



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE LA PstS-1 DE
Mycobacterium tuberculosis
RECOMBINADA EN *Mycobacterium
microti***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

VIRIDIANA GARCÍA RUIZ



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 ASIGNADO

PRESIDENTE: MARÍA GUADALUPE TSUZUKI REYES
VOCAL: LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ
SECRETARIO: YOLANDA LÓPEZ VIDAL
1er. SUPLENTE: MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
2o. SUPLENTE: GONZALO CASTILLO ROJAS

Sitio donde se realizó el tema:

Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, U.N.A.M.

Dra. Yolanda López Vidal
Asesor

cDra. Patricia Orduña Estrada
Supervisor técnico

Viridiana García Ruiz
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química.

A los profesores que me permitieron aprender durante mi formación profesional.

A la Dra. Yolanda López Vidal por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por enseñarme en todos los aspectos, por guiarme y asesorarme durante el desarrollo de este proyecto.

A la cDra. Patricia Orduña Estrada por su asesoría, sus consejos, su paciencia y sus comentarios.

A la Q.F.B. Karen Flores Moreno por su asesoría en el área de proteómica.

Al Dr. Guillermo Mendoza Hernández, Facultad de Medicina, por su valiosa colaboración en la identificación de las proteínas por espectrometría de masas.

A mi comité tutorial: Profa. Ma. Guadalupe Tsuzuki Reyes y al Prof. Luciano Hernández Gómez por sus correcciones y comentarios en mi trabajo de tesis.

El proyecto fue financiado por los proyectos de CONACyT SALUD2007-C01-68729, CONACyT SALUD2010-C01-140998 y DGAPA PAPIIT-IN227611.

DEDICATORIAS

A Dios, por darme fortaleza y paz cuando las necesité.

A mis abuelitos Juana, José y Guadalupe, y a mi tío Rubén. Donde quiera que estén, sé que están orgullosos de mí.

A mis padres:

- *Benito: papi, gracias por todos tus consejos, por tu solidaridad, por tu tiempo, por la educación que me diste, por enseñarme, a ser libre, a dar lo mejor de mí, a aplicar todo lo que he aprendido, tener confianza en mí misma y por hacer hasta lo imposible para que nada nos faltara. Eres el mejor papá del mundo. Te amo.*
- *Virginia: mami, te agradezco de todo corazón todas las lecciones de vida, tus palabras de aliento, tus apapachos, tus risas, tus chistes, tu amabilidad, tu paciencia y la energía que siempre transmites. También te agradezco por educarme para hacer siempre las cosas bien desde que era pequeña y por tener fe en mí. Ser tu hija fue una bendición.*

A mis hermanas:

- *Betty: flaca, te doy gracias por ser mi cómplice, por ser paciente conmigo, por entenderme, por ubicarme, por ayudarme cuando te necesité, por permitirme enseñarte y por salir y divertirme contigo. Sé que no fue fácil, pero mil gracias.*
- *Itzel, princesa, mil gracias por acompañarme a todos los lugares donde se me ocurre estar, por entenderme, por ayudarme cuando sentía que no podía, por ser tan especial y por ser paciente conmigo, tqm.*

Les agradezco el tiempo que pasamos juntas y también por hacerme reír al máximo. ¡Me la paso increíble con ustedes!

A mis primos:

- *Mario y Rubén: Por ser mis amigos, por hacerme reír y por ser casi mis hermanos. Espero siempre estar juntos.*
 - *Los Saltamontes (Adolfo, Natali y David): Por toda la energía que transmiten.*
-
-

A mis tíos, tías, primos, primas, sobrinos y a mi abuelito Mario. Todos y cada uno de ustedes son una parte de mí. Gracias por todas las porras que siempre me echan, gracias por sus palabras, gracias por su compañía, sus risas y su apoyo incondicional. Siempre están en mi mente.

A mis mejores amigos (¿Acaso hay otros?):

Abraham (Por tus pláticas y consejos), Brenda (Por ser incondicional), Evelin (por ser mi cómplice), Gonzalo (por ser como mi hermano y enseñarme a reír), Jorge Lojero (por ser la mejor compañía), Jorge Oscar (por todas las aventuras que hemos vivido), Luz (por estar cuando me haces falta), Oscar Jonathan (Por enseñarme a cumplir mis sueños), Tania (por ser parte de todo lo que he hecho desde hace casi 11 años) y Xanic (por enseñarme a ser una verdadera amiga). Prezer con ustedes, sigue siendo una gran experiencia. Cada uno tiene miles de características que agradezco y por las cuales los admiro. Les agradezco todo el tiempo que han pasado conmigo y todo su apoyo que siempre me han brindado. Todos son un ejemplo a seguir.

A mis compañeros, a Guillermo, José Luis, Karla, Marina, Norma y Paty y a las personas que conocí en el grupo 04.

A la Dra. Yolanda López Vidal, Dra. María Antonia Castillo Rodal y Dr. Gonzalo Castillo Rojas por todos los conocimientos que me transmitieron, por su ayuda y sus consejos.

A mis compañeros de laboratorio: Arturo, Eduardo, Gabby, Guillermo, Lulú, Karen, Katia, Marianela, Maribel, Marisa, Mónica, Paty, Raúl, René, Romy, Stephanie y Ju.

ÍNDICE:

Agradecimientos.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Resumen.....	viii
Abreviaturas.....	ix
Unidades.....	xi
1. Antecedentes.....	1
2. Introducción.....	2
2.1 Tuberculosis.....	2
2.1.1 Tuberculosis	2
2.1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
2.2 Epidemiología de la tuberculosis.....	5
2.2.1 Tuberculosis en el mundo	5
2.2.2 Tuberculosis en México	7
2.3 Vacunación contra la tuberculosis (Bacilo Calmete-Guerin).....	7
2.3.1 Bacilo Calmette-Guerín	7
2.4 Vacunas contra la tuberculosis.....	8
2.4.1 Vacunas de DNA	8
2.4.2 Vacunas recombinantes	10
2.4.3 Vacunas de subunidades proteicas	10
2.5 <i>Mycobacterium microti</i> como vacuna.....	10
2.6 Proteína PstS-1.....	11
2.7 Antígeno 85B.....	11
2.8 Glicosilación.....	12
2.8.1 N-glicosilación	13
2.8.2 O-glicosilación	14
3. Justificación.....	15

4. Objetivo general.....	15
4.1 Objetivos particulares	15
5. Hipótesis.....	16
6. Metodología.....	17
7. Resultados.....	28
8. Discusión.....	44
9. Conclusiones.....	48
10. Anexos.....	49
11. Referencias.....	54

RESUMEN

La vacunación con BCG es la única forma para prevenir la tuberculosis. Sin embargo, la eficacia varía de 0-80%, es por ello que se desea desarrollar nuevas y mejores vacunas, una opción para mejorar la eficacia de la vacunación contra la tuberculosis son las vacunas recombinantes.

En este trabajo se utilizaron tres cepas diferentes *Mycobacterium microti* (*M. microti*), *M. microti* Rv0934 y *M. microti* Rv1886c, de las cuales las últimas dos sobre-expresan las proteínas inmunogénicas; PstS-1 para *M. microti* Rv0934 y el Ag85B para *M. microti* Rv1886c (Para fines de simplificación, a partir de esta línea se hace referencia a *M. microti* Rv0934 como *M. microti*/PstS-1 y a *M. microti* Rv1886c como *M. microti*/Ag85B).

Cada una de las cepas mencionadas, se cultivaron y cosecharon, se extrajeron proteínas de los extractos celulares y se separaron de acuerdo a su masa molecular por electroforesis en una dimensión. Posteriormente, se realizó un Western-Blot en el cual se utilizaron cinco lectinas; *Galanthus nivalis* (GNA), *Sambucus nigra* (SNA), *Maackia amurensis* (MAA), de *Arachis hypogaea* (PNA) y *Datura stramonium* (DSA), que identifican diferente(s) glicano(s) con la finalidad de obtener las proteínas glicosiladas.

Después de esto, las proteínas del extracto celular se marcaron con fluorocromos y se realizaron dos proteomas con las tres cepas en cada proteoma. Uno de los geles se utilizó para realizar un Western-Blot, en el cual se utilizaron las lectinas con las que se obtuvieron resultados positivos de glicosilación de acuerdo al ensayo anterior y se identifican los perfiles de glicosilación para cada cepa. Este blot se trató con una enzima que rompe los enlaces de tipo N- con el cual se podía diferenciar el tipo de glicosilación que presentan las proteínas glicosiladas (N- u O-glicosilación). Otro de los geles se utilizó para obtener las imágenes de los proteomas de cada cepa, al igual que las combinaciones entre cepas. De acuerdo con la información obtenida en los ensayos, se identificaron las proteínas que no fueron expresadas en una o dos de las cepas y las proteínas que presentaron algún tipo de glicosilación para después ser secuenciadas por Espectrofotometría de Masas (MS/MS).

ABREVIATURAS

1D	Primera dimensión
2D	Segunda dimensión
Ag	Antígeno
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
BCG	Bacilo Calmette-Guerín
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
BSA	Albúmina Sérica Bovina
$C_6H_8O_7 \cdot Fe \cdot H_3N$	Citrato férrico de amonio
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1 propanosulfato
CMT	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Cy	Cianina
D.O.	Densidad óptica
DSA	<i>Datura stramonium</i>
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
GNA	<i>Galanthus nivalis</i>
IPG	Gradiente de pH inmóvil
K_2HPO_4	Fosfato monobásico de potasio
<i>M. microti</i>	<i>Mycobacterium microti</i>
<i>M. microti Rv0934</i>	<i>Mycobacterium microti Rv0934</i>
<i>M. microti Rv1886c</i>	<i>Mycobacterium microti Rv1886c</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MAA	<i>Maackia amurensis</i>
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Sulfato de magnesio heptahidratado
$MnCl_2$	Cloruro de manganeso
MM	Marcador de masa molecular
MS/MS	Espectrometría de Masas Tándem
Na_2HPO_4	Fosfato monobásico de sodio

NaCl	Cloruro de sodio
NBT	4-nitro azul tetrazolio cloruro
pH	Potencial de hidrógeno
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
SAA	<i>Sambucus nigra</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
TBS	Solución Amortiguadora de Tris con Tween 20
Tris-base	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

UNIDADES

H ₂ O _d	Agua desionizada estéril
A	Amperes
cm	Centímetros
°C	Grados Centígrados
λ	Longitud de onda
m/m	Masa/masa
m/v	Masa/volumen
μL	Microlitros
rpm	Revoluciones por minuto
U	Unidades
V	Voltios
v/v	Volumen/volumen

1. ANTECEDENTES

La vacuna BCG presenta una alta variabilidad en la eficacia protectora contra la tuberculosis pulmonar en adultos (0-80%). Las vacunas recombinantes son una alternativa para el desarrollo de nuevas vacunas contra la tuberculosis, por lo que en nuestro grupo de trabajo se recombinaron las proteínas Ag85B y PstS-1 de *M. tuberculosis* H37Rv en *M. microti* que es una cepa naturalmente atenuada para el humano.

Durante el análisis de las proteínas recombinadas se encontró que los genes que codifican para la PstS-1 y el Ag85B tienen una identidad de 100% y 99.9% entre *M. tuberculosis* y *M. Microti*, respectivamente. Además, se observó que en *M. microti* la proteína PstS-1 tiene un menor tamaño en el extracto celular en comparación con la encontrada en el filtrado de cultivo. Sin embargo, en las cepas recombinantes se pierde la liberación de ésta proteína al medio de cultivo. Las diferencias encontradas en el tamaño de la proteína y su secreción al medio de cultivo podrían deberse a que estas cepas presentan diferencias en sus procesos de glicosilación. Por tal motivo, se decidió realizar la caracterización de los perfiles de glicosilación de *M. microti* y sus recombinantes.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad conocida desde la antigüedad. Existen evidencias de la presencia de ADN de *M. tuberculosis* en momias de Egipto que datan de 5500 y 3500 a. C. [3]

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que se transmite por vía aérea y es causada por una bacteria llamada *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). La transmisión se da a través de gotas de saliva expulsadas al toser o estornudar por un individuo enfermo. [4]

Las micobacterias ingresan al organismo a través de los pulmones y se diseminan desde su ubicación inicial en los pulmones a otras partes del cuerpo vía torrente sanguíneo, el sistema linfático o por extensión directa a otros órganos. [5]

La tuberculosis pulmonar es la forma más frecuente de esta enfermedad y usualmente constituye más del 80% de los casos. Esta es la forma de tuberculosis más contagiosa. [5]

Por otra parte, la tuberculosis extrapulmonar afecta a los ganglios linfáticos, la columna vertebral, huesos, articulaciones, el tracto genitourinario, el sistema nervioso, el abdomen, es decir, prácticamente cualquier órgano.[6]

De las personas que están infectadas con *M. tuberculosis*, alrededor del 10% desarrolla la enfermedad en alguna etapa de su vida. De hecho, los microorganismos pueden permanecer en estado latente dentro del cuerpo durante un largo periodo de tiempo.[5] [7]

2.1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

El género *Mycobacterium* pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* y al orden *Actinomycetales*. La bacteria *M. tuberculosis* forma parte del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) que comprende especies estrechamente relacionadas y responsables de la tuberculosis en diferentes hospederos.[1]

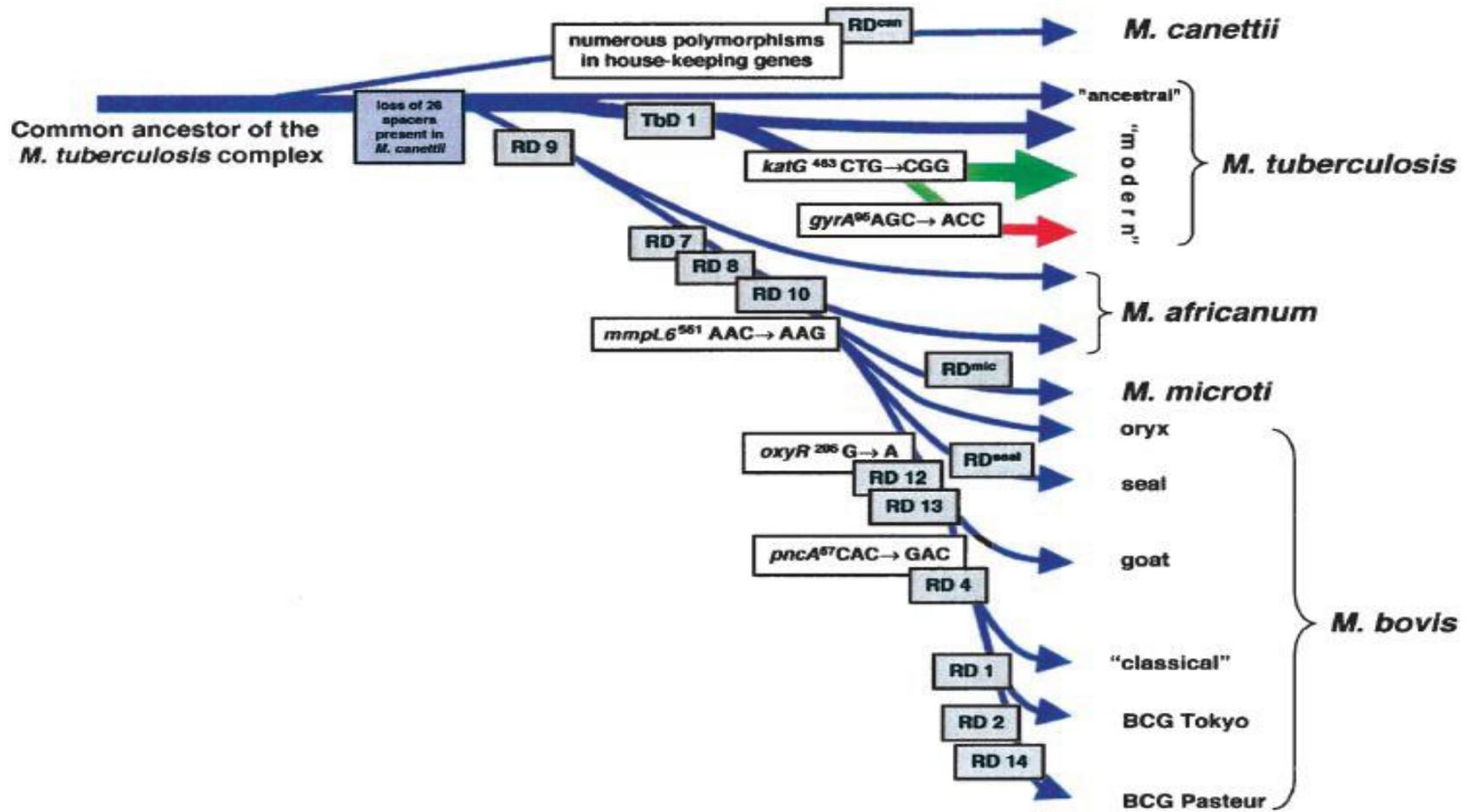


Figura 1. Genealogía propuesta del complejo *M. tuberculosis*, esquema basado en la presencia o ausencia de regiones conservadas y en la presencia de polimorfismos en cinco genes seleccionados. [1]

Las especies que forman al CMT tienen un 99.9% de identidad a nivel de nucleótidos y secuencias idénticas de ARN ribosomal 16S (Figura 1); cada una de éstas especies difiere en su hospedero, fenotipo y patogenicidad. Así, *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. canettii* infectan al humano, *M. bovis* es el agente causal de la tuberculosis bovina, *Mycobacterium microti* [1, 8] causa tuberculosis en voles o ratones de campo, *M. caprae* afecta a cabras y el hospedero de *M. pinnipedii* son los leones marinos y las focas. [9]. Sin embargo, algunas de éstas últimas también han sido encontradas en humanos como *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti* y *M. pinnipedii*. [10] También se considera dentro de éste grupo la cepa de la vacuna BCG (Bacilo de Calmette-Guérin).

Las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* presentan un alto contenido de G+C (61-71%) en su ADN. Son microorganismos aerobios estrictos, inmóviles, pleomórficos (rectos o ligeramente curvos), no capsulados y no forman esporas ni flagelos. Además poseen una pared gruesa con un elevado contenido lipídico que supone el 60% del peso seco de la micobacteria y está constituida por cuatro capas (Figura 2). La más interna es de peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico. Esta capa da rigidez y forma a la bacteria. La segunda posee arabinogalactanos que se encuentran unidos a los ácidos micólicos de la tercera capa. Los cuales son ácidos grasos de cadena larga (60-90 átomos de carbono) con una gran importancia taxonómica. La capa más externa se encuentra constituida por lípidos como el “*factor cordon*” (trehalosa 6, 6'-dimicolato) y por mucósidos. En conjunto, esta composición de la pared le confiere a las micobacterias una escasa permeabilidad celular que es responsable, entre otras cosas, de la ineficacia de múltiples agentes antimicrobianos, así como de la característica de ácido-alcohol resistencia que presentan con algunas tinciones para su visualización microscópica. Además, determinados componentes de la pared, como el lipoarabinomanana, intervienen en la patogenia y favorecen la supervivencia del microorganismo en el interior de los macrófagos. [11] [12] [13]

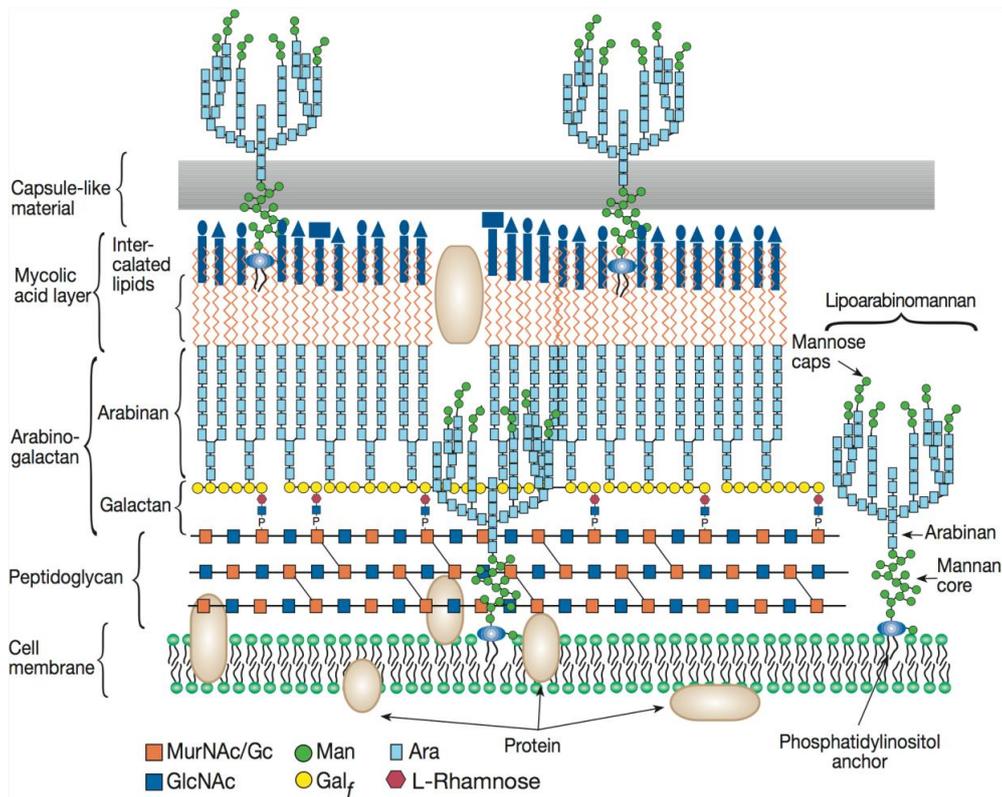


Figura 2. Estructura de la pared celular de las micobacterias. [12]

2.2 Epidemiología de la tuberculosis

2.2.1 Tuberculosis en el mundo

La tuberculosis representa un serio problema de salud a nivel mundial, ya que se estima que más de dos millones de personas (un tercio de la población mundial) están infectadas con el bacilo de la tuberculosis. De estas personas, una de cada 10 contraerá tuberculosis activa en algún momento de su vida. [14]

La tuberculosis afecta principalmente a personas que viven en países con escaso nivel socioeconómico, desnutridas, inmunocomprometidas y la mayor parte de los casos son adultos jóvenes en edad productiva y económicamente activos.

La incidencia de la tuberculosis, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, fue de 9.4 millones de nuevos casos en el 2009. Sin embargo, el número de nuevos casos sigue en aumento por lo reporte obtenidos anualmente. La mayor parte de los casos en el año 2009 se presentaron en Asia (55%) y África (30%). En la figura 3 se aprecia el mapa en el cual la intensidad de color aumenta, representa la mayor

incidencia de esta enfermedad. De los 9.4 millones de nuevos casos al año, se estima que entre 1.0 y 1.2 millones correspondieron a personas VIH-positivos (13.11%). [2]

En cuanto a la mortalidad, es importante señalar que cada 8 segundos muere una persona por tuberculosis en el mundo. En el año 2009 hubo un estimado de 1.3 millones de muertes y de las cuales 0.38 millones fueron mujeres y 0.4 millones fueron VIH-positivos. [14]

En el mundo, la OMS se ha fijado dos metas importantes para el 2015 con respecto a la tuberculosis:

- Detener y comenzar a reducir la incidencia.
- La Alianza propuesta por la OMS “Alto a la tuberculosis” consiste en reducir a la mitad el número de muertes por la tuberculosis.

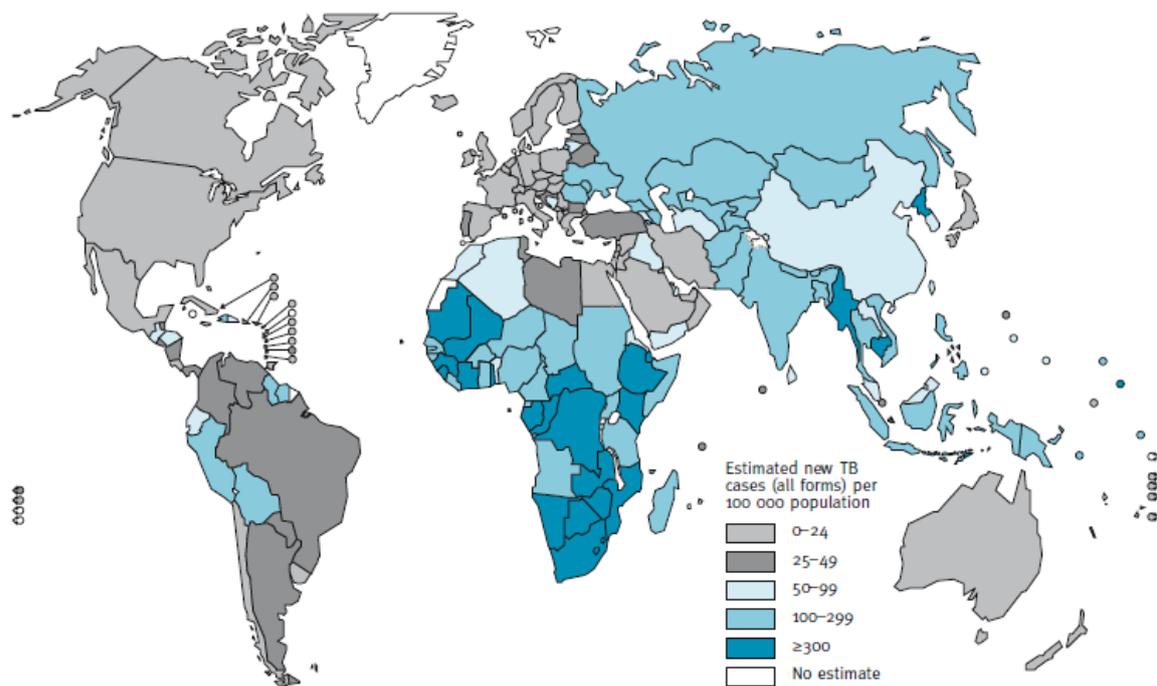


Figura 3. En el mapa se muestra la incidencia de la tuberculosis por país, estimada para el 2009. Casos de tuberculosis por cada 100 000 habitantes. (WHO 2010)

Desde 1995 se han tratado exitosamente 41 millones de personas infectadas con tuberculosis y se han salvado 6 millones de vidas. El “Plan Mundial para Detener la Tuberculosis 2011-2015” propuesto por la OMS podría salvar más de 5 millones de vidas si es que se consigue financiar. [15].

2.2.2 Tuberculosis en México

La incidencia de la tuberculosis en México fue de 18,085 casos nuevos en el 2009, de los cuales el 82.5% correspondieron a tuberculosis pulmonar, el 1.5% a tuberculosis meníngea, el 5.6% a tuberculosis ganglionar y el 10.4% a otras formas. El 23% de los nuevos casos de tuberculosis México, en el 2009, fueron asociados a diabetes mellitus y un 5% a personas infectadas con VIH. [16]

En el 2008, 2,164 personas murieron a causa de la tuberculosis pulmonar. Como podemos apreciar en la figura 4, la incidencia de tuberculosis ha ido disminuyendo en los últimos doce años. [15]

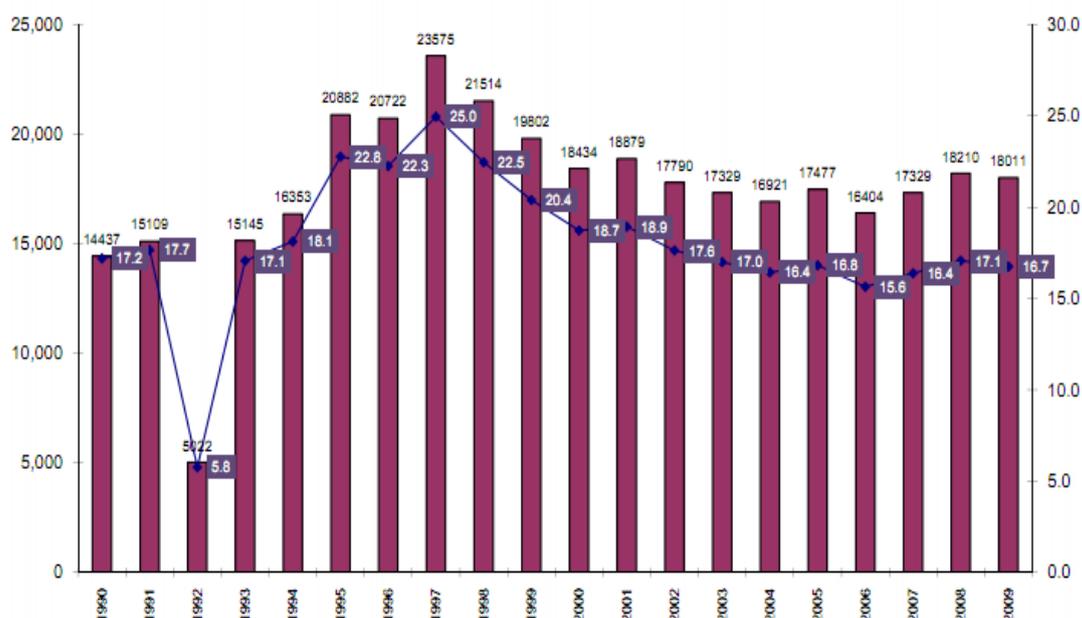


Figura 4. Incidencia de la tuberculosis en México de 1990-2009. En barras se muestran los casos de tuberculosis y en líneas se muestra la morbilidad de la tuberculosis. [16]

2.3 Vacunación contra la tuberculosis

2.3.1 Bacilo Calmette-Guérin (BCG)

La vacuna BCG fue desarrollada por Albert Charles Calmette y Camille Guérin en el Instituto Pasteur, en Lille, Francia a principios del siglo XX. Calmette y Guérin trabajaron durante 13 años con una cepa de *M. bovis* aislada de mastitis bovina realizando 230 cultivos subsecuentes de la cepa en un medio de cultivo de papa glicerizada adicionado con bilis de buey. Lo que llevó a la obtención de una cepa atenuada en comparación con la cepa virulenta de *M. bovis*. [17]

En la primera inoculación reportada (antes de la primera vacunación notificada), se informó que un hombre no identificado recibió 44 000 bacilos por vía intravenosa, resultando "inofensivos". Posteriormente, en 1921 Weil-Hallein realizaron con éxito la vacunación de un niño, lo que llevó a la vacunación de 664 niños en 1924. A partir de éste año muchos lotes semillas fueron distribuidos a nivel mundial para el uso de esta cepa como vacuna.

Hasta el momento sólo se cuenta con la vacuna BCG para la prevención de la tuberculosis, no obstante existen evidencias de que la eficacia protectora conferida contra la tuberculosis pulmonar varía de un 0-80 %. [18]

Entre las explicaciones de la variación observada en la eficacia de la vacuna BCG se encuentran: la variación genética de las cepas BCG, la variación genética poblacional, la interferencia de micobacterias no tuberculosas, la interferencia por infección con parásitos recurrentes y la exposición de la vacuna a la luz UV. [19] [20, 21] [22]

2.4 Vacunas contra la tuberculosis

La variabilidad de la eficacia protectora contra la tuberculosis pulmonar mostrada por la vacuna BCG ha llevado al desarrollo de nuevas vacunas. Hoy en día existen diferentes tipos de vacunas desarrolladas con la finalidad de aumentar la eficacia protectora de la vacuna BCG. Las vacunas con las que se cuenta, se encuentran en diferentes fases del desarrollo desde la preclínica hasta la fase III. Entre las vacunas que se encuentran en desarrollo se encuentran las vacunas recombinantes, de ADN, de subunidades proteicas e incluso de cepas filogenéticamente relacionadas a *M. tuberculosis* (figura 5). [23]

2.4.1 Vacunas de ADN

Las vacunas de ADN utilizan vectores que expresan antígenos con los promotores eucariotes del huésped vacunado y por lo tanto inducir potente respuesta inmunológica, tanto humoral como celular, que comprenden la activación de células T CD4 y T CD8, entre otras subpoblaciones. En este tipo de vacunas se requiere un adyuvante e inmunización intramuscular para inducir una respuesta tipo Th1. [24] [25] [26]

2.4.2 Vacunas recombinantes

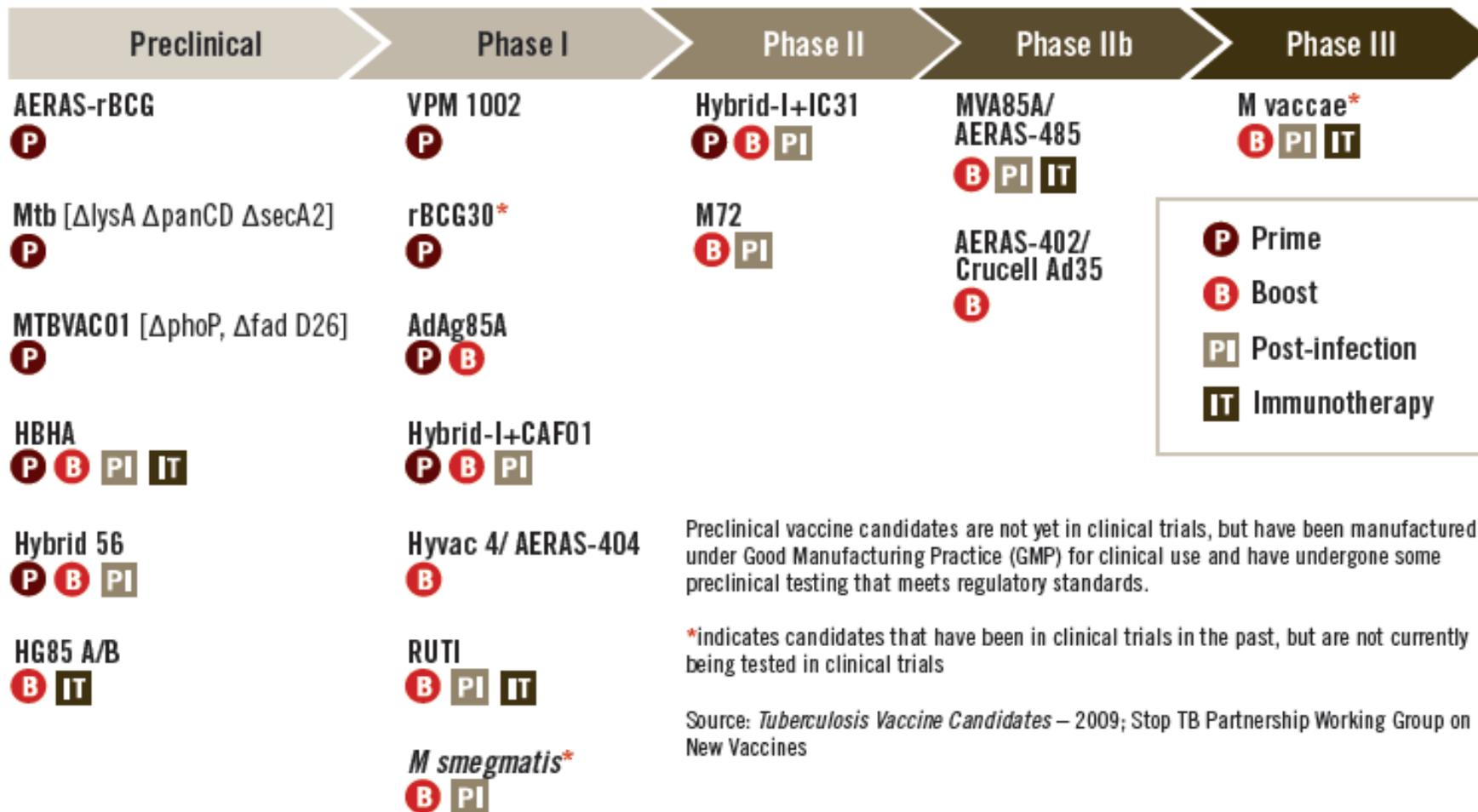


Figura 5. Desarrollo de nuevas vacunas contra la tuberculosis, etapas del desarrollo. [2]

Estas vacunas, por lo general son cepas manipuladas genéticamente que sobre-expresan antígenos de *M. tuberculosis*. Una amplia gama de antígenos se ha utilizado como lo son el Ag85A, Ag85B, PstS-1, entre otros. [27]

2.4.3 Vacunas de subunidades proteicas

Las vacunas de subunidades proteicas se obtienen a partir de proteínas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*. Se requiere de coadyuvantes que activan las células presentadoras de antígeno (CPA) para el desencadenamiento de la inmunidad protectora. Sin embargo, no se sabe que vías de señalización participan en la presentación a CPA y cómo estas vías se unen a la respuesta inmune adaptativa. Además, tienen la desventaja de no inducir inmunidad protectora por un largo periodo de tiempo. [28]

Las vacunas de subunidad proteicas se han desarrollado con las proteínas Ag85B-ESAT-6 y Ag85B TB10.4. Estudios de estas vacunas en modelos animales han revelado su capacidad para generar respuestas inmunes protectoras. Sin embargo, se ha sugerido que la diversidad genética entre cepas de *M tuberculosis* compromete la eficacia de la vacuna. [29]

2.5 *Mycobacterium microti* como vacuna

Debido a que esta especie es naturalmente atenuada para el humano y a su más cercana relación filogenética con *M. tuberculosis* (Figura 1), en Checoslovaquia, en 1951 y 1969 se utilizó ésta cepa como vacuna, donde se administró por vía intradérmica a aproximadamente 500,000 personas, en su mayoría recién nacidos. En este estudio se observó que ésta vacuna confirió una protección de aproximadamente 75% contra la tuberculosis. Para 1954 se reportó un estudio comparativo de *M. microti* y BCG en donde se observó una protección contra la tuberculosis del 75 al 80%. [30], Sin embargo, se decidió no emplearla más como vacuna debido a que presentaba un mayor número de efectos adversos comparada con la BCG. Tales como reacciones cutáneas de mayor induración y alérgicas [31]. Sin embargo, hoy en día se considera que *M. microti* es una buena candidata para el desarrollo de nuevas vacunas contra la tuberculosis e incluso se han evaluado vías de administración alternativas para evitar reacciones secundarias. Por ejemplo, se observó que tanto por vía oral como

intranasal presentó una mayor protección en comparación con la BCG administrada por vía subcutánea. [32]

2.6 PstS-1

Este antígeno es una proteína de 38 kDa que se encuentra codificada por el gen *pstS-1* (Rv0934). En *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG es uno de los principales constituyentes del filtrado de cultivo; también se le conoce como: Ag 78 (detección por contraelectroforesis), proteína de 38 kDa, AgB (detección con anticuerpos monoclonales) o Ag5 (detección por inmunoelectroforesis). [33]. Las micobacterias no tuberculosas no produce esta proteína [32]

La proteína PstS-1 se localiza en la pared celular de la bacteria. Es un receptor primario de un sistema de transporte de fosfato tipo ABC, presenta un 30% de identidad con la proteína PhoS de *Escherichia coli* (*E. coli*) cuya función es el transporte de fosfato. [34]

Hasta el momento se sabe que el sistema *pst* se encuentra organizado en un operón que sugiere estar regulado por fosfato ya que, la expresión del gen *pstS1* se da en ausencia de fosfato en el medio de cultivo. [35] [36, 37] [38]

Este antígeno induce la proliferación de células T CD4+ y genera altos niveles de INF- γ e IgG2a. Además, existe una elevada producción de IL-12 por los macrófagos y la estimulación de CD8+ citotóxicas. [39]

2.7 Antígeno 85B

Este antígeno es el principal componente del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv cuya masa molecular es de 20 kDa. El Ag85B (*Rv1886c*) es una micolil transferasa cuya función es la síntesis de componentes de la pared celular. Se le han asignado diferentes nombres como antígeno 6, MPT59/MPB59 o antígeno 85B. [40] [41]

El Ag85B forma parte del complejo 85. Estas proteínas están codificadas por tres genes independientes *fbpA*, *fbpB* y *fbpC*. Estas proteínas se secretan en una relación de 3:2:1 (30kDa/32A/32B), siendo el antígeno 85B el componente mayoritario en el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*. Esta proteína es producida como una pre-

proteína con un péptido señal de 40 residuos de aminoácidos, lo cual permite su secreción. [42] [43]

2.8 Glicosilación

La glicosilación es la unión covalente de los hidratos de carbono a un polipéptido, lípidos, polinucleótido, hidratos de carbono o compuesto orgánico catalizada por enzimas denominadas glicosiltransferasas [44] [45] [46]

Uno de los aspectos característicos de esta modificación postraduccional es el fenómeno de la microheterogeneidad. Este término indica la gran variedad de estructuras adjuntas que forman los glicanos y el tipo de célula que las presentan. El alcance de esta microheterogeneidad varía considerablemente de sitio de glicosilación a otro, de la glicoproteína y de un tipo de célula a otro. Por lo tanto, una proteína puede existir en numerosas "glicofomas", cada forma con diferentes propiedades. [47] [48]

Existen diferentes tipos de glicosilación: C-, N-, O- y P-glicosilación, las formas más comunes son la N- y la O-. En las bacterias sólo se encontró los tipos N- y O, los cuales son descritos a continuación. [44, 46] [49]

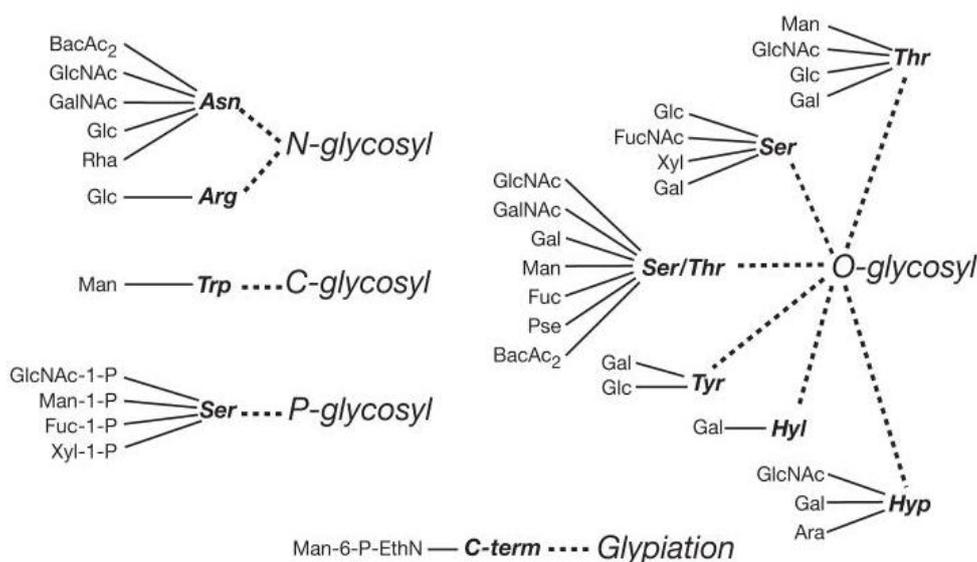


Figura 6. Representación esquemática de los cinco tipos de glicosilaciones encontradas en la naturaleza. arabinosa (Ara); ramnosa (RHA); (FucNAc) N-acetilfucosamina (2-acetamido-2,6-dideoxi-D-galactosa), (Bac) bacilosamina (2,4-diamino-2,4, 6-trideoxi-D-glucosa); (PSE) ácido pseudaminico (ácido 5,7-diacetamido-

3,5,7,9-tetradexoxi-L-glicero-L-mano-nonulosónico); (Hyl) hidroxilisina; (Hyp) hidroxiprolina, (C-*término*) residuo de aminoácido carboxi-terminal. Gliptación es el proceso por el que se añade un glicosilfosfatidilinositol (GPI) de anclaje de una proteína. [50]

2.8.1 N-glicosilación

En la glicosilación de tipo N- el glicano está unido de forma covalente a las proteínas en el residuo de asparagina, mediante un enlace N-glicosídico. Se han reportado cinco diferentes N-glicanos ligados, de los cuales la N-acetilglucosamina es el más común (Asn-GlcNAc β 1). [51] [17]

La N-acetilglucosamina fue descubierta por el análisis bioquímico de las glipoproteínas más abundantes en el suero, como las inmunoglobulinas. Se han llevado a cabo estudios donde se confirma que no todas las asparaginas pueden sufrir el proceso de glicosilación, si no que la glicosilación se da en una secuencia consenso (Asparagina-X-Serina/Treonina) donde X es cualquier aminoácido, excepto la prolina. [46]

2.8.2 O-glicosilación

La O-glicosilación es una modificación común donde un azúcar se une covalentemente a residuos de serina y treonina. Los O-glicanos se unen covalentemente a la N-acetilgalactosamina (GalNAc) en su forma α en el residuo -OH de la serina o treonina mediante un enlace O-glicosídico. [52]

En la glicosilación de tipo O- no existe una secuencia consenso debido a que hay diferentes transferasas involucradas en el proceso de glicosilación. Se sabe que residuos de prolina cercanos a los aminoácidos que sufren glicosilación favorecen las estructuras β y se ha propuesto que la glicosiltransferasa reconoce a las prolinas para llevar a cabo su función de transferencia de glicanos.[44]

3. JUSTIFICACIÓN

La variación que presenta la vacuna BCG en la eficacia protectora contra la tuberculosis pulmonar ha propiciado el desarrollo de nuevas vacunas. Una alternativa son las cepas recombinantes como *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B, las cuales posiblemente presentan diferentes perfiles de glicosilación. La caracterización de estas glicosilaciones resulta de interés debido a que ha sido reportado que están implicadas en la interacción con células del sistema inmune.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil de glicosilación de las proteínas de extracto celular en *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B.

4.1 Objetivos particulares

- Obtener las proteínas de extracto celular de *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B.
- Determinar el perfil de proteínas glicosiladas en *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B en geles de una dimensión.
- Construir y comparar los proteomas de las cepas *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B.
- Identificar en los proteomas las proteínas glicosiladas y el tipo de glicosilación.

5. HIPÓTESIS

La caracterización de los perfiles de glicosilación de las proteínas de *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B mostrará que existen diferencias en el perfil de glicosilación entre éstas cepas.

6. METODOLOGÍA

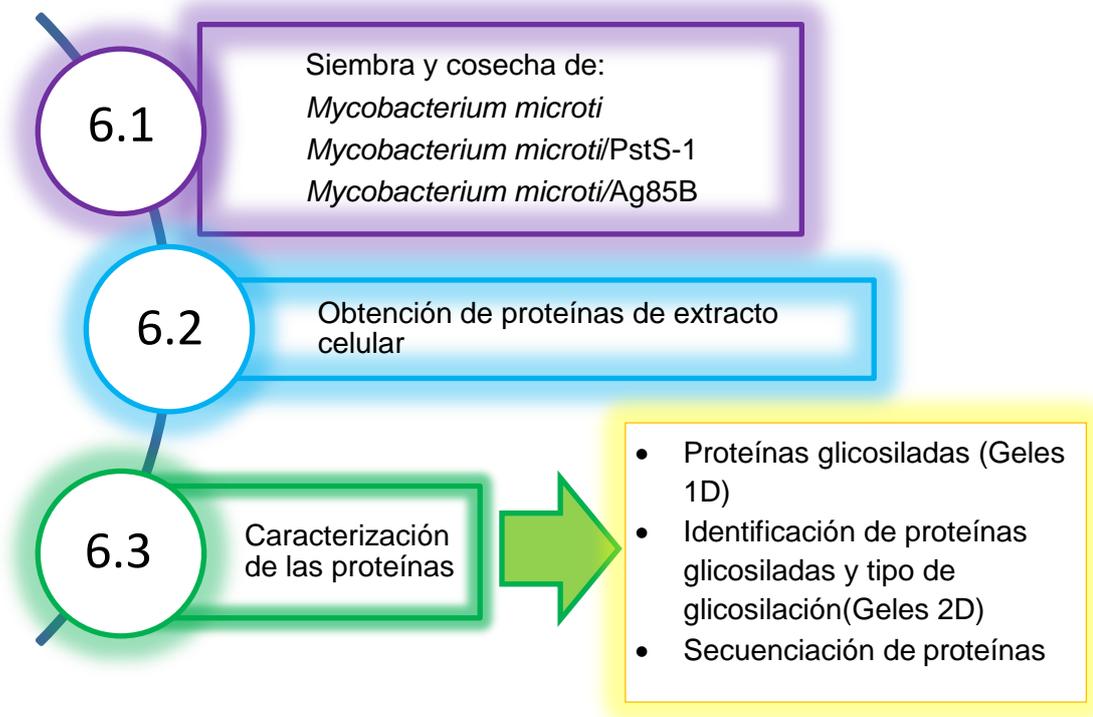


Figura 9. Esquema general de la metodología.

6.1 Siembra y cosecha de *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium microti*/PstS-1 y *Mycobacterium microti*/Ag85B

Las cepas utilizadas durante el desarrollo experimental fueron: *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium microti* Rv0934 y *Mycobacterium microti* Rv1886c. Las últimas dos cepas sobre-expresan las proteínas PstS-1 (Rv0934) y Ag85B (Rv1886c), respectivamente. Para fines de este texto se utilizará la terminología *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B para *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium microti* Rv0934 y *Mycobacterium microti* Rv1886c.

Las cepas de *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B se inocularon en medio BD Middlebrook 7H10 (ver anexos, apartado 9.1) por estría cruzada a 37°C, durante cuatro semanas. Una vez que se tuvieron colonias aisladas se observaron sus características macroscópicas y microscópicas, para éstas últimas se realizó una tinción de Ziehl-Neelsen en caliente (Ver anexos, apartado 9.2). Las tinciones fueron observadas en un microscopio de luz, Leica DMLS™ (Leica Microsystem Wetzlar GmbH, Germany).

Posteriormente, las cepas se cultivaron en medio Sauton modificado con glucosa y piruvato (ver anexos, apartado 9.3) de la siguiente forma: se tomó una asada de las cepas *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B que se obtuvieron del medio Middlebrook 7H10 y se sembraron e incubaron a 37°C y 150 rpm hasta obtener una D.O._{600nm} entre 0.6 y 0.8 de absorbancia. A las cepas de *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B se les agregó kanamicina (30 µg/mL, concentración final) cada 72 horas. Una vez que se alcanzó la D.O. antes mencionada se realizó una tinción de Ziehl-Neelsen y se corroboró que la morfología correspondiera a la descrita en el paso anterior. El cultivo se conservó a 4°C hasta su uso.

6.2 Obtención de las proteínas de extracto celular.

Los medios de cultivo de cada una de las cepas se cosecharon por centrifugación a 4°C, 5,000 rpm por 15 minutos. Posteriormente, el paquete celular bacteriano se obtuvo por decantación.

Para obtener las proteínas del extracto celular, el paquete celular se lavó tres veces por centrifugación con H₂O_d fría a 4°C y 5,000 rpm por 15 minutos en cada lavado. Al paquete celular bacteriano obtenido se le agregó H₂O_d fría para obtener una

suspensión bacteriana de 300 mg/mL. Después, las bacterias se lisaron por sonicación con el equipo Ultrasonic Precursor™ (Cole Parmer Corporation) aplicando 18 pulsos de 100 mV (1 minuto encendido y 1 minuto apagado) a 4°C. Durante la sonicación se le agregó PMSF a una concentración final de 1 mM. Finalmente, el extracto celular bacteriano se obtuvo por centrifugación a temperatura ambiente a 14,000 rpm durante 5 min. Al sobrenadante se le realizó una tinción de Ziehl-Neelsen y de ésta forma se comprobó que se los bacilos fueron lisados.

Para concentrar las proteínas del extracto celular éstas se colocaron en tubos AMICON™ (Ultra-15 Centrifugal Filter Units, MILLIPORE) y se centrifugó a 4°C y 5,000 rpm hasta obtener aproximadamente 1mL. A este concentrado se le agregó azida de sodio y PMSF a una concentración final de 0.05% y 1mM, respectivamente. Posteriormente, se cuantificó la proteína por el método de Bradford y las muestras se etiquetaron y almacenaron a -70°C hasta su uso.

Para la cuantificación de las proteínas por el método de Bradford, se realizó una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA) (Ver anexo, apartado 9.4).

6.3 Identificación de proteínas glicosiladas en el extracto celular de *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B

Como parte de la identificación de las proteínas glicosiladas en las cepas de interés primero se realizaron geles de 1D, en los cuales se determinó si éstas cepas tienen proteínas glicosiladas y que tipo de glicano presentan. Posteriormente, en geles de 2-D se identificaron las proteínas glicosiladas así como si corresponden a una N- u O-glicosilación.

6.3.1 Identificación de glicanos: Geles en 1 dimensión (1D)

6.3.1.1 Geles de acrilamida al 12.5%

Las proteínas del extracto celular de *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B en una solución amortiguadora de carga (Tris-HCl 0.625M pH 6.8, glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0.05% m/v y β -mercaptoetanol 0.05% v/v) en proporción 1:1.

Una vez realizado lo anterior, se colocaron 1 µg de cada una de las muestras, así como del marcador de masa molecular Precision Plus Protein™ (Standars Dual Color; 250-10 kDa. Bio-Rad Laboratories), del control positivo (proteínas específicas mencionadas en la tabla 1) y de la proteína PstS-1 (control negativo) en geles de acrilamida al 12.5% (PhastGel™, Homogeneous 12.5 Amersham Biosciences). La electroforesis se realizó en el equipo PhastSystem® (Amersham Biosciences) con tiras de amortiguador SDS Buffer Strips (0.20 M tricina, 0.20 M Tris-base, 0.55% SDS pH 8.1, Amersham Biosciences) a 400V, 10mA y 15°C durante 15 minutos.

Tabla 1. Controles positivos utilizados con las diferentes lectinas.

Control positivo	Lectina				
	GNA	SNA	MAA	DSA	PNA
Carboxipeptidasa Y	+	-	-	-	-
Transferrina	-	+	-	(+)	-
Fetuina	-	+	+	+	-
Asialofetuina	-	-	-	+	+

+ = Reacción fuerte, (+) = Reacción débil, - = Reacción negativa.

6.3.1.2 Transferencia en membranas de PVDF

Una vez que se realizó la separación por masa molecular de las proteínas, uno de los geles se utilizó para transferir las proteínas a una membrana de PVDF (Hybond-P Membrane™ Amersham Biosciences) y el otro se tiñó con plata. La transferencia se realizó en semiseco en el equipo PhastSystem™ (Amersham Biosciences) con una solución amortiguadora de Towbin (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH8.3) a 400V, 10mA y 15°C durante 30 minutos.

Una vez terminada la transferencia, la membrana se colocó en solución de bloqueo (Blocking Reagent™ Amersham Biosciences) diluida 9:1 en TBS (solución amortiguadora de Tris-base con tween 20 a un pH 7.5) durante toda la noche con agitación constante a 4°C y posteriormente se utilizó el kit DIG Glycan Differentiation™ (Amersham Biosciences) para identificar que glicosilaciones presentan las proteínas de cada una de las cepas analizadas.

6.3.1.3 Diferenciación de glicanos

Para la identificación de glicanos, se utilizó el kit DIG Glycan Differentiation™ (Amersham Biosciences) que tiene las siguientes características: Cada una de las lectinas incluidas en el kit se une específicamente a un glicano. En la tabla 2 se muestran ejemplos del tipo de estructura molecular que identifica cada lectina, en la tabla 3 se ilustran ejemplos de glicanos a los cuales se unen las lectinas.

Tabla 2. Lectinas utilizadas y tipo de glicanos a los que se unen.

Lectina	Glicanos que se identifican	Dilución
<i>Galanthus nivalis</i> (GNA)	Manosa, terminal	1:1000
<i>Sambucus nigra</i> (SNA)	Ácido siálico ligado (2-6) a galactosa o N-acetilgalactosamina	1:1000
<i>Maackia amurensis</i> (MAA)	Ácido siálico ligado (2-3) a galactosa	1:200
<i>Arachis hypogaea</i> (PNA)	Galactosa- β (1-3)-N-acetylgalctosamina	1:100
<i>Datura stamonium</i> (DSA)	Galactosa- β (1-4)-N-acetilglucosamina	1:1000

El kit utilizado funciona de la siguiente forma: Las lectinas, unidas a la anti-digoxigenina AP (Anti-digoxigenina Fosfatasa Alcalina), se unen específicamente a un glicano. Cuando se lleva a cabo la unión de la lectina al glicano específico y posteriormente se le agregan los colorante NBT/BCIP, éstos llevan a cabo una reacción de tipo óxido-reducción (REDOX) con la fosfatasa alcalina. Los colorantes que tienen una coloración amarilla, forman un precipitado que va del gris al negro. En la figura 10 se muestra una representación de cómo se llevó a cabo la identificación de los glicanos con las lectinas. En la tabla 3 se ejemplifica el tipo de glicano que identifica cada lectina de acuerdo a sus características estructurales.

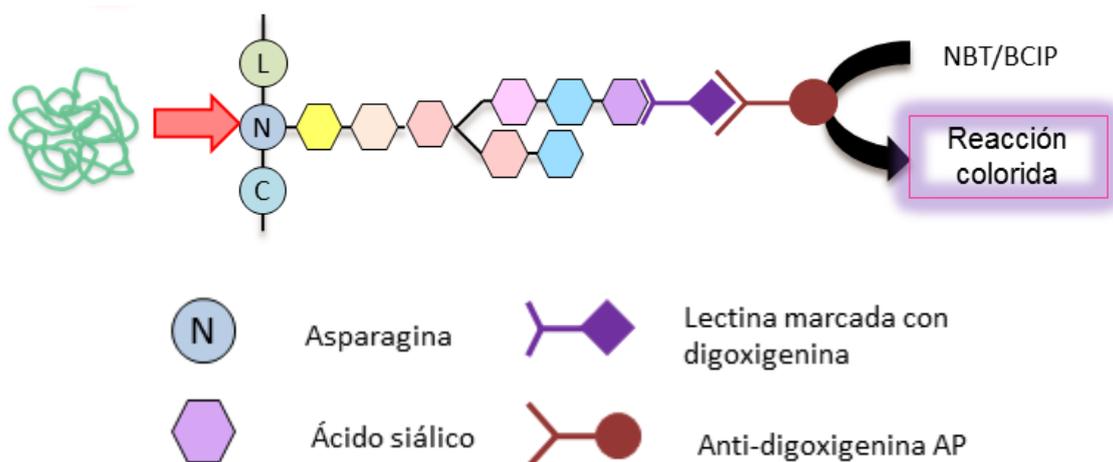


Figura 10. Resumen de cómo se lleva a cabo la identificación de los glicanos con ayuda del KIT DIG Glycan Differentiation™ (Roche-Applied Science).

Una vez que se tuvo la membrana bloqueada, se eliminó el excedente con solución amortiguadora de tris-boratos salino (TBS) de 10 min cada uno y uno más con solución amortiguadora de cloruros (1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1mM CaCl₂, en TBS a pH7.5) a temperatura ambiente. Al término, la membrana se incubó con la lectina de interés a diferentes diluciones (Tabla 2), durante una hora en agitación constante. Para cada lectina, se realizó un ensayo electroforético y de transferencia en las condiciones mencionadas anteriormente.

Una vez que se llevó a cabo la incubación de la membrana con las lectinas, ésta se eliminó la lectina no reactante con TBS en agitación constante y a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de esto, la membrana se incubó con Anti-Digoxigenina-AP™ (Amersham Biosciences) a una dilución 1:1000 (TBS) en agitación constante y a temperatura ambiente. Para detectar la unión de la lectina a las proteínas glicosiladas se utilizaron los colorantes cloruro de 4-nitro azul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (NBT/BCIP) en una dilución 1:50 en solución amortiguadora de Tris-ácido (Tris-HCl 0.1 M, MgCl₂ 0.05M y NaCl 0.1M, pH 9.5). La membrana se incubó con los colorantes sin agitación a temperatura ambiente hasta notar precipitación y un cambio de color de gris a negro. Posterior a la identificación de las lectinas, se tomó la imagen con el densitómetro Molecular Imager GS-800™ (Bio-Rad Laboratories) para su análisis con el programa Quantity One™ (1-D Analysis Software, Bio-Rad Laboratories).

6.3.1.4 Tinción con plata

Los geles utilizados tanto en la separación electroforética como en la transferencia se tiñeron con plata con la siguiente metodología. Al término del corrimiento electroforético, los geles se colocaron en la solución de fijación (metanol 50%, ácido acético 50% más 0.5 mL de formaldehído al 37%) durante 2 horas. Se realizaron 3 lavados con solución de lavado (etanol 50%) durante 20 min por cada uno. Se eliminó la solución de lavado y se agregó la solución de pretratamiento (Tiosulfato de sodio pentahidratado 0.2 g/L), se incubó durante 1 minuto y se lavó 3 veces con H₂O_d por 20 segundos en cada lavado y al final se retiró esta solución. El gel se colocó en solución de plata (nitrato de plata 0.2% y 0.002% de formaldehído) durante 20 min en la oscuridad. Se retiró la solución de plata y el gel con H₂O_d por 20 segundos cada ocasión e inmediatamente se le agregó la solución de revelado (carbonato de sodio 60g/L, formaldehído 37%/L, tiosulfato de sodio pentahidratado 4 mg/L) durante 10 min. En seguida, el gel se trató 2 veces con H₂O_d por 2 min. Los geles se colocaron en solución de inhibición de precipitación de la plata (metanol 50%, ácido acético 12%) por 10 minutos, al término se descartó la solución y los geles fueron colocados en solución de lavado. Por último, los geles se mantuvieron en H₂O_d hasta su deshidratación.

Los resultados se compararon con las imágenes que se tomaron con el densitómetro Molecular Imager GS-800TM (Bio-Rad Laboratories) para su posterior análisis con el programa Quantity OneTM (1-D Analysis Software, Bio-Rad Laboratories).

6.3.2 Identificación de proteínas glicosiladas: geles en 2 dimensiones (2D)

De acuerdo a los resultados obtenidos en la primera dimensión, sólo se realizaron los ensayos de 2D con las lectinas que reconocieron proteínas glicosiladas en las muestras. Se realizaron dos geles en un mismo ensayo de los cuales uno se utilizó para marcarlos con los diferentes fluorocromos y el otro para ser transferido a una membrana de PVDF.

6.3.2.1 Primera dimensión: Isoelectroenfoco

Las proteínas del extracto celular de las diferentes cepas utilizadas se marcaron por separado de la siguiente forma:

Se cuantificó las proteínas del extracto celular por el método de Bradford y se ajustó el pH a 8.5. Se colocaron 50 µg del extracto celular en un tubo Ependorf y 1 µL de la solución de trabajo de cada fluorocromo CyDye™ (DIGE Fluor for 2-D fluorescence difference gel electrophoresis, Amersham Biosciences) en dimetilformamida (DMF) (400 pmol/µL) de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 4. Fluorocromos utilizados para el marcaje de las proteínas de extracto celular.

Cepa	Fluorocromo	Absorción en DMF (nm)	Emisión en DMF (nm)
<i>M. microti</i>	Cy3	553 ± 3	572 ± 5
<i>M. microti/PstS-1</i>	Cy5	641 ± 3	660 ± 5
<i>M. microti/Ag85B</i>	Cy2	492 ± 3	510 ± 5

Posteriormente, las muestras se incubaron a 4°C en la oscuridad durante 30 minutos, la reacción se detuvo con Lisina (10 mM). Al término, las muestras se incubaron durante 10 minutos a 4°C en la oscuridad. Las proteínas marcadas se solubilizaron en 360 µL de solución amortiguadora de rehidratación [Urea 9M, CHAPS 4%, ditiotretol (DTT) 100 mM, anfolinas 0.1%, Bio-Lite™ pH 3-10 (Bio-Rad Laboratories) y azul de bromofenol 0.001%. La mezcla se utilizó para rehidratar dos tiras de gradiente de pH linmóvil (IPG, pH 4-7, 11 cm) durante 16 horas. Después de que las tiras se rehidrataron, se llevó a cabo el isoelectroenfoque bajo las siguientes condiciones: a) 500 V, 1 mA, 5 W a 1 V/h, b) 2500 V, 1 mA, 5 W y c) 2500 V, 1 mA, 5W a 49500 V/h en el equipo Multiphor II Electrophoresis Unit, Flatbed System™ (Amersham Biosciences) durante 8 horas.

6.3.2.2 Segunda dimensión: Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Después de la realización del isoelectroenfoque, cada una de las tiras se colocó en 5 mL de una solución de ditiotretol 70 mM en solución amortiguadora de equilibrio Urea 6 M, glicerol 30% v/v Tris-base 50 mM, dodecil sulfato de sodio (SDS) 2% y azul de bromofenol 0.002%] y posteriormente en 5 mL de una solución de Iodoacetamida (IAA) 193 mM preparada en solución amortiguadora. Posteriormente, las tiras se colocaron sobre geles desnaturizantes de poliacrilamida al 12%, al igual que el marcador de masa molecular Precision Plus Protein™ Dual color de 250-10 kDa

(Bio-Rad Laboratories). La electroforesis se llevó a cabo en una cámara Hoeffer SE 600TM (Pharmacia Biotech) en solución amortiguadora (Glicina 192 mM, Tris-base 25 mM y SDS 0.1% m/v) a 50 V por 30 minutos, 100 V por 2 horas y 200 V por 3 horas. Uno de los geles se utilizó para tomar una imagen con el equipo TyphonTM 9400 (Amersham Biosciences) y realizar el análisis con el programa QuantityOneTM (1-D Analysis Software, Bio-Rad Laboratories).

6.3.2.3 Transferencia en PVDF

Uno de los geles utilizados obtenidos en la segunda dimensión se transfirió a una membrana de PVDF en solución amortiguadora de Towbin (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH8.3) a 100V durante 1 hora en una cámara en semiseco Trans-BlotTM (Bio-Rad Laboratories).

Después de la transferencia, la membrana se colocó en solución de bloqueo (Blocking ReagentTM (Amersham Biosciences), diluida 9:1 en TBS a un pH 7.5, durante toda la noche a 4°C y en agitación. Posteriormente, se utilizó el kit DIG Glycan DifferentiationTM (Amersham Biosciences) para diferenciar el tipo de glicosilación que presentan las proteínas de los extractos celulares.

6.3.2.4 Identificación de proteínas con manosa terminal y ácido siálico ligado (2-3) a galactosa

Una vez que se tuvo la membrana bloqueada se hicieron tres lavados; dos con TBS durante 10 min cada uno y 1 con solución amortiguadora de cloruros (1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂, en TBS a pH7.5) a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se incubó durante una hora a temperatura ambiente y agitación constante con la lectina GNA que reconoce manosa terminal.

Después que se llevó a cabo la incubación de la membrana con la lectina GNA, se lavó 3 veces con TBS en agitación constante a temperatura ambiente, durante 10 minutos. Después de esto, se incubó con la Anti-Digoxigenina-APTM (Amersham Biosciences) en dilución 1:1000 con TBS en agitación constante durante 1 hora. La unión de la lectina a las proteínas glicosiladas, se identificó con NBT/BCIP diluída 1:50 en solución amortiguadora de Tris-ácido (Tris-Hcl 0.1 M, MgCl₂ 0.05 M y NaCl 0.1 M, pH 9.5) sin agitación y a temperatura ambiente hasta observar precipitación y un cambio de color de gris a negro. Posterior a la identificación de las lectinas, se tomó la

imagen con el densitómetro Molecular Imager GS-800™ (Bio-Rad Laboratories) para su posterior análisis con el programa PDQuest™ (2-D Analysis Software Bio-Rad Laboratories).

Con la finalidad de diferenciar si la glicosilación identificada en éste ensayo es de tipo N- u O-glicosilación se realizó lo siguiente: la membrana se incubó con 20 U de N-glycosidasa F (N-Glycosidase F, recombinant™, Roche Applied Science), la enzima se diluyó en 100 mL de solución amortiguadora de incubación, (fosfato monobásico de sodio (NaH₂PO₄) 1 M, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 50 mM, 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1 propanosulfato (CHAPS) 2%, SDS 0.2% y β-mercaptoetanol 1% v/v pH 7.8) toda la noche en agitación constante a 37°C. Después de la incubación, la membrana se eliminó los excesos de reactivos con 2 veces con TBS durante 10 minutos y la imagen se tomó con el densitómetro Molecular Imager GS-800™ (Bio-Rad Laboratories) con el programa PDQuest™ (2-D Analysis Software Bio-Rad Laboratories).

Para la identificación de las proteínas glicosiladas con ácido siálico ligado (2-3) a galactosa se utilizó la misma metodología mencionada en el apartado 5.3.2.4.

6.3.2.5 Tinción con plata

La tinción con plata se realizó de la misma forma que la mencionada anteriormente en el punto 5.3.1.3

6.3.2.6 Identificación y secuenciación de proteínas glicosiladas

Los proteomas se analizaron con el programa PDQuest™ (2-D Analysis Software Bio-Rad Laboratories) con la finalidad de identificar las diferencias en la presencia/ausencia de proteínas entre las tres cepas analizadas, así como las proteínas que presentaron algún tipo de glicosilación.

Después del análisis, las proteínas que resultaron ser únicas en una o dos de las cepas, al igual que las proteínas que presentaron un tipo de glicosilación o ambas características, se secuenciaron por Espectrometría de Masas en Tándem (MS/MS).

7. RESULTADOS

7.1 Obtención de las proteínas de *M. microti*, *M. microti/PstS-1* y *M. microti/Ag85B*

Las cepas *M. microti*, *M. microti/PstS-1* y *M. microti/Ag85B* crecidas durante 4 semanas en el medio Middlebrook 7H10 mostraron colonias circulares, pequeñas de 2-4 mm de diámetro. Después de realizar la tinción de Ziehl Neelsen, se observaron bacilos ácido alcohol resistentes (ver anexos, apartado 9.5).

Las tres cepas cultivadas en medio Sauton modificado se cultivaron durante 8 días hasta una D.O._{600nm} de 0.6 a 0.8. Las morfologías se observaron muy similares y se muestran en la figura 11.

Las D.O. a 600 nm se midieron para cada una de las cepas cada 72 horas en éste ensayo se utilizó como blanco medio Sauton modificado con glucosa y piruvato. En la siguiente tabla se muestran las D.O. de crecimiento de *M. microti*, *M. microti/PstS-1* y *M. microti/Ag85B* cada 72 horas.

Tabla 5. Crecimiento de *M. microti*, *M. microti/PstS-1* y *M. microti/Ag85B*

Cepa	Tiempo de crecimiento (días)	D.O. a 600 nm
<i>M. microti</i>	0	0.01
	2	0.06
	4	0.23
	6	0.55
	8	0.78
<i>M. microti/PstS-1</i>	0	0.01
	2	0.06
	4	0.20
	6	0.54
	8	0.71
<i>M. microti/Ag85B</i>	0	0.01
	2	0.05
	4	0.18
	6	0.56
	8	0.76

Una vez que se obtuvieron absorbancias en el intervalo de 0.6-0.8 a los medios de cultivo, se realizaron preparaciones de *M. microti*, *M. microti/PstS-1* y *M. microti/Ag85B* y se tiñeron con Ziehl-Neelsen (ver anexos apartado 9.2). La morfología

de cada una de las cepas se observó en el microscopio de luz Leica DMLS™ (Leica Microsystem Wetzlar GmbH, Germany) la cual mostró bacilos curvos ácido alcohol resistentes que se muestra en la figura 11.

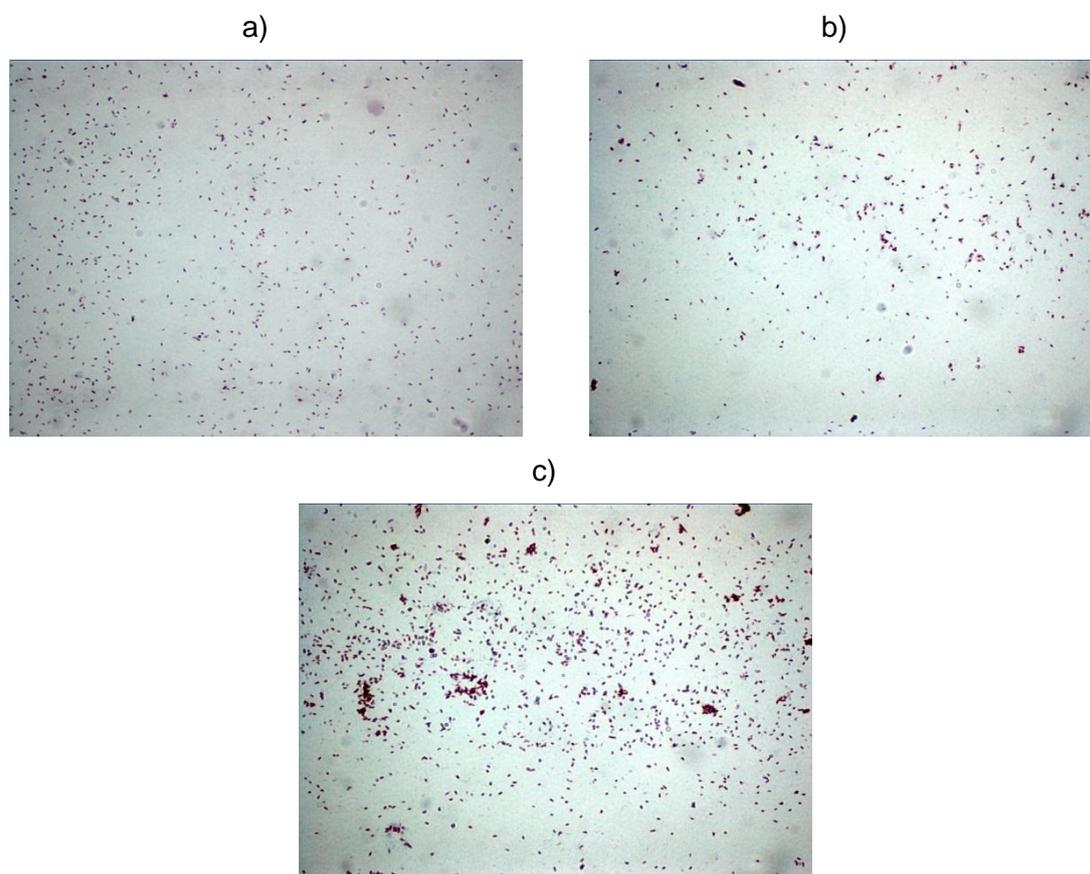


Figura 11. Observación microscópica de a) *M. microti*, b) *M. microti*/PstS-1 y c) *M. microti*/Ag85B de preparaciones teñidas por Ziehl-Neelsen con un aumento de 100x; bacilos ácido alcohol resistentes ligeramente curvos.

Los resultados de la cuantificación de proteínas de extracto celular para cada una de las cepas se muestran en la tabla 6 (Ver anexos, apartado 9.6)

Tabla 6. Concentración de proteínas de *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B

Cepa	Concentración de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
<i>M. microti</i>	1.8
<i>M. microti</i> /PstS-1	2.1
<i>M. microti</i> /Ag85B	2.0

7.2 Identificación de proteínas glicosiladas en *M. microti*, *M. microti/PstS-1* y *M. microti/Ag85B*

Los resultados de la identificación de proteínas glicosiladas se describen a continuación.

7.2.1 Proteínas glicosiladas a partir de geles en 1D

En esta fase se determinó la presencia de cinco tipos de glicanos [manosa terminal, ácido siálico ligado (2-6) a galactosa o N-acetilgalactosamina, ácido siálico ligado (2-3) a galactosa, galactosa- β (1-3)-N-acetilgalactosamina y galactosa- β (1-4)-N-acetilglucosamina] en las proteínas de extracto celular de las muestras analizadas. Únicamente se encontraron resultados positivos con las lectinas GNA y MAA que reconocen manosa terminal y ácido siálico ligado (2-3) a galactosa, respectivamente. Los resultados obtenidos con estas dos lectinas se describen a continuación.

En la figura 12 se muestra la membrana de PVDF incubada con la lectina GNA que reconoce específicamente manosa terminal y cuya glicosilación es de tipo N-. Como se aprecia, los perfiles de glicosilación son muy similares, excepto por una proteína de aproximadamente 44 kDa que se encontró en *M. microti/PstS-1*, pero no en *M. microti* y *M. microti/Ag85B*. No obstante, se logró identificar a más de una proteína ya que comparten la misma masa molecular.

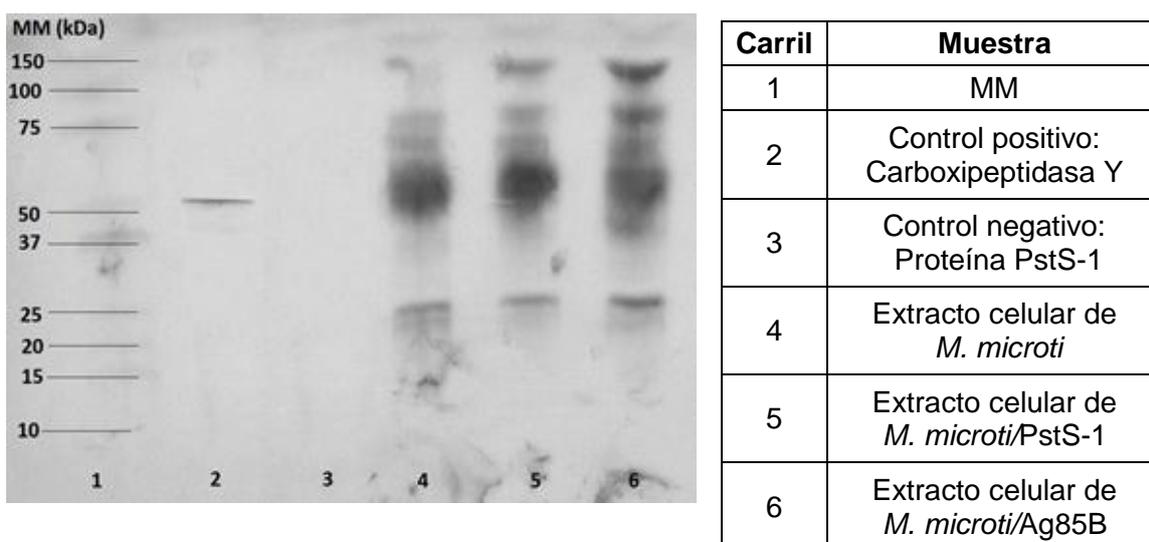


Figura 12. Proteínas del extracto celular de *M. microti*, *M. microti/PstS-1* y *M. microti/Ag85B* con glicosilación manosa terminal de tipo N-.

En la figura 13 se muestra la membrana de PVDF incubada con la lectina MAA que reconoce específicamente ácido siálico ligado (2-3) a galactosa y cuya glicosilación es N- u O-. En la figura 13 se observa una proteína de 55-57 kDa que está presente en las tres cepas; *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B.

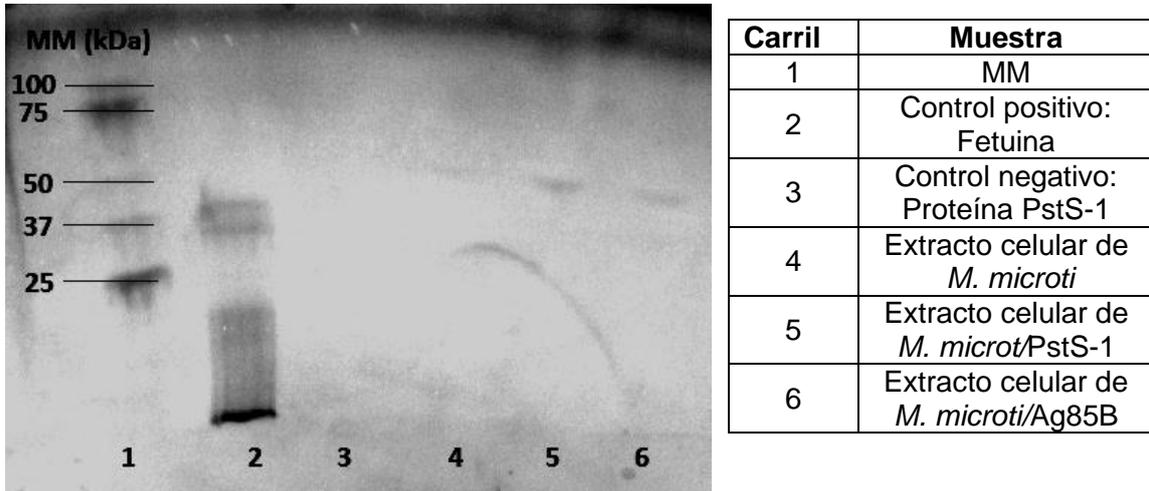


Figura 13. Proteínas del extracto celular de *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B que tienen glicosilación ácido siálico ligado (2-3) a galactosa.

Los resultados se compararon con los geles teñidos con plata que se muestran en los anexos (apartado 9.7). El total de glicosilaciones encontradas en las cepas de *M. microti* analizadas se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Masa molecular de las proteínas de extracto celular glicosiladas en *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B y el tipo de glicanos que se identificó.

Tipo de glicosilación	<i>M. microti</i> (kDa)	<i>M. microti</i> /PstS-1 (kDa)	<i>M. microti</i> /Ag85B (kDa)
Manosa terminal	133	131	124
	80	80	80
	68	68	66
	54	57	55
	-	-	44
	26	26	26
Ácido siálico ligado (2-3) a galactosa	57	55	55

7.2.2 Perfiles de glicosilación de *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B en geles de 2-D

7.2.2.1 Proteomas de *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B

A partir del ensayo en el cual se marcaron con diferentes fluorocromos las proteínas de extracto celular para *M. Microti* (Cy3, verde), *M. microti*/PstS-1 (Cy5, rojo) y *M. microti*/Ag85B (Cy2, azul) se obtuvieron los proteomas para cada cepa. En la figura 14 se señalan los colores que corresponden a las proteínas de extracto celular de *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B de acuerdo a los fluorocromos utilizados, así como, los colores observados en las proteínas compartidas entre las cepas. Así, las proteínas compartidas entre *M. microti* y *M. microti*/PstS-1 se observaron de color anaranjado, *M. microti* y *M. microti*/Ag85B de color azul claro, las proteínas compartidas entre *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B fueron de color lila oscuro, mientras que las proteínas compartidas entre las tres cepas fueron de color lila.

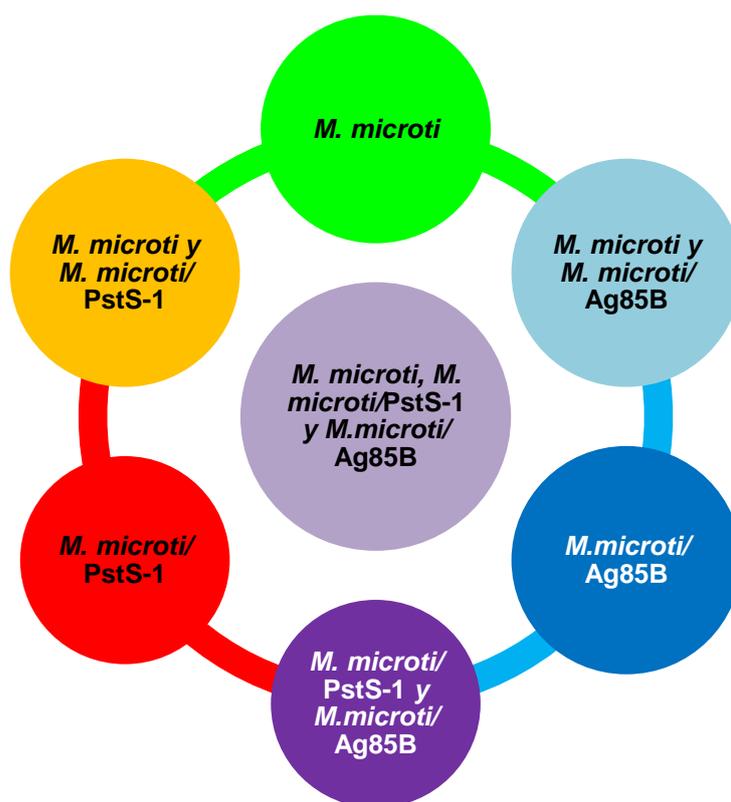


Figura 14. Colores de las proteínas compartidas en *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B para las figuras 15 a la 20.

En las figuras 15 a la 20 se muestran los proteomas de los extractos celulares de *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B donde se aprecian perfiles muy similares entre ellas.

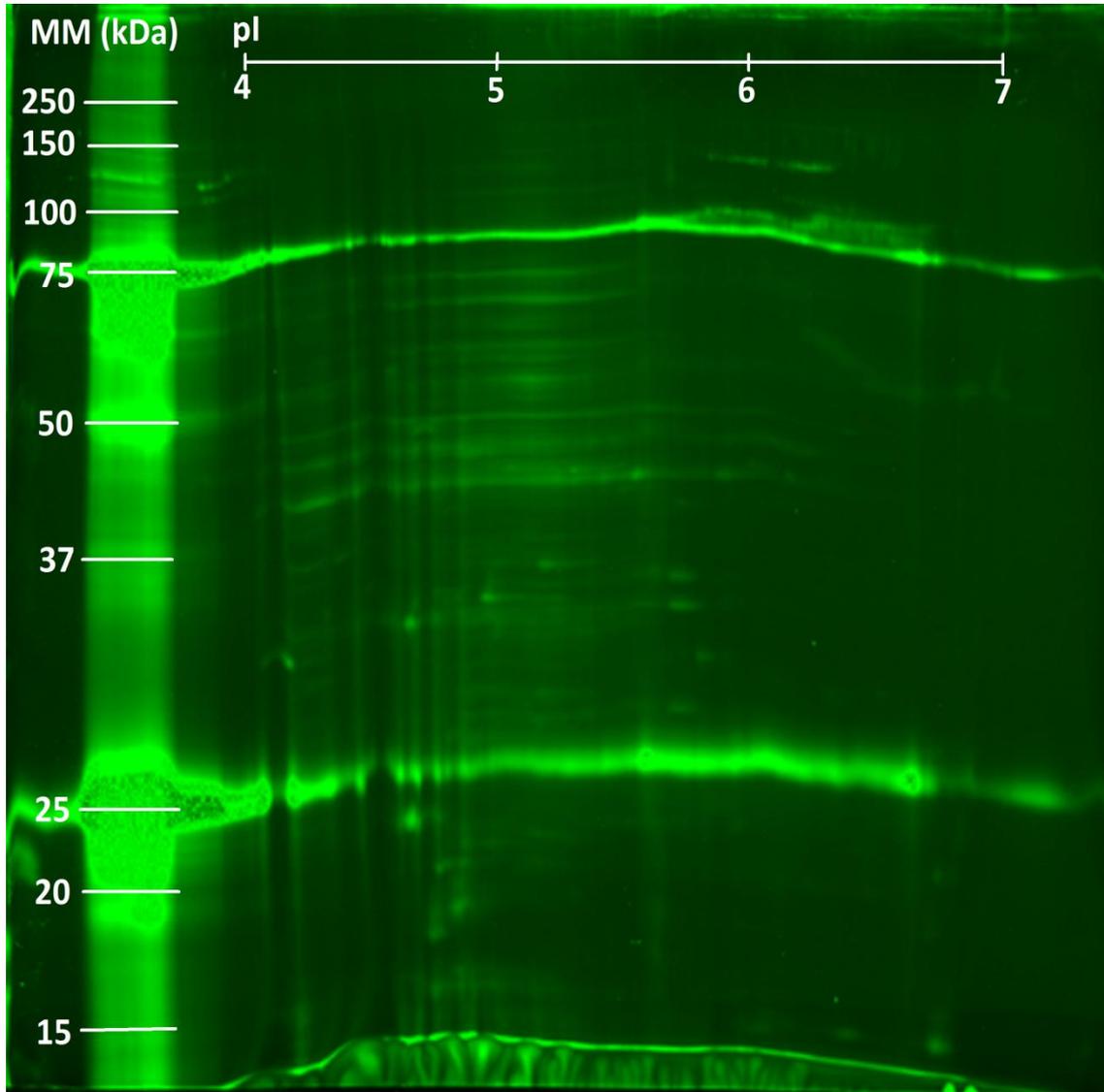


Figura 15. Proteoma del extracto celular de *M. microti* en el cuál las proteínas están marcadas con el fluorocromo Cy3 CyDye™ (DIGE Fluor for 2-D fluorescence difference gel electrophoresis, Amersham Biosciences).

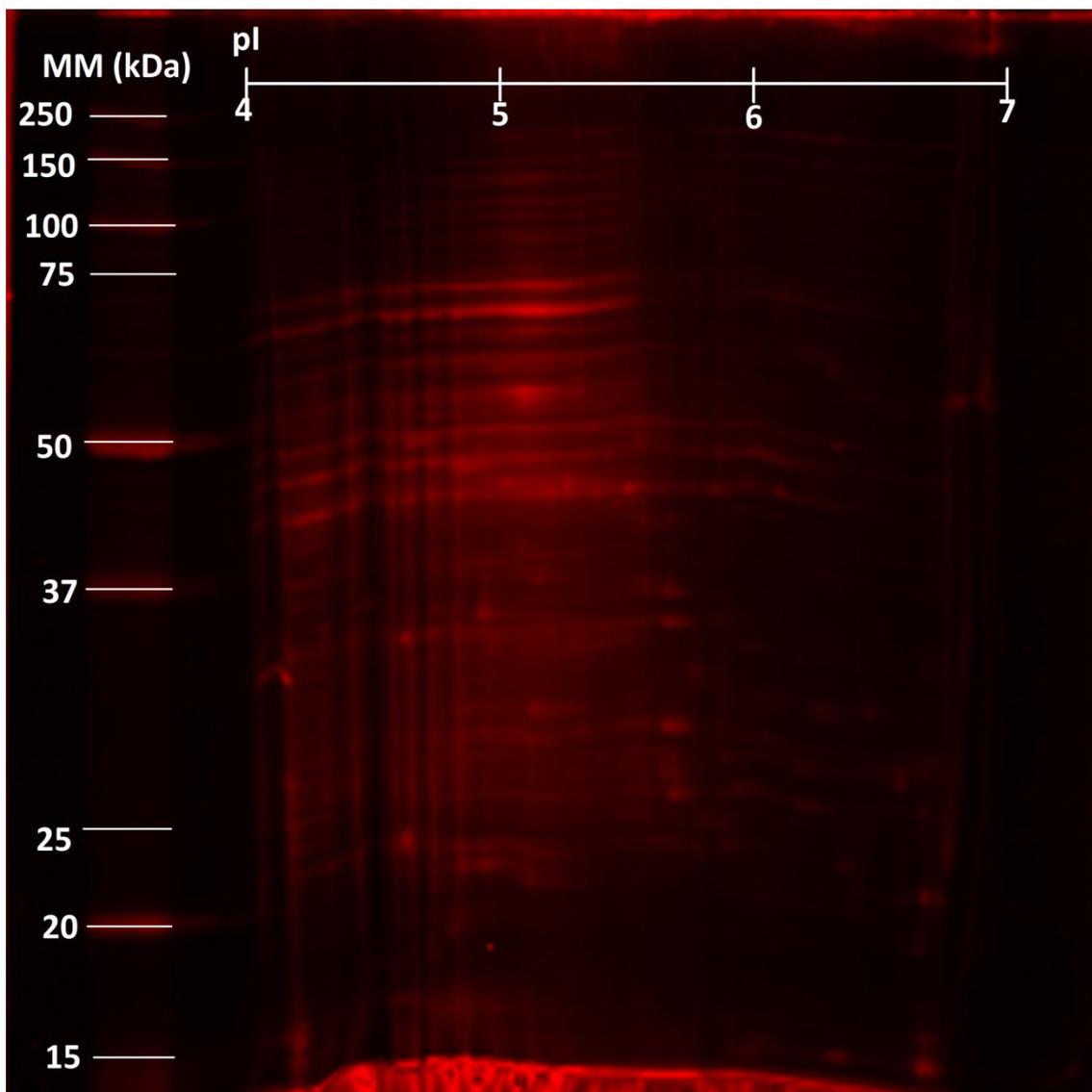


Figura 16. Proteoma del del extracto celular de *M. microti*/PstS-1 en el cuál las proteínas están marcadas con el fluorocromo Cy5 CyDye™ (DIGE Fluor for 2-D fluorescence difference gel electrophoresis, Amersham Biosciences).

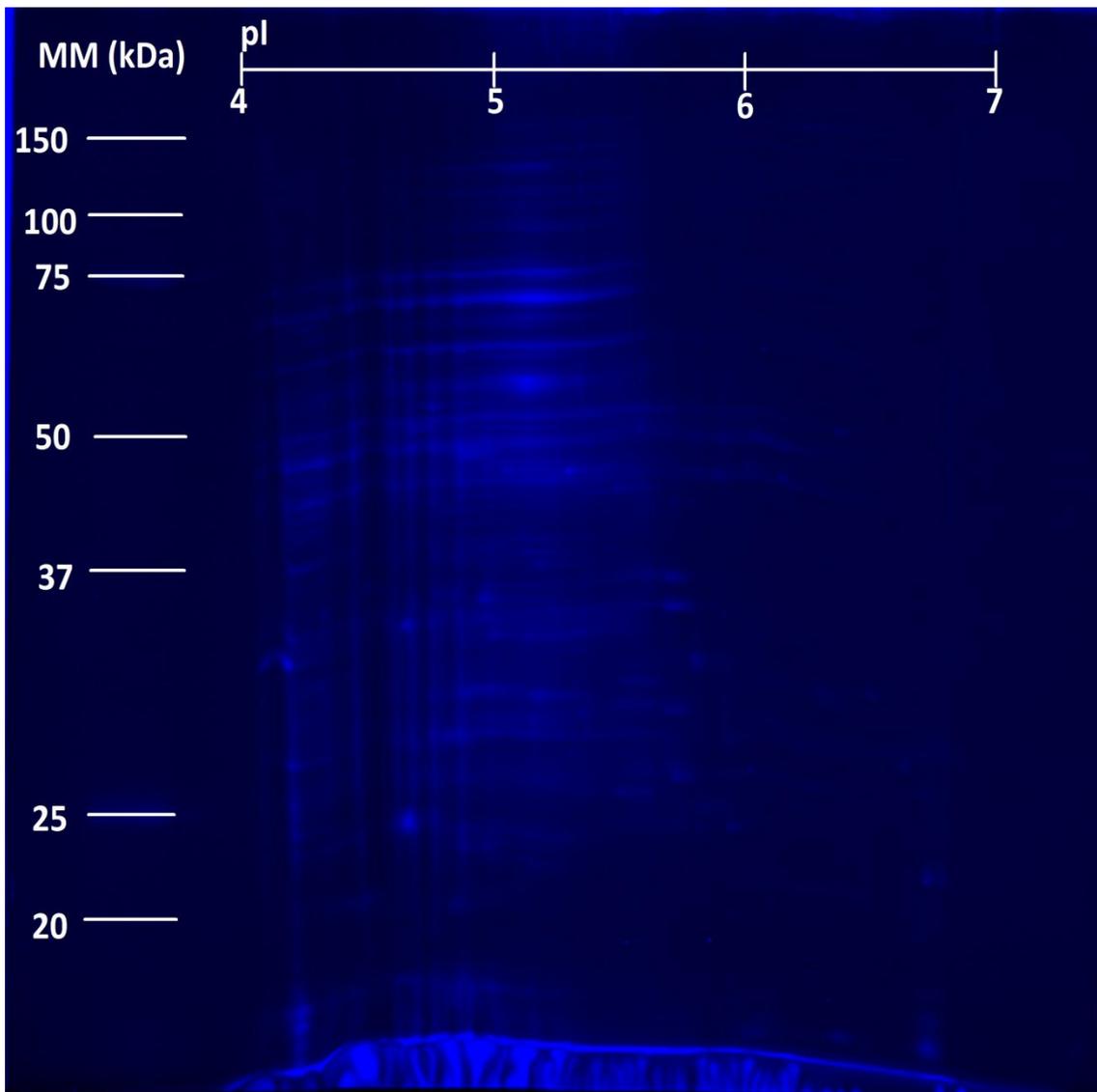


Figura 17. Proteoma del extracto celular de *M. microti*/Ag85B en el cuál las proteínas están marcadas con el fluorocromo Cy2 CyDye™ (DIGE Fluor for 2-D fluorescence difference gel electrophoresis, Amersham Biosciences).

El marcaje de los extractos celulares con fluorocromos nos permitió determinar las proteínas que se comparten entre las cepas. En la figura 18 se muestran la comparación de los proteomas del extracto celular de *M. microti* y *M. microti*/PstS-1, en el cual se encuentran las proteínas únicas de *M. microti* de color verde, de color rojo las de *M. microti*/PstS-1 y las proteínas compartidas se muestran de color amarillo. En la tabla 9 se muestran las proteínas únicas para *M. microti*.

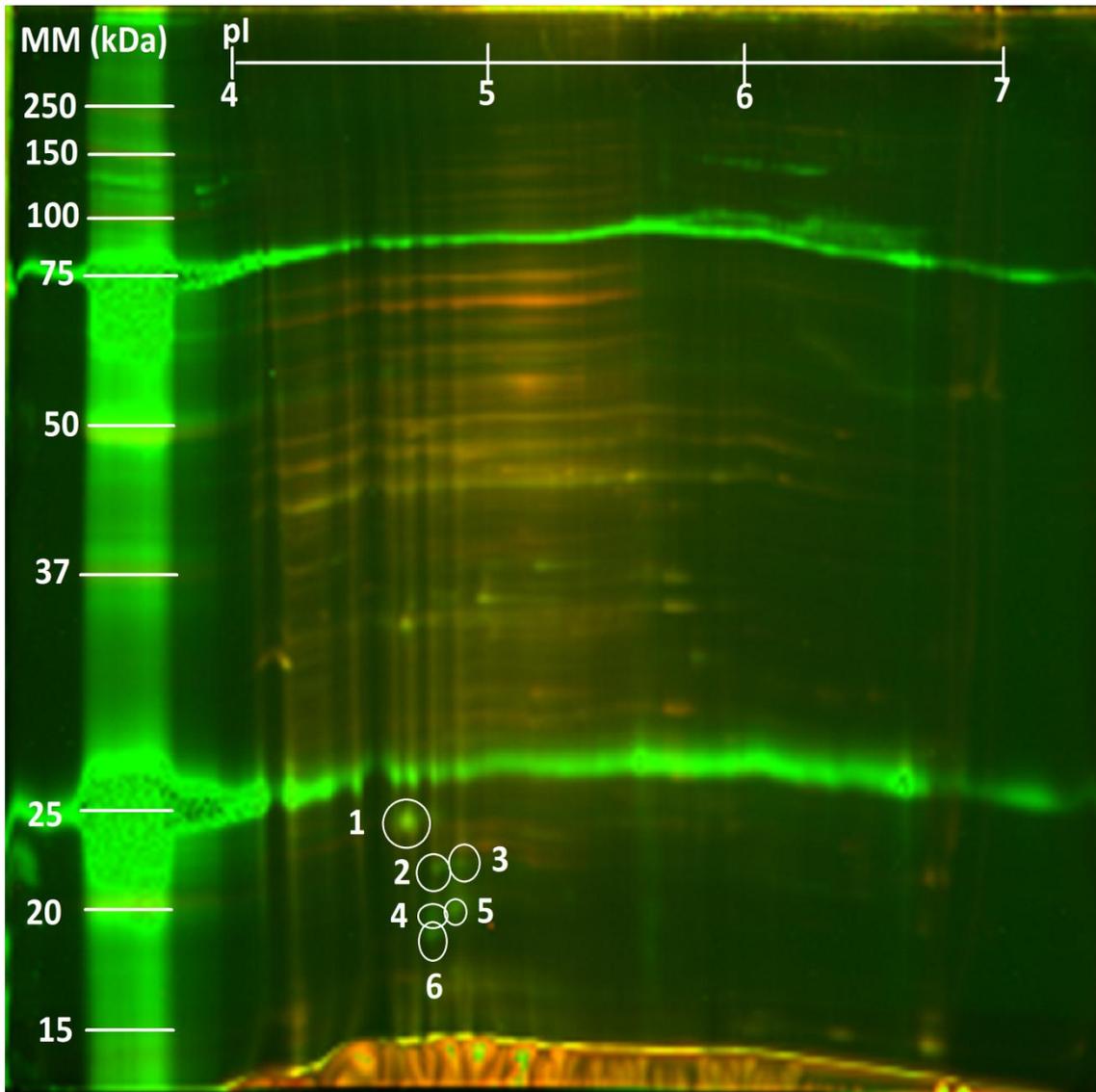


Figura 18. Comparación del proteoma de *M. microti* y *M. microti*/PstS-1. En círculos blancos, se muestran enumeradas las proteínas expresadas solo en *M. microti*.

Tabla 8. Proteínas expresadas solo en *M. microti* (Figura 18).

Número de proteína	Masa molecular (kDa)	pI
1	24.5	4.7
2	22.0	4.8
3	22.5	4.9
4	19.6	4.8
5	20.0	4.9
6	18.8	4.7

En la figura 19 se muestra la comparación de los proteomas del extracto celular de *M. microti* y *M. microti*/Ag85B, en el cual se encuentran las proteínas únicas de *M. microti* de color verde, de color azul las de *M. microti*/Ag85B y las proteínas compartidas se muestran de color azul claro. En la tabla 9 se resumen las proteínas únicas para *M. microti* que son las proteínas 1-7 y 10 mientras que las proteínas expresadas solo en *M. microti*/Ag85B son las 8 y 9.

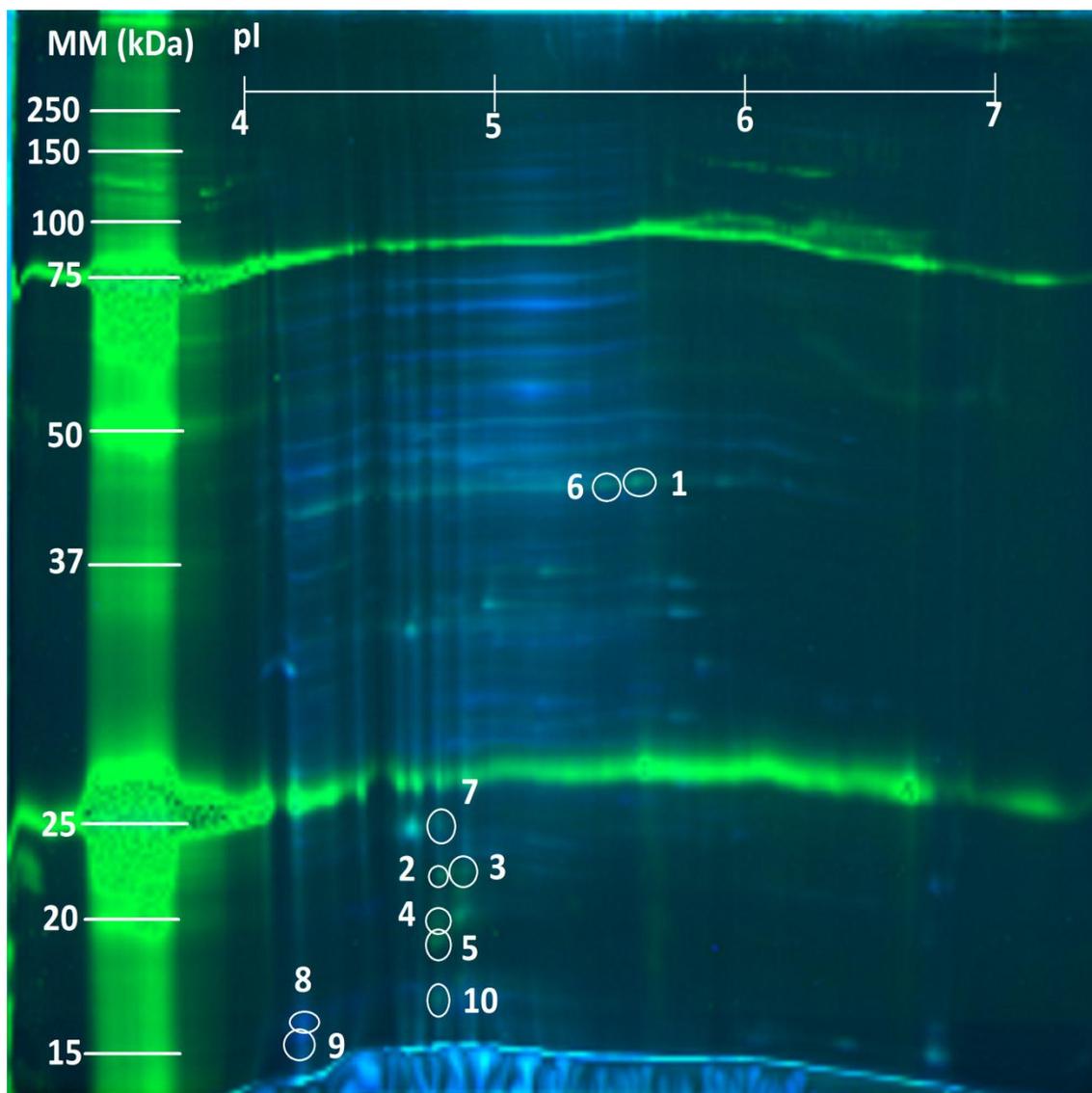


Figura 19. Proteoma del extracto celular de *M. microti* y *M. microti*/Ag85B. Se muestran en círculos blancos las proteínas únicas expresadas en *M. microti* (1-7 y 10) y para *M. microti*/Ag85B (8 y 9).

Tabla 9. Proteínas únicas expresadas en *M. microti* y *M. microti*/Ag85B.

Número de proteína (Fig. 19)	Masa molecular (kDa)	pI
1	46.0	5.6
2	22.0	4.8
3	22.5	4.9
4	19.6	4.8
5	18.8	4.7
6	45.0	5.4
7	19.6	4.8
8	16.5	4.3
9	15.8	4.3
10	17.3	4.8

Mientras que en la figura 20 se muestra la comparación de los proteomas del extracto celular de *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B, en el cual se encuentran las proteínas únicas de *M. microti*/PstS-1 de color rojo, de color azul fuerte las de *M. microti*/Ag85B y las proteínas compartidas se muestran de color lila. En la tabla 10 se resumen las proteínas únicas para *M. microti*/PstS-1 que son las proteínas 2 y 4 y *M. microti*/Ag85B que corresponde a las proteínas 1, 3 y 5.

Tabla 10. Proteínas únicas expresadas en *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B (Figura 20)

Número de proteína	Masa molecular (kDa)	pI
1	54.7	4.8
2	45.7	5.5
3	28.7	4.9
4	30.8	5.7
5	19.6	4.5

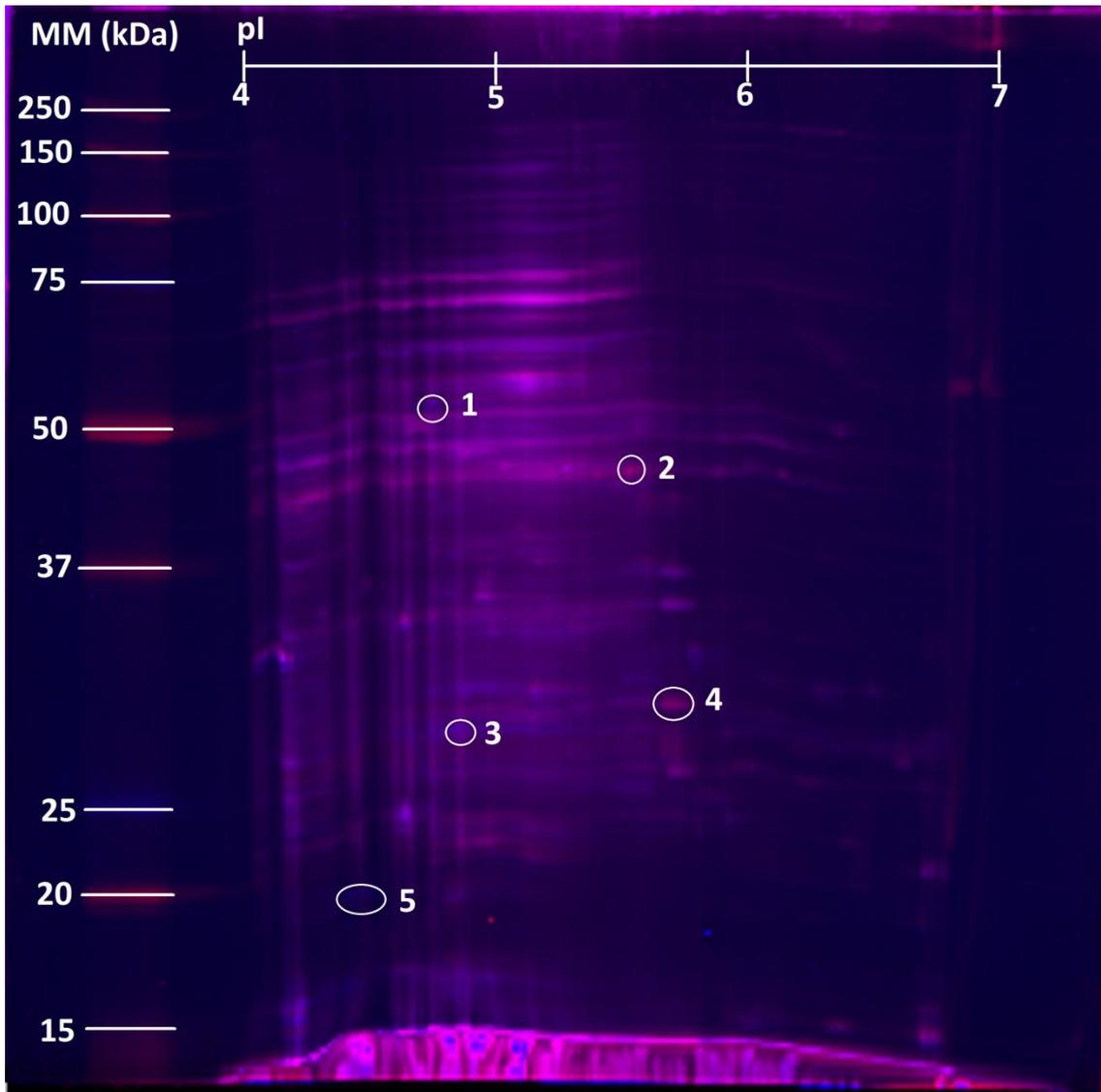


Figura 20. Proteoma de *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B. Se muestran en círculos blancos las proteínas únicas de *M. microti*/1PstS-1 (proteínas 2 y 4) y *M. microti*/Ag85B (proteínas, 3 y 5).

Después de analizar los proteomas por separado, se analizaron las proteínas por presencia/ausencia para se comparó entre las cepas de *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B, en un gel de 2D teñido con plata al 0,02%. Los resultados de éstos análisis se muestran a continuación:

Las proteínas que se lograron secuenciar se resumen en la tabla 11. De lado izquierdo se muestran en número la proteína que corresponde en el proteoma de la figura 21. También se señala con un signo (+) la presencia de la proteína para cada cepa, mientras que el signo (-) indica que las proteínas están ausentes en determinada cepa. Por ejemplo; la proteína AhpD que corresponde a la proteína 3 en el proteoma de la figura 21 se expresa en *M. microti*, *M. microti*/Ag85B pero no en *M. microti*/PstS-1.

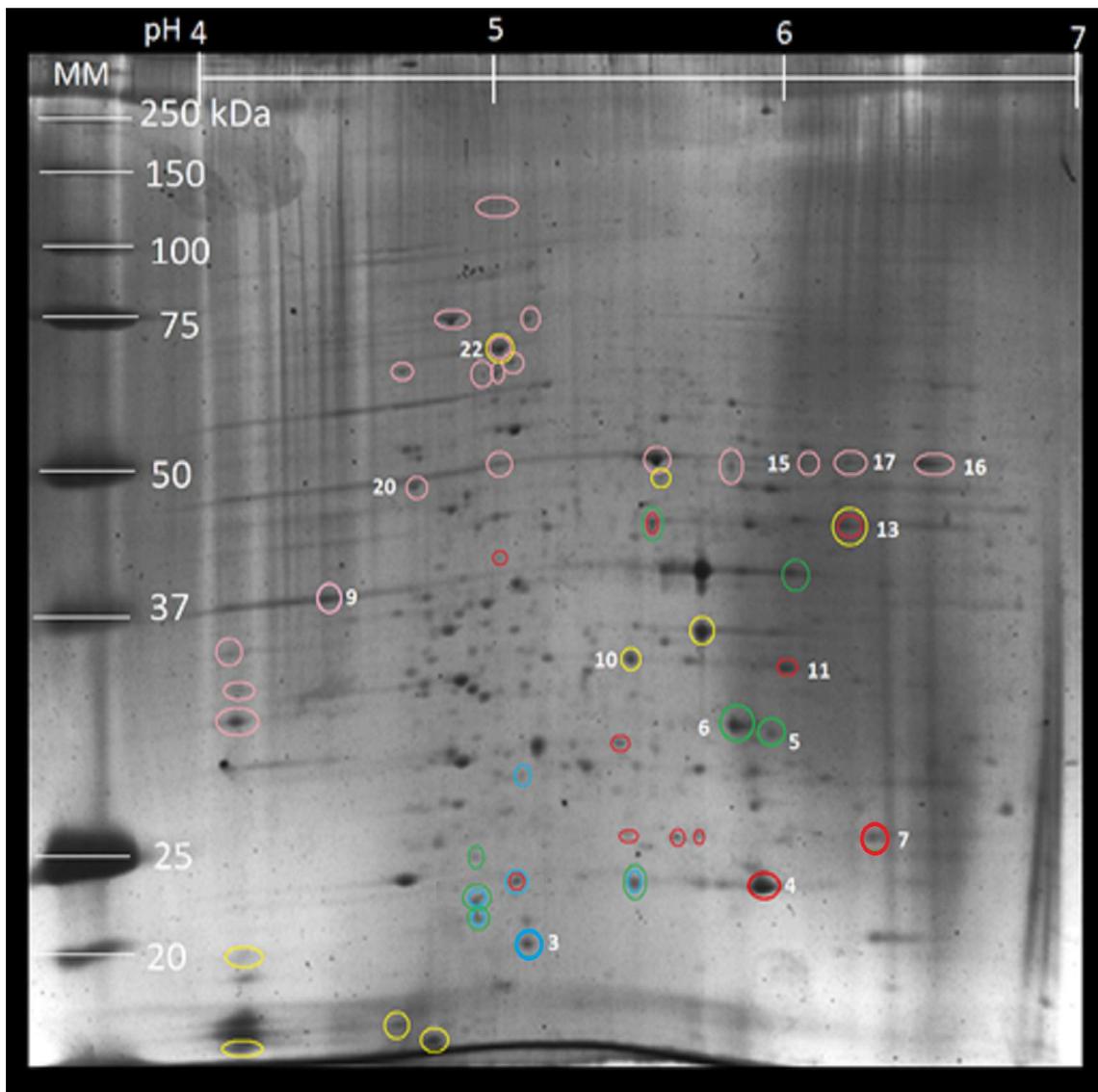


Figura 21. Proteoma de *M. microti*, *M. microti/PstS-1* y *M. microti/Ag85B*. Se muestran las proteínas únicas para *M. microti*, *M. microti/PstS-1* y *M. microti/Ag85B* en círculos de color rojo, azul y verde, respectivamente. También se muestran las proteínas con glicosilación de tipo manosa terminal y ácido siálico ligado (2-3) a galactosa en círculos rosas y amarillos respectivamente. Los números muestran las proteínas que se obtuvieron al secuenciar por MS/MS.

Tabla 11. Diferencias en la expresión de proteínas de las cepas de *M. microti* y sus recombinantes.

Proteína	<i>M. microti</i>	<i>M. microti</i> / PstS-1	<i>M. microti</i> / Ag85B
3. AhpD	+	-	+
4. Superóxido dismutasa (SoD)	-	+	+
5. Proteína hipotética MAP1452c (MAP1452c 5)	+	+	-
6. Enzima multifuncional peroxisomal tipo 2 (FabG)	+	+	-
7. Proteína hipotética MAP3475c (FabG)	-	+	+
11. Dihidropicolinato sintasa (DHDPS)	-	+	+
13. MoxR	-	+	+

7.2.2.2 Proteínas con glicanos manosa terminal y ácido siálico ligado (2-3) a galactosa

De acuerdo al proteoma mostrado en la figura 21 se observan proteínas con glicosilaciones de tipo manosa terminal y ácido siálico ligado (2-3) a galactosa.

La lectina GNA fue útil para identificar glicosilaciones de tipo manosa terminal, sin embargo, no permite identificar si la glicosilación es de tipo N- u O-, por lo que se utilizó la enzima N-glicosidasa F para determinar el tipo de glicosilación que tienen las proteínas de interés.

Table 12. Proteínas glicosiladas en *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B

N-glicosilación	
Manosa terminal	Ácido siálico ligado (2-3)
9. P40 15. MaviaA2_17499 16. 3-cetoacil-(proteína acarriadora de acilos) reductasa 17. Serina hydroxymetiltransferasa 20. Fosfopiruvato hidratasa 21. Proteína hipotética MaviaA2_00119 22. Chaperona GroEL	10. Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa 22. Chaperona GroEL

Se muestran enumeradas las proteínas que corresponden al proteoma (Figura 21)

7.2.3 Secuenciación de proteínas

Aunque existe un gran número de proteínas diferentes entre los proteomas de cada cepa, sólo se secuenciaron un cierto número de proteínas las cuales se muestran a continuación.

Tabla 13. Proteína de *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B identificadas con las lectinas de *Galanthus nivalis* y *Maackia amurensis* por MS/MS

Ausente <i>Mycobacterium microti</i>			
Proteína	Función	MM (Da)	Pi
4. Superóxido dismutasa (SoD)	Cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno	22462	5.74
7. Proteína hipotética MAP3475c (FabG)	Familia de la nitroreductasa	23997	5.97
11. Dihidropicolinato sintasa (DHDPS)	En vía de degradación de lisina	30925	5.63
13. MoxR	Regulador transcripcional	40705	5.89
18. Transaldolasa	Cataliza la reacción sedoheptulosa 7-fosfato y D-gliceraldehido 3-fosfato para producir D-eritrosa 4-fosfato y D-fructosa fosfato en la <u>vía de pentosa fosfato</u>	40456	4.72
19. Fosfoglicerato cinasa	1,3BPG es utilizado para formar ATP y 3-fosfoglicerato (3PG)	42525	4.84
Ausente <i>Mycobacterium microti</i> <i>M. microti</i>/PstS-1 y <i>M. microti</i>/Ag85B			
2. Subunidad proteolítica I proteasa Clp ATP-dependiente	Hidrolasas; actúan sobre los enlaces peptídicos (peptidasas); Serina endopeptidasas	21651	4.78
Ausente <i>Mycobacterium microti</i>/PstS-1			
3. AhpD	Subunidad del sistema alquil hidroperóxido reductasa	18830	4.96
Ausente <i>Mycobacterium microti</i>/PstS-1 y Glicosilación ácido siálico ligado (2-3) a galactosa			
12. Proteína p40	Proteína responsable de la unión a la IL-12R	36437	5.44
Ausente <i>M. microti</i>/Ag85B			
5. Proteína hipotética MAP1452c (MAP1452c 5)	Función desconocida	32383	5.48
6. Enzima multifuncional peroxisomal tipo 2 (FabG)	(S)-3-hidroxiacil-CoA + NAD ⁺ → 3-oxoacil-CoA + NADH + H ⁺	29887	5.55
Glicosilación manosa terminal			
9. Proteína p40	Proteína involucrada en la respuesta del sistema inmune	36240	5.44

15. Proteína hipotética MaviaA2_17499	Función desconocida	43581	5.62
16. 3-cetoacil reductasa	Proteína acarreadora del grupo acilo	47198	5.95
17. Serina hidroximetiltransferasa	Cataliza la reacción de glicina en L-serina	44927	5.75
20. Fosfopiruvato hidratasa	Cataliza la reacción: 2-fosfo-D-glicerato ↔ fosfoenolpiruvato + H ₂ O	44846	4.52
21. Proteína hipotética MaviaA2_00119	Familia DUF3662 Función desconocida	30827	4.98
22. Chaperona GroEL	Chaperona; Ayuda al plegamiento de las proteínas	56580	4.84
Glicosilación ácido siálico ligado (2-3) a galactosa			
10. Fructosa-1,6- bifosfato aldolasa	D-fructose 1,6- biphosphate ↔ glicerol fosfato + D-gliceraldehido 3-fosfato	33624	5.31
22. Chaperona GroEL	Chaperona; Ayuda al plegamiento de las proteínas	56580	4.84

7. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos, los perfiles de glicosilación, al igual que los perfiles electroforéticos mostraron diferencias en la expresión de sus proteínas. En los geles de una dimensión se obtuvo una proteína con glicanos manosa terminal de aproximadamente 44 kDa que no se mostró en la cepa *M. microti* y *M. microti/PstS-1*. Sin embargo el tipo de metodología que se utilizó nos permitió apreciar las bandas con una definición limitada. Si se busca la proteína de 44 kDa en el proteoma de la figura 21 resultó difícil la identificación de la proteína con glicosilación de tipo manosa en esa masa molecular. Esto se debe a que el gel es muy pequeño y a que en los geles de 1D las bandas que se muestran en una masa molecular contendrán de forma usual más de una proteína pero con diferente punto isoeléctrico. Aunque se utilizó el software Quantity One™ (1-D Analysis Software, Bio-Rad Laboratories), la resolución de las proteínas es más confiable en el proteoma puesto que se separan las proteínas de acuerdo a su masa molecular y su punto isoeléctrico. Esta proteína no fue secuenciada ya que se requería comprobar con otro método más confiable que existían diferencias en las glicosilaciones entre *M. microti* y sus recombinantes. [53]

En los resultados de los geles de dos dimensiones se aprecia que existen diferencias en el perfil de las proteínas de una cepa con respecto a alguna otra. En las comparaciones entre dos cepas por ejemplo *M. microti* y *M. microti/PstS-1* se muestran seis diferentes proteínas con masas moleculares desde 18 a 24.5 kDa y punto isoeléctrico de 4.7 a 4.9 que solo se expresan en *M. microti* pero no en la cepa *PstS-1*. Mientras que en la comparación de las cepas *M. microti* y *M. microti/Ag85B* se muestran en la figura 19 la proteína de la 1 a la 7 y la 10 sólo expresadas en *M. microti* y de las proteínas 8 y 9 que sólo se encuentran expresadas en *M. microti/Ag85B*. En cambio en la figura 24 se muestran las proteínas 2 y 4 expresadas sólo en *M. microti/PstS-1* en comparación con las proteínas 1,3 y 5 que sólo se expresan en *M. microti/Ag85B*.

Si comparamos las tres cepas; *M. microti*, *M. microti/PstS-1* y *M. microti/Ag85B*, en la figura 21 se encontraron 9 proteínas expresadas sólo en *M. microti*, de las cuales sólo se secuenciaron, la 4, 7, 11 y la 13 que corresponden a la superóxido dismutasa, La proteínas hipotética MAP3475c, dihidropicolinato sintasa y MoxR respectivamente. De estas proteínas, la proteína 13 tiene glicosilación ácido siálico ligado (2-3) a galactosa. No se encontró información en la literatura acerca de qué tipo de glicanos tienen las proteínas mencionadas en éste trabajo.

En la figura 21, se encontró una proteína que se pudo secuenciar que sólo se expresa en *M. microti*/PstS-1 y que corresponde a AhpD que es una subunidad del sistema de enzimas alquil hidroperóxido reductasa.

Dos proteínas (las marcadas en verde en la figura 21); la proteína hipotética MAP1452c y la enzima multifuncional peroxisomal fueron secuenciadas. Estas proteínas sólo se expresan en *M. microti*/Ag85B.

Como se aprecia a lo largo de los resultados, se observan diferencias en la presencia/ausencia de las proteínas. La proteómica es útil para comparar los cambios en presencia/ausencia de un gran número de proteínas bajo diferentes condiciones genéticas y ambientales. A diferencia de la transcriptómica, que se centra en la expresión genética, la proteómica analiza los niveles de proteínas y sus cambios en respuesta a los diferentes genotipos y condiciones. Los estudios en proteomas en condiciones bien definidas proporcionan una mejor comprensión de los procesos biológicos complejos y permite la inferencia de las funciones de proteínas desconocidas. Por encima de todo, la proteómica proporciona información acerca de las modificaciones postraduccionales que no se obtiene a partir de perfiles de expresión de ARNm, estos enfoques han demostrado ser fundamentales para nuestra comprensión de la función fisiológica, el desplazamiento, y la localización subcelular de las proteínas. [54]

Estudios en los que la modificación de cepas al ser recombinadas, modifica los perfiles proteicos de proteínas se han realizado. Como es el ejemplo de *E. coli* y su recombinante en la cual se sobreexpresaron proteínas por inducción de IPTG causando la expresión diferencial significativa de numerosas proteínas celulares; la mayoría de estas proteínas disminuyeron su regulación, incluyendo enzimas conectado a la vía pentosa fosfato y la enzima LuxS, esta última que podría conducir a una inhibición de la síntesis de ARNt. Cuando la cepa que contiene el plásmido se comparó con la cepa silvestre se encontró que la gluconeogénesis ocurrió por una vía diferente en comparación con la cepa silvestre. En este mismo estudio también se encontró una sobrerregulación en las chaperonas ClpB, HslU y GroEL al igual que en las proteínas de choque térmico (IbpA y IbpB) en cepas que sobreexpresan GST-GICNAc 2-epimerasa-5D pero no en cepas que expresan GST-Neu5Ac aldolase-5R de *E. coli*. [55]

En éste trabajo sólo se utilizaron lectinas para identificar los siguientes glicanos: manosa terminal, ácido siálico ligado (2-6) a galactosa o N-acetil

galactosamina, ácido siálico ligado (2-3) a galactosa, galactosa- β (1-3)-N-acetilgalactosamina y galactosa- β (1-4)-N-acetilglucosamina. Aunque se conoce que existe una amplia variedad de moléculas que están glicosiladas, hay una gran variedad de glicanos que presentan éstas glicosilaciones. Por lo que, los resultados de este trabajo son por demás muy interesantes.

Los perfiles proteicos muestran que existen dos tipos de glicosilación en las cepas en estudio. En la figura 21 se aprecian proteínas circuladas de color rosa que son proteínas glicosiladas con manosa terminal (Proteínas 9, 15, 16, 17, 20, 21, y 22). Estas proteínas corresponden a p40, MaviaA2_17499, 3-cetoacil-(proteína acarreadora de acilos) reductasa, Hidroximetiltransferasa serina, Fosfopiruvato hidratasa, Proteína hipotética MaaviaA2_00119 y la chaperona GroEL, lo cual concuerda perfectamente con la referencia [55].

También la secuencia de las proteínas 10 y 22 se obtuvieron con glicanos ácido siálico ligado (2-3) a galactosa enmarcadas con color amarillo y que corresponden a las proteínas Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa y chaperona GroEL respectivamente. De tal forma que la proteína GroEL tiene los dos tipos de glicanos identificados en estos ensayos.

Una amplia gama de glicanos difundidos en la naturaleza se han encontrado: han sido reportados 13 diversos monosacáridos y 8 tipos de aminoácidos que participan en los enlaces de glicosilación proteica y al menos 31 combinaciones de aminoácido-monosacárido [56]. La N-glicosilación es la más abundante en la naturaleza al igual que el enlace β -glicosilamina con glicanos N-acetilglucosamina en el aminoácido asparagina. Lo cual es coherente con los resultados que se obtuvieron en la tabla 14 donde fueron secuenciadas las 10 proteínas con glicosilación de tipo N-.

Los procesos de glicosilación han sido de interés debido a las siguientes razones: están involucradas en el reconocimiento, evasión del sistema inmune y porque son posibles blancos para la síntesis de nuevos fármacos. Por ejemplo, el sistema inmune posee receptores tipo Toll (TLR) cuyo reconocimiento se basa en patrones moleculares extraños al organismo como proteínas glicosiladas [47, 57]

En un estudio realizado con *M. avium* los autores encontraron que se requiere de acetilaciones específicas para que se dé la señalización a través de TLR2. Es decir, que además de alterar los patrones de glicosilación, las micobacterias también son capaces de alterar la acilación de glicolípidos. Por ejemplo, las micobacterias

modifican la estructura de lipomananas, las cuales se produce en una variedad de formas "acilo" las formas, que van desde monoacilados hasta tetra-acilados. Las lipomananas con tres o cuatro cadenas de acilo se ha demostrado que estimulan TLR2 para producir TNF- α de los macrófagos murinos y humanos, mientras que las formas monoaciladas y diaciladas no inducen la producción de citoquinas. En conjunto, estos estudios concluyen cómo las estructuras de patrones moleculares varían en los patógenos y hacen hincapié en la importancia de los estados de glicosilación y acilación de muchos de los ligandos [47, 58]. También se ha encontrado que el tipo de acilación estimula de manera diferente los receptores tipo Toll-2 en cada cepa [48].

8. CONCLUSIONES

- Las proteínas de extracto celular de *M. microti*, *M. microti/PstS-1* y *M. microti/Ag85B* fueron obtenidas.
- Los perfiles de glicosilación presentes en las proteínas de las cepas *M. microti*, *M. microti/PstS-1* y *M. microti/Ag85B* en geles de 1- y 2-D se determinaron.
- un proteoma de las cepas *M. microti*, *M. microti/PstS-1* y *M. microti/Ag85B* Se construyó y se identificaron los patrones de glicosilación, al igual que las proteínas únicas para cada cepa.
- Las cepas *M. microti*, *M. microti/PstS-1* y *M. microti/Ag85B* presentaron glicosilaciones de tipo N con glicanos manosa terminal y ácido siálico ligado (2-3) a galactosa.

9. ANEXOS

9.1 Preparación del medio sólido BD Middlebrook 7H10

Se preparó medio BD Middlebrook 7H10 (DIFCO™) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, 19g del polvo liofilizado fueron disueltos en 900 mL de agua desionizada conteniendo 5mL de glicerol. El medio se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121°C. Posteriormente, se vació a placas Petri y una vez gelificado se mantuvo a 4°C hasta su uso.

El medio Middlebrook 7H10 contiene los siguientes componentes por cada litro de agua:

Reactivo	Cantidad	Reactivo	Cantidad
Sulfato magnésico	0,025 g	Albúmina bovina (fracciónV)	5,0 g
Citrato férrico de amonio	0,04 g	Catalasa	0,004 g
Citrato sódico	0,4 g	Piridoxina	0,001 g
Sulfato de amonio	0,5 g	Sulfato de zinc	0,001 g
Glutamato monosódico	0,5 g	Sulfato de cobre	0,001 g
Fosfato disódico	1,5 g	Biotina	0,0005 g
Fosfato monopotásico	1,5 g	Cloruro de calcio	0,0005 g
Agar	17,0 g	Verde malaquita	0,0025 g
Cloruro sódico	0,85 g	Glicerol	5,0 g
Glucosa	2,0 g	Ácido oléico	0,05 mL

9.2 Tinción de Ziehl-Neelsen

La tinción de Ziehl-Neelsen se realizó de la siguiente forma: En condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar de seguridad Clase II (LABCONCO™) se hizo un frotis de cada una de las cepas y se dejó secar al aire libre. Posteriormente, se fijó el frotis por calentamiento (a 60°C) durante 30 minutos. Se le agregó fucsina fenicada durante 10 minutos (controlando la emisión de vapores en una campana de flujo laminar), se lavó con alcohol-ácido hasta quitar el exceso de colorante y se le agregó azul de metileno de Loeffler durante 3 minutos, a temperatura ambiente. El frotis se lavó con H₂O_d y se dejó secar a temperatura ambiente.

9.3 Preparación del medio líquido Sauton modificado

El medio Sauton está constituido por los siguientes reactivos :

Reactivo	Cantidad
Asparagina	30.3 mM
ácido cítrico	10.4 mM
K ₂ HPO ₄	2.9 Mm
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 Mm
C ₆ H ₈ O ₇ ·Fe·H ₃ N	0.4 mM
Tween 80	0.05%
glicerol	1.5%

Los cuales se disolvieron en aproximadamente 800 mL de H₂O_d y se ajustó a pH 7.4. Después se aforó hasta 1000 mL y se esterilizó 15 minutos a 121°C. Finalmente, se agregaron glucosa y piruvato (40 mM, concentración final) en condiciones de esterilidad.

9.4 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La curva se realizó por duplicado, como se indica en la tabla 14:

Tabla 14. Curva patrón de BSA

BSA a una concentración de 1 mg/mL (μ L)	0	1	2	3	4	5	6	8	10
H ₂ O (μ L)	50	49	48	47	46	45	44	42	40
Agregar 200 μ L del Reactivo de Bradford, incubar 5 min en la oscuridad y leer a una longitud de onda (λ) de 595 y 450 nm									

Por otra parte, las muestras se prepararon por duplicado como se muestra en la tabla 15:

Tabla 15. Preparación de las muestras de extracto celular por el método de Bradford

Filtrado de cultivo (μ L)	1
H ₂ O (μ L)	49

Agregar 200 μ L del Reactivo de Bradford, incubar 5 min en la oscuridad y leer a una longitud de onda (λ) de 595 y 450 nm

9.5 Morfología de *M. microti*, *M. microti*/PstS-1, *M. microti*/Ag85B en medio sólido Middlebrook 7H10

Las características macroscópicas fueron similares para cada una de las tres cepas, cuya morfología mostró colonias circulares pequeñas de 2-4 mm de diámetro, con bordes irregulares, color amarillo opaco, de consistencia rugosa y ligeramente elevadas. En cuanto a la microscopía se observaron bacilos cortos ácido alcohol resistentes mostrados en la figura 22.

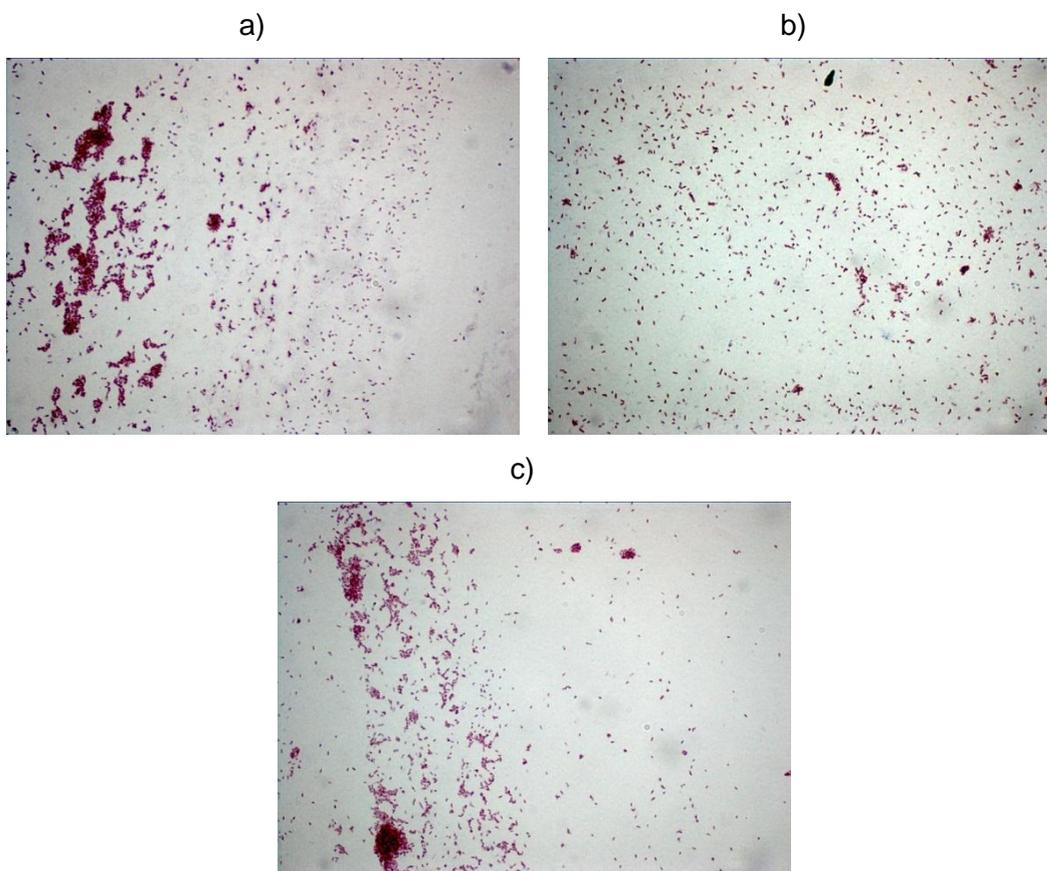


Figura 22. Observación microscópica de *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B de preparaciones teñidas por Ziehl-Neelsen con un aumento de 100x; bacilos ácido alcohol resistentes ligeramente curvos.

9.6 Cuantificación de las proteínas del extracto celular

Se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford (anexos, apartado 9.4) Los resultados obtenidos se mencionan a continuación.

Tabla 16. Concentración de proteínas de extracto celular de *M. microti*, *M. microti/PstS-1* y *M. microti/Ag85B*

Cepa	Concentración de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
<i>M. microti</i>	2.6
<i>M. microti/PstS-1</i>	2.9
<i>M. microti/Ag85B</i>	2.8

9.7 Tinción con plata al 0,02% de geles de extracto celular de *M. microti*, *M. microti/PstS-1* y *M. microti/Ag85B*

Los resultados obtenidos al identificar el tipo de glicano que presentan las proteínas, se compararon con los geles teñidos con plata que se muestran en las figuras 23 y 24.

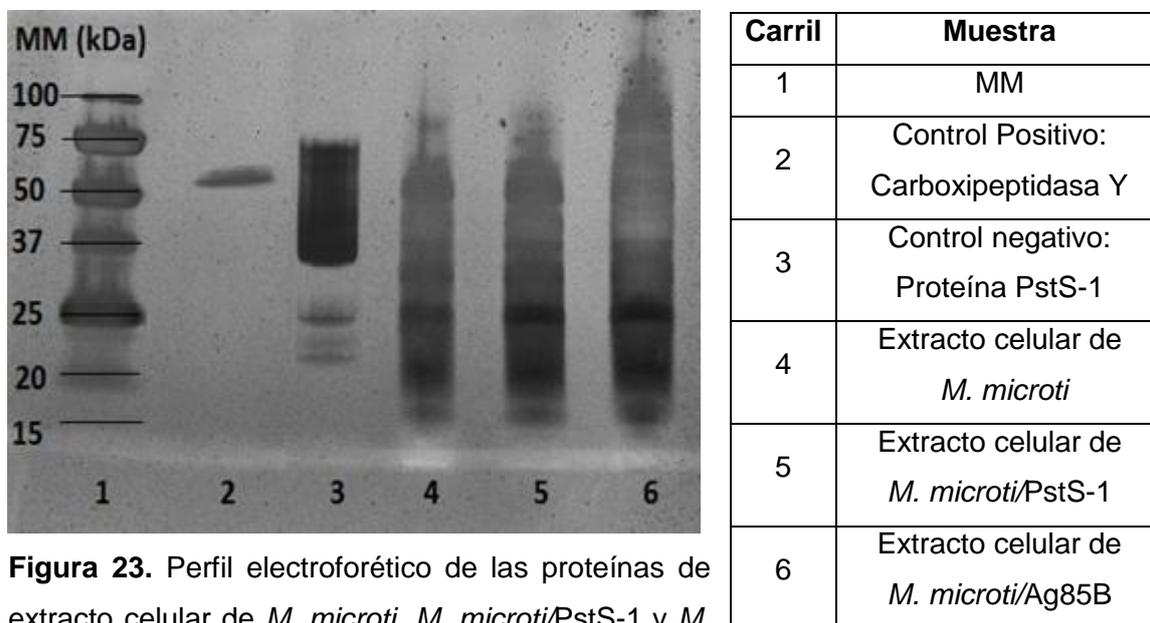


Figura 23. Perfil electroforético de las proteínas de extracto celular de *M. microti*, *M. microti/PstS-1* y *M. microti/Ag85B*.

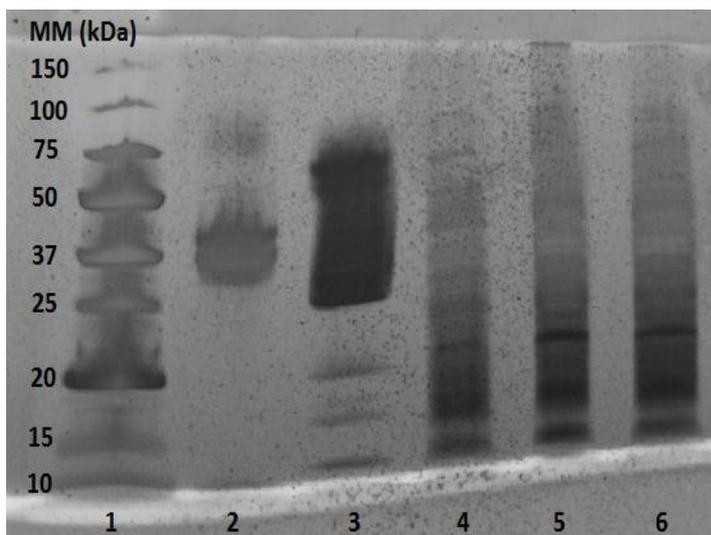


Figura 24. Perfil electroforético de las proteínas del extracto celular de *M. microti*, *M. microti*/PstS-1 y *M. microti*/Ag85B

Carril	Muestra
1	MM
2	Control Positivo: Carboxipeptidasa Y
3	Control negativo: Proteína PstS-1
4	Extracto celular de <i>M. microti</i>
5	Extracto celular de <i>M. microti</i> /PstS-1
6	Extracto celular de <i>M. microti</i> /Ag85B

En general, se encontraron proteínas con glicosilaciones manosa terminal de masa molecular de 44 a 133 kDa y también proteínas glicosiladas con ácido siálico ligado (2-3) a galactosa de 55-57 kDa, aproximadamente. Los perfiles de glicosilación obtenidos para cada cepa se muestran en la tabla 7.

10. REFERENCIAS

1. Brosch, R., et al., *A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(6): p. 3684-9.
2. WHO. *BCG vaccine*. 2010 [cited 2010; Available from: <http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/bcg/en/>].
3. Daniel, V.S. and T.M. Daniel, *Old Testament biblical references to tuberculosis*. Clin Infect Dis, 1999. 29(6): p. 1557-8.
4. in *Tuberculosis: Clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control* 2006: London.
5. Ait-Khaled N, A.E., Armengol R, Bissell K, Boillot F, Caminero J A, Chiang C-Y, Clevenbergh P, Dlodlo R, Enarson D A, Enarson P, Fujiwara P I, Harries A D, Heldal E, Hinderaker S G, Lienhardt C, Monedero I, Rieder H L, Rusen I D, Trébuçq A, Van Deun A, Wilson N. Manejo, *Manejo de la tuberculosis. Una guía esencial de buenas prácticas*. Edith Alarcón ed2010, Paris, France: 2010. 95.
6. Mehta, J.B., et al., *Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis. A comparative analysis with pre-AIDS era*. Chest, 1991. 99(5): p. 1134-8.
7. José A. Caminero Luna, M.C.R., Vicente Ausina Ruiz, José M. Pina Gutiérrez y Jesús Sauret Valet, *Diagnóstico de la tuberculosis. Recomendaciones SEPAR*, Epidemiología, Editor 2002, 1999: México, D.F.
8. de Jong, B.C., M. Antonio, and S. Gagneux, *Mycobacterium africanum--review of an important cause of human tuberculosis in West Africa*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. 4(9): p. e744.
9. Hershberg, R., et al., *High functional diversity in Mycobacterium tuberculosis driven by genetic drift and human demography*. PLoS Biol, 2008. 6(12): p. e311.
10. Djelouadji, Z., et al., *A single-step sequencing method for the identification of Mycobacterium tuberculosis complex species*. PLoS Negl Trop Dis, 2008. 2(6): p. e253.
11. Manuel Casal, A.G., Nuria Martín, Santiago Moreno y M^a Carmen Nogales. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. 2009 [cited 2010; Available from: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap9.htm>].
12. Esko, J.D., T.L. Doering, and C.R.H. Raetz, *Eubacteria and Archaea*, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2009: Cold Spring Harbor (NY).
13. Barksdale, L. & K.S. Kim, *Mycobacterium*. Bacteriol Rev, 1977. 41(1): p. 217-372.
14. WHO. 2010; Available from: http://www.who.int/features/factfiles/tb_facts/es/index.html.
15. WHO, *Global Tuberculosis Control*, 2010, World Health Organization. p. 218.
16. CENAVE. 2008 2009]; Available from: <http://www.cenave.gob.mx/tuberculosis/CURSO%20HG/2010/LUNES/TB%20actual%202010.pdf>.
17. Behr, M.A. and P.M. Small, *A historical and molecular phylogeny of BCG strains*. Vaccine, 1999. 17(7-8): p. 915-22.
18. Colditz, G.A., et al., *Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature*. JAMA, 1994. 271(9): p. 698-702.
19. Irwin, S.M., et al., *Immune response induced by three Mycobacterium bovis BCG substrains with diverse regions of deletion in a C57BL/6 mouse model*. Clin Vaccine Immunol, 2008. 15(5): p. 750-6.
20. Rodríguez-Alvarez, M., et al., *Phenotypic differences between BCG vaccines at the proteome level*. Tuberculosis (Edinb), 2009. 89(2): p. 126-35.

21. Berredo-Pinho, M., et al., *Proteomic profile of culture filtrate from the Brazilian vaccine strain Mycobacterium bovis BCG Moreau compared to M. bovis BCG Pasteur*. BMC Microbiol, 2011. 11: p. 80.
22. Brosch, R., et al., *Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(13): p. 5596-601.
23. WHO. 2009; Available from: <http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/bcg/en/>.
24. Mollenkopf, H.J., et al., *Application of mycobacterial proteomics to vaccine design: improved protection by Mycobacterium bovis BCG prime-Rv3407 DNA boost vaccination against tuberculosis*. Infect Immun, 2004. 72(11): p. 6471-9.
25. Derrick, S.C., et al., *Immunization with a DNA vaccine cocktail protects mice lacking CD4 cells against an aerogenic infection with Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 2004. 72(3): p. 1685-92.
26. Luo, Y., et al., *Recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) expressing mouse IL-18 augments Th1 immunity and macrophage cytotoxicity*. Clin Exp Immunol, 2004. 137(1): p. 24-34.
27. Baena, A. & S.A. Porcelli, *Evasion and subversion of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis*. Tissue Antigens, 2009. 74(3): p. 189-204.
28. Werninghaus, K., et al., *Adjuvanticity of a synthetic cord factor analogue for subunit Mycobacterium tuberculosis vaccination requires FcRgamma-Syk-Card9-dependent innate immune activation*. J Exp Med, 2009. 206(1): p. 89-97.
29. Davila, J., et al., *Assessment of the genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis esxA, esxH, and fbpB genes among clinical isolates and its implication for the future immunization by new tuberculosis subunit vaccines Ag85B-ESAT-6 and Ag85B-TB10.4*. J Biomed Biotechnol, 2010. 2010: p. 208371.
30. Hart, P.D. & I. Sutherland, *BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life*. Br Med J, 1977. 2(6082): p. 293-5.
31. Brodin, P., et al., *Enhanced protection against tuberculosis by vaccination with recombinant Mycobacterium microti vaccine that induces T cell immunity against region of difference 1 antigens*. J Infect Dis, 2004. 190(1): p. 115-22.
32. Cavanagh, R., et al., *Mycobacterium microti infection (vole tuberculosis) in wild rodent populations*. J Clin Microbiol, 2002. 40(9): p. 3281-5.
33. Kadival, G.V., S.D. Chaparas, and D. Hussong, *Characterization of serologic and cell-mediated reactivity of a 38-kDa antigen isolated from Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 1987. 139(7): p. 2447-51.
34. Chang, Z., et al., *The immunodominant 38-kDa lipoprotein antigen of Mycobacterium tuberculosis is a phosphate-binding protein*. J Biol Chem, 1994. 269(3): p. 1956-8.
35. Andersen, A.B. & E.B. Hansen, *Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1989. 57(8): p. 2481-8.
36. Espitia, C., et al., *Phosphate starvation enhances expression of the immunodominant 38-kilodalton protein antigen of Mycobacterium tuberculosis: demonstration by immunogold electron microscopy*. Infect Immun, 1992. 60(7): p. 2998-3001.
37. Torres, A., et al., *Molecular analysis of Mycobacterium tuberculosis phosphate specific transport system in Mycobacterium smegmatis. Characterization of recombinant 38 kDa (PstS-1)*. Microb Pathog, 2001. 30(5): p. 289-97.
38. Vyas, N.K., M.N. Vyas, and F.A. Quijcho, *Crystal structure of M tuberculosis ABC phosphate transport receptor: specificity and charge compensation dominated by ion-dipole interactions*. Structure, 2003. 11(7): p. 765-74.

39. Wilkinson, R.J., et al., *38 000 MW antigen-specific major histocompatibility complex class I restricted interferon-gamma-secreting CD8+ T cells in healthy contacts of tuberculosis*. Immunology, 1998. 95(4): p. 585-90.
40. Daffe, M., *The mycobacterial antigens 85 complex - from structure to function and beyond*. Trends Microbiol, 2000. 8(10): p. 438-40.
41. Anderson, D.H., et al., *An interfacial mechanism and a class of inhibitors inferred from two crystal structures of the Mycobacterium tuberculosis 30 kDa major secretory protein (Antigen 85B), a mycolyl transferase*. J Mol Biol, 2001. 307(2): p. 671-81.
42. Triccas, J.A., et al., *Molecular and immunological analyses of the Mycobacterium avium homolog of the immunodominant Mycobacterium leprae 35-kilodalton protein*. Infect Immun, 1998. 66(6): p. 2684-90.
43. Harth, G., et al., *Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1996. 64(8): p. 3038-47.
44. Nothhaft, H. and C.M. Szymanski, *Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever*. Nat Rev Microbiol, 2010. 8(11): p. 765-78.
45. Jones, M.B., et al., *Structure and synthesis of polyisoprenoids used in N-glycosylation across the three domains of life*. Biochim Biophys Acta, 2009. 1790(6): p. 485-94.
46. Stanley, P., H. Schachter, and N. Taniguchi, *N-Glycans*, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2009: Cold Spring Harbor (NY).
47. Sweet, L., et al., *Mycobacterium avium glycopeptidolipids require specific acetylation and methylation patterns for signaling through toll-like receptor 2*. J Biol Chem, 2008. 283(48): p. 33221-31.
48. Doz, E., et al., *Acylation determines the toll-like receptor (TLR)-dependent positive versus TLR2-, mannose receptor-, and SIGNR1-independent negative regulation of pro-inflammatory cytokines by mycobacterial lipomannan*. J Biol Chem, 2007. 282(36): p. 26014-25.
49. Dell, A., et al., *Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes*. Int J Microbiol, 2010. 2010: p. 148178.
50. Varki, A. & N. Sharon, *Historical Background and Overview*, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2009: Cold Spring Harbor (NY).
51. Weerapana, E. & B. Imperiali, *Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems*. Glycobiology, 2006. 16(6): p. 91R-101R.
52. Hart, G.W. & Y. Akimoto, *The O-GlcNAc Modification*, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2009: Cold Spring Harbor (NY).
53. Dra. Hilda Marilín García, D.D.H., Lic. Odalys Martín y Dr. Félix Ganem, *Comportamiento de diferentes sistemas tampón en equipo PhastSystem*. 2000. 1(2): p. 8-14.
54. Han, M.J. & S.Y. Lee, *The Escherichia coli proteome: past, present, and future prospects*. Microbiol Mol Biol Rev, 2006. 70(2): p. 362-439.
55. Cheng, C.H. & W.C. Lee, *Protein solubility and differential proteomic profiling of recombinant Escherichia coli overexpressing double-tagged fusion proteins*. Microb Cell Fact, 2010. 9: p. 63.
56. Spiro, R.G., *Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds*. Glycobiology, 2002. 12(4): p. 43R-56R.
57. Wang, B., et al., *A Toll-like receptor-2-directed fusion protein vaccine against tuberculosis*. Clin Vaccine Immunol, 2007. 14(7): p. 902-6.
58. Gilleron, M., et al., *The acylation state of mycobacterial lipomannans modulates innate immunity response through toll-like receptor 2*. Chem Biol, 2006. 13(1): p. 39-47.