



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Clonación y expresión de la glicoproteína de 19kDa de
Mycobacterium tuberculosis (Gen Rv3763) en
Streptomyces lividans.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARÍA DANIELA TORRES RODRÍGUEZ



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

*A mis padres, por el amor y la educación que recibí de ellos.
Por brindarme los medios necesarios para culminar mi
carrera y apoyarme en cada momento.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la que debo toda mi formación.

A mi tutor, el Dr. Luis Servín, por darme la oportunidad de aprender en su laboratorio, por guiarme cada seminario y por estar siempre pendiente de mis resultados.

A la M. en C. Gabriela González Cerón, por su asesoría, por su disposición a atender siempre mis dudas y por enseñarme la mayoría de las técnicas que apliqué en la realización de éste proyecto.

A la Dra. Clara Espitia, por su colaboración y por darle seguimiento a éste proyecto, por sus observaciones que me ayudaron a concluir mi tesis.

A la Biol. Laura Elena Córdova, por su asesoría, apoyo técnico y su contribución en el análisis de resultados.

A la M. en C. Cristina Parada, por su asesoría y apoyo técnico en la inmunización de conejas NZA, la obtención de anticuerpos policlonales y en la realización de los geles de doble dimensión.

A la Dra. Andrea Segal, la Dra. Yolanda López Vidal y el Dr. Jesús Ramírez, por las observaciones que hicieron a éste documento.

A la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

A CONACyT por el financiamiento del Proyecto # 103214: “Glicosilación de proteínas en *Streptomyces*. Mecanismos de glicosilación y expresión de proteínas endógenas y de *Mycobacterium tuberculosis*”.

Al Programa de Becas para la Educación Superior, por otorgarme la beca de Titulación 2011.

A Gandi Valdés, por acompañarme en los últimos años, por estar siempre dispuesto a ayudarme y animarme cada vez que lo necesité; por hacerme ver mis debilidades y reconocer mis virtudes y por todo el amor, la confianza y los momentos tan agradables que me ha brindado.

A mi hermana Gaby, por demostrarme su apoyo todos los días. A mi hermano Quique, por hacerme olvidar el estrés haciéndome sonreír todos los días.

A mis amigos del CCH Azcapo, Mariana, Prócoro (Alan), Isvi, Dioni y Nilda (Hilda, Morenita o como se llame). Por mantener esta amistad y por su apoyo durante toda mi carrera.

A mi amiga Nancy, por demostrarme su cariño siempre con una sonrisa y por echarme porras durante todo este camino.

A todos los miembros del laboratorio, Laurita, Isaf, Cristian, Manuel, Auri, Gaby, Tania, Jacqueline, Anayeli, Trini y Martí, por hacer de mi estancia en el lab un momento muy agradable.

A los integrantes del laboratorio de la Dra. Gloria Soberón, por las observaciones que realizaron a mi proyecto en cada seminario.

ABREVIATURAS

Apra^R: Resistencia a apramicina

BSA: Albúmina sérica bovina (Por sus siglas en inglés: **B**ovine **S**erum **A**lbumin)

CHAPS: 3-(3-Cholamidopropyl dimethylammonio)-1-Propanosulfatonate

Cm^R: Resistencia a cloranfenicol.

ConA-peroxidasa: Concanavalina A acoplada a peroxidasa

DOC: Dioxicolato

DTT: Dithiothreitol

IL: Interleucina

INF- γ : Interferón gamma

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactósido

Kan^R: Resistencia a Kanamicina

kDa: Kilodalton

LAM: Lipoarabinomamano

Lgt: Prolipoproteína diacilglicerol transferasa (Phosphatidylglycerol-pre-Prolipoprotein Diacylglyceryl Transferase)

LM: Lipomanano

Lnt: Lipoproteína N-aciltransferasa (Phospholipid-Apolipoprotein N-acyltransferase)

LspA: Prolipoproteína peptidase señal (Por sus siglas en inglés: Prolipoprotein **S**ignal **P**eptidase)

MHC: Complejo Principal de Histocompatibilidad (Por sus siglas en inglés: **M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex)

PEG: Polietilenglicol

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

pI: Punto Isoeléctrico

PIM: Fosfatidil inositol manósido

PMT: Proteína manosil transferasa

Ppm: Poliprenol fosfato manosa (Por sus siglas en inglés: **P**olyprenol **P**hosphate **M**annose)

P_{tip}A: Promotor inducible con tioestreptón

PVDF: Polivinilo de difluorido (Por sus siglas en inglés: **P**oly**v**inylidene **F**luoride)

SDS: Dodecilsulfato sódico

TBS: Buffer Tris Salino (Por sus siglas en inglés: **T**ris **B**uffered **S**aline)

TCA: Ácido Tricloracético

TLR: Receptor tipo toll (Por sus siglas en inglés: **T**oll-like **R**eceptor)

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alpha (Por sus siglas en inglés: **T**umor **N**ecrosis **F**actor)

tRNA: RNA de transferencia

tsr: Resistencia a tioestrepton

ÍNDICE

1. Resumen.....	10
2. Introducción.....	11
2.1. Características de <i>M. tuberculosis</i>	12
2.2. Infección por <i>M. tuberculosis</i>	13
2.3. Proteínas glicosiladas como antígenos de <i>M. tuberculosis</i>	15
2.4. Características del género <i>Streptomyces</i>	18
2.5. Producción de proteínas recombinantes por <i>Streptomyces</i>	19
2.6. Una comparación entre <i>Mycobacterium</i> y <i>Streptomyces</i>	20
2.7. Secreción de proteínas.....	22
2.8. Síntesis de lipoproteínas en actinomicetos.....	24
2.9. Mecanismo de <i>O</i> -manosilación de proteínas en actinomicetos.....	25
2.10. La glicoproteína de 19kDa de <i>M. tuberculosis</i>	27
2.11. Características estructurales del antígeno de 19kDa.....	27
2.12. Características inmunológicas del antígeno de 19kDa.....	29
3. Antecedentes.....	31
4. Justificación.....	32
5. Objetivos.....	34
6. Metodología.....	35
6.1. Cepas bacterianas y plásmidos.....	35
6.2. Amplificación y clonación del gen Rv3763.....	36
6.3. Purificación de la lipoproteína de 19kDa por cromatografía de afinidad.....	39
6.4. Clonación en los vectores de expresión de <i>S. lividans</i>	39
6.5. Expresión del antígeno de 19kDa en <i>S. lividans</i>	40
6.6. Obtención de proteína y fraccionamiento celular.....	41
6.7. Electroforesis de proteínas y Western Blot.....	41
6.8. Electroforesis de doble dimensión.....	42
7. Resultados.....	44
7.1. Clonación del gen Rv3763 en <i>E. coli</i>	44
7.2. Purificación de la proteína de 19kDa por cromatografía de afinidad y obtención de anticuerpos.....	45
7.3. Clonación del gen Rv3763 en <i>S. lividans</i>	46
7.4. Plásmido pBD3.1.....	47
7.5. Experimentos de expresión para la construcción pBD3.1 en <i>S. lividans</i>	48
7.6. Plásmido pBD2.1.....	51

7.7. Experimentos de expresión para la construcción pBD2.1 en <i>S. lividans</i>	51
7.8. Plásmido pBD3.2.....	53
7.9. Experimentos de expresión para la construcción pBD3.2 en <i>S. lividans</i>	56
7.10. Electroforesis en dos dimensiones (2D).....	59
7.11. Plásmido pBD3.1 (2D).....	60
7.12. Plásmido pBD2.1 (2D).....	62
8. Discusión.....	64
9. Conclusiones.....	69
10. Perspectivas.....	70
11. Anexos.....	71
Anexo #1. Buffer y medios de cultivo.....	71
Anexo #2. Transformación por electroporación.....	73
Anexo #3. Protocolo para conjugación <i>E. coli-Streptomyces</i>	74
Anexo #4. Purificación de fragmentos de DNA en geles de agarosa de bajo punto de fusión.....	75
Anexo #5. Protocolo para minipreparaciones de DNA plasmídico.....	76
Anexo #6. Transformación de protoplastos de <i>Streptomyces</i>	77
Anexo #7. Precipitación de proteínas con Metanol-Cloroformo.....	78
Anexo #8. Fraccionamiento Celular.....	79
12. Referencias bibliográficas.....	80

1. RESUMEN

Las glicoproteínas expuestas en la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* tienen un papel fundamental en la patogénesis de esta bacteria, ya que desencadenan múltiples respuestas cuando hay una infección. Las propiedades antigénicas de los componentes glicosilados les hace ser objeto de estudio para entender en un contexto biológico al microorganismo, comprender su interacción con el sistema inmune a fin de establecer su potencial como vacunas o posibles blancos terapéuticos. Con el objetivo de generar grandes cantidades de los antígenos más representativos, se han empleado otras bacterias para su sobreexpresión. *Streptomyces lividans* es una bacteria relacionada con *M. tuberculosis* y, debido a que presenta un sistema de glicosilación de proteínas similar al de éste patógeno, se ha utilizado para la expresión de proteínas recombinantes con dicha modificación postraducciona. Experimentalmente, *S. lividans* es una bacteria que se puede manipular con mayor facilidad, debido a que su crecimiento es más rápido, además de que no requiere las condiciones de bioseguridad de la micobacteria. El objetivo del presente estudio fue clonar el gen Rv3763 que codifica para el antígeno de 19kDa de *M. tuberculosis* en *S. lividans*. La expresión de la proteína con su propio péptido señal permitió ver la proteína manosilada en la membrana de *Streptomyces*; sin embargo, también se encontró proteolisada en el sobrenadante, conservando la manosilación. Por otra parte, se construyó una recombinante con un péptido señal de secreción de *Streptomyces* y, aunque la proteína fue secretada, no se encontró evidencia de manosilación. Estos resultados corroboran el hecho de que las maquinarias de glicosilación están conservadas entre ambos organismos e indican que, en el antígeno de 19kDa, su péptido señal podría estar involucrado con la manosilación.

2. INTRODUCCIÓN

La glicosilación de proteínas es una importante modificación postraduccional que se lleva a cabo tanto en procariontes como en eucariontes y es necesaria para que ciertas proteínas desempeñen funciones biológicas específicas (Kazuaki & Marth, 2006). En los procariontes, la glicoproteómica ha sido un campo que recientemente ha tomado gran importancia debido a que en las bacterias patógenas se ha observado que las proteínas asociadas a azúcares desempeñan un papel fundamental para la patogénesis, desencadenando múltiples respuestas cuando hay una infección (Moens et al, 1997).

El agente causal de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, es un ejemplo de este tipo de bacterias. Sus glicoproteínas se encuentran expuestas en la pared bacteriana o bien son secretadas; en el primer paso de la infección bacteriana hay un reconocimiento del hospedero hacia la bacteria, el cual se da específicamente con las proteínas expuestas en su pared que en muchos casos están en forma de glicoproteínas (Espitia & Mancilla, 1989 y González-Zamorano et al. 2008). Todos los componentes expuestos en la membrana celular de *M. tuberculosis* pueden servir como blanco de los medicamentos, se pueden emplear en pruebas de diagnóstico o incluso, utilizarse para la generación de vacunas recombinantes contra dicha enfermedad, por lo cual su estudio es de gran interés.

Con el propósito de obtener altos niveles de expresión de algunos antígenos y debido a las dificultades técnicas para trabajar con *M. tuberculosis*, se han utilizado otros organismos no patógenos y con un crecimiento más rápido al de este bacilo, por ejemplo *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*; sin embargo, en estos sistemas es imposible expresar las proteínas con modificaciones postraduccionales como la glicosilación (Hart et al. 1997 y Garbe et al. 1993 y Lara et al. 2004).

Cabe señalar que en otras especies no patógenas del género *Mycobacterium* como *M. smegmatis*, se ha tratado de expresar algunos antígenos. Aunque esta bacteria también cuenta con los mecanismos de glicosilación, el resultado no ha sido el esperado, ya que las

proteínas expresadas son glicosiladas de distinta manera a la proteína nativa y esto repercute en su efecto inmunológico (Garbe et. al. 1993).

Otros organismos que no son patógenos, también cuentan con la maquinaria necesaria para glicosilación de proteínas. Tal es el caso de las especies del género *Streptomyces*, en donde se pueden generar proteínas recombinantes con dicha modificación postraduccional (Lara et. al 2004; MacLeod et. al. 1992 y Pozidis et. al. 2001). Esta es una característica de gran importancia ya que representa una alternativa para trabajar con glicoproteínas de organismos patógenos.

2.1. Características de *M. tuberculosis*.

Mycobacterium tuberculosis es una bacteria Gram positiva de muy lento crecimiento perteneciente al orden taxonómico Actinomycetales, con un tiempo de replicación de aproximadamente 24 horas (Cole et. al. 1998, Garbe et. al. 1993 y Sasseti & Rubin 2003); es un bacilo delgado de forma ligeramente curvada y ácido-alcohol resistente. Este microorganismo se alberga en los macrófagos humanos en estructuras granulomatosas en el pulmón (Joanne & Chan 2001)

El ciclo de vida de *M. tuberculosis* comienza cuando el bacilo ingresa al organismo y es internalizado por células fagocíticas. En la primera etapa, hay un crecimiento vegetativo donde el patógeno se divide dentro de los macrófagos; en éste caso, las divisiones celulares se dan hacia los polos, de manera bifurcada (Scherr et. al. 2009). Aunado a la división intracelular, las células fagocíticas que llevan internalizado al bacilo pueden diseminarse en sitios extrapulmonares (Ahmad, 2010).

La etapa de crecimiento vegetativo cesa porque el sistema inmune comienza a atacar y logra controlar al patógeno, pero no lo elimina totalmente, más bien la micobacteria entra en un estado de *dormancia* que es altamente resistente a antibióticos (Keren et. al. 2011); en la enfermedad es lo equivalente a la tuberculosis latente (TBL). Dicha etapa donde el bacilo se conserva con baja actividad metabólica y replicativa puede permanecer constante durante muchos años (Ahmad, 2010 y Scherr et. al. 2009).

Posterior al estadio de *dormancia*, puede existir una reactivación del crecimiento vegetativo provocando una tuberculosis activa (Fig. 1); se desconoce exactamente qué condiciones son las que desatan éste cambio; aunque se cree que está asociado a que el sistema inmune se ve debilitado, lo cual es una condición favorable para la micobacteria (Scherr et. al. 2009). En esta etapa de la enfermedad las células pueden replicarse extracelularmente e invaden las cavidades del pulmón (Joanne & Chan 2001).

La micobacteria es transmitida dentro de microgotas que son expulsadas por los individuos que padecen una tuberculosis activa y que son inhaladas por otros individuos. Así se restablece de nuevo el ciclo (Ahmad, 2010).

Una característica distintiva de *M. tuberculosis* es su pared celular que es muy compleja y difícilmente penetrable; está constituida por peptidoglicanos y ácidos micólicos unidos entre sí por medio de enlaces covalentes D-arabino-D-galactano; además posee un alto contenido de glicolípidos y glicoproteínas (Fig. 1) (Brennan & Nikaido, 1995). Los ácidos micólicos son de gran importancia para el crecimiento, sobrevivencia y patogénesis de la micobacteria ya que la protegen de la deshidratación y el daño químico (Scherr et. al. 2009).

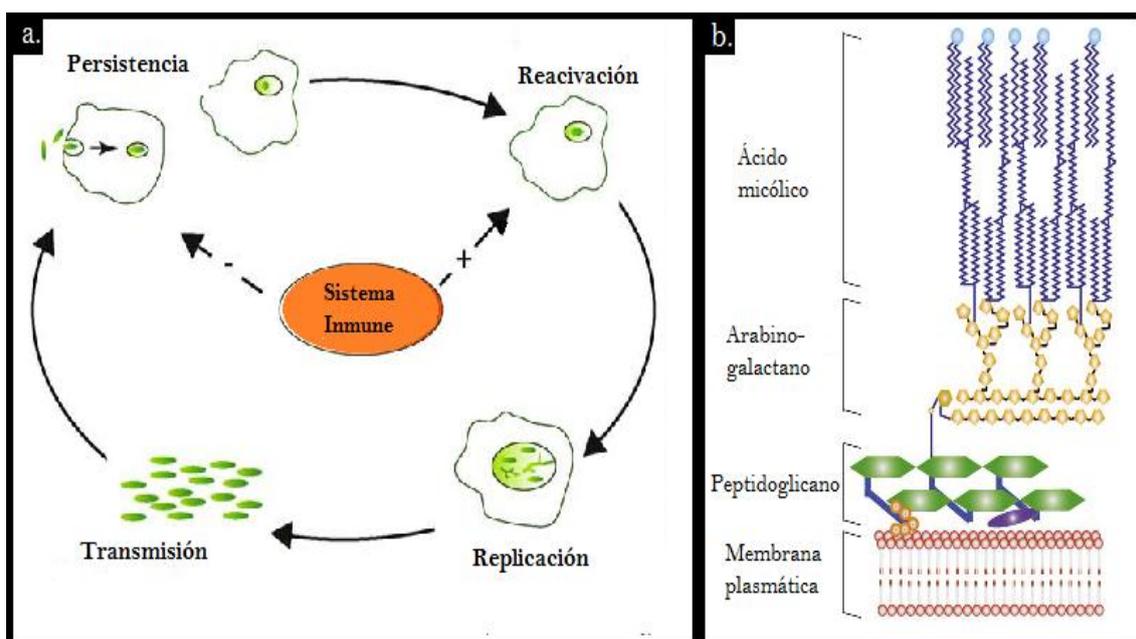


Figura 1. *M. tuberculosis*. a. Ciclo de vida. b. Composición de la pared celular. Modificado de Scherr et al. 2009.

La membrana celular de las micobacterias representa una barrera de permeabilidad y forma un espacio periplásmico. Si se considera la estructura tan compleja de la cubierta celular de *M. tuberculosis* es más parecida a la de las bacterias Gram negativas que a la de las Gram positivas (Brennan & Nikaido, 1995).

2.2. Infección por *M. tuberculosis*.

M. tuberculosis es un parásito estricto que crece en condiciones aeróbicas; la infección que provoca se caracteriza por la formación de granulomas en los tejidos infectados. Los granulomas (llamados también tubérculos) están constituidos por los bacilos dentro de los macrófagos, células T, células B y fibroblastos y se diseminan a través de los bronquios (Joanne & Chan 2001). En su formación influyen una gran cantidad de antígenos que son capaces de inducir las respuestas inmunológicas, como la expresión de ciertas citocinas, que contribuyen al daño tisular (Quesniaux et. al. 2004).

La interacción inicial de la micobacteria y el sistema inmune ocurre a través de los receptores tipo toll (TLR) que detectan patrones moleculares en las bacterias y, después de su activación, se desata la respuesta inmune (Akira et. al. 2001 y Flynn & Chan 2001).

El control de la infección por *M. tuberculosis* se basa en una respuesta tipo T_{H1} para antígenos intracelulares, inducida por la producción inicial de Interleucina-12 (IL-12) (Feng et. al. 2003 y Méndez-Samperio et. al. 2010). En este tipo de respuesta hay producción de citocinas como Interferón γ (INF- γ) que controla la infección y el Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α), que se encarga de la respuesta granulomatosa y la inmunidad mediada por células (Quesniaux et. al. 2004).

Los macrófagos que fagocitan a los bacilos, acoplan los antígenos con moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad II (MHC-II) y los presentan a los linfocitos T_{CD4+} , éstos son activados y son los productores de INF- γ (Pai et. al., 2004) para activar a los macrófagos y eliminar al bacilo; sin embargo algunas bacterias logran evadir la destrucción intracelular (Flynn & Chan 2001 y Noss et. al. 2001).

Los bacilos que escapan a la destrucción se multiplican dentro del macrófago y provocan su ruptura (Noss et. al. 2001). Cuando esto ocurre, los monocitos de la sangre son atraídos al pulmón y se diferencian a macrófagos para fagocitar nuevamente a la micobacteria, aunque no la destruyen; además de los monocitos, otras células son atraídas al sitio de infección y proliferan formando los tubérculos (Flynn & Chan 2001 y Joanne & Chan 2001).

La respuesta inmune que se desata ante la infección por *M. tuberculosis* controla al patógeno sin eliminarlo. La bacteria puede permanecer en un estado latente, albergándose dentro de los fagosomas de los macrófagos infectados; sin embargo hay reactivación de la infección cuando existen perturbaciones en el sistema inmune provocando una enfermedad activa (Flynn & Chan 2001).

La infección provocada por *M. tuberculosis* se ha combatido con la vacuna BCG (Bacillus Calmette-Guerin), la cual consta de bacilos atenuados de *Mycobacterium bovis* BCG. Esta vacuna presenta intervalos de eficacia muy variables entre la población, y ofrece protección solo contra formas graves de la enfermedad en la infancia, en controversia con la forma pulmonar en la población adulta (Meya & McAdam, 2007). Sumado a esto, se sabe que han emergido cepas resistentes a antibióticos y que hay una alta incidencia de infección por éste patógeno en pacientes infectados con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) o en personas que padecen diabetes, siendo muy difícil erradicar la infección del organismo (Snider et. al. 1998 y Meya & McAdam, 2007). Por tal motivo la investigación acerca de la patogénesis de dicha bacteria se ha incrementado con la necesidad de controlar la enfermedad con una vacuna más eficiente o con medicamentos alternos que ataquen a proteínas específicas en la infección bacteriana.

2.3. Proteínas glicosiladas como antígenos de *M. tuberculosis*.

Las proteínas secretadas y de la superficie de *M. tuberculosis* son importantes para la patogenicidad. Se han caracterizado varias de estos antígenos y los más importantes se han

tratado de aislar empleando como hospederos otras bacterias no patógenas y que tienen un crecimiento más rápido al de *M. tuberculosis*, con el propósito de producir en gran escala proteínas recombinantes (Lara et. al. 2004); sin embargo, algunos antígenos poseen modificaciones postraduccionales y esto hace más difícil la posibilidad de expresarlos en otros organismos, por ejemplo en *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, que experimentalmente son fáciles de manipular (Hart et. al. 1997, y Garbe et. al. 1993).

Mediante el uso de lectinas se han detectado proteínas glicosiladas inmunogénicas en el sobrenadante del cultivo y en extractos de membrana celular de *M. tuberculosis* (González-Zamorano et. al. 2008).

El tipo de glicosilación de las proteínas de este organismo es la *O*-manosilación (Espitia & Mancilla, 1989), es decir, hay unión covalente únicamente con manosas por medio de enlaces *O*-glicosídicos a las cadenas laterales de algunas serinas y treoninas. González-Zamorano et. al. (2008) revelaron, por medio de la afinidad a Concanavalina A (una lectina de unión a manosas) que *M. tuberculosis* posee un alto número de proteínas manosiladas (Tabla 1); la mayoría de ellas son también lipoproteínas.

Tabla 1. Algunas de las proteínas manosiladas presentes en el sobrenadante de cultivo y extractos de membrana de *M. tuberculosis*. Tomado de González-Zamorano et. al. 2008.

protein name ^b	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv gene	NCBI accession number	theoretical M_r^c	theoretical pI ^f	Mowse score	matched peptides	sequence coverage %
Not identified							
Lipoprotein LpqW	<i>Rv1166</i>	gi/15608306	66.1	5.34	38	5	9
Lipoprotein LpqW	<i>Rv1166</i>	gi/15608306	66.1	5.34	47	2	3
Not identified							
Lipoprotein LpqW	<i>Rv1166</i>	gi/15608306	66.1	5.34	229	11	17
Lipoprotein LpqB	<i>Rv3244c</i>	gi/15610380	61.1	5.19	95	4	8
Bifunctional membrane-associated penicillin-binding protein 1A/1B PonA2	<i>Rv3682</i>	gi/57117145	84.5	5.34	66	5	7
Not identified							
Lipoprotein LpqB	<i>Rv3244c</i>	gi/15610380	61.1	5.19	223	12	27
Lipoprotein LpqB	<i>Rv3244c</i>	gi/15610380	61.1	5.19	202	12	25
Lipoprotein LpqB	<i>Rv3244c</i>	gi/15610380	61.1	5.19	216	11	23
Lipoprotein LpqB	<i>Rv3244c</i>	gi/15610380	61.1	5.19	255	15	34
Lipoprotein LpqB	<i>Rv3244c</i>	gi/15610380	61.1	5.19	353	13	20
Lipoprotein LpqF	<i>Rv3593</i>	gi/15610729	48.4	6.49	27	1	2

Tabla 1. Continuación.

protein name ^b	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv gene	NCBI accession number	theoretical M_r	theoretical pI	Mowse score	matched peptides	sequence coverage %
Secreted protease	<i>Rv2672</i>	gi/15609809	53.9	4.88	70	1	2
Secreted protease	<i>Rv2672</i>	gi/15609809	53.9	4.88	195	5	10
Not identified							
Peniplasmic oligopeptide-binding lipoprotein OppA	<i>Rv1280c</i>	gi/15608420	63.4	6.56	51	2	6
Hypothetical protein Rv3491	<i>Rv3491</i>	gi/15610627	20.3	6.23	40	1	3
Lipoprotein LppC	<i>Rv1911c</i>	gi/15609048	19.8	5.76	34	1	3
19 kDa lipoprotein antigen precursor LpqH	<i>Rv3763</i>	gi/15610899	15.1	6.54	98	2	22
19 kDa lipoprotein antigen precursor LpqH	<i>Rv3763</i>	gi/15610899	15.1	6.54	63	2	22
Hypothetical protein Rv2799	<i>Rv2799</i>	gi/15609936	22.8	6.81	41	1	4

La glicosilación en algunos antígenos se demostró para la glicoproteína Apa que se caracterizó al igual que Mpb83 de *M. bovis* (Mpt83 en *M. tuberculosis*). El análisis mostró que en Apa hay manosas unidas covalentemente a cuatro treoninas con un enlace α (1,2), mientras que Mpb83 es manosilada en dos treoninas con un enlace α (1,3) (Dobos et. al. 1996, Juárez et. al. 2001 y Michell et. al. 2003).

La importancia de la glicosilación de proteínas en la interacción con el sistema inmune se demostró en una recombinante de la glicoproteína Apa cuando un patrón distinto de manosilación provocó un decremento en la capacidad para estimular a los linfocitos T (Horn et. al. 1999).

La lipidación también influye con la patogénesis de la micobacteria. La existencia de lípidos en la membrana celular provee de un ambiente hidrofóbico en el cual se desencadenan solo ciertas reacciones bioquímicas; hay reportes que atribuyen la inmunogenicidad de las proteínas de membrana a la inherente hidrofobicidad y a su modificación lipídica (Rezwan et. al. 2007 y Sutcliffe & Harrington 2004).

2.4. Características del género *Streptomyces*.

Los miembros del género *Streptomyces* también pertenecen al orden taxonómico Actinomycetales (Gram positivas), son bacterias filamentosas aerobias (Kieser et. al. 2000). Su pared celular está constituida por peptidoglicanos que rodean a la membrana citoplasmática (Fig. 2).

Debido a que se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo, utilizan una gran variedad de compuestos orgánicos como fuente de carbono y producen una gran cantidad de metabolitos secundarios que son secretados al medio para llevar a cabo múltiples biotransformaciones; por lo que son organismos muy importantes a nivel industrial (Bentley et. al. 2002).

El ciclo de vida es muy complejo y se caracteriza por tener varios estadios morfológicos. Su forma de reproducción es a través de esporas, las cuales germinan y dan lugar a hifas multigenómicas; inicialmente se forma un micelio vegetativo que se adhiere al sustrato, posteriormente un micelio aéreo (Fig. 2), del cual, con su formación coincide con la biosíntesis de antibióticos (Büttner et. al. 2009).

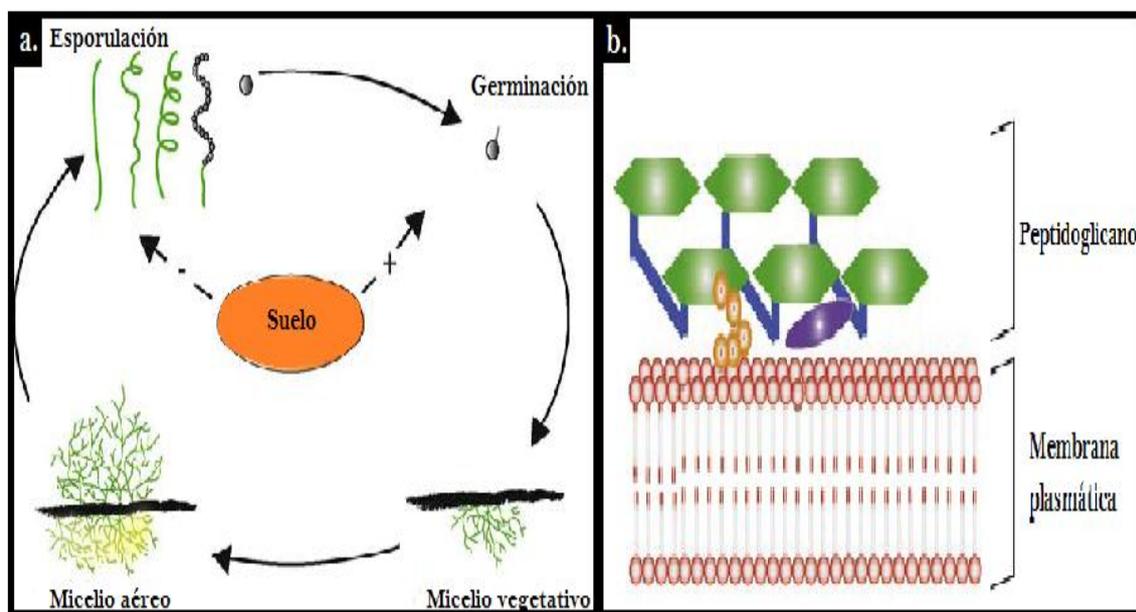


Figura 2. *Streptomyces*. **a.** Ciclo de vida. **b.** Composición de la pared celular. Modificado de Scherr et al. 2009.

En condiciones ambientales desfavorables las hifas del micelio aéreo se secan para dar lugar a las esporas, células individuales muy resistentes. El ciclo comienza de nuevo cuando las condiciones son favorables y toma lugar de nuevo la germinación de las esporas (Fig. 2). El crecimiento vegetativo de *Streptomyces* es multipolar, esto es, el crecimiento ocurre en múltiples sitios a lo largo del micelio (Büttner et. al. 2009).

Recientemente se han secuenciado los genomas de varias especies de este género. En la mayoría de las especies estudiadas se ha visto que presentan un cromosoma lineal en el cual los genes esenciales y el origen de replicación se localizan en el centro, mientras que los genes no esenciales se localizan en los extremos (Cole et. al. 1998, Bentley et. al. 2002, y Kieser et. al. 2000). Además, se caracterizan por tener una gran cantidad de genes que codifican para funciones de regulación genética y de transporte y degradación de nutrientes extracelulares (Bentley et. al. 2002).

Una característica importante es que cuentan con sistemas de restricción de DNA metilado. Estos sistemas funcionan como un mecanismo de defensa para distinguir entre el DNA celular (el cual no está modificado) y cualquier DNA exógeno que ingrese a la célula (metilado). Así el DNA que está modificado por metilación en ciertas bases es reconocido y después degradado por enzimas específicas (González-Cerón et. al. 2009).

2.5. Producción de proteínas recombinantes por *Streptomyces*.

Las especies del género *Streptomyces*, han sido empleadas para generar proteínas recombinantes de otros organismos debido a que poseen el mecanismo de modificación postraduccional por glicosilación, además de un sistema de secreción de proteínas.

Dada la heterogeneidad de su hábitat, *Streptomyces* cuenta con una gran cantidad de proteínas secretadas. Por ejemplo, en *S. coelicolor* A(3)2 se han identificado 819 genes que codifican para éste tipo de proteínas, entre las cuales se encuentran hidrolasas, proteasas, quitinasas, endoglucanasas y amilasas (Bentley et. al. 2002).

La forma a través de la que se secretan éstas proteínas es un sistema de tipo Sec (Kendall & Izard. 1994). Ésta vía ha sido empleada para secretar proteínas de otros organismos

generadas en *Streptomyces*. La secreción de una proteína tiene la ventaja de facilitar el proceso de extracción y purificación, así como reducir el riesgo de contaminación por proteínas propias del hospedero.

Una característica que hace que *S. lividans* sea el organismo más empleado, de éste género para realizar proteínas recombinantes, es que, además de ser más fácil de manejar en el laboratorio, posee un limitado sistema de modificación-restricción, lo cual es una limitante al trabajar con otras especies como *S. coelicolor* A(3)2, ya que se requiere forzosamente de utilizar DNA no metilado para realizar transformaciones o conjugaciones. Además, comparado con muchos otros *Streptomyces*, posee una baja actividad de proteasas, lo cual también podría interferir al tratar de purificar proteínas expuestas en la membrana o secretadas (Anné et. al., 2011).

Existen varios ejemplos de producción de proteínas recombinantes por *S. lividans*. La exoglucanasa de *Cellulomonas fimi* que fue expresada y glicosilada (MacLeod et. al. 1992); incluso se ha logrado la expresión de proteínas eucariontes como el TNF- α de ratón (Pozidis et. al. 2001).

2.6. Una comparación entre *Mycobacterium* y *Streptomyces*.

Ambas bacterias son representantes del orden taxonómico Actinomycetales (Tabla 2), que está conformado por bacterias Gram positivas con un alto contenido en guanina y citocina en su material genético (Scherr et. al. 2009).

Tabla 2. Clasificación taxonómica de los géneros *Mycobacterium* y *Streptomyces*.

Dominio	Bacteria	Bacteria
Phylum	Actinobacteria	Actinobacteria
Orden	Actinomycetales	Actinomycetales
Familia	Mycobacteriaceae	Streptomycetaceae
Género	<i>Mycobacterium</i>	<i>Streptomyces</i>

Los ciclos de vida de ambos géneros son distintos en cuanto al hábitat y a las morfologías de los organismos en cada una de las etapas del ciclo. *Streptomyces* son bacterias filamentosas y no patógenas, cuya composición de la pared celular es como la de cualquier otra Gram positiva, mientras que *Mycobacterium* son bacterias patógenas con una pared muy compleja que las hace más bien parecidas a la de las Gram negativas. A pesar de ello comparten muchas características a nivel genético, ya que son géneros filogenéticamente cercanos.

Del género *Streptomyces*, la especie más estudiada a nivel genómico es *Streptomyces coelicolor* A3(2), cuyo genoma ha sido secuenciado al igual que el de *M. tuberculosis* (Bentley et. al. 2002 y Cole et. al. 1998). El análisis comparativo ha revelado un alto grado de sintenia entre el cromosoma completo de *M. tuberculosis* y el centro del cromosoma de *S. coelicolor* (Fig. 3).

En ambas bacterias se encuentran conservados algunos genes individuales y clusters de genes que codifican para las funciones esenciales relacionadas con la división celular, replicación y transcripción del DNA, síntesis proteica y biosíntesis de aminoácidos (Bentley et. al. 2002). Cabe señalar que las maquinarias tanto de acilación, como de glicosilación de proteínas, también se encuentran conservadas (Espitia et. al. 2010; Lara et. al. 2004; Lamani et. al. 2006; Rezwan et. al. 2007 y Vanderven et. al. 2005).

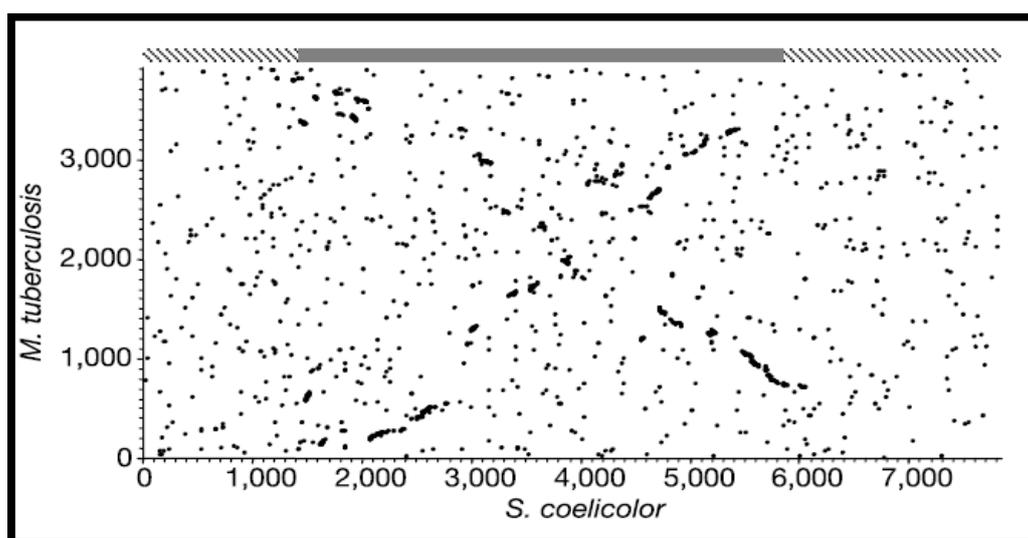


Figura 3. Comparación de los cromosomas de *S. coelicolor* A3(2) y *M. tuberculosis*. La barra trazada en la parte superior corresponde al cromosoma completo de *S. coelicolor* A3(2), solo la región sombreada se refiere al centro del cromosoma, en donde hay un mayor grado de sintenia con el cromosoma completo de *M. tuberculosis*. Tomado de Bentley et. al. 2002.

Streptomyces lividans es una especie similar a *S. coelicolor* A(3)2 con algunas diferencias a nivel genómico. Experimentalmente es un organismo más fácil de manejar ya que su ciclo de vida es más rápido; además se tienen bien descritos procedimientos de manipulación genética y clonación para este organismo. Kieser et. al (1996) han demostrado que, debido a las características genéticas que comparte con las especies del género *Mycobacterium*, *S. lividans* utiliza eficientemente promotores micobacterianos y expresar genes de *M. bovis* BCG.

Es así que *Streptomyces lividans* se ha empleado para generar proteínas recombinantes glicosiladas de *M. tuberculosis*; tal es el caso de la proteína Apa, la cual fue expresada como una recombinante secretada en *Streptomyces lividans* (Lara et. al. 2004), siendo glicosilada con manosas en los mismos aminoácidos que la proteína nativa en *M. tuberculosis*, lo cual testifica que las maquinarias de *O*-manosilación en ambos organismos están conservadas. Además, la proteína producida en *S. lividans* es reconocida por el suero de pacientes infectados.

2.7. Secreción de proteínas.

El transporte de proteínas bacterianas a través de la membrana de los actinomicetos, está relacionado con la presencia de un péptido señal y con las modificaciones postraduccionales de acilación y glicosilación. La conversión de las proteínas de una forma asociada a la membrana a una forma secretada, ocurre con frecuencia en lipoproteínas de bacterias Gram positivas y la glicosilación juega un papel importante en la regulación de este proceso, al menos en las micobacterias (Herrman et. al., 1996).

Las proteínas que están designadas a ser transportadas son previamente sintetizadas en el citoplasma. Se caracterizan por la presencia de una extensión en su porción N-terminal denominada péptido señal, que es requerida para su exportación (Kendall & Izard., 1994).

El péptido señal de secreción (Fig.4) es una secuencia de aminoácidos que posee una carga neta positiva en el extremo N-terminal (lisina, arginina e histidina), la cual permite

la interacción electrostática inicial con las cargas negativas de los fosfolípidos de la membrana, además de favorecer la interacción con las proteínas que ayudarán a su transporte. La región central del péptido señal está compuesta por aminoácidos hidrofóbicos que tienden a formar una α -hélice; en medio de ésta región hay un residuo interruptor (glicina o prolina) que forma una estructura de horquilla, esta secuencia es la que queda insertada dentro de la bicapa lipídica. El extremo C-terminal generalmente tiene aminoácidos neutros (alanina, glicina, serina y treonina), en esta porción se encuentra el sitio de corte (Rezwan et. al. 2007, Sutcliffe & Harrington 2004 y Tjalsma et. al. 2000).

Otro tipo de péptido señal es el de anclaje para lipoproteínas (Fig.4). En éste tipo, las regiones N-terminal y la región central son similares a las del péptido señal de secreción; sin embargo la porción C-terminal del péptido señal es distinta, ya que presenta un motivo de cuatro aminoácidos, conocido como “lipo-box”, entre los que se localiza un residuo de cisteína conservado que funciona como sitio de acilación para el anclaje a la membrana (Sutcliffe & Harrington 2004 y Tjalsma et. al. 2000).

La secreción de proteínas implica una serie de pasos: síntesis proteica, reconocimiento del péptido señal, inserción en la membrana, translocación, reconocimiento del sitio de corte del péptido señal por una peptidasa y, finalmente, la localización de la proteína madura (Kendall & Izard., 1994).

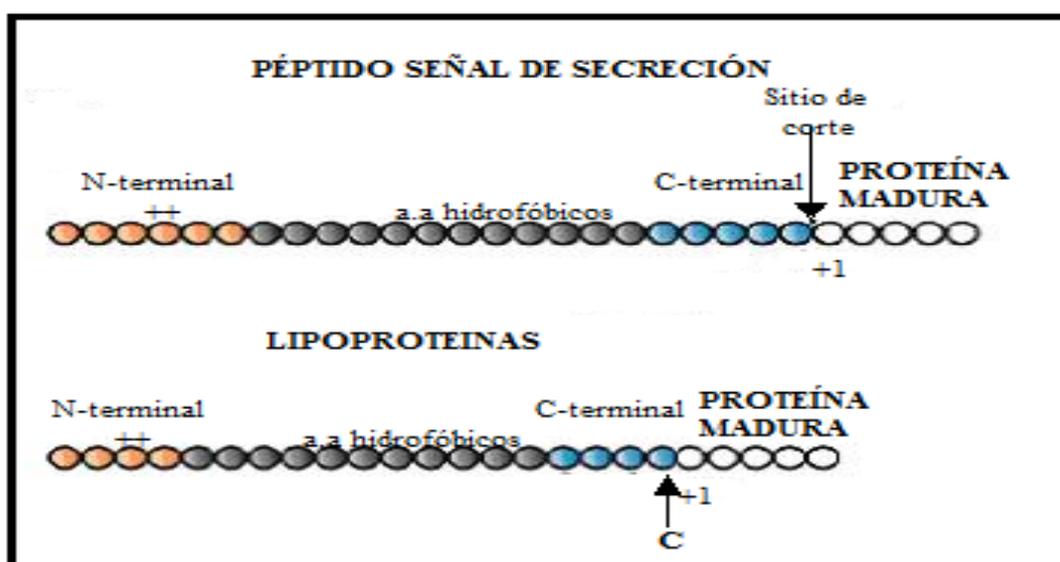


Figura 4. Péptidos señal de secreción y de anclaje. El color naranja indica la región N-terminal, el color gris indica la región central, el azul indica la región C-terminal del péptido señal y, el color blanco indica la proteína madura que comienza en el aminoácido +1. Modificado de Tjalsma et. al. 2000.

El sistema de translocación de proteínas preferentemente empleado es el sistema Sec, en el que están involucradas una serie de proteínas que se enlistan a continuación: SecB, es una proteína citoplásmica que actúa como chaperona durante el transporte. SecA, es la ATPasa que brinda la energía para el proceso, se encuentra en forma soluble o anclada a la membrana interna. SecE y SecY son proteínas integrales de membrana involucradas con la translocación. Por último, SecD es otra proteína integral de membrana que ayuda a la liberación de la proteína madura de la membrana (Kendall & Izard., 1994). Cuando el péptido señal indica que la proteína debe ser secretada y no quedarse anclada en la membrana, después del proceso de translocación, las peptidasas reconocen el sitio de corte y liberan el péptido (Sutcliffe & Harrington 2004).

El sistema de translocación Sec está relacionado con las modificaciones de acilación y *O*-manosilación, al menos en los actinomicetos (Rezwan et. al. 2007, y Espitia et. al.2010).

2.8. Síntesis de lipoproteínas en actinomicetos.

La lipidación es requerida para el anclaje y organización de proteínas en la superficie celular. Las lipoproteínas representan un subgrupo de proteínas secretadas caracterizadas por la presencia de un motivo llamado “lipo-box”. Este motivo, que funciona como señal de reconocimiento, está localizado en el extremo N-terminal del péptido señal y consiste en cuatro aminoácidos con un residuo de cisteína conservado (Babu et. al. 2006 y Rezwan et. al. 2007).

El precursor de una lipoproteína está unido a la membrana celular y sufre modificaciones, las cuales están mediadas por la actividad de tres enzimas localizadas en la membrana plasmática: Prolipoproteína diacilglicerol transferasa (Lgt), Prolipoproteína peptidasa señal II (LspA) y Lipoproteína N-aciltransferasa (Lnt) (Rezwan et. al. 2007).

El residuo lipídico unido covalentemente al motivo de la cisteína conservada permite el anclaje de la proteína en la membrana por interacción hidrofóbica. En bacterias Gram +, generalmente las lipoproteínas están ancladas en la membrana plasmática (en la cara

interna). Sin embargo, el análisis proteómico de extractos fraccionados de *M. tuberculosis* mostró que algunas lipoproteínas se encuentran en la fracción citosólica y otras en la fracción externa (Mawuenyega et. al. 2005).

Las lipoproteínas son sintetizadas como pre-prolipoproteínas y maduran por modificaciones postraduccionales. La primera que actúa es Lgt, la cual adiciona un residuo diacilglicerol al grupo tiol de la cisteína conservada en la secuencia señal. Este lípido es derivado del fosfatidilglicerol de la membrana lipídica. Luego, la enzima LspA se encarga de cortar el péptido señal justamente frente a la cisteína modificada. Las lipoproteínas que ya han sido procesadas por LspA son después modificadas por Lnt quien añade un tercer residuo acilo al grupo amino de la cisteína modificada; el grupo acilo es donado por fosfatidiletanolamina o fosfatidilglicerol. En *Mycobacterium*, la modificación hecha por Lnt es necesaria para el transporte de las lipoproteínas a través de los ácidos micólicos de la pared (Rezwan et. al. 2007).

En *M. tuberculosis* Lnt es codificada por el gen Rv2051 y tiene dos dominios, el extremo C-terminal corresponde al dominio transmembranal de una proteína poliprenol fosfato manosa sintasa que interviene en el mecanismo de O-manosilación (Baulard et. al. 2003). Homólogos de Lnt se encuentran en *Streptomyces* y *Corynebacterium* (Espitia et. al. 2010).

2.9. Mecanismo de O-manosilación de proteínas en actinomicetos.

La glicosilación consiste en la unión covalente de azúcares a los aminoácidos de las proteínas y es de dos tipos. La O-glicosilación se da con la unión del azúcar con el grupo hidroxilo de las cadenas laterales de serina, treonina, hidroxiprolina o tirosina, mientras que la N-glicosilación es la unión del azúcar al grupo amino de la asparagina (Herrmann et. al. 1996). La glicosilación es muy variada en cuanto al número, la posición y el tipo de carbohidratos que se adicionan a una proteína, lo cual crea proteínas con ramificaciones muy complejas.

La O-manosilación de proteínas requiere de proteínas glicosiltransferasas, azúcares y lípidos acarreadores (Espitia et. al. 2010). La vía biosintética de O-manosil glicanos en los

actinomicetos fue inicialmente caracterizada en micobacterias con un ensayo de glicosilación fuera de la célula y con péptidos sintéticos derivados de la proteína Apa (Cooper et. al. 2006). Los experimentos demostraron que la manosa debe ser primero activada en un lípido de membrana fosforilado. En actinomicetos la membrana citoplasmática alberga poliprenoles fosforilados, que son lípidos acarreadores de manosa, estos son activados y manosilados por la enzima poliprenol fosfato manosa (Ppm) sintasa (Cooper et. al. 2002 y Espitia et. al. 2010).

La enzima Ppm sintasa participa en la manosilación de lípidos de la membrana de *Mycobacterium*, como el lipomanano (LM), lipoarabimano (LAM) y fosfatidilinositolmanósido (PIM). Esta enzima también está presente en *S. coelicolor* mostrando que los dominios catalíticos están altamente conservados entre ellos (Cowlisaw & Smith, 2002 y Espitia et. al. 2010).

La *O*-manosilación en actinomicetos es llevada a cabo por una manosil transferasa de proteínas (Pmt) homóloga a la de eucariontes. La Pmt es una proteína integral de membrana con once dominios transmembranales que necesita de manosa activada en una molécula de Ppm para hacer el enlace (Vandervan et. al. 2005). Al carecer los actinomicetos de aparato de Golgi y retículo endoplásmico, la reacción se realiza en la membrana citoplasmática y depende de la manosa activada. En *M. tuberculosis* la *O*-manosilación depende del sistema de translocación mediada por Sec, ya que la unión de azúcares se da para su secreción (Vandervan et al 2005; Espitia et. al. 2010).

No está claro si otras glicosiltransferasas son responsables de la unión de moléculas de manosa adicionales a la primera manosa unida por la Pmt. La única glicoproteína de actinomicetos que se ha caracterizado en detalle es la proteína Apa, en donde hay di o tri manosas en configuración α (1,2) (Dobos et. al. 1996), esta estructura también está presente en LAM, lo cual sugiere que la enzima encargada de manosilar LAM está también involucrada en la manosilación de la proteína Apa. Una observación interesante es que *S. coelicolor* no sintetiza LAM, pero sí glicosila Apa (Espitia et. al. 2010).

Aparentemente para la glicosilación no hay una secuencia específica que sirva como señal para determinar cuáles residuos de serina o treonina serán manosilados. Análisis estadísticos alrededor de residuos de serina y treonina manosilados revelan que hay un

número elevado de residuos de prolina alrededor del sitio de glicosilación, en comparación con los residuos de serina y treonina sin glicosilar. Los residuos de prolina en las posiciones -1 y/o +3 favorecen la glicosilación. Un ambiente local rico en prolina es suficiente aparentemente para la glicosilación por parte de Pmt (Christlet et. al. 2001).

2.10. La glicoproteína de 19kDa de *M. tuberculosis*.

Un componente glicosilado de *M. tuberculosis* es la lipoproteína de 19kDa codificada por el Gen Rv3763. Es un antígeno biológicamente muy activo ya que actúa en el reconocimiento de la bacteria, desencadena una respuesta inmune tipo celular y humoral e induce producción de varias citocinas; por tales motivos ha sido ampliamente estudiado.

2.11. Características estructurales del antígeno de 19kDa.

El antígeno de 19kDa de *M. tuberculosis*, codificado por el gen Rv3763, es una glicoproteína de membrana que presenta un péptido señal de secreción para lipoproteínas. Su glicosilación es de tipo *O*-manosilación (González-Zamorano et. al. 2008), aunque se desconoce el tipo de enlace con el que se unen los azúcares a la proteína.

Por medio de mutagénesis, se identificaron algunos sitios de unión a manosas. Se proponen como sitios de glicosilación dos “cluster” de dos y tres residuos de treonina en las posiciones 13 al 15 y 19 al 20 de la proteína madura, respectivamente (Fig. 5); Herrmann et. al (1996) observaron que al reemplazar estos residuos de treonina por valina se reducía la glicosilación del polipéptido; asimismo, la proteína se proteolizó en pequeños péptidos; esto mostró que la glicosilación en *M. tuberculosis* funciona como un mecanismo regulador entre la forma secretada de un antígeno y la forma anclada a la pared para llevar a cabo diferentes funciones.

Dentro de la secuencia de aminoácidos hay otros probables sitios de glicosilación, algunos residuos de treonina y serina (Fig. 5), que no han sido probados y de los que no se sabe su papel en la manosilación del péptido. Por medio del análisis NetOglyc

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>), es posible predecir cuáles son los aminoácidos que son sitios potenciales de *O*-glicosilación (Herrmann et. al. 2000).

Translation of Rv3763 (19kDa)
Universal code
Total aminoacid number 165

V	K	R	G	L	T	V	A	V	A	G
A	A	I	L	V	A	G	L	S	G	C
										← Anclaje a membrana
S ₂	S ₃	N ₄	K ₅	S ₆	T ₇	T ₈	G ₉	S ₁₀	G ₁₁	E ₁₂
T ₁₃	T ₁₄	T ₁₅	A ₁₆	A ₁₇	G ₁₈	T ₁₉	T ₂₀	A ₂₁	S ₂₂	P ₂₃
G ₂₄	A ₂₅	A ₂₆	S ₂₇	G ₂₈	P ₂₉	K ₃₀	V ₃₁	V ₃₂	I ₃₃	D ₃₄
G ₃₅	K ₃₆	D ₃₇	Q ₃₈	N ₃₉	V ₄₀	T ₄₁	G ₄₂	S ₄₃	V ₄₄	V ₄₅
C ₄₆	T ₄₇	T ₄₈	A ₄₉	A ₅₀	G ₅₁	N ₅₂	V ₅₃	N ₅₄	I ₅₅	A ₅₆
I ₅₇	G ₅₈	G ₅₉	A ₆₀	A ₆₁	T ₆₂	G ₆₃	I ₆₄	A ₆₅	A ₆₆	V ₆₇
L ₆₈	T ₆₉	D ₇₀	G ₇₁	N ₇₂	P ₇₃	P ₇₄	E ₇₅	V ₇₆	K ₇₇	S ₇₈
V ₇₉	G ₈₀	L ₈₁	G ₈₂	N ₈₃	V ₈₄	N ₈₅	G ₈₆	V ₈₇	T ₈₈	L ₈₉
G ₉₀	Y ₉₁	T ₉₂	S ₉₃	G ₉₄	T ₉₅	G ₉₆	Q ₉₇	G ₉₈	N ₉₉	A ₁₀₀
S ₁₀₁	A ₁₀₂	T ₁₀₃	K ₁₀₄	D ₁₀₅	G ₁₀₆	S ₁₀₇	H ₁₀₈	Y ₁₀₉	K ₁₁₀	I ₁₁₁
T ₁₁₂	G ₁₁₃	T ₁₁₄	A ₁₁₅	T ₁₁₆	G ₁₁₇	V ₁₁₈	D ₁₁₉	M ₁₂₀	A ₁₂₁	N ₁₂₂
P ₁₂₄	M ₁₂₅	S ₁₂₆	P ₁₂₇	V ₁₂₈	N ₁₂₉	K ₁₃₀	S ₁₃₁	F ₁₃₂	E ₁₃₃	I ₁₃₄
E ₁₃₅	V ₁₃₆	T ₁₃₇	C ₁₃₈	S ₁₃₉	* ₁₄₀	P ₁₄₁	K ₁₄₂	A ₁₄₃	C ₁₄₄	R ₁₄₅
C ₁₄₆	G ₁₄₇	I ₁₄₈								

Figura 5. Secuencia de aminoácidos del antígeno 19kDa de *M. tuberculosis* mostrando la Cisteína de anclaje a membrana y su péptido señal en color gris, la numeración de los aminoácidos inicia a partir de la Cisteína de anclaje. Los 5 residuos de Treonina marcados en rojo son sitios de glicosilación propuestos por Herrmann et. al., 1996. Los aminoácidos marcados en azul son otros probables sitios de glicosilación que indica el análisis con el programa NetOglyc.

Por otra parte, el análisis glicoproteómico de la membrana de *M. tuberculosis*, mostró que la proteína de 19kDa, es reconocida por la Concanavalina A (lectina de unión a

manosas), como varias manchas o “spots” en una electroforesis de doble dimensión. El punto isoeléctrico (pI) predicho para esta proteína es de 6.54, sin embargo, ninguno de los “spots” identificados correspondió con ese pH. Las posibles causas de este comportamiento es que podría tratarse de glicofomas de la proteína de 19kDa, con diferencias en la manosilación (González-Zamorano et. al. 2008).

2.12. Características inmunológicas.

Se sabe que cuando *M. tuberculosis* entra en el organismo, el primer evento que ocurre es la adherencia de la bacteria por receptores de la superficie de los macrófagos alveolares, entre los cuales se encuentra el receptor de manosa (Sthal & Ezekowitz, 1995). Un componente ampliamente representado en la membrana de *M. tuberculosis* es LAM, un glicolípido que interactúa con estos receptores. Aunque es el mayor componente de la membrana de las micobacterias, no es el único que se une a los receptores de superficie de las células. Díaz-Silvestre, et. al. (2005) demostraron que al igual que LAM, el antígeno de 19kDa, sobreexpresado en una recombinante de *M. smegmatis*, actúa como una adhesina que interactúa con el receptor de manosas en macrófagos alveolares, promoviendo la fagocitosis por estas células en la respuesta inmune innata.

Se ha demostrado que el antígeno de 19kDa es reconocido también por receptores tipo Toll (TLR), los cuales reconocen patrones moleculares (Akira et. al. 2001); específicamente es reconocido por TLR-2 que identifica lipoproteínas. La activación de TLR-2 induce la producción de citocinas proinflamatorias como la interleucina IL-12p40. Esta citocina actúa generando la respuesta T_{H1} (Brightbill et. al. 1999, Méndez-Samperio et. al. 2010 y Stewart et. al. 2005).

Stewart et. al. (2005), sobreexpresaron el antígeno de 19kDa en *M. tuberculosis* y observaron que además de IL-12p40, también se promovía que los monocitos, macrófagos y células dendríticas secretaran algunas citocinas, como TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral) un potente mediador de la respuesta inmune e IL-1 β , encargada de atraer las células efectoras al sitio de lesión. Este efecto favorece la respuesta inmune contra la micobacteria.

Sin embargo, dentro del monocito, actúa también inhibiendo el procesamiento antigénico y la expresión de MHC-II dependiente de la activación de TLR-2 (Noss et. al. 2001 y Pai et. al. 2004); por lo tanto la presentación antigénica y la activación de los linfocitos T CD4⁺ se ven afectadas; esto representa un mecanismo de evasión al sistema inmune por parte de la micobacteria ya que las células T no identifican a los macrófagos infectados y no los destruyen, así puede mantenerse la infección latente (Noss et. al. 2001 y Stewart et. al., 2005).

Las modificaciones postraduccionales como la acilación o la glicosilación tienen efectos en la inmunogenicidad del antígeno de 19kDa. Es así que la inmunización con lipopéptidos induce la respuesta por células T y la glicosilación modifica la capacidad de los péptidos para unirse a moléculas de MHC específicas (Garbe et. al., 1993).

Por otra parte, la función fisiológica de la proteína es desconocida, aunque se postula que es importante para el crecimiento ya que algunos reportes muestran que la delección del gen que codifica para esta proteína reduce el crecimiento de *M. tuberculosis*, al menos en algunos roedores (Sasseti & Rubin 2003) y dentro de los macrófagos humanos activados por INF- γ ; pero no lo es así para el crecimiento en medio de cultivo (Stewart et. al., 2005).

Garbe et. al. (1993), lograron expresar el antígeno de 19kDa en una micobacteria saprófita y de rápido crecimiento, *Mycobacterium smegmatis*. La proteína de 19kDa se localizó en la membrana y además se encontró en una forma glicosilada; sin embargo, tuvo una respuesta cinco veces más potente que la generada por *M. tuberculosis*, en cuanto a la proliferación de las células T.

3. ANTECEDENTES

Lara et. al. (2004) lograron expresar el antígeno Apa de *M. tuberculosis* en *S. lividans*. El análisis estructural demostró que la proteína expresada y secretada por *S. lividans* fue manosilada en los mismos sitios de glicosilación como ocurre en *M. tuberculosis*, tanto en el extremo amino, como en el carboxilo terminal de la proteína nativa; además, al ser secretada, su péptido señal fue cortado en el mismo sitio que es cortado por *M. tuberculosis*. Otro dato interesante es que la proteína recombinante purificada fue reconocida eficientemente por el suero de pacientes infectados con *M. tuberculosis* y por los anticuerpos monoclonales MAb 6A3 (Lara et. al. 2004).

4. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, cerca de dos mil millones de personas, lo que equivale a un tercio de la población mundial, ha estado expuesta a *M. tuberculosis* y puede presentarla como una enfermedad latente (WHO: Report 2011); se estima que cada año ocho millones de personas son infectadas con el bacilo y que alrededor de 2 millones mueren a causa de la enfermedad (Gandhi et. al. 2010 y Meya & McAdam, 2007).

Se han identificado varias glicoproteínas expuestas en la membrana de las micobacterias involucradas con el reconocimiento del sistema inmune y en las reacciones posteriores que ayudan al mantenimiento de la infección (González-Zamorano et. al. 2008); varios de estos antígenos han sido propuestos como candidatos para combatir la enfermedad expresándolos en vacunas recombinantes o como blanco terapéutico (Espitia & Mancilla 1989, Hart et. al. 1997, Mustafa 2002, Rao et. al. 2004). Para continuar con su estudio es necesaria una gran producción de estas proteínas; sin embargo, existen algunas dificultades para obtenerlas en suficientes cantidades como se requiere. Esto se debe en gran medida a las extremas condiciones de seguridad que se requieren para trabajar con *M. tuberculosis* debido a su patogenicidad, lo cual restringe la investigación acerca de la bacteria; además, es un microorganismo de muy lento crecimiento lo que también es una limitación experimental.

S. lividans es un actinomiceto relacionado con *M. tuberculosis*, en el que se expresan proteínas recombinantes que están modificadas con azúcares, lo cual es una limitante en otras bacterias de muy rápido crecimiento, ya que los organismos modelo como *Escherichia coli*, no tienen la maquinaria necesaria para la glicosilación de proteínas; es así que, a pesar de que se logra su expresión el efecto inmunológico no es el mismo que el de la proteína en *M. tuberculosis* (Hart et. al. 1997. y Garbe et. al. 1993).

Por otra parte, se ha demostrado que *S. lividans* es un organismo que expresa eficientemente proteínas micobacterianas utilizando sus propios promotores (Espitia et. al. 2004 y Kieser et. al. 1996).

Además de presentar un sistema de manosilación semejante al de las micobacterias, el trabajar con *S. lividans* ofrece otras ventajas, como una mejor manipulación en el laboratorio dado que su tiempo de división celular es más rápido (4 horas en medio mínimo), aparte de que no requiere tantas condiciones de bioseguridad ya que no es una bacteria patógena (Kieser et. al. 2000).

Así, el objetivo de este proyecto es clonar el gen Rv3763 de *M. tuberculosis*, el cual codifica para la glicoproteína de 19kDa en *S. lividans*, detectar su presencia en membrana y en sobrenadante, tanto de la proteína silvestre como de una recombinante secretada y comprobar la glicosilación con una lectina de unión específica a manosas (Concanavalina A).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General:

- Clonar el gen Rv3763 de *M. tuberculosis* en *S. lividans* para la expresión de la glicoproteína de 19kDa.

5.2. Objetivos Particulares:

- Realizar una construcción para la expresión en *E. coli* de la proteína de 19kDa sin péptido señal y con una cola de 6 Histidinas para facilitar su purificación.
- Obtener anticuerpos policlonales de conejo contra la proteína purificada de 19kDa.
- Comprobar la presencia y manosilación de la proteína de 19kDa en membranas de *S. lividans* que expresen el gen Rv3763 con su propio péptido señal.
- Realizar una construcción para secretar la proteína de 19kDa en *S. lividans* a través de una recombinante que contenga un péptido señal de secreción, y comprobar su expresión y manosilación.

6. METODOLOGÍA

6.1. Cepas bacterianas y plásmidos.

Las cepas y plásmidos empleados en el presente estudio se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Cepas bacterianas y plásmidos empleados en el presente trabajo.

Cepa/Plásmido	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Rosetta	Para la expresión de la proteína de 19 kDa sin su péptido señal ni cisteína de anclaje a membrana. Contiene el plásmido pRARE (Cm ^R) que codifica para 6 tRNAs raros. Facilita la expresión de genes que contienen estos codones raros para <i>E. coli</i> (con alto contenido en GC).	Novagen
<i>E. coli</i> ET12567	dam-13::Tn9,dcm-6, hsd-M. Empleada para conjugar los plásmidos integrativos con <i>Streptomyces</i> . Contiene plásmido pUZ8002 que contiene genes necesarios para la transferencia entre <i>E. coli</i> y <i>Streptomyces</i> .	MacNeil et. al., 1992
<i>E. coli</i> IBEC58	Δ dam, Δ dcm, Δ hsd, derivada de BW25113. Para obtener DNA plasmídico sin metilación.	González-Cerón et. al., 2009.
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F</i> endA1 hsdR17 (r _k ⁻ m _k ⁺) supE44 thi-1 λ recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ (lacZYA-argF) U169 ϕ 80dlacZ Δ M15. Utilizada para secuenciar los fragmentos obtenidos.	Grant et. al., 1990.
<i>S. lividans</i> 1326	Cepa silvestre de <i>S. lividans</i> 66. Para las pruebas de expresión y glicosilación de la proteína.	John Innes Centre
pUCBM21	Utilizado para la clonación y secuenciación de los fragmentos obtenidos.	
pET28a	Vector de expresión, Kan ^R . Empleado para la expresión de proteínas con cola de 6xHis en el extremo N terminal.	Novagen
pBD1	Gen Rv3763 sin porción que codifica el péptido señal ni la cisteína de anclaje, introducido en los sitios <i>Nde</i> I- <i>Eco</i> RI dentro del plásmido pET28. .	Éste trabajo.
pIJ6902	Vector de <i>E. coli</i> que funciona como integrativo y de expresión en <i>Streptomyces</i> (Apra ^R) Empleado para	Huang et. al., 2005.

	expresar el gen Rv3763 con su propio péptido señal en <i>S. lividans</i> 1326 a partir del promotor P _{tipA} .	
pBD2.1	Gen Rv3763 completo clonado con los sitios <i>NdeI</i> - <i>EcoRI</i> en el vector pIJ6902.	Este trabajo.
pBD2.2	Gen Rv3763 modificado para cambiar el péptido señal de la proteína de 19kDa por el de la lipasa de <i>S. exfoliatus</i> M11, clonado con los sitios <i>NdeI</i> - <i>EcoRI</i> en el vector pIJ6902.	Este trabajo.
pIJ6021	Vector de expresión de alto número de copias de <i>Streptomyces</i> (Kan ^R). Contiene el promotor inducible con tioestrepton P _{tipA} . Empleado para sobreexpresar proteínas en <i>S. lividans</i> 1326	Takano et. al., 1995.
pBD3.1	Gen Rv3763 completo clonado con los sitios <i>NdeI</i> - <i>EcoRI</i> en el vector pIJ6021.	Este trabajo.
pBD3.2	Gen Rv3763 modificado para cambiar el péptido señal de la proteína de 19kDa por el de la lipasa de <i>S. exfoliatus</i> M11, clonado con los sitios <i>NdeI</i> - <i>EcoRI</i> en el vector pIJ6021.	Este trabajo

6.2 Amplificación y clonación del gen Rv3763.

El DNA cromosómico de *M. tuberculosis* H37Rv fue donado por la Dra. Yolanda López Vidal (Facultad de Medicina, UNAM), de donde fue obtenido el gen Rv3763. Para amplificar este gen se realizaron reacciones de PCR, con la enzima Pfu Ultra DNA polimerasa AD (Stratagene), utilizando como templado el DNA cromosómico; los oligonucleótidos para estas reacciones se muestran en la tabla 4. Algunos sitios de restricción fueron incluidos como extensiones para la posterior manipulación de los fragmentos amplificados, en particular, el sitio *NdeI* fue introducido debido a que contiene el codón ATG de inicio del gen.

Para obtener el gen Rv3763 sin su péptido señal, se diseñaron dos oligonucleótidos, en los cuales, se incluyeron como extensiones los sitios de restricción de las enzimas *HindIII*-*NdeI*, en el primer *forward* y *EcoRI* en el primer *reverse* (tabla 4). El producto de PCR fue inicialmente clonado en el vector pUCBM21 dentro de los sitios *HindIII*-*EcoRI*; este

plásmido se introdujo por electroporación (Ver anexo #2) en la cepa de *E. coli* DH5 α y se realizó extracción de DNA plasmídico para checar algunas colonias por patrón de restricción y así secuenciar las probables construcciones correctas. Una vez verificada la secuencia, se introdujo el fragmento en el vector pET28a dentro de los sitios *NdeI-EcoRI*. Este plásmido fue denominado pBD1 y se empleó para inducir la expresión de la proteína y purificarla de *E. coli* BL21 *Rosetta*.

Por otra parte, se generaron dos construcciones que contenían el gen Rv3763 completo, para la expresión o sobreexpresión de la proteína con su propio péptido señal en *S. lividans*. Por medio de una reacción de PCR se amplificó el gen Rv3763 a partir del DNA cromosómico de *M. tuberculosis* con dos oligonucleótidos que contenían como extensiones los sitios de restricción de las enzimas *XbaI-NdeI*, en el primer *forward* y *EcoRI* en el primer *reverse* (tabla 4). Los sitios *XbaI-EcoRI* permitieron la ligación del inserto dentro del vector pUCBM21, ésta construcción fue electroporada en *E. coli* DH5 α para posteriormente obtener DNA plasmídico y verificar la secuencia. Los sitios *NdeI-EcoRI* permitieron la ligación en los vectores de expresión pIJ6902 y pIJ6021, dando lugar a los plásmidos pBD2.1 y pBD3.1 respectivamente, los cuales fueron posteriormente transformados en *S. lividans* para inducir la expresión de la proteína de 19kDa.

Por último, para obtener el inserto del gen Rv3763 con el péptido señal de la lipasa de *S. exfoliatus*, se realizaron dos amplificaciones por PCR. En una primera reacción, se amplificó el péptido señal de la lipasa de *S. exfoliatus*; el primer *forward* incluyó a la secuencia los sitios de restricción de las enzimas *BamHI* y *NdeI* (tabla 4), mientras que el primer *reverse* incluyó como extensión en el extremo 3' el inicio del gen Rv3763 después de la cisteína de anclaje a membrana.

Con el fin de fusionar el péptido señal de la lipasa de *S. exfoliatus* con el gen Rv3763, el producto del PCR anterior y el gen Rv3763 completo ya amplificado fueron utilizados como templado para una segunda reacción (“overlap PCR”). Para ésta se empleó el oligonucleótido *forward* utilizado en la reacción que amplificó el péptido señal M11, y el oligonucleótido *reverse* con el cual se amplificó el gen Rv3763, cada uno con los sitios de restricción antes mencionados, y los cuales se enlistan en la tabla 4.

El resultado de ésta última reacción fue el gen Rv3763 con el péptido señal de la lipasa de *S. exfoliatus*, con los sitios de restricción de las enzimas *Bam*HI-*Nde*I en el extremo 5' y *Eco*RI en el extremo 3'. Para verificar la secuencia del inserto, se clonó con los sitios *Bam*HI-*Eco*RI en el vector pUCBM21 y se introdujo por electroporación en *E. coli* DH5 α , tal como se realizó con las demás construcciones. Por otra parte, los sitios *Nde*I-*Eco*RI se emplearon para ligar el inserto en los vectores de expresión pIJ6902 y pIJ6021, generando así los plásmidos pBD2.2 y pBD3.2, respectivamente.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones realizadas en este estudio.

Templado	Oligonucleótidos	Producto de PCR
DNA cromosomal de <i>M. tuberculosis</i> .	<p><i>Foward:</i> 5' <u>GCTCTAGACATATGA</u>AAGCGTGGACTGACGG 3' <i>Xba</i>I <i>Nde</i>I</p> <p><i>Reverse:</i> 5' GGA<u>AATTCCGCATCGACACGCTTTAG</u> 3' <i>Eco</i>RI</p>	Gen Rv3763 completo (504pb).
DNA cromosomal de <i>M. tuberculosis</i> .	<p><i>Foward:</i> 5' CCCA<u>AAGCTTCATATG</u>TCAAGCAACAAGTCGACTACAGGA 3' <i>Hind</i>III <i>Nde</i>I</p> <p><i>Reverse:</i> 5' GGA<u>AATTCCGCATCGACACGCTTTAG</u> 3' <i>Eco</i>RI</p>	Gen Rv3763 sin codificar péptido señal ni cisteína de anclaje (445pb).
Péptido señal de la lipasa de <i>S. exfoliatus</i>	<p><i>Foward:</i> 5' <u>GCGGATCCATATG</u>CCCCAGCACCTCC 3' <i>Bam</i>HI <i>Nde</i>I</p> <p><i>Reverse:</i> 5' CCTGTAGTCGACTTGTTGCTTGAGGCCGCGGCCCTGG 3'</p>	Péptido señal de la lipasa de <i>S. exfoliatus</i> conteniendo el inicio del gen Rv3763.
Producto del PCR anterior y el Gen Rv3763 completo.	<p><i>Foward:</i> 5' <u>GCGGATCCATATG</u>CCCCAGCACCTCC 3' <i>Bam</i>HI <i>Nde</i>I</p> <p><i>Reverse:</i> 5' GGA<u>AATTCCGCATCGACACGCTTTAG</u> 3' <i>Eco</i>RI</p>	Gen Rv3763 con el péptido señal M11 (591pb).

6.3 Purificación de la proteína 19kDa por cromatografía de afinidad.

La construcción pBD1 fue introducida por electroporación en *E. coli* BL21 (Ver anexo #2) *Rosetta*. Esta cepa se creció en medio líquido YT2X (Ver anexo #1) y la expresión de la proteína se indujo con 100µg/ml de IPTG. El cultivo fue centrifugado a 7500rpm, 10 minutos a temperatura ambiente; el botón celular se sonicó a 30 pulsos de 20 segundos cada uno y la fracción soluble se hizo pasar por la columna, la cual fue previamente empacada con resina NiNTA y equilibrada con buffer de lisis (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, imidazol 10mM, pH8). La muestra fue aplicada a la columna, se dejó pasar lentamente y se recolectó. La columna se lavó con un buffer de lavado A que contenía NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, imidazol 20mM, pH8; posteriormente se lavó con un buffer de lavado B que contenía NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, imidazol 50mM, pH8; por último se eluyó con un buffer de elusión que contenía NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, imidazol 250mM, pH8; de los lavados y la elusión se recolectaron fracciones. La proteína purificada se cuantificó por medio del método de Bradford con albúmina 0.5mg/ml como estándar. Las fracciones fueron analizadas en geles de poliacrilamida-SDS 16%, y de una de éstas se elaboraron geles preparativos, los cuales se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. Con la proteína purificada e identificada con Rojo Ponceau en las membranas de nitrocelulosa se inmunizaron dos conejas NZA de ocho semanas de edad, aplicando 2 retos con 100 µg de proteína cada uno, para la obtención de anticuerpos policlonales anti-19kDa en el suero.

6.4. Clonación en los vectores de expresión de *S. lividans*.

Las construcciones en vector integrativo (pBD2.1 y pBD2.2) fueron primero transformadas por electroporación en la cepa de *E. coli* ET12567 (Ver anexo #2) y se seleccionaron con 50µg/ml de apramicina. Para introducir éstas construcciones en *S. lividans* 1326, se conjugó con *E. coli* ET12567 que ya contenía cada uno de los plásmidos (Ver anexo #3), seleccionando las colonias transformadas con 50µg/ml de apramicina.

Por otra parte, los plásmidos pBD2.1 y pBD2.2 fueron introducidos por electroporación en *E. coli* IBEC58, para asegurar que el DNA no estaría metilado para aumentar la eficiencia de transformación al introducir el gen en el vector de alto número de copias en *S. lividans*. Para esto, se realizó extracción de DNA plasmídico de un cultivo en medio líquido YT2X (Ver anexo #5) de estas clonas, luego se digirieron en los sitios de restricción NdeI-EcoRI y se corrió un gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 0.6% para extraer la banda que correspondía al inserto por el protocolo de purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa LMP (Ver anexo #4). El inserto se ligó con la enzima T4 DNA ligasa en el vector pIJ6021, dando como resultado pBD3.1 y pBD3.2, respectivamente; dichos plásmidos se transformaron en *S. lividans* 1326 por transformación con polietilenglicol (PEG), de acuerdo al método de Kieser et. al., 2000 (Ver anexo #6). De la transformación resultaron colonias aisladas, las cuales se sembraron en sectores en medio MS con 50µg/µl de Kanamicina, se incubaron a 30°C y después de esporular se extrajo DNA plasmídico para verificar la transformación por digestión con enzimas de restricción. Con el DNA plasmídico de los sectores que contenían la construcción correcta se retransformó *S. lividans* 1326; posteriormente se sembraron cultivos confluentes en MS con 50µg/ml Kanamicina, se incubaron a 30°C por una semana, luego de esporular se cosecharon las esporas y se almacenaron en glicerol al 20%.

6.5. Expresión del antígeno de 19kDa en *S. lividans*.

Las esporas de *S. lividans* 1326 con cada una de las construcciones fueron centrifugadas a 6000 rpm por 6 minutos para retirar el glicerol, posteriormente se lavaron con H₂O y se resuspendieron en medio YT2X para pregerminar incubando a 37°C en agitación. Después de 6 horas, el cultivo se centrifugó y se retiró el sobrenadante; las esporas pregerminadas fueron resuspendidas en medio LB con azúcar 25% (Ver anexo #1) y 50µg/ml de kanamicina (para vector pIJ6021) o 50µg/ml de apramicina (para vector pIJ6902). La expresión de la proteína se indujo después de 14 horas de crecimiento con 5µg/ml de tioestrepton; el cultivo se detuvo a las 40 horas para la obtención de proteína de membrana, citoplasma y sobrenadante.

6.6 Obtención de proteínas y fraccionamiento celular.

Los cultivos de 40 horas de *S. lividans* con las construcciones pBD2.1 y pBD3.1, se centrifugaron a 7500rpm por 10 minutos a 10°C, se apartó el sobrenadante y se precipitaron las proteínas con metanol/cloroformo de acuerdo al protocolo de Wessel & Flügge, 1983 (Ver anexo #7). Por otra parte, el botón celular (micelio), se lavó tres veces con Buffer Tris 20mM pH8 y se sonicó 30 pulsos de 20 segundos cada uno; posteriormente se continuó con el fraccionamiento celular (Ver anexo #8) obteniendo muestras de citoplasma y membrana.

Para la construcción pBD3.2, se obtuvieron proteínas del sobrenadante y el botón celular fue sonicado a 30 pulsos de 20 segundos cada uno. El extracto se centrifugó a 7000rpm 10 minutos a 10°C y el sobrenadante de ésta centrifugación se utilizó para las pruebas de expresión. Las muestras obtenidas (a excepción del sobrenadante) fueron cuantificadas por el método de Bradford y leídas en espectrofotómetro a 595nm utilizando una curva estándar con albúmina 0.5mg/ml.

6.7 Electroforesis de proteínas y Western Blot.

La electroforesis fue realizada en geles de poliacrilamida-SDS al 16%. Para determinar la presencia de la proteína el gel fue teñido con azul brillante de Coomassie.

Para determinar la manosilación de la proteína se realizó la transferencia a membrana de PVDF. La membrana fue previamente activada 15 segundos en metanol; posteriormente se realizó la transferencia en cámara húmeda toda la noche a 12mA (Amperaje constante), con buffer de transferencia Tris-glicina (0.3% Tris base, 1.4% glicina, 20% metanol, pH8.3). Retirada la transferencia, la membrana con las proteínas se secó y se puso a bloquear con BSA 1% en buffer TBS 1 hora a temperatura ambiente; después de 3 lavados con TBS la membrana fue incubada con Concanavalina A (ConA) 1:1000 disuelta en TBS con 1mM CaCl₂, 1mM MnCl₂ y 1mM MgCl₂ por 16 horas a temperatura ambiente; después de dar tres lavados con TBS 1X, la membrana fue revelada de acuerdo a las instrucciones del estuche de quimioluminiscencia de Roche (BM Chemiluminescence Blotting Substrate POD).

Por otra parte, para ver el reconocimiento con los anticuerpos policlonales, se transfirieron los geles de poliacrilamida-SDS 16% a PVDF, como se describió anteriormente. La membrana se secó y se bloqueó 12 horas a 4°C con TBS + Tween 20 (0.05%) + leche descremada al 5%; posteriormente se incubó durante 12 horas a 4°C con TBS + Tween 20 (0.05%) + leche descremada al 5%, con el anticuerpo primario en una dilución 1:100; luego de lavar la membrana con TBS + Tween 20 (0.05%) se incubó la membrana por 2 horas a temperatura ambiente con TBS + Tween 20 (0.05%) + leche descremada al 5% con el anticuerpo secundario anti-IgG unido a peroxidasa en una dilución 1:1000. Después de realizar tres lavados con TBS + Tween 20 (0.05%), la membrana fue revelada de acuerdo a las instrucciones del estuche de quimioluminiscencia de Roche (BM Chemiluminescence Blotting Substrate POD).

6.8 Electroforesis de doble dimensión.

El isoelectroenfoque fue realizado para las muestras de membrana de las construcciones con el gen completo (pBD2.1 y pBD3.1), las cuales fueron desaladas en una columna Sephadex G25 (columna NAP-5, GE Healthcare), la cual fue previamente equilibrada con buffer de fosfatos 10mM pH7.4, la elución se hizo con buffer de fosfatos 10mM + CHAPS 2%. Se colectaron fracciones de 500µl y fueron monitoreadas en un espectrofotómetro a 280nm, posteriormente se cuantificó toda la muestra por el método de Lowry teniendo como referencia albúmina 0.5mg/ml.

Se calcularon 150µg de proteína total. Se agregó dioxicolato (DOC) a un volumen de muestra para obtener una concentración final de 0.02% y se dejó precipitando por 10min a temperatura ambiente, luego se añadió ácido tricloroacético (TCA) para alcanzar una concentración del 10% y se dejó precipitando por una hora a temperatura ambiente; posteriormente se centrifugó a 13500rpm por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se agregaron 200µl de acetona fría, se dejó precipitando en hielo por 15 minutos y se volvió a centrifugar. La pastilla fue resuspendida en un volumen total de 130µl con buffer de rehidratación (Urea 8M, CHAPS 2%, buffer IPG 0.5% y DTT 20mM). Con la muestra se rehidrató una tira de 7cm pH3-11 (Immobiline DryStips, GE

Healthcare) por 16 horas a temperatura ambiente en el recipiente de rehidratación cubriendo con aceite mineral.

Las tiras se corrieron en el equipo Ettan IPGphor III Electrophoresis Unit (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del proveedor. El programa comenzó a 300V (1 hora), incrementó a 1000V (30 min) y posteriormente aumentó hasta 5000V (2 horas).

Después de correr la primera dimensión las tiras fueron equilibradas por 20 min en buffer de equilibrio (SDS 2%, Tris HCl 50mM pH8.8, Urea 6M Glicerol 30%, azul de bromofenol 0.002% y DTT 0.5%) y se corrieron en un gel de poliacrilamida-SDS 14%, después de la electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF. Las membranas fueron teñidas con azul de Coomassie y utilizadas para realizar Western blot revelando tanto con anticuerpos policlonales como con ConA, como se describió anteriormente.

7. RESULTADOS

7.1. Clonación del gen Rv3763 en *E. coli*.

A partir del DNA cromosómico de *M. tuberculosis* H37Rv se logró la amplificación por PCR del gen Rv3763. Para su expresión y purificación a partir de *E. coli*, se clonó dentro de los sitios de restricción *NdeI-EcoRI* en el vector pET28 omitiendo la parte del gen que codifica el péptido señal y la cisteína de anclaje a membrana.

Como resultado se obtuvo el plásmido pBD1 (Fig. 6), el cual fue introducido por electroporación en la cepa de *E. coli* BL21 *Rosetta* (Novagen), debido a que contiene el plásmido pRARE que codifica tRNAs de uso poco frecuente en *E. coli*, con el fin de traducir más eficientemente los transcritos del gen Rv3763, el cual proviene de *M. tuberculosis* y por lo tanto presenta un alto contenido en GC.

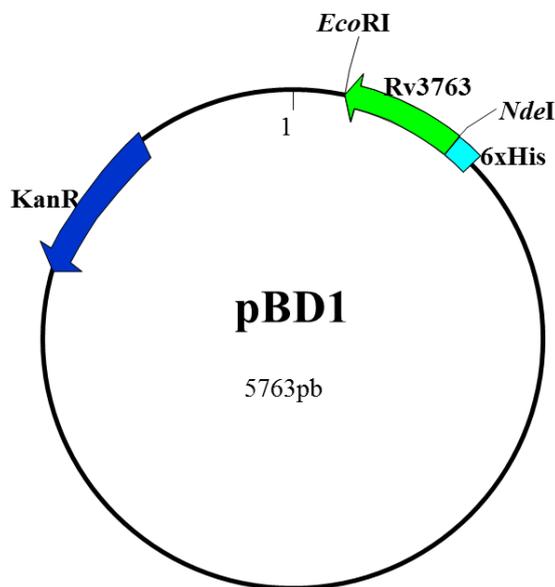


Figura 6. Plásmido pBD1, resultado de la ligación dentro de los sitios *NdeI-EcoRI* de un fragmento de 445pb que corresponde a la secuencia del gen Rv3763 sin codificar al péptido señal ni la cisteína de anclaje, dentro del vector pET28a. Este vector inserta una cola de 6 residuos His al fragmento introducido.

7.2. Purificación de la proteína de 19kDa por cromatografía de afinidad y obtención de anticuerpos.

El vector pET28a fue empleado debido a que contiene una secuencia de 6 residuos de Histidina, los que se fusionan al extremo N-terminal del fragmento introducido para su manipulación. Dado que el inserto no codifica péptido señal ni cisteína de anclaje, la proteína no es exportada a través de la membrana por lo que se detectó en citoplasma.

Antes de pasar por la columna de Ni-NTA para purificarla, el concentrado de células se sonicó y se realizó un gel de poliacrilamida-SDS con el que se observó que la proteína se encontraba en la fracción soluble más no en la fracción insoluble dentro de cuerpos de inclusión. La masa molecular esperada de la proteína, de acuerdo a su composición de aminoácidos es de 15.4kDa (Fig. 7). Por lo tanto, la fracción soluble se hizo pasar a través de la columna de Ni-NTA agarosa.

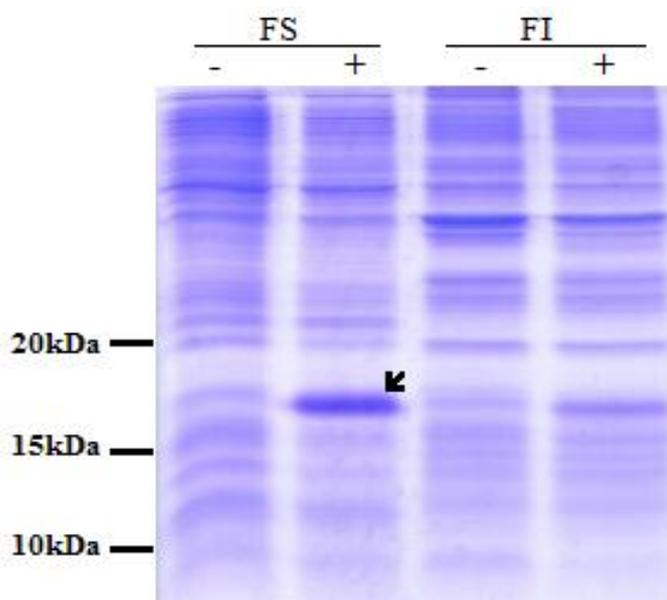


Figura 7. Expresión de la proteína de 19kDa en *E. coli*. Muestras de fracción soluble (FS) y fracción insoluble (FI) en un cultivo de *E. coli* con la construcción pBD1 sin inducir (-) e inducido con IPTG (+). Como se puede observar la proteína se encontró mayoritariamente FS del cultivo inducido con IPTG. Cada carril contiene 10µg de proteína total.

La columna se lavó y posteriormente se eluyó obteniendo cinco fracciones que se analizaron en un gel de poliacrilamida-SDS que mostró a la proteína de una masa molecular aproximado de 16kDa, cerca de su masa molecular esperada y más chica que el

antígeno en *M. tuberculosis*, dado que la proteína expresada por *E. coli* no se encuentra glicosilada (Fig. 8). Cabe señalar que la proteína de 16kDa no fue la única que se unió a la columna, sin embargo sí se encontró en mayor proporción. La fracción número 4 fue elegida para realizar los geles preparativos debido a que presentó una cantidad adecuada de la proteína purificada de acuerdo a la cuantificación con el método de Bradford.

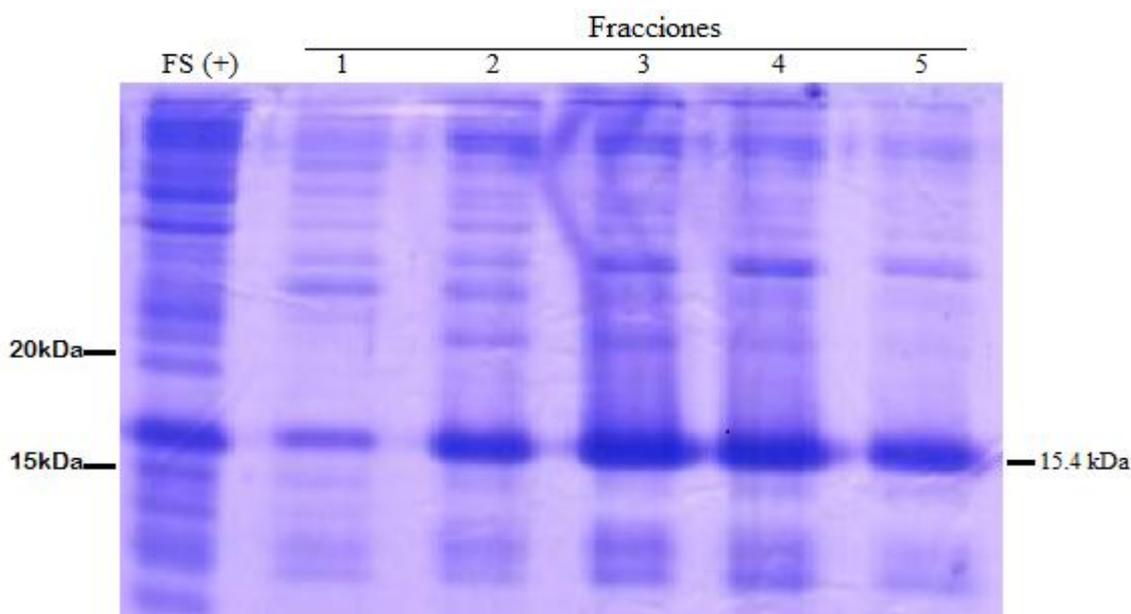


Figura 8. Antígeno de 19kDa purificado a partir de *E. coli* por medio de afinidad a Ni-NTA Agarosa. Se obtuvieron 5 fracciones para purificar la proteína a partir de la fracción soluble (FS). Dada la cantidad de proteína se utilizó la fracción 4 para la inmunización de conejas NZA. Cada carril contiene 10µg de proteína total.

La inmunización de conejas NZA fue realizada en el laboratorio de la Dra. Clara Espitia. Después de aplicar 2 retos se obtuvo el suero que contiene los anticuerpos policlonales anti-19kDa; sin embargo el suero obtenido de una de las conejas mostró un título muy bajo; por tal motivo no se contempló para las pruebas de reconocimiento de la proteína en los ensayos posteriores.

7.3. Clonación del gen Rv3763 en *S. lividans*.

Los experimentos de expresión en *S. lividans* se realizaron inicialmente para la proteína con su propio péptido señal, el cual funciona como una señal de anclaje a la membrana en

M. tuberculosis. El gen se clonó tanto en un vector de expresión multicopia (pIJ6021) como en uno integrativo (pIJ6902). En ambos vectores se utiliza el mismo promotor (P_{tipA}) que es un promotor fuerte e inducible por tioestreptón.

Para esto, se crecieron cultivos de *S. lividans* con cada una de las construcciones y con el vector vacío como control negativo de la expresión de la proteína (pIJ6902 o pIJ6021). La expresión de la proteína se indujo con tioestrepton a las 14 horas posteriores a la inoculación. Cada cultivo se detuvo a las 40 horas de crecimiento.

En todos los casos se colectó tanto el micelio como el sobrenadante. El micelio este se sometió a fraccionamiento celular para obtener la fracción soluble (citoplasma) y la fracción de membrana. Todas las fracciones fueron analizadas para determinar la localización de la proteína.

Adicionalmente, se realizaron construcciones en las que el péptido señal de la proteína fue reemplazado por el de la lipasa extracelular de *S. exfoliatus* M11, el cual es un péptido señal de secreción. En este caso se espera que el antígeno sea secretado, ya que carece de una “lipobox” y una cisteína de anclaje a lípidos de membrana.

A continuación se describen las diferentes construcciones y los resultados obtenidos con cada una de ellas.

7.4. Plásmido pBD3.1.

La región codificadora del gen Rv3763 fue amplificada por PCR introduciendo un sitio de *NdeI* en el extremo 5' y un sitio de *EcoRI* en el extremo 3'. Este fue ligado dentro del vector multicopia pIJ6021 digerido con las mismas enzimas y la ligación fue transformada en *S. lividans*. El resultado de ésta clonación fue el plásmido pBD3.1 (Fig. 9A).

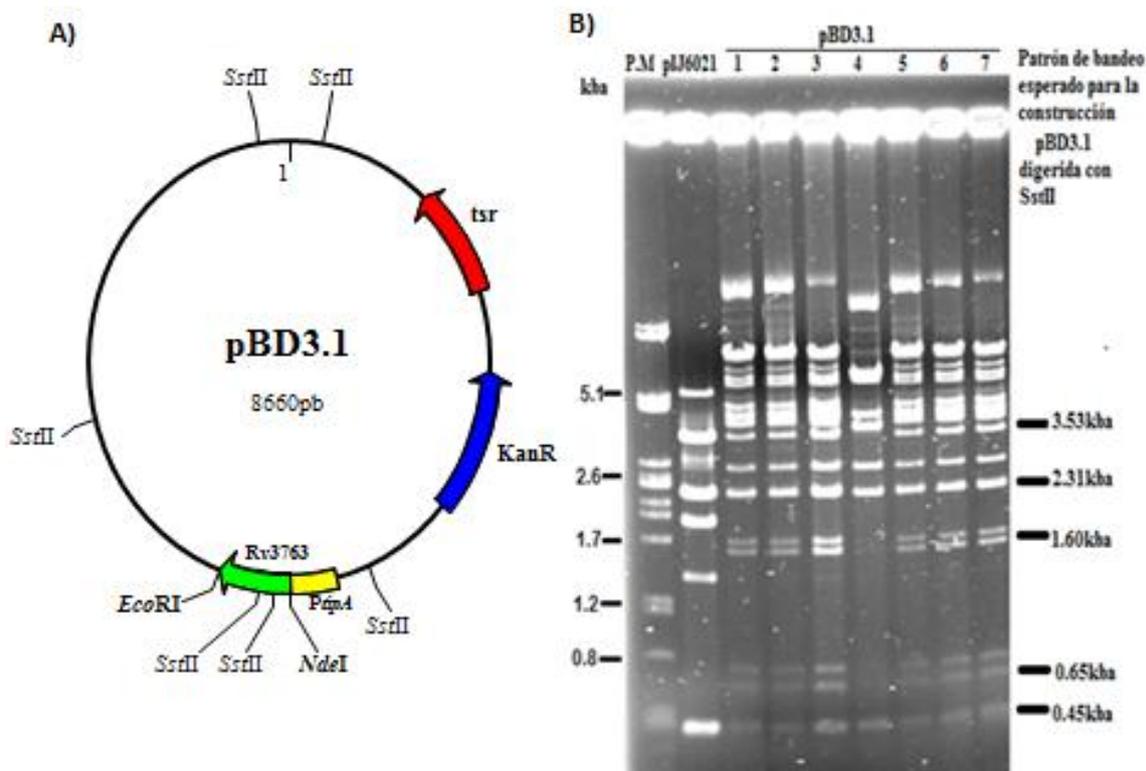


Figura 9. A) Plásmido pBD3.1, resultado de la ligación del gen completo Rv3763 en los sitios NdeI-EcoRI, dentro del plásmido multicopia pIJ6021, mostrando los sitios de restricción de la enzima *SstII*. B) Patrón de restricción del vector pIJ6021 y de la construcción pBD3.1 con la enzima *SstII* en un gel de agarosa. La mayoría de las bandas que se observan son producto de una digestión parcial, sin embargo es posible distinguir en 6 de las construcciones analizadas las bandas del peso molecular esperado, siendo únicamente la número 4 la que no presentó dicho patrón.

Varias colonias resultantes de la transformación fueron elegidas al azar y se les hizo extracción de DNA plasmídico, el cual se digirió con la enzima *SstII* y se observó el patrón de restricción en un gel de agarosa. (Fig. 9). Posteriormente se retransformó *S. lividans* con uno de los plásmidos que mostró el patrón esperado para asegurarse de que todas las células posean la construcción correcta. A partir de estas colonias se obtuvo una preparación densa de esporas de la cepa con el plásmido correcto.

7.5. Experimentos de expresión para la construcción pBD3.1 en *S. lividans*.

Las muestras de membrana, citoplasma y sobrenadante de *S. lividans* con el plásmido pBD3.1 y con el vector vacío se sometieron a electroforesis. Posteriormente fueron teñidas con azul de Coomassie y transferidas a membranas de PVDF para realizar

experimentos de Western blot, los cuales se revelaron con anticuerpos anti-19kDa y con ConA-peroxidasa.

No fue posible distinguir inicialmente la presencia de la proteína de 19kDa en geles teñidos con azul de Coomassie, ya que, de acuerdo a su masa molecular, su corrimiento correspondería a una zona del gel de entre 20 y 25kDa en donde casi todas las bandas presentaron un corrimiento aberrante, impidiendo su análisis; no se sabe cuál es el motivo de dicho corrimiento en esta zona en particular, pero se cree que un lípido de membrana podría ser el responsable; por tanto se precipitaron las proteínas de membrana con metanol/cloroformo antes de someterlas a electroforesis para eliminar impurezas de la muestra .

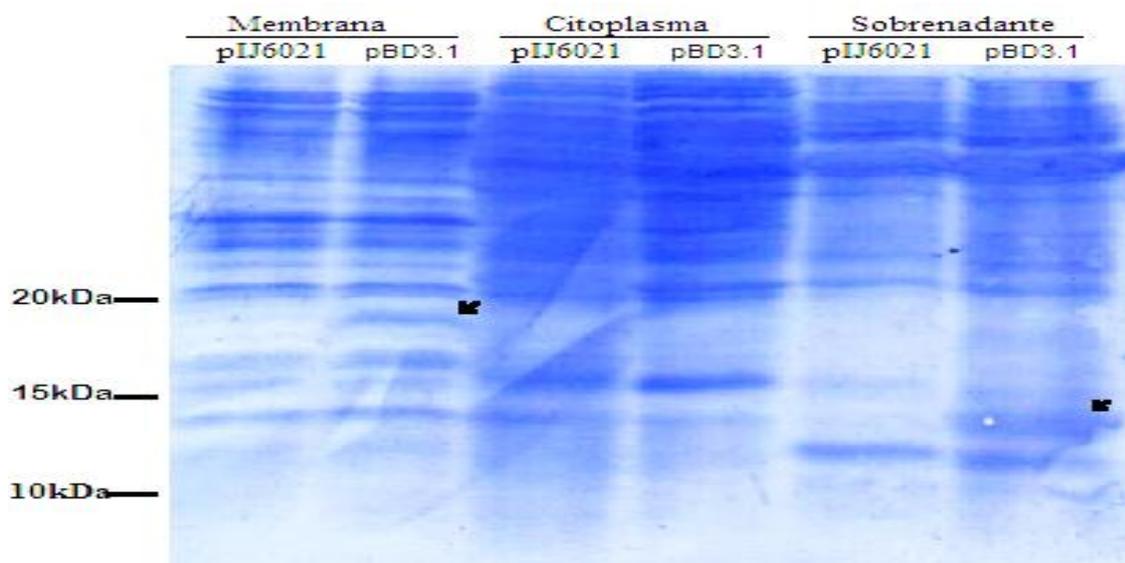


Figura 10. Identificación de la proteína de 19KDa expresada en *S. lividans*. Este gel muestra la presencia de una proteína en la fracción membranal de un peso molecular aproximado de 20kDa y una en el sobrenadante a una altura de 14kDa aproximadamente en el cultivo de *S. lividans* con el plásmido pBD3,1. Los carriles de membrana y citoplasma contienen 10µg de proteína total, mientras que el carril de sobrenadante contiene la proteína presente en 1.4mL.

De esta manera fue posible identificar a una proteína de 20kDa en la fracción membranal, y una proteína en sobrenadante de aproximadamente 14kDa, que no se encuentran en las muestras que provienen de cultivos con el vector vacío. Por otro lado en el citoplasma no se observaron diferencias entre las proteínas de *S. lividans* con el vector vacío y con el plásmido pBD3.1 (Fig. 10).

El análisis por Western blot mostró que la proteína de 20kDa en la membrana de *S. lividans* con la construcción pBD3.1 fue reconocida fuertemente por los anticuerpos, mientras que en la muestra de proteína total de la fracción citoplásmica no fue reconocida ninguna proteína. Por otro lado en el sobrenadante sí hubo un reconocimiento de una banda de aproximadamente 14kDa y una más pequeña de 10kDa, que podrían ser resultado de proteólisis de la proteína expresada en membrana (Fig. 11A).

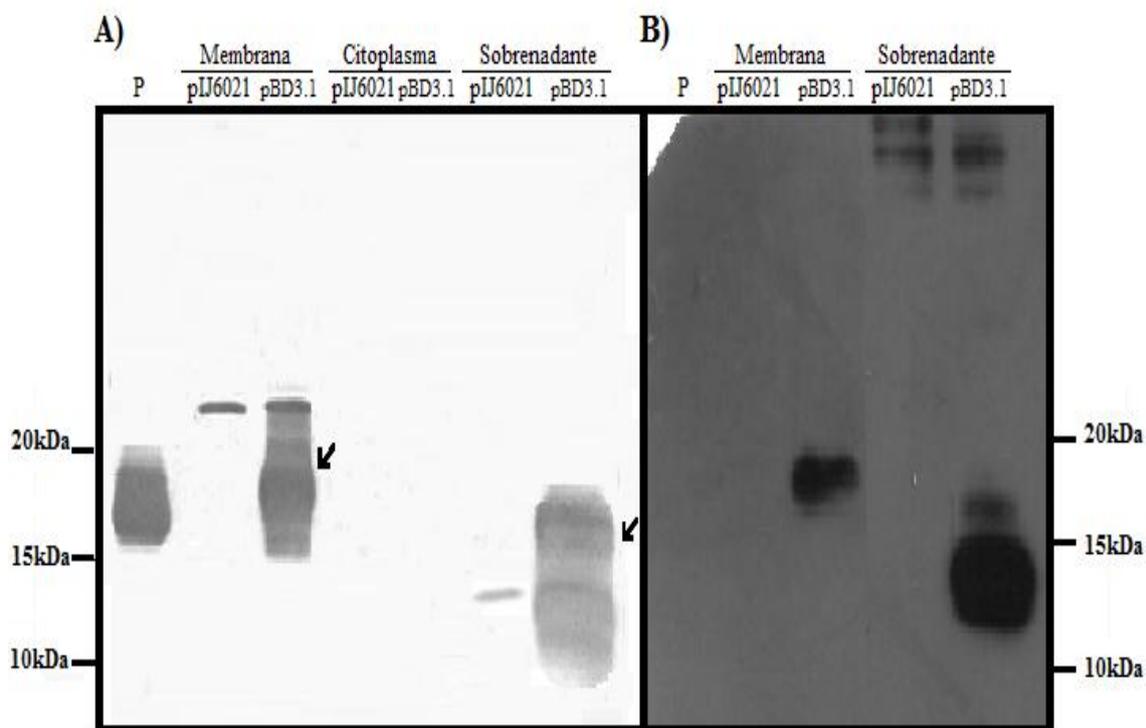


Figura 11. Expresión de la proteína de 19kDa a partir de un vector multicopia en *S. lividans*. A). Los anticuerpos policlonales reconocieron una banda presente en la membrana a una altura de 20kDa aproximadamente, y a una doble banda del sobrenadante (14/10kDa) en *S. lividans* que contenía el plásmido pBD3.1. Asimismo reconocieron el control positivo que es la proteína purificada de *E. coli* (P). B). Prueba de manosilación del antígeno de 19kDa expresado en *S. lividans*. La lectina ConA-peroxidasa reconoció tanto la proteína presente en membrana como la de 14kDa presente en el sobrenadante de *S. lividans* con el plásmido pBD3.1. Los carriles de membrana y citoplasma contienen 10µg de proteína total, mientras que el sobrenadante contiene la proteína presente en 1.4mL.

Para determinar si la proteína se encontraba manosilada se utilizó la proteína purificada de *E. coli* como control negativo para la ConA-peroxidasa ya que no está manosilada y no debe ser reconocida por la lectina. La prueba fue positiva para la proteína de 19kDa expresada en membrana y en sobrenadante, ya que las dos formas fueron reconocidas por la ConA-peroxidasa (Fig. 11B).

7.6. Plásmido pBD2.1

Dado que el gen Rv3763 dentro del vector pIJ6021 se sobreexpresa en forma abundante y fue reconocido por parte de los anticuerpos anti-19kDa, se analizó si la proteína de 19kDa con su propio péptido señal se podía expresar y detectar en *S. lividans* a partir de un vector integrativo estable.

El plásmido pBD2.1 que resultó de la clonación del gen Rv3763 completo dentro del vector pIJ6902 (Fig. 12), se introdujo por conjugación a *S. lividans*, y se realizaron cultivos para analizar la expresión de esta proteína.

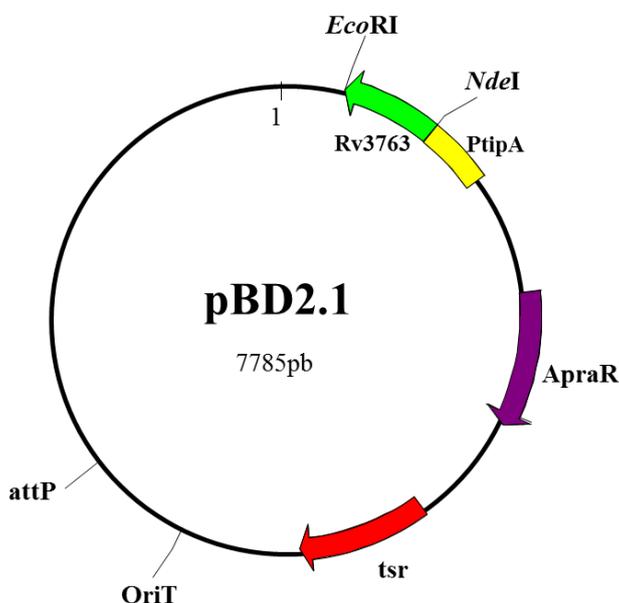


Figura 12. Plásmido pBD2.1. Este plásmido integrativo fue empleado para la expresión del antígeno de 19kDa en *S. lividans*.

7.7. Experimentos de expresión para la construcción pBD2.1 en *S. lividans*.

Para detectar la presencia de la lipoproteína de 19kDa expresada en *S. lividans* la proteína total de membrana, sobrenadante y citoplasma de *S. lividans* con el vector pIJ6902 y con la construcción pBD2.1 se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS que fue teñido con azul de Coomassie. A pesar de precipitar la proteína de membrana con

metanol/cloroformo, no se identificó la banda correspondiente a la proteína expresada a partir del vector integrativo. Esto posiblemente se deba a que es mucho menor la cantidad de proteína sintetizada, a comparación de aquella que se sobreexpresó de un plásmido multicopia. Además en esta zona del gel migran muchas otras proteínas que no permiten identificar claramente a la proteína de 19kDa (Fig.13).

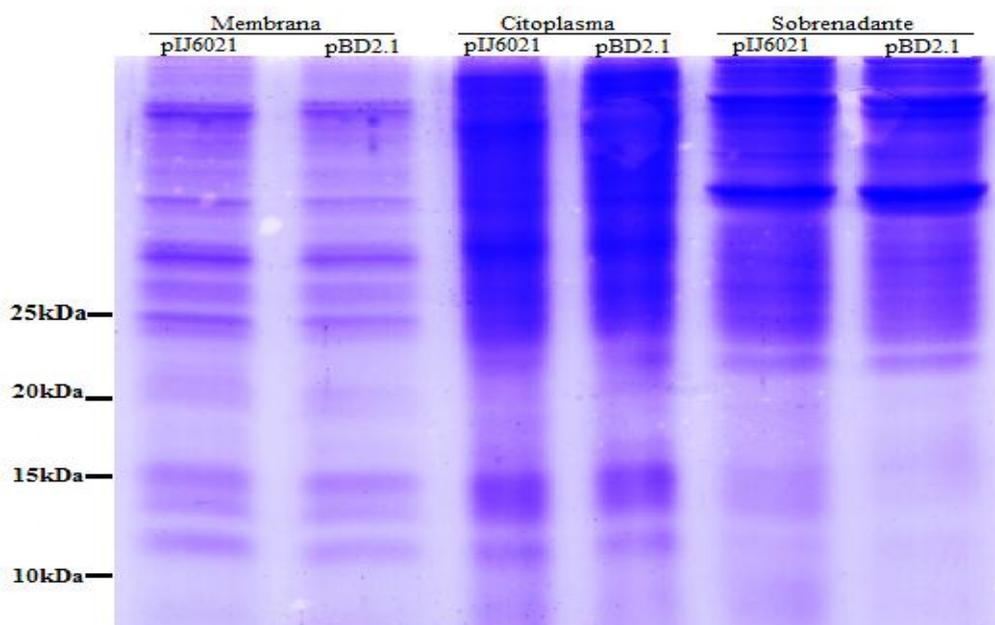


Figura 13. Tinción de Azul de Coomassie para ver la presencia de la proteína de 19kDa expresada a partir de un vector integrativo en *S. lividans*. Los carriles de membrana y citoplasma contienen 10 μ g de proteína total, mientras que el sobrenadante contiene la proteína presente en 1.4mL.

Con el fin de determinar si la proteína se encontraba presente a pesar de no ser distinguible por tinción, la proteína total de membrana, citoplasma y sobrenadante fue transferida a membrana de PVDF y revelada con anticuerpos anti-19kDa. El análisis mostró que una proteína de 20kDa en la membrana de *S. lividans* con el plásmido pBD2.1 fue reconocida por los anticuerpos y que esta proteína no está presente en el control. Los anticuerpos no reconocieron ninguna proteína presente en el citoplasma, mientras que en sobrenadante de *S. lividans* con la el plásmido pBD2.1 sí hubo reconocimiento de una banda de aproximadamente 14kDa y una banda un poco menor, de 10kDa; ambas podrían ser resultado de proteólisis de la proteína expresada en membrana (Fig. 14A).

Los resultados anteriores concuerdan con lo observado con el plásmido multicopia.

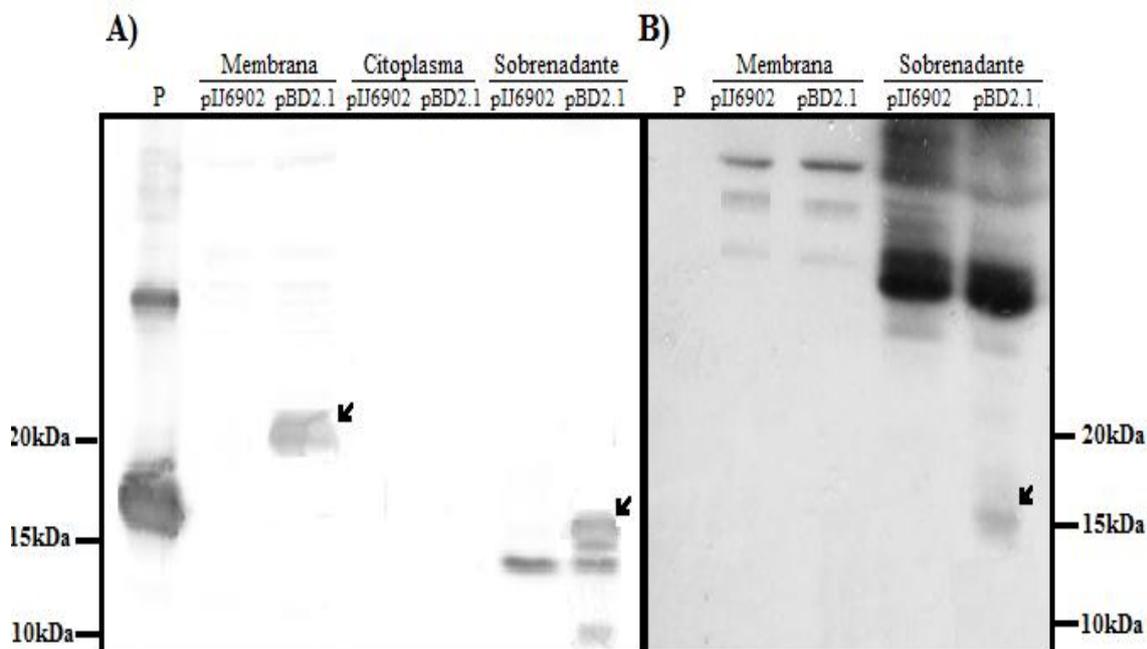


Figura 14. Expresión de la proteína de 19kDa a partir de un vector integrativo en *S. lividans*. A) Reconocimiento por anticuerpos policlonales, que reconocen tanto a la proteína purificada de *E. coli* (P), como a la proteína presente en *S. lividans* y se localiza en membrana a una altura aproximada de 20kDa, de la misma manera reconoce 2 bandas en el sobrenadante que posiblemente sean el resultado de proteólisis de dicho antígeno. B) Reconocimiento por medio de ConA-peroxidasa, la cual no reconoce la proteína purificada de *E. coli*, tampoco a la proteína presente en la membrana de *S. lividans*; aunque sí reconoce la proteína de 14kDa que es también identificada por Anti-19kDa. Los carriles de membrana y citoplasma contienen 10 μ g de proteína total, mientras que el sobrenadante contiene la proteína presente en 1.4mL.

Para el reconocimiento con ConA-peroxidasa se transfirieron a PVDF las muestras de proteína total de membrana y sobrenadante. La proteína purificada con la que se realizaron los anticuerpos se utilizó como control negativo para ConA-peroxidasa. Solamente la banda de 14kDa que reconoció el anti-19kDa en sobrenadante fue detectada también por la lectina más no la proteína de 20kDa presente en membrana (Fig. 14B).

7.8. Plásmido pBD3.2.

Con el fin de secretar el antígeno de 19kDa, el péptido señal de la proteína de 19 kDa fue sustituido por el péptido señal de la lipasa extracelular de *S. exfoliatus* M11, que corresponde a una señal de secreción a través de la membrana de *Streptomyces*.

Para sustituir al péptido señal se realizaron tres reacciones de PCR. En la primera reacción se utilizó como molde el DNA cromosómico de *M. tuberculosis*, y los oligonucleótidos diseñados amplificaron el gen Rv3763 completo; en la segunda reacción se utilizó como DNA molde la secuencia del péptido señal de la lipasa, el primer *foward* contenía el inicio del péptido señal M11, y el primer *reverse* contenía el inicio del gen Rv3763 (después de la cisteína de anclaje a membrana) más el final del péptido señal M11, ésta amplificación dio como resultado el péptido señal M11 más el inicio del gen Rv3763.

Por último, se llevó a cabo una tercera reacción utilizando como templados los productos de las dos reacciones anteriores. El primer *foward* correspondió al inicio del péptido señal M11 de *S. exfoliatus*, con sus sitios de restricción correspondientes; el primer *reverse* fue el final del gen Rv3763, también con un sitio de restricción para manipular el inserto.

Todo el procedimiento para sustituir el péptido señal del gen y generar la fusión se resume en la figura 15.

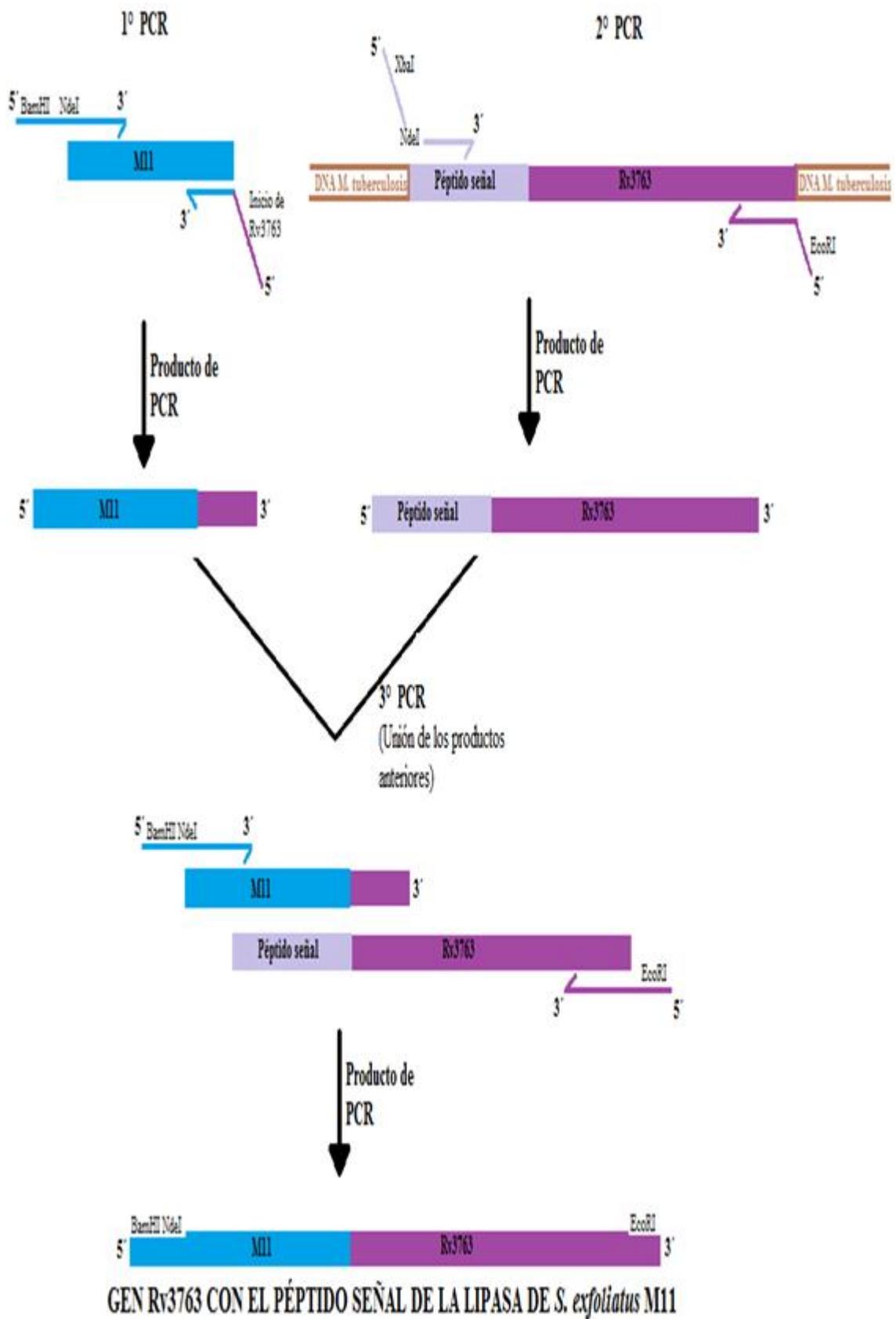


Figura 15. Fusión del péptido señal M11 al antígeno de 19kDa de *M. tuberculosis* por medio de reacciones de PCR.

El inserto se clonó bajo el promotor P_{tipA} del vector multicopia pIJ6021 para sobreproducir la proteína secretada. Resultado de esto fue la construcción del plásmido pBD3.2, el cual se verificó por patrón de restricción del DNA plasmídico digerido con la enzima *SstII* y observándolo en un gel de agarosa (Fig. 16).

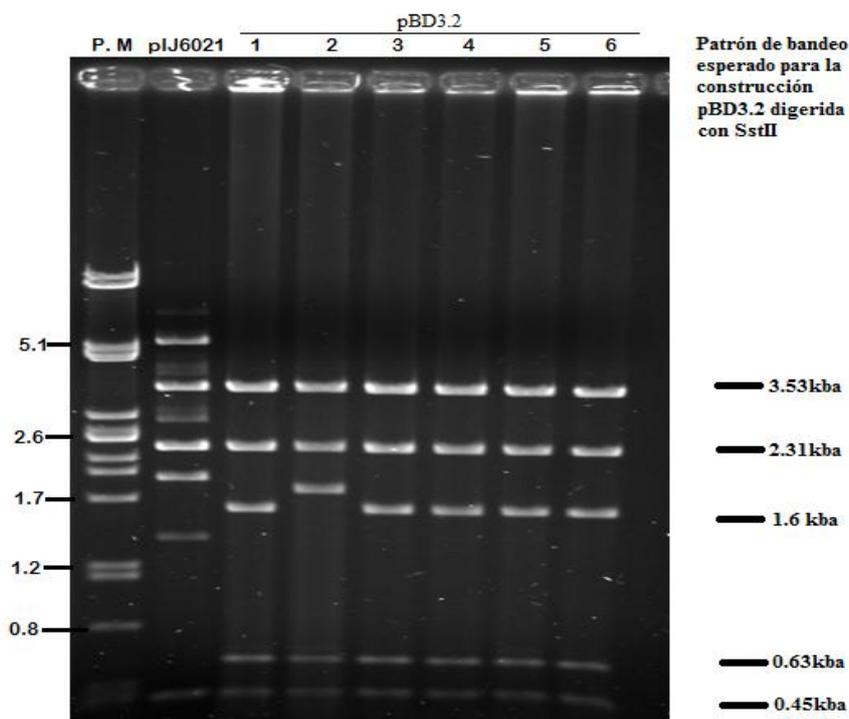


Figura 16. Patrón de restricción del vector pIJ6021 y del plásmido pBD3.2 con la enzima *SstII* en un gel de agarosa. El patrón esperado se presentó en 5 de las construcciones analizadas, únicamente la número 2 no presentó dicho patrón.

7.9. Experimentos de expresión para la construcción pBD3.2 en *S. lividans*.

Las muestras de extracto sonicado y sobrenadante de *S. lividans* con el plásmido pBD3.2 y con el vector vacío fueron sometidas a electroforesis y teñidas con azul de Coomassie. Como se puede observar en la Fig. 17, no hay diferencias entre la proteína total del extracto sonicado del cultivo con el vector y con pBD3.2; por otro lado en el sobrenadante sí fue posible observar una banda a una altura aproximada de 14kDa que está presente en cultivos de *S. lividans* con pBD3.2 y no en el control.

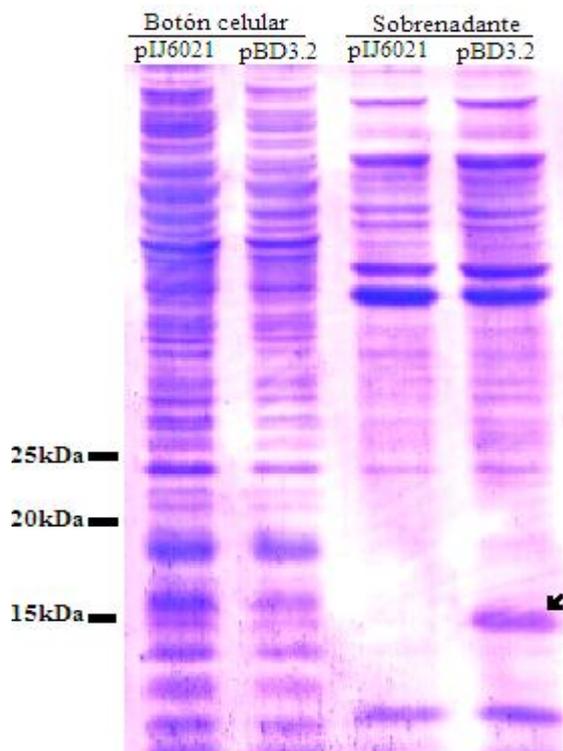


Figura 17. Tinción con Azul de Coomassie para ver la presencia de la proteína de 19kDa clonada con el péptido señal de la lipasa de *S. exfoliatus* M11 en *S. lividans*. Como podemos observar, hay una proteína de aproximadamente 14kDa presente en la muestra de sobrenadante de *S. lividans* con la construcción. Los carriles de extracto sonicado contienen 10µg de proteína total, mientras que el sobrenadante contiene la proteína presente en 1.4mL.

Por su parte, los anticuerpos anti-19kDa reconocieron esta banda en el sobrenadante de cultivos con pBD3.2 y no hubo reconocimiento por alguna banda presente en la proteína total del sonicado, descartando así la idea de que alguna parte de la proteína no se hubiera exportado. Por otra parte, no hubo reconocimiento por parte de la ConA-peroxidasa, lo cual indica que la proteína secretada no está siendo manosilada (Fig. 18).

La expresión de la proteína expresada en el sobrenadante de *S. lividans* con el plásmido pBD3.2 fue monitoreada a distintos tiempos en un cultivo de 40 horas; se tomaron muestras de sobrenadante a las 2, 10, 22 y 26 horas posteriores a la inducción con tioestreptón. A todos los tiempos la proteína fue identificada por la misma masa molecular, 14kDa aproximadamente (Fig. 19); mostrando así que en la forma secretada no hay mayor degradación de la proteína conforme avanza el tiempo, pero sí es de un tamaño menor al esperado en todos los casos.

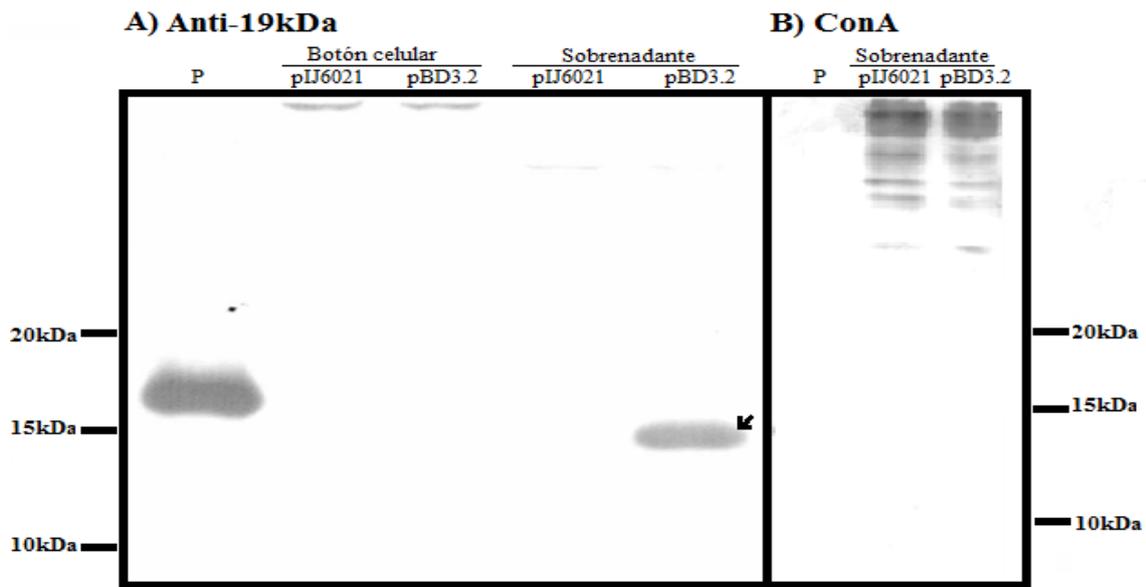


Figura 18. Reconocimiento de la proteína de 19kDa secretada por *S. lividans* por anticuerpos anti-19kDa y por ConA. A) Los anticuerpos policlonales reconocieron tanto la proteína purificada de *E. coli* (P), como la proteína secretada por *S. lividans* que se encuentra a un peso molecular de aproximadamente 14kDa. B) La prueba fue negativa para la proteína expresada por *E. coli* y para la expresada y secretada por *S. lividans*. Los carriles de extracto sonicado contienen 10 μ g de proteína total, mientras que el sobrenadante contiene la proteína presente en 1.4mL.

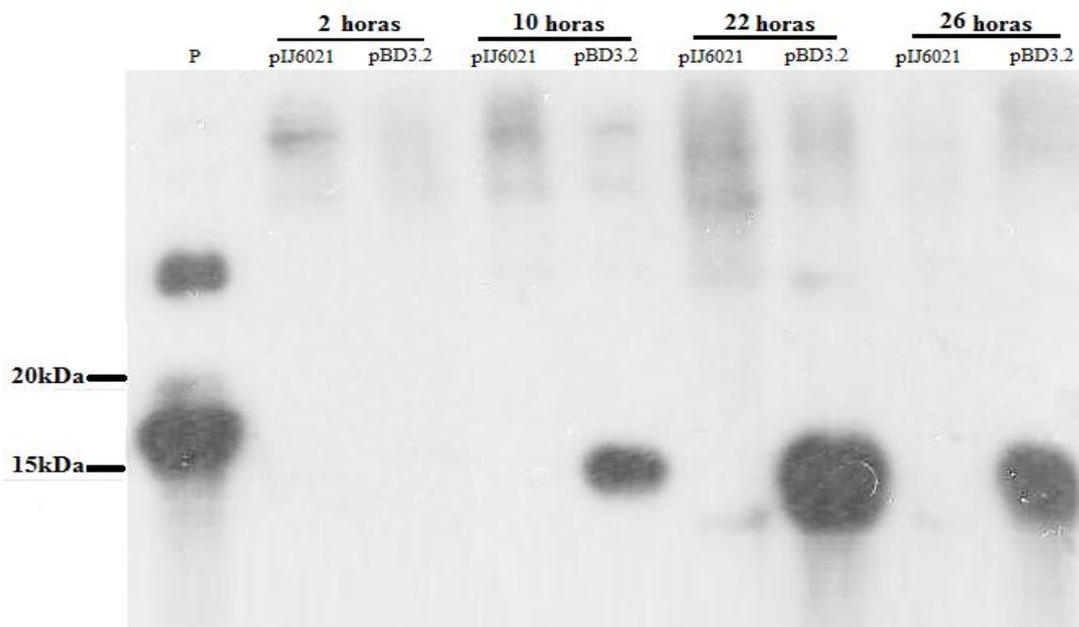


Figura 19. Expresión de la proteína de 19kDa secretada por *S. lividans* a diferentes tiempos post-inducción. La proteína secretada por *S. lividans* se muestra a la misma altura a las 2, 10, 22 y 26 horas después de la inducción. Los carriles contienen la proteína presente en 1.4mL de sobrenadante.

Adicionalmente se realizó un gel de poliacrilamida-SDS, que fue teñido con azul de Coomassie, éste contenía las muestras de sobrenadantes de las dos construcciones realizadas en el vector multicopia, debido a que en ambas construcciones se observa el antígeno, de una forma proteolisada (en pBD3.1) y de una forma secretada (en pBD3.2). El análisis mostró que la masa molecular de ambas proteínas es aproximadamente la misma, a pesar de que la que se produce a partir de pBD3.1 sí está modificada con manosas y la forma secretada no (Fig. 20).

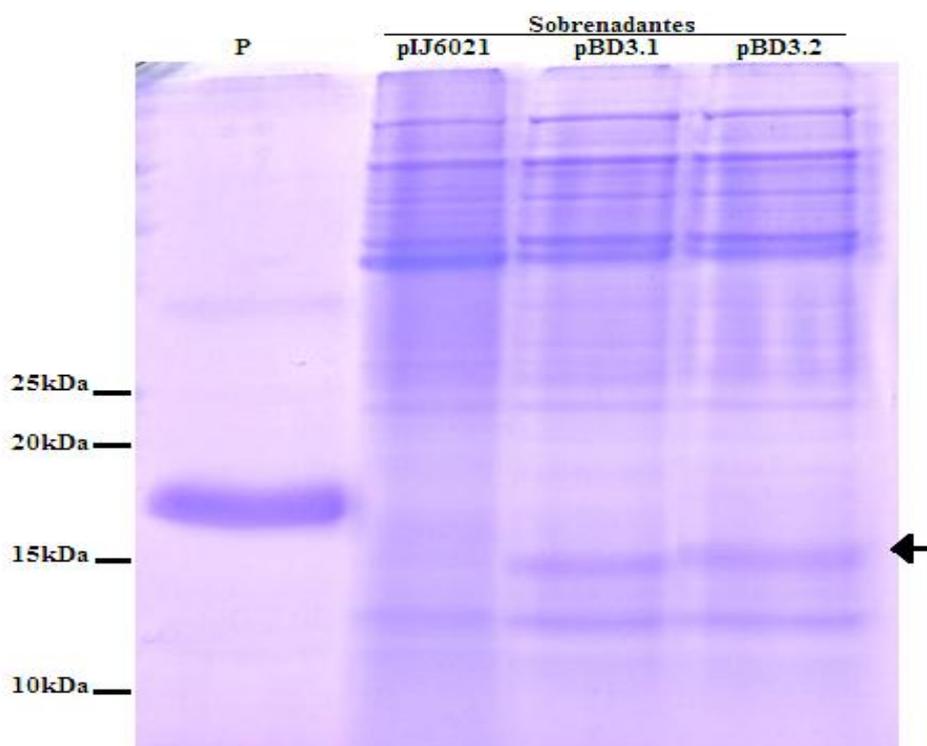


Figura 20. Tinción con Azul de Coomassie de los sobrenadantes de los cultivos con los plásmidos pBD3.1 y pBD3.2.

7.10. Electroforesis en dos dimensiones (2D).

La electroforesis 2D se realizó para las muestras de membrana que contenían a la proteína con su propio péptido señal expresada del plásmido integrativo y sobreexpresada del plásmido multicopia en *S. lividans*, debido a que las pruebas previas mostraron que la proteína se encontraba en una masa molecular aproximado al de la proteína nativa,

además de que fue también manosilada; lo cual no se pudo probar en la recombinante secretada. El objetivo de observarlas en 2D fue para tener una identificación más precisa de la proteína expresada en membrana y glicosilada.

7.11. Plásmido pBD3.1 (2D).

La proteína total de membrana de *S. lividans* con el vector vacío y con el plásmido pBD3.1 fue visualizada en un gel de doble dimensión para identificar el spot correspondiente a la proteína de 19kDa.

El punto isoeléctrico teórico de la proteína es de 6.54. La tinción con azul de Coomassie mostró un “spot” en las proteínas de la membrana de cultivos con el pBD3.1 que no se encontró en la membrana de cultivos con el vector vacío, a una altura aproximada de 21.5kDa y con un pH más bien ácido, de aproximadamente 3 (Fig. 21A).

Por su parte los anticuerpos anti-19kDa mostraron un fuerte reconocimiento que no se observa como una sola mancha, sino como un barrido de proteína que por su posición de la masa molecular y del pI corresponde al spot identificado por la tinción con azul de Coomassie y que, de igual manera, no aparece en el caso del vector vacío (Fig. 21B). Este spot es reconocido también por la ConA-peroxidasa, lo cual indica que la proteína expresada está modificada con manosas (Fig. 21C).

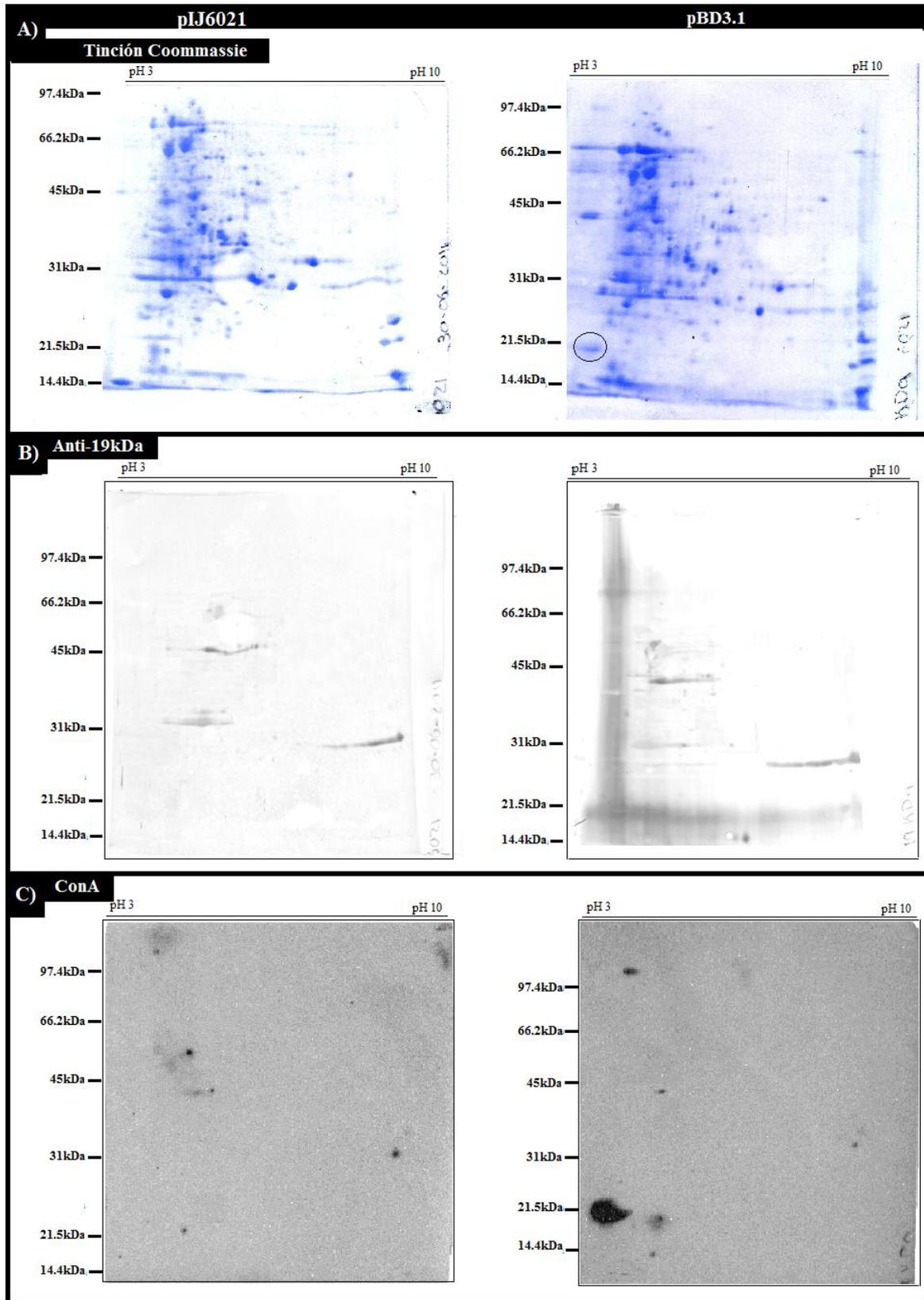


Figura 21. Electroforesis 2D de extractos de membrana de *S. lividans* con el vector pIJ6021 (lado izquierdo) y con el plásmido pBD3.1 (lado derecho). A) Tinción con Azul de Coomassie, el spot señalado en la membrana de la construcción corresponde a la proteína expresada por *S. lividans*. B) Reconocimiento por anticuerpos anti-19kDa. C) Reconocimiento por ConA-peroxidasa.

7.12. Construcción pBD2.1 (2D).

La proteína total de membrana de *S. lividans* con el vector vacío y con el plásmido pBD2.1 fue también sometida a electroforesis de doble dimensión. Mediante la tinción con azul de Coomassie no fue posible detectar ningún “spot” que pudiera corresponder a la proteína de 19kDa (Fig. 22A), sin embargo los anticuerpos anti-19kDa si mostraron un buen reconocimiento hacia un spot a una altura aproximada de 21.5kDa y con un pI ácido que corresponde a la proteína esperada, ya que no está presente en el control y además coincide con lo observado en las muestras de membrana de *S. lividans* con el plásmido pBD3.1 (Fig. 22B). Por otra parte, no hubo reconocimiento por parte de la lectina de la proteína expresada en membrana (Fig. 22C).

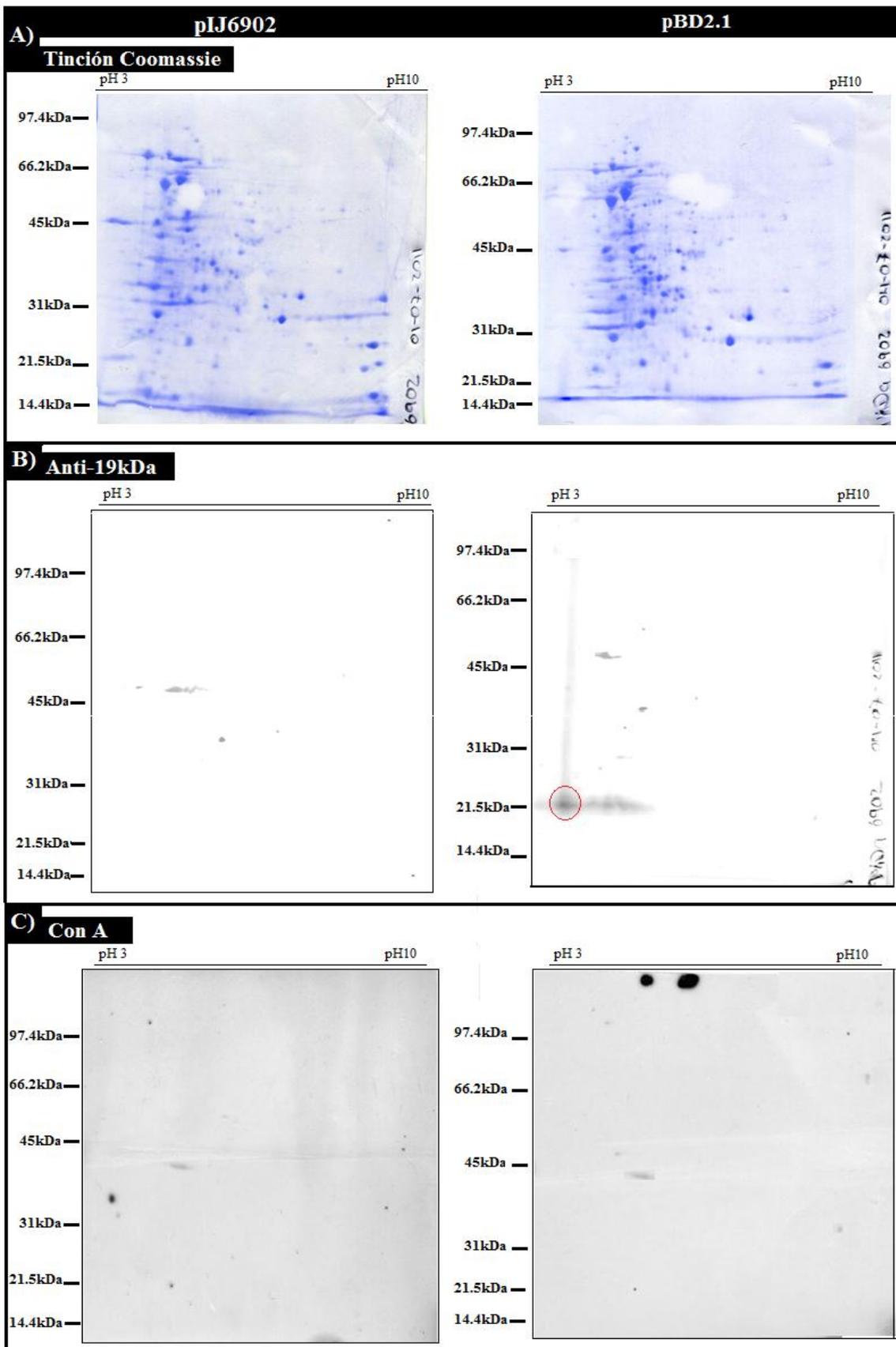


Figura 22. Electroforesis 2D de extractos de membrana de *S. lividans* con el vector pIJ6902 (lado izquierdo) y con el plásmido pBD2.1 (lado derecho). A) Tinción con Azul de Coomassie. B) Reconocimiento por anticuerpos anti-19kDa. C) Reconocimiento por ConA-peroxidasa.

8. DISCUSIÓN

En reportes previos, se ha demostrado la capacidad de las especies del género *Streptomyces* para producir proteínas recombinantes glicosiladas. Uno de los principales motivos por los que se emplea esta bacteria como hospedero es que posee un mecanismo de glicosilación de proteínas, lo cual no todas las bacterias poseen. Además cuenta con un sistema eficiente de secreción de proteínas lo que facilita la extracción y purificación de las proteínas expresadas y secretadas al medio de cultivo.

M. tuberculosis, al ser muy cercana filogenéticamente a *Streptomyces*, comparte mecanismos de modificación postraduccional, por lo que es posible expresar eficientemente algunas de sus proteínas que son antígenos de interés, en dicho organismo. Esto ya se ha demostrado al menos para el antígeno Apa que, como se mencionó anteriormente, se ha logrado su expresión en *S. lividans* conservando el patrón de manosilación (Lara et. al. 2004).

El presente estudio se enfocó en otra proteína antigénica de gran importancia en el curso de la infección por *M. tuberculosis*, la proteína de 19kDa. Este antígeno en su forma nativa se encuentra como una lipoproteína manosilada. La inducción del gen Rv3763 codificando su propio péptido señal en *S. lividans* permitió ver la expresión de la proteína de 19kDa en extractos de membrana y en el medio de cultivo.

Al inducir la expresión del gen Rv3763 clonado en un vector monocopia, la tinción con azul de Coomassie no permitió detectar a la proteína debido a la poca cantidad producida y dado a que su corrimiento corresponde a una zona del gel donde migran muchas otras proteínas no es posible distinguir si alguna de ellas es la proteína de interés (ver figura 13); sin embargo el reconocimiento con anticuerpos policlonales anti-19kDa mostró que, efectivamente, la proteína se expresó y localizó en la membrana, observándose como una banda de 20kDa (ver figura 14). Es decir, el péptido señal utilizado en *M. tuberculosis* para dirigir a la proteína a la membrana pudo ser reconocido por *S. lividans* y tuvo una localización correcta de la proteína.

Por otra parte, es importante recordar que el ambiente natural en el que se desarrolla *S. lividans* es muy heterogéneo y cuenta con una gran cantidad de proteínas secretadas que cumplen una función de degradación, entre las cuales están proteasas y cuya actividad está repercutiendo en la proteína de 19kDa expresada en la membrana de *Streptomyces*.

Es así que los anticuerpos policlonales tuvieron reconocimiento hacia dos bandas en el sobrenadante de cultivos con el plásmido pBD2.1; muy probablemente estas bandas corresponden a fragmentos de la proteína de 19kDa que ha sufrido proteólisis y que por lo tanto se observan de un peso molecular más bajo (10 y 14kDa aproximadamente) y en el sobrenadante. Una observación interesante es que a pesar de estar proteolisada, la banda de 14kDa presente en el sobrenadante sí se encuentra manosiada, lo cual no es posible observar en la proteína de membrana para la construcción en el vector monocopia (ver figura 14).

Al sobreexpresar la proteína de 19kDa mediante el uso de un vector multicopia, dada la gran cantidad que se genera, es posible entender lo que sucede con el antígeno expresado en la membrana de *S. lividans*, ya que en este caso tanto los anticuerpos policlonales como la ConA, tienen reconocimiento tanto por la proteína localizada en la membrana como en el sobrenadante. En este caso el reconocimiento por parte de los anticuerpos anti-19kDa es mayor en el sobrenadante que en la membrana (ver figura 11); esto indica que la mayoría de la proteína que se produce está siendo proteolisada, tal vez debido a que no es reconocida como una proteína propia, de manera que las proteasas la degradan.

S. lividans, fue elegida en un principio, debido a que no es una cepa tan proteolítica en comparación con *S. coelicolor*. Sin embargo es evidente que aún en esta cepa existen proteasas extracelulares que afectaron a la proteína producida.

Ahora bien, a diferencia de la proteína obtenida utilizando un vector monocopia, la lectina sí reconoció a la proteína de membrana así como a la forma proteolisada del sobrenadante (banda de 14kDa) (ver figura 11). Es decir, la proteína con su propio péptido señal se expresa y *Streptomyces* emplea su maquinaria de glicosilación para añadirle las manosas mientras va siendo exportada para quedar anclada en la membrana, tal como sucede en *Mycobacterium* y la proteólisis que se da en esta proteína expuesta en

la membrana ocurre en un sitio que no afecta su manosilación, ya que tiene gran afinidad por la lectina.

Sin embargo, la banda de 10kDa, que también es producto de proteólisis, no fue reconocida por ConA-peroxidasa; por tanto en este caso la proteólisis ocurrió en un sitio que sí afecta la manosilación, que posiblemente sea en el extremo N-terminal, puesto que es ahí donde se encuentran los aminoácidos que son modificados.

Así demostramos que la proteína de 19kDa puede ser expresada y glicosilada por *S. lividans*, sin embargo no fue posible evitar la acción de sus propias enzimas que se encargan de proteolisar la proteína generada y a mayor expresión ocurre mayor degradación.

La expresión de la proteína localizada en membrana e inducida a partir del vector monocopia se puede observar en un gel de doble dimensión y el anticuerpo puede reconocerla eficientemente, sin embargo no es suficiente la cantidad para observar la glicosilación (ver figuras 21 y 22), así que es necesaria su sobreexpresión para obtener una cantidad de proteína suficiente en membrana tomando en cuenta que hay mucha proteína que se está proteolizando.

González-Zamorano et al. (2008), estudiaron el glicoproteoma de *M. tuberculosis* en geles de doble dimensión e identificaron por el reconocimiento con ConA a las glicoproteínas expuestas en la membrana de este organismo. Entre estas se encontró la glicoproteína de 19kDa que tiene un pI teórico de 6.54; sin embargo ellos encontraron isoformas que corrieron en forma de varias manchas (entre pH 4-5). De igual manera, la expresión en *S. lividans*, mostró otro pI, ya que la proteína expresada en membrana se situó muy cercana al extremo ácido en una tira de pH 3-10 (ver figuras 21 y 22).

Probablemente, el barrido de proteínas que se observa en geles de doble dimensión también se deba a isoformas que pueden explicarse por diferencias en la conformación de la proteína o en su patrón de manosilación. Hay al menos una forma manosilada que sí es detectada por ConA-peroxidasa, pero también pueden haber otras formas no glicosiladas,

o que su glicosilación sea con otros azúcares, o glicosiladas con manosas en una conformación que no pueda ser detectada por ésta lectina.

A pesar de que *Streptomyces* y *Mycobacterium* son organismos filogenéticamente cercanos y comparten muchas características, son en realidad bacterias adaptadas a tipos de vida muy distintos y no se puede asegurar que la proteína de 19kDa glicosilada que expresamos en *S. lividans* sea igual a la de *M. tuberculosis*. No solamente se trata de expresar el DNA de una especie en otra y seguir un mecanismo de glicosilación, sino que también los ambientes en cada organismo son distintos ya que no son las mismas enzimas, lípidos o azúcares con los que se está interactuando, lo que podría afectar la conformación de la proteína.

Por lo tanto, a pesar de que *S. lividans* pudo manosilar la proteína, no podemos asegurar que sea exactamente en la misma posición y de la misma forma que la proteína en *M. tuberculosis*; asimismo, una diferencia en el patrón de glicosilación también podría estar relacionado con el corte proteolítico, tal como lo mencionó Herrmann et. al. (1996), al observar que mutando los aminoácidos involucrados con la manosilación se generaban varios péptidos de menor peso molecular.

Por otra parte, al producir la proteína de 19kDa recombinante con un péptido señal de secreción, se pudo observar la proteína secretada en el medio de cultivo y fue reconocida por el anticuerpo, aunque es de un peso molecular ligeramente menor al esperado (14kDa); sin embargo la proteína no fue reconocida por la lectina, es decir, no está manosilada (ver figura 18). Al monitorear el cultivo se observó que la proteína se expresó desde las primeras horas y a lo largo de todo el crecimiento a la misma masa molecular (ver figura 19), así que no hubo corte en esta proteína que pudiera afectar específicamente sitios de glicosilación, sino que desde un inicio la proteína sintetizada no fue manosilada.

El menor tamaño observado en esta proteína muy probablemente sí se deba a la presencia de proteasas producidas por *S. lividans* que eliminan algunos de los aminoácidos de la proteína. Sin embargo, es poco probable que esta sea la razón de la falta de manosilación, pues la proteína observada en el sobrenadante a partir del plásmido pBD3.1 de la que se

postula es una forma proteolisada de la proteína expuesta en membrana, es aproximadamente de la misma masa molecular a la forma secretada y sí se encuentra manosilada.

Cabe señalar que la mayoría de las glicoproteínas de la membrana de *M. tuberculosis*, se han identificado como lipoproteínas (González-Zamorano et. al., 2008), posiblemente hay una relación entre ambos mecanismos y por este motivo, en la proteína de 19kDa, el reemplazo del péptido señal afectó la manosilación.

En el estudio previo realizado por Lara et al. (2004) donde se expresó la glicoproteína Apa, se realizó una comparación de las secuencias de los extremos N-terminal que demostró que la proteína producida en *S. lividans* era idéntica a la proteína nativa y que su péptido señal había sido reconocido tal como lo reconoce la micobacteria, ocurriendo el corte en el mismo sitio. A diferencia de la proteína de 19kDa, la glicoproteína Apa en su forma nativa es secretada, por tanto no es una lipoproteína y su propio péptido señal ya contiene el sitio de corte; mientras tanto, el péptido señal para lipoproteína que presenta el antígeno de 19kDa contiene un sitio de anclaje a membrana.

La secreción de ésta misma proteína en *S. lividans*, fue reportada anteriormente por Tremblay et. al (2002); aunque no se sabe si las proteínas expresadas fueron manosiladas. Por otra parte, ellos trataron de purificar la proteína expresada a través de cromatografía de afinidad, sin embargo esto no se logró debido la pérdida de algunos aminoácidos por proteólisis lo cual interfirió en su procedimiento. Lo mismo nos podría estar ocurriendo en ésta recombinante, y que una pérdida de aminoácidos es la que afecta la manosilación del péptido.

Por lo tanto, una posibilidad interesante para explicar esta falta de glicosilación de la proteína de 19kDa cuando es secretada con el péptido señal de *S. exfoliatus* es que, las maquinarias de acilación y glicosilación estén relacionadas, de manera que solamente se manosila la proteína cuando es anclada a la membrana y el péptido señal de la proteína de 19kDa de *M. tuberculosis* influye en gran medida en la manosilación de dicha proteína ya que al ser reemplazado no hubo manosilación.

9. CONCLUSIONES

- El gen Rv3763 fue clonado eficientemente en *S. lividans*, tanto con su péptido señal, como en la recombinante.
- La proteína de 19kDa con su péptido señal se expresó y se encontró anclada en la membrana tal como ocurre en *M. tuberculosis* además de estar manosilada; a pesar de ello es necesario sobreexpresar la proteína para observar la manosilación.
- Una gran parte de la proteína expresada en la membrana de *S. lividans* es proteolisada aunque no pierde su glicosilación.
- Se observó la proteína secretada en el sobrenadante de cultivo de *S. lividans* cuando se cambió su péptido señal por uno de secreción y fue reconocida por el anticuerpo; sin embargo el reemplazo de su péptido señal alteró la manosilación.

10. PERSPECTIVAS

- Debido a que la forma secretada no está glicosilada, es necesario que la purificación del antígeno sea a partir de esta forma sobreexpresada en la membrana de *S. lividans* en donde ya se demostró su manosilación.
- Es necesario realizar un análisis estructural para demostrar si la proteína generada es manosilada de la misma manera que la proteína nativa en *M. tuberculosis*.
- Es recomendable purificar la proteína que está proteolisada y manosilada, ya que, en cantidad está mejor representada que el mismo antígeno expresado en membrana; de la misma manera secuenciar el péptido e identificar el sitio de corte y los sitios de manosilación.
- Realizar pruebas inmunológicas para observar el efecto inmunológico de esta proteína expresada en *S. lividans*.

11. ANEXOS.

Anexo #1. Buffer y medios de cultivo empleados.

Medio YEME

Extracto de levadura	0.3g
Peptona.....	0.5g
Extracto de malta.....	0.3g
Glucosa.....	1g
Sacarosa.....	34g
TOTAL 100mL en agua Milli-Q, pH7	

Después de autoclave adicionar:

MgCl ₂ (1M).....	0.5ml
Glicina 10%.....	5.0ml

Medio R2YE.

Solución base:

K ₂ SO ₄	10.3g
MgCl ₂	0.025g
Glucosa.....	1g
Casaminoácidos.....	1g
Aforar 80ml con H ₂ O Milli-Q.	

Después de autoclavar añadir:

KH ₂ PO ₄ (0.5%).....	1ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O (3.68%).....	8ml
L-Prolina	1.5ml
Tris.Cl (3%, pH7.2).....	10ml
Trazas R5*	0.2ml
CuSO ₄ 2mM.....	0.2ml
NaOH 1N.....	0.2ml
Extracto de levadura 10%.....	5ml

*Trazas R5: KH₂PO₄ (0.5%),
CaCl₂ (0.25M), Tris.Cl (0.25M,
pH 7.2)

Agar suave para transformaciones

Sacarosa.....	10.3g
MgCl ₂	1g
Tris.Cl (3%, pH 7.2).....	10ml

CaCl₂ (5M).....0.4ml
Agar.....0.65g
TOTAL 100ml en agua Milli-Q.

Medio YT2X

Bacto triptona.....1.6g
Extracto de levadura..... 1g
NaCl..... 0.5g
TOTAL 100mL en agua Milli-Q, pH7.2

Medio LB + Azúcar 25%

Bacto triptona.....1g
Extracto de levadura.....0.5g
NaCl.....1g
Azúcar.....25g
TOTAL 100ml en agua Milli-Q, pH 7

Buffer P

Sacarosa.....25.75g
MgCl₂.....0.5g
K₂SO₄.....0.062g
TOTAL 200ml en agua Milli-Q

Buffer de tratamiento 2X para proteínas.

Tris HCl pH 6.8.....2.5ml
SDS 10%.....4ml
Glicerol.....2ml
2-mercaptoetanol.....1ml
H₂O bidestilada.....0.5ml
Azul de bromofenol.....0.0005gr
TOTAL.....10ml

Buffer para sonicar:

MgCl₂ 1M.....0.44ml
DTT 4mM.....0.061g
RNAsa.....0.5µl
Inhibidor de proteasas Roche.....5 tabletas
Tris 20mM pH8.....107.06ml
TOTAL.....110ml

Anexo #2. Transformación por electroporación.

1. Incubar 3ml de medio SOB con *E. coli* y dejar toda la noche creciendo.
2. Pasar 100µl de precultivo a un matraz con 25ml de medio SOB, dejar crecer hasta una D. O de 600nm.
3. Pasar a un tubo y centrifugar 5 minutos a 5000rpm, decantar el sobrenadante y agitar para resuspender.
4. Colocar 15ml de glicerol al 10% estéril y a 4°C, agitar bien y centrifugar 5 minutos a 5000rpm.
5. Decantar el sobrenadante y agrega nuevamente 15ml de glicerol al 10% y volver a centrifugar 5 minutos a 5000rpm.
6. Pasar 50µl de células a un tubo eppendorf y colocar 2µl de DNA y mezclar.
7. Colocarlo en las cubetas para electroporación estériles, las cuales previamente deben ser enfriadas en hielo. Dar un pulso de 1820 volts en el electroporador.
8. Recuperar las células de la cubeta añadiendo 1ml de medio SOB, resuspender con una pipeta y pasar a un tubo chico con tapón de metal. Dejar recuperando en agitación por 1 hora.
9. Pasar la muestra a un tubo eppendorf y centrifugarla a 5000rpm durante 5 minutos. Decantar el sobrenadante y resuspender en vórtex. Agregar 200µl de medio SOB.
10. Sembrar en cajas con medio LB y sus antibióticos correspondientes, colocando 100µl de muestra en cada caja e incubar toda la noche.

Anexo #3. Protocolo para conjugación *E. coli-Streptomyces* (Flett et. al., 1997; modificado por Servín-González).

1. Hacer un pre cultivo de *E. coli* ET12567/pUZ8002 que contiene el vector a transferir, en este caso pIJ6902, en 3ml de medio líquido YT2X con de apramicina 50µg/ml, cloranfenicol 25µg/ml y kanamicina 50µg/ml. Incubar toda la noche a 37°C en agitación.
2. Inocular con el precultivo un matraz con 20ml de medio YT2Xy los mismos antibióticos a las concentraciones arriba descritas Incubar de 4-5 horas a 37°C en agitación hasta una DO de 600nm.
3. Centrifugar el cultivo a 6000rpm 10 min a temperatura ambiente. Retirar el sobrenadante.
4. Lavar tres veces con 20ml de YT2X a 6000rpm 10 min a temperatura ambiente.
5. Resuspender el pellet en 0.3ml de YT2X.
6. Aparte, a 50µl de una preparación concentrada de esporas de *S. lividans* 1326, dar choque térmico a 50°C por 10 min.
7. Juntar las esporas de *S. lividans* con *E. coli* resuspendida en YT2X. Hacer diluciones 10^{-1} y 10^{-2} .
8. Plaquear en medio MS con MgCl₂ 10mM.
9. Incubar a 30°C y a las 18-20 horas inundar la superficie de las cajas de conjugación con 1 ml de agua estéril que contiene 25µl de ácido nalidíxico y 20µl de apramicina.

Anexo #4. Purificación de fragmentos de DNA en geles de agarosa de bajo punto de fusión.

1. Después de correr el gel y teñir con bromuro de etidio hay que cortar las bandas, procurando cortar la agarosa lo más cerca del DNA.
2. Poner a fundir la rebanada de agarosa que contiene el DNA en un tubo eppendorf a 65-70°C, durante 10 min. Calcular el volumen de la agarosa fundida y añadir 1/10 de volumen de NaCl 5M. Mezclar bien y dejar 5 min más en el baño.
3. Saturar un poco de fenol con NaCl de la siguiente manera: en un tubo eppendorf mezclar 100µl de NaCl 5M, 400µl de agua y 500µl de fenol. Centrifugar un minuto y retirar la fase acuosa. Colocar el fenol a 37°C.
4. Colocar la agarosa fundida 5 min a 37°C.
5. Añadir al tubo con la agarosa 2/3 de volumen de fenol saturado e inmediatamente agitar en vórtex durante 30 seg (trabajar lo más rápido posible para evitar que la agarosa se gelifique).
6. Centrifugar 5 min en la microfuga y pasar la fase acuosa a un tubo limpio.
7. Añadir al fenol 90µl de TE o agua y 10µl de NaCl 5M. Agitar en vórtex.
8. Centrifugar 2 min y mezclar la fase acuosa con la anterior.
9. Añadir 1 vol de fenol/cloroformo a la fase acuosa, agitar 15 seg en vórtex y centrifugar 2 min.
10. Pasar la fase acuosa a un tubo limpio y añadir 1 µl de glucógeno (20 µg/µl) y 1 volumen de isopropanol. Mantener a -20°C por al menos 2 horas.
11. Centrifugar el DNA 10 min a 14000rpm. Sacar todo el alcohol y secar el pellet.
12. Resuspender en un volumen adecuado de TE.

Anexo #5. Protocolo para minipreparaciones de DNA de plásmido (Kieser et al., 2000; modificado por Servín-González).

1. Resuspender el paquete de células o el micelio en 200µl de Tris 25mM, EDTA 25mM pH8. En el caso de *Streptomyces* el TE 25mM debe contener lisozima 2mg/ml.
2. Para *E. coli* incubar 5 min en hielo. Para *Streptomyces* al menos 30 min a 37°C o hasta que el micelio esté visiblemente lisado (debe ponerse translúcido y viscoso).
3. Añadir 400µl de una solución fresca de NaOH 0.2N, SDS 1%. Mezclar bien por inversión vigorosa de los tubos, hasta que se vea transparente, homogéneo y muy viscoso. En el caso de *Streptomyces*, si no se mezcla bien, agitar 10 seg aproximadamente en el vórtex con los tubos invertidos. Incubar 10 min en hielo.
4. Añadir 300µl de acetato de potasio 3M pH4.8, mezclar bien por inversión hasta que se pierda la viscosidad y se vea un precipitado blanco. Incubar 15 min en hielo. (Centrifugar en microfuga 5 min; pasar el sobrenadante a un tubo limpio).
5. Añadir al tubo 400µl de fenol/cloroformo, agitar 30seg en vórtex y centrifugar 2min en la microfuga.
6. Pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir 1ml de etanol absoluto frío. Dejar precipitando 5min a temperatura ambiente.
7. Centrifugar 10 min en la microfuga. Retirar todo el sobrenadante.
8. Agregar 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y 1 volumen de isopropanol; precipitar 10 min en hielo. Centrifugar 10 min a 3500rpm y retirar todo el sobrenadante.
9. Resuspender el pellet en 50µl de TE (Tris 10mM, EDTA 0.1mM pH8). Añadir 150µl de acetato de sodio 4M pH6. Mezclar e incubar una hora a -20°C.
10. Centrifugar 10 min en la microfuga. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio y añadir 200µl (o un volumen) de isopropanol. Precipitar 10 min en hielo.
11. Centrifugar 10 min en la microfuga. Eliminar todo el sobrenadante. Resuspender en 45µl de TE, añadir 5µl de acetato de sodio 3M pH6 y 125µl de etanol frío.
12. Centrifugar 10 min en la microfuga. Eliminar todo el sobrenadante. Secar pellet y resuspenderlo en 25µl de TE.

Anexo #6. Transformación de protoplastos de *Streptomyces* (Kieser et. al., 2000; modificado por Servín-González).

1. Crecer el micelio a partir de esporas en 25mL de YEME suplementado con $MgCl_2$ 1M (0.125ml) y glicina 10% (1.25ml) durante 36 horas a 29°C con agitación.
2. Lavar el micelio con sacarosa al 10.3% (Pasar el cultivo a un tubo de centrifuga de rotor JA20 y agregar 10ml de sacarosa, centrifugar por 5 min a 3500rpm, secar el pellet y resuspender en 25ml de sacarosa; distribuirlo en 5 tubos de vidrio de tapón de rosca estériles, centrifugar 5 min a 3500 rpm, eliminar el sobrenadante y congelar el pellet a -20°C).
3. Suplementar el buffer P y dejar reposar 30 min. Tomar 5ml de éste y disolver 5mg de lisozima. Filtrar el buffer P y después los 5m con lisozima.
4. Descongelar el micelio y agregarle el filtrado de lisozima, mezclar e incubar 1 hora a 30°C agitando suavemente cada 15 min. Tomar una muestra para ver al microscopio y asegurarse que se hayan formado los protoplastos.
5. Filtrar los protoplastos por un filtro de algodón, en ese mismo filtro, agregar 5ml de buffer P y pasarlos a un tubo de vidrio. Centrifugar 12 min a 3500rpm.
6. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en lo poco que haya quedado de sobrenadante; agregar 3µl del plásmido purificado e inmediatamente después agregar 0.6ml de PEG (0.5gr disueltos en 1.5ml de buffer P) con una pipeta Pasteur mezclando con la misma pipeta 4 o 5 veces. Agregarle 5 ml de buffer P y centrifugar 12 min a 3500rpm.
7. Eliminar el sobrenadante y resupender con los nudillos para luego agregarle 0.3ml de buffer P.
8. Hacer diluciones 10^{-1} y 10^{-2} .
9. Poner en cada caja de medio R2 suplementado 0.1ml de la dilución y 2.5ml de agar suave hipertónico. Cubrir completamente la superficie, dejar gelificar e incubar a 30°C entre 18 y 20 horas.
10. Inundar las cajas con 1 ml de agua estéril con el antibiótico correspondiente e incubar nuevamente a 30°C por una semana hasta que esporulen las colonias transformantes.

Anexo #7. Precipitación de proteínas con Metanol-Cloroformo. Wessel & Flügge, 1983 (Modificado para sobrenadante de *S. lividans*)

1. En un tubo con tapón de rosca colocar 1.4ml de muestra, agitar con vórtex.
2. Agregar 5.6ml de metanol, agitar con vórtex.
3. Agregar 1.4ml de cloroformo, agitar con vórtex.
4. Agregar 4.2ml de agua, agitar con vórtex.
5. Centrifugar 10 min a 4500rpm. Retirar la fase acuosa superior sin tocar ni remover la interfase de proteínas.
6. Agregar 4.2ml de metanol, agitar con vórtex.
7. Pasar 1.5ml a un tubo eppendorf y centrifugar 1 min a 12000rpm. Quitar todo el sobrenadante.
8. Repetir el paso anterior hasta terminar de precipitar la muestra.
9. Resuspender la muestra en buffer de tratamiento 2X. Hervir y congelar.

Anexo #8. Fraccionamiento celular.

1. Sonicar muestras a 30 pulsos/20 seg c/u en 25ml de buffer para sonicar.
2. Centrifugar a 7000 rpm 1 hora a 4°C.
3. Ultracentrifugar el sobrenadante a 33000 rpm 1 hora a 4°C en rotor 70Ti.
4. Colectar el sobrenadante (citoplasma) y lavar el pellet (membrana) con NaCl 50mM en Tris 20mM pH8.
5. Ultracentrifugar nuevamente a 33000rpm 30 min a 4°C. Retirar todo el sobrenadante y resuspender el pellet en 100µl de buffer para sonicar. Almacenar a -70°C.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **World Health Organization WHO:** Report 2011. Global Tuberculosis Control, Surveillance, Planning.
2. **Ahmad S.** 2010. New approaches in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection. Respratory Research. 11: 169-186.
3. **Akira S., Takeda K. & Kaisho T.** 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nature Immunology. 2: 675-680.
4. **Anné J., Maldonado B., Impe J. V., Mellaert L. V. & Bernaerts K.** 2011. Recombinant protein production and Streptomycetes. Journal of Biotechnology.
5. **Baulard, A. R., Gurcha, S. S., Engohang-Ndong, J., Gouffi, K.,Locht, C. & Besra G. S.** 2003. In vivo interaction between the polyprenol phosphate mannose synthase Ppm1 and the integral membrane protein Ppm2 from *Mycobacterium smegmatis* revealed by a bacterial two-hybrid system. The Journal of Biological Chemistry 278: 2242–2248.
6. **Bentley S., Chater K., Cerdeño-Tárraga M., Challis G., Thomson R., James K., Harris D., Quail M., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O’Neil S., Rabinowitschi E., Rajandream M., Rutherford K., Rurtter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Wooward J., Barrell B., Parkhill J. & Hopwood D.** 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature. 417: 141-147.
7. **Brennan P. J. & Nikaido H.** 1995. The envelope of mycobacteria. Annual Review of Biochemistry. 64: 29–63.
8. **Brightbill H. D., Libraty D.H., Krutzik S.R.**1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. Science. 285:732-736.

9. Büttner M. J. & Flärdh K. 2009. Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. Nature Reviews Microbiology. 7: 36-49.
10. Christlet T. H. & Veluraja K. 2001. Database analysis of O-glycosylation sites in proteins. Biophysical Journal. 80: 952-960.
11. Cole S., Brosch R., Perkhill J., Garnier T., Churcher C., Haris D., Gordon S., Elgimeler K., Gas S., Barry C., Tekala F., Badcock K., Basham D., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M., Rajandream M., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J., Taylor K., Whitehead S. & Barrell B. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 393:537-544.
12. Cooper H. N., Gurcha S., Nigou J., Brennan P., Belisle J., Besra G. & Young D. 2002. Characterization of mycobacterial protein glycosyltransferase activity using synthetic peptide acceptors in a cell-free assay. Glycobiology. 12: 427-434.
13. Cowlshaw D. A. & Smith M. C. 2002. A gene encoding a homologue of dolichol phosphate β -D-Mannose synthase is required for infection of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by Phage ϕ C31. Journal of Bacteriology. 184: 6081-6083.
14. Díaz-Silvestre H., Espinosa-Cueto P., Sánchez-González A., Esparza-Cerón M., Pereira-Suárez A., Bernal-Fernández G., Espitia C. & Mancilla R., 2005. The 19kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria. Microbial pathogenesis. 39: 97-107.
15. Dobos K. M., Khoo K. H., Swiderek K. M., Brennan P. J. & Belisle J. T. 1996. Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Bacteriology. 178: 2498-2506.
16. Espitia C. & Mancilla R. 1989. Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens. Clinical and Experimental Immunology. 77: 378-383.
17. Espitia C., Servín González L. & Mancilla R. 2010. New insights into protein O-mannosylation in actinomycetes. Molecular Biosystems. 6: 775-781.

18. **Feng C. G., Jankovic D., Kullberg M., Cheever A., Scanga C.A. & Hieny S.** 2003. Maintenance of pulmonary Th1 effector function in chronic tuberculosis requires persistent IL-12 production. Journal of Immunology. 174: 4185-4192.
19. **Flynn, J. L. & Chan J.** 2001. Immunology of tuberculosis. Annual Review of Immunology. 19, 93–129.
20. **Garbe T., Harris D., Vordermeier M., Lathigra R., Ivanyi J. & Young D.** 1993. Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* 19-Kilodalton antigen in *Mycobacterium smegmatis*: Immunological analysis and evidence of glycosylation. American Society for Microbiology. 61: 260-267.
21. **Gandhi N. R., Nunn P., Dheda K., Schaaf H. S., Zignol M., van Soolingen D., Jensen P. & Bayona J.** 2010. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. The Lancet. 375: 1830-1843.
22. **González-Cerón G., Miranda-Olivares O. J. & Servin-González L.** 2009. Characterization of the methyl-specific restriction system of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and of the role played by laterally acquired nucleases. FEMS Microbiology. 301:35-43.
23. **González-Zamorano M., Mendoza H. G., Xolalpa W., Parada C., Vallencillo A., Bigi F. & Espitia C.** 2008, *Mycobacterium tuberculosis* glycoproteomic base on ConA-Lectin affinity capture of mannosylated proteins. American Chemical Society. 8:721-733.
24. **Grant S. G., Jessee J., Bloom F. R. & Hanahan D.** 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 87: 4645-4649.
25. **Harth G., Lee B. & Horwitz M. A.,** 1997. High levels heterologous expression and secretion in rapidly growing nonpathogenic mycobacteria of four major *Mycobacterium tuberculosis* extracellular proteins considered to be leading vaccine candidates and drug targets. Infect Immunology. 65: 2321-2328.
26. **Herrmann J. L., Gaora P.O., Gallagher A., Thole J. E. & Young D. B.** 1996. Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. The EMBO Journal. 14: 3547-3554.

27. Herrmann J. L., Delahay R., Gallagher A., Robertson B. & Young D. B. 2000. Analysis of post-translational modification of mycobacterial proteins using a cassette expression system. FEBS Letters. 473:358-362.
28. Horn C., Namane A., Pescher P., Riviere M., Romain F., Puzo G., Barzu O. & Marchal G. 1999. Decreased capacity of recombinant 45/47kDa molecules (APA) of *Mycobacterium tuberculosis* to stimulate T lymphocyte responses related to changes in their mannosylation pattern. The Journal of Biological Chemistry. 274: 32023-32030.
29. Huang J., Shi J., Molle V., Solhberg B., Weaver D., Bibb M. J., Karoonuthaisiri N., Kao C. M., Buttner M. J. & Cohen S. N. 2005. Molecular Microbiology. 58:1276-1287.
30. Joanne L. F. & Chan J. 2001. Tuberculosis: Latency and Reactivation. Infection and Immunity. 69: 4195-4201.
31. Juarez M. D., Torres A. & Espitia C. 2001. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* region containing the *mpt83* and *mpt70* genes. FEMS Microbiology. 203: 95-102.
32. Kazuaki O & Marth JD. 2006. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. Cell. 126: 855-867.
33. Kendall D. A. & Izard J. W. 1994. Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. Molecular Microbiology. 15: 765-773.
34. Keren I., Minami S., Rubin E. & Lewis K. 2011. Characterization and transcriptome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* persisters. MBio. 2.
35. Kieser T., Moss M. T., Dale J. W. & Hopwood D. A. 1986. Cloning and expression of *Mycobacterium bovis* BCG DNA in *Streptomyces lividans*. Bacteriology. 168: 72-80,
36. Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F. & Hopwood D. A. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation. Norwich, U. K.
37. Lara M., Espitia C., Servín-González L., Singh M., Moreno C., Cohen I. & Nimtze M. 2004. Expression, secretion and glycosylation of the 45/47 kDa glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans*. Applied and Environmental Microbiology. 70: 679-685.

38. MacLeod A., Gilkes N., Escote-Carlson L., Warren R., Kilhurn D. & Miller R. C. 1992. *Streptomyces lividans* glycosylates an exoglucanasa (Cex) from *Cellulomonas fimi*. Gene. 121: 143-147.
39. Mawuenyega K. G., Forst C. V., Dobos K. M., Belisle J. T., Chen J., Bradbury E. M., Bradbury A. R & Chen X. 2005. *Mycobacterium tuberculosis* functional network analysis by global subcellular protein profiling. Molecular Biology of the Cell. 16:396-404.
40. McNeil D. J., Gewain K. M., Ruby C. L., Dezeny G., Gibbons P. H. & McNeil T. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. Gene. 111:61-68.
41. Meya D. B. & McAdam K. P. 2007. The TB pandemic: an old problem seeking new solutions. Journal of Internal Medicine. 261: 309-329.
42. Michell S. L., Whelan A. O., Wheeler P. R., Panico M., Easton L. R., Etienne T., Haslam S. M., Dell A., Morris H. R., Reason A. J., Hermman L., Young D. B. & Hewinson G. 2003. The MPB83 antigen from *Mycobacterium bovis* contains O-linked mannose and (1→3)-mannobiose moieties. The Journal of Biological Chemistry. 278: 16423-16432.
43. Moens S., Vanderleyden J. & Janssens A. 1997. Glycoproteins in prokaryotes. Archives of Microbiology. 168: 169–175.
44. Mustafa A. S. 2002. Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis. Molecular Immunology. 39: 113-119.
45. Nicole Scherr and Liem Nguyen. 2009 *Mycobacterium* versus *Streptomyces* we are different, we are the same. Current Opinion in Microbiology. 12:699–707.
46. Noss E., Pai R., Sellati T., Radolf J., Belisle J., Golenbock D., Boom W. & Harding C. 2001. Toll like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Immunology. 166: 910-918.
47. Pai R.K., Pennini M., Tobian A.A., Canaday D.H., Boom W.H. & Harding C.V. 2004. Prolonged Toll-like Receptor signaling by *Mycobacterium tuberculosis* and its 19-kDa lipoprotein inhibits Interferon- γ -induced regulation of selected genes in macrophages. Infect Immunology. 72: 6603-6614.

48. **Pozidis C., Lammertyn E., Politou A., Anne J., sianidis G. & Economou A.** 2001. Protein secretion biotechnology in *Streptomyces lividans*: large-scale production of tumor necrosis factor alpha. Biothechnology. 72: 611-619.
49. **Quesniaux V., Fremond C., Jacobs M., Parida S., Nicolle D., Yeremeev V., Bihl F., Erard F., Botha T., Drennan M., Soler M. N., Le Bert M., Schnyder B. & Ryffel B.** 2004. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. Microbes Infect. 6:946-959.
50. **Rao V., Dhar N., Shakila H., Singh R., Khera A., Jain R., Naseema M., Paramasivan C. N., Narayanan P. R., Ramanathan V. D. & Tyagi A. K.** 2004. Increased expression of *Mycobacterium tuberculosis* 19kDa lipoprotein obliterates the protective efficacy of BCG by polarizing host immune response to the Th2 subtype. Scandinavian Journal of Immunology. 61: 410-417.
51. **Reiko T. Lee., Gordan L. & Yuan C.** 2005. Glycoproteomics: protein modifications for versatile functions. European Molecular Biology Organization.6:1018-1022.
52. **Rezwan M., Grau T., Tschumi A. & Sander P.** 2007. Lipoprotein synthesis in mycobacteria. Microbiology. 153: 652-658.
53. **Sasseti A. & Rubin E.** 2003. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. National Academy of Sciences. 100: 12989-12994.
54. **Scherr N. & Nguyen L.** 2009. *Mycobacterium* versus *Streptomyces* – we are different, were are the same. Current Opinion in Microbiology. 12:699-707.
55. **Snider D. E. & Castro K. G.** 1998. The global threat of drug-resistant tuberculosis. The New England Journal of Medicine. 338: 1689-1690.
56. **Sthal P. D. & Ezekowitz R. A.** 1998. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. Current Opinion in Microbiology. 10: 50-55.
57. **Stewart G., Wilkinson K., Newton S., Sullivan S., Neyrolles O., Wain J., Patel J., Pool K-L., Young D. & Wilkinson R.** 2005. Effect of deletion or overexpression of the 19-kilodalton lipoprotein Rv3763 on the innate response to *Mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immunity. 73: 6831-6837.
58. **Sutcliffe I. C. & Harrington D. J.** 2004. Lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components. FEMS Microbiology Reviews. 28: 645-659.

59. **Takano E., White J., Thompson C. J. & Bibb M. J.** 1995. Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. Gene. 166:144-137.
60. **Tjalsma H., Bolhuis A., Jongbloed J. D. H., Bron S. & Van Dijk J. M.** 2000. Signal Peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64: 515-547.
61. **Tremblay D., Lemay J., Gilbert M., Chapdelaine Y., Dupont C. & Morosoli R.** 2002. High-level heterologous expression and secretion in *Streptomyces lividans* of two major antigenic proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. Canadian Journal of Microbiology. 48: 43-48.
62. **Vandervan C. B., Harder D., Crick C. D., & Belisle T. J.** 2005. Export-mediated assembly of mycobacterial glycoproteins parallels eukaryotic pathways. Science. 309:941-943.
63. **Wilkinson K., Newton S., Stewart G., Martineau A., Patel J., Sullivan S., Herrmann J-L., Neyrolles O., Young D. & Wilkinson R.** 2009. Genetic determination of the effect of post-translational modification on the innate immune response to the 19kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiology. 9: 93-103.