Aberg, E. et al.** (2000). Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni*. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 42530-42539.



## Abreviaturas

a.a	Aminoácido
Asn	Asparragina
AG	Aparato de Golgi
$\alpha$ -Met-D-Manp	alfa-Metil-D-Manopiranosido
BSA	Albumina sérica bovina
ConA	Concanavalina A
ConA-HRP	Concanavalina acoplada a peroxidasa
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intracellular molecule-3-Grabbing Non-integrin
Dol-P	Dolicol- fosfato
FC	Filtrado de cultivo
F1	Filtrado de cultivo secuencial
FC-FG	Filtrado de cultivo fracción glicoproteica
F1-FG	Filtrado de cultivo secuencial fracción glicoproteica
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Agua bidestilada
LAM	Lipoarabinomanan
Lpps	Lipoproteínas
Lpp	Lipoproteína
mAb	Anticuerpo monoclonal
Manp	Manopiranosido
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
Mr	Masa relativa
MS	Espectrometría de masas
-P-	Fosfato
PBS	Amortiguador salino se fosfatos
PBS-T	PBS con Tween
PBS-TB	PBS con Tween y BSA



---

PMI	Fosfomanosa isomerasa
pI	Punto isoeléctrico
Pro	Prolina
Proteína A-HRP	Proteína A acoplada a peroxidasa
PVDF	Polivinil-deno fluoruro
RE	Retículo endoplásmico
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de sodio
2D SDS-PAGE	Electróforesis de doble dimensión en Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de sodio
Ser	Serina
TA	Temperatura ambiente
TLR	Receptor tipo toll
Thr	Treonina
Val	Valina