



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Clonación, expresión y glicosilación de la lipoproteína
antigénica MPT83 (Rv2873) de *Mycobacterium
tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

ISAÍ

ARISTA

CARRERA



**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.

Hoja de Datos del Jurado

I. Datos del alumno

Arista
Carrera
Isaí
26 13 18 96
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
305043894

II. Datos del tutor

Dr.
Luis
Servín
González

III. Datos del sinodal 1

Dr.
Sergio
Sánchez
Esquivel

IV. Datos del sinodal 2

Dra.
Clara Inés
Espitia
Pinzón

V. Datos del sinodal 3

M. en C.
Gabriela
González
Cerón

VI. Datos del sinodal 4

Dra.
Laura
Kawasaki
Watanabe

VII. Datos del trabajo escrito

Clonación, expresión y glicosilación de la lipoproteína antigénica MPT83 (Rv2873) de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*

80 págs.

2012

A mis padres...

Agradecimientos:

A la UNAM, por permitirme ser parte de su excelente comunidad académica y científica, por darme la formación académica necesaria para lograr terminar esta carrera, por proveer de enormes facilidades y gran cantidad de recursos en su labor de enseñanza y por mantener siempre ese espíritu universitario que portamos orgullosos.

Al Dr. Luis Servín González por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por brindarme el apoyo, asesoría, atención y continuo seguimiento a este proyecto, por sus excelentes explicaciones y por permitirme acercarme al mundo de las bacterias.

A la M. en C. Gabriela González Cerón por su asesoría en todos los experimentos realizados en este trabajo, por despejar mis dudas, por su disponibilidad de tiempo y por haberme enseñado la mayoría de las técnicas necesarias para trabajar en el laboratorio.

A la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón por su colaboración con este proyecto, por sus observaciones, críticas y sugerencias durante la realización del mismo.

A la M. en C. Cristina Parada por su apoyo técnico en la inmunización de conejas NZA, en la obtención de anticuerpos policlonales y por su ayuda en la realización de los ensayos de electroforesis de doble dimensión, muchas gracias.

A la Biól. Laura Elena Córdova Dávalos por su ayuda, comentarios y sugerencias en este proyecto, por sus consejos y por responder siempre a la multitud de dudas que me surgían durante los experimentos.

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por las correcciones a este escrito.

A la Dra. Laura Kawasaki Watanabe por las sugerencias, aclaraciones y correcciones a este escrito y sobre todo por ser una excelente profesora e impartir una de las mejores clases que tomé en la Facultad de Ciencias.

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

A CONACYT por haber financiado el Proyecto #103214: "Glicosilación de proteínas en *Streptomyces*. Mecanismos de glicosilación y expresión de proteínas endógenas y de *Mycobacterium tuberculosis*".

A mis amigos del laboratorio por hacer que la vida entre mecheros sea sumamente agradable.

Dedicatorias:

A las dos personas que he querido desde que abrí los ojos, que creyeron en mi, que me ayudaron, que me enseñaron, que admiro siempre y que han dado todo por brindarme la oportunidad de estudiar esta carrera. A ustedes no les dedico sólo esta tesis, les dedico mi vida entera. A ustedes padre y madre.

A mi hermano Jonás por haberme enseñado a sumar, restar y dividir para no necesitar hacerle caso a la profesora, y a mi hermana Osiris por ponerme un curita una vez cuando me corté el dedo. Pero sobre todo por haberme permitido crecer al lado de ustedes, por haber sido sólo nosotros tres durante todas esas tardes de nuestra infancia, que sin duda, nos definieron en gran parte. Gracias por cuidarme y tratar de enseñarme siempre para no cometer sus errores, por regañarme cuando era necesario y por intentar impulsar siempre cada una de mis aptitudes. Les dedico esta tesis porque su ayuda ha sido indispensable para poder lograr muchas de las cosas que he hecho en mi vida y porque en definitiva siempre serán aquellas dos personas de las que hablaré, que presumiré y que admiraré siempre.

A Edna Ayerim por su amistad, confianza y por sólo haber necesitado un atardecer para conocernos totalmente. Gracias porque eres la única persona que ha visto realmente cómo soy y aún sigues allí, y porque con tu sonrisa me ayudaste a dibujar el camino más agradable que he recorrido.

A Carlos Rosas porque me enseñó que no es necesario compartir algunos genes para ser hermanos.

A Omar, Wendy, Laura, Susana, Héctor, Iván, Alfonso, Julio, Ilse, Adrián, Efraín, Othón, Aníbal, Antonio y más, por vivir juntos muchas aventuras, por ayudar a construir mi forma de ser y por darme el privilegio de conocerlos.

A mis amigos del CCH Oriente, por todas esas tardes, carcajadas y locuras que cometimos juntos.

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. Importancia del estudio de la tuberculosis	3
2.2. Lipoproteínas de <i>M. tuberculosis</i>	4
2.2.1. Síntesis de lipoproteínas en micobacterias.....	5
2.3. Glicosilación de lipoproteínas en <i>M. tuberculosis</i>	9
2.3.1. Biosíntesis de proteínas O-manosiladas en bacterias	10
2.4. MPT83: uno de los principales antígenos de <i>M. tuberculosis</i>	12
2.5. <i>Streptomyces lividans</i> como hospedero para la producción de proteínas heterólogas	15
3. Justificación	17
4. Objetivos	18
5. Material y Métodos	19
5.1. Cepas Bacterianas y plásmidos utilizados	19
5.2. Obtención del gen Rv2873 de <i>M. tuberculosis</i>	21
5.3. Clonación del gen Rv2873 y obtención de anticuerpos.....	22
5.3.1. Purificación de la proteína MPT83 para la obtención de anticuerpos	22
5.3.2. Obtención de anticuerpos	23
5.4. Clonación del gen Rv2873 con péptido señal de lipasa	24
5.5. Clonación del gen Rv2873 con péptido señal y Rv2873 con péptido señal de lipasa en <i>S. lividans</i> 1326	26
5.5.1. Clonación de los genes en vector monocopia pIJ6902.....	26
5.5.2. Clonación del gen Rv2873 en vector multicopia pIJ6021.....	26
5.6. Obtención de esporas	27
5.7. Expresión de proteínas	28
5.7.1. Crecimiento de cultivos de <i>S. lividans</i> 1326.....	28
5.7.2. Separación de fracciones celulares de membrana, citoplasma, sobrenadante y obtención de proteínas	28

5.7.3.	Preparación de muestras de carga y electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	29
5.7.4.	Transferencia de proteínas a membranas PVDF (Difluoruro de polivinilideno).....	30
5.8.	Electroforesis de doble dimensión en geles de poliacrilamida	31
6.	Resultados y Discusión.....	33
6.1.	Expresión de la proteína MPT83 en <i>E. coli</i>	33
6.2.	Purificación de la proteína MPT83 en columna de agarosa Ni-NTA	34
6.3.	Expresión de la proteína MPT83 en <i>S. lividans</i>	34
6.4.	Expresión de la proteína MPT83 con péptido señal de secreción.....	34
6.5.	Glicosilación de MPT83 en <i>S. lividans</i> con el plásmido pBIA3.....	40
6.6.	Expresión de la proteína MPT83 con su propio péptido señal y su localización en la membrana plasmática.....	42
6.7.	Glicosilación de MPT83 en células con el plásmido pBIA4	48
6.8.	Expresión de proteínas a partir del vector integrativo pIJ6902.....	51
6.9.	Electroforesis en doble dimensión de la proteína MPT83 expresada a partir del plásmido pBIA4	53
6.10.	Electroforesis en doble dimensión de la proteína MPT83 expresada a partir del plásmido pBIA6	56
7.	Conclusiones	59
8.	Perspectivas	60
9.	Bibliografía	61
10.	Anexos	65
10.1.	Medios de Cultivo	65
10.2.	Protocolos	67

1. RESUMEN

El gen Rv2873 codifica para la lipoproteína MPT83 anclada a la membrana de *Mycobacterium tuberculosis* que en estado maduro se encuentra glicosilada. Esta proteína (MPT83) es uno de los antígenos inmunodominantes de *M. tuberculosis* y cuya función, aparentemente relacionada con la adhesión de la bacteria a la células del hospedero, es poco conocida.

En el presente trabajo, el gen Rv2873 que codifica la lipoproteína MPT83 fue expresado en *Escherichia coli* mediante el uso del vector pET28a, que permitió la unión de una cola de seis histidinas en la región N-terminal de la proteína sin el péptido señal. Posteriormente la proteína expresada fue purificada mediante una columna de Ni-NTA agarosa y utilizada para la obtención de anticuerpos policlonales anti-MPT83.

La proteína MPT83 también fue expresada en *Streptomyces lividans* mediante la clonación del gen Rv2873 en el vector de expresión de alto número de copias pIJ6021. Mediante ensayos de PCR se diseñaron los plásmidos pBIA3 y pBIA4 los cuales contenían el gen Rv2873 con un péptido señal de secreción proveniente de una lipasa extracelular de *Streptomyces exfoliatus* y el gen Rv2873 con su propio péptido señal tal como se encuentra en *M. tuberculosis* respectivamente. Se analizó la presencia de la proteína mediante ensayos de Western-blot en dos fracciones celulares: membrana y citoplasma, además del sobrenadante del cultivo, así como la presencia de glicosilación mediante el reconocimiento de manosas con el uso de la lectina Concanavalina A.

La proteína expresada a partir del plásmido pBIA3 fue observada únicamente en el sobrenadante del cultivo de forma proteolizada y carente de glicosilación, mientras que en las células con el plásmido pBIA4 se observó la proteína en la membrana celular con una masa de aproximadamente 25 kDa y dos formas proteolizadas de la proteína en el sobrenadante del cultivo. La proteína encontrada en la fracción membranal y una de las formas proteolizadas del sobrenadante fueron reconocidas por la Concanavalina A sugiriendo la presencia de glicosilación. No se observó la presencia de la proteína en la fracción del

citoplasma. Adicionalmente, la proteína MPT83 fue clonada en el vector integrativo pIJ6902 con su péptido señal y con el péptido señal de secreción, observando el mismo patrón de expresión de la proteína.

Se realizó además, electroforesis en doble dimensión a las proteínas observadas en la fracción de la membrana celular, confirmando expresión de la proteína MPT83 en *S. lividans* de forma glicosilada.

El hecho de haber observado la proteína MPT83 en *S. lividans* expresada correctamente en la membrana celular y de forma glicosilada, hizo evidente la homología que existe entre los mecanismos de glicosilación y acilación de *M. tuberculosis* y *S. lividans*.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Importancia del estudio de la Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* que afecta principalmente a los pulmones y que se transmite vía aérea mediante pequeñas gotas de saliva expulsadas por las personas que han sido infectadas con la bacteria. Sin embargo, esta infección suele ser asintomática en personas sanas dado que el sistema inmune promueve la formación de una barrera alrededor de la bacteria, por lo que del 30% de personas infectadas a nivel mundial, solamente el 10% llegan a desarrollar la enfermedad, sin embargo, las personas infectadas por el HIV tienen mayor probabilidad de enfermarse (OMS, 2011).

La TB es una de las enfermedades con mayor morbilidad y mortalidad; tan solo en el 2010 se reportaron 8.5-9.2 millones de casos de TB a nivel mundial y con un estimado de 1.2 a 1.5 millones de muertes (incluyendo los casos con HIV) a pesar de tener una tasa de incidencia que ha ido cayendo con un aproximado de 1.3% cada año desde el 2002 (OMS, 2011). Actualmente, la TB es tratada con 4 medicamentos principalmente, dentro de los cuales se encuentran la isoniazida y rifampicina como antibióticos de primera línea, sin embargo, éstos han sido usados desde hace ya varias décadas por lo que el surgimiento de una gran cantidad de cepas resistentes a dichos antibióticos ha llegado a ser un grave problema (Kaufmann, 2011; OMS, 2011).

La BCG (Bacillus Calmette-Guérin) es la única vacuna aprobada y usada desde hace varias décadas y que protege a los niños contra varios tipos de la enfermedad (meningitis y TB miliar) pero que falla en la protección de la forma más prevalente en estos días, la tuberculosis pulmonar en los adultos, además de sus problemas de seguridad con los pacientes que presentan HIV. Sin embargo, la aparición y el desarrollo de técnicas de manipulación genética durante los últimos años han ayudado a obtener información importante que ha facilitado el estudio y comprensión de *M. tuberculosis*. Además, la obtención de la secuencia completa

de su genoma, así como su manipulación, han abierto las puertas al desarrollo de numerosas investigaciones enfocadas al estudio de moléculas antigénicas indispensables durante la infección de la bacteria que podrían utilizarse para crear una vacuna que no solamente proteja a niños con la misma eficacia de la BCG, sino que sea segura para pacientes inmunocomprometidos y eficaz contra la tuberculosis en los adultos (Kaufmann, 2011).

2.2. Lipoproteínas de *Mycobacterium tuberculosis*

Las membranas celulares contienen proteínas especializadas enlazadas a la membrana. Esas proteínas se dividen en tres clases según su modo de asociación a la bicapa lipídica: proteínas integrales de membrana, proteínas periféricas de membrana y proteínas de membrana unidas a lípidos (lipoproteínas). Las proteínas integrales de membrana, llamadas también proteínas transmembranales, contienen regiones hidrofóbicas incrustadas en el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica; además se encuentran incrustadas con una parte expuesta sobre la superficie externa, y una parte expuesta a la superficie interna. Las proteínas periféricas de membrana se asocian a una cara de la membrana, mediante enlaces iónicos o puentes de hidrógeno con las proteínas integrales de membrana o con los grupos polares de los lípidos de membrana. Las lipoproteínas se encuentran unidas a la membrana mediante un enlace covalente con un lípido, en donde una cadena lateral de aminoácidos se une por un enlace de amida o éster a un grupo de ácido graso. Otras lipoproteínas de membrana están enlazadas de forma covalente a una cadena isoprenoide a través del átomo de azufre de un residuo de cisteína en el dominio C de la proteína (Horton, *et al.*, 2008).

La envoltura de las micobacterias posee componentes altamente bioactivos como lípidos, glicolípidos y polisacáridos que mantienen un papel importante en la patogenicidad de la bacteria (Daffé, *et al.*, 1998). Debido a esto, el estudio de los componentes de la envoltura celular se ha incrementado durante los últimos años para poder identificar cuáles de ellos contribuyen de manera directa o indirecta en

el desarrollo de la enfermedad.

Las lipoproteínas son una subclase de proteínas que se encuentran comúnmente en la envoltura celular de las bacterias; aproximadamente, entre el 1% y 3% del genoma bacteriano codifica lipoproteínas. Existe una gran cantidad de funciones en las que éstas se encuentran involucradas, como el transporte y plegamiento de proteínas, resistencia a antibióticos, sistemas de transporte ABC en donde actúan como proteínas de unión a sustrato e involucradas en la señalización celular (Juliane, *et al.*, 2010). Entre las lipoproteínas de *M. tuberculosis* que más han sido estudiadas se encuentran Mpt83, LppX, LpqW, LpqH (proteína de 19kDa) y PstS1 (proteína de 38 kDa).

Las lipoproteínas representan un subgrupo de proteínas de secreción caracterizadas por la presencia de una caja lipídica o lipobox. El motivo lipobox se encuentra localizado en la región C – terminal del péptido señal de la lipoproteína y está formado por 4 aminoácidos principalmente [LVI/ASTVI/GAS/C]. La función de este motivo es proveer una señal de reconocimiento para la modificación con lípidos, la cual es realizada mediante la unión de grupos acilo a un residuo de cisteína ubicado junto al péptido señal que es indispensable para el anclaje a la membrana lipídica. El precursor de la lipoproteína es translocado principalmente mediante el sistema Sec hacia la membrana plasmática y modificado posteriormente. La modificación de la proteína precursora es mediada por la acción de tres enzimas: fosfatidilglicerol-pre-prolipoproteína diacilglicerol transferasa (Lgt), peptidasa señal II (LspA) y fosfolípidos-apolipoproteínas N-aciltransferasa (Lnt). Mientras Lgt y LspA se encuentran presentes de manera universal en las bacterias, Lnt está reportada fundamentalmente en bacterias Gram-negativas (Rezwan, *et al.*, 2007).

2.2.1. Síntesis de lipoproteínas en micobacterias

Las lipoproteínas son sintetizadas como pre-lipoproteínas y su maduración ocurre mediante modificaciones post-traduccionales. Estas modificaciones son realizadas por enzimas que se encuentran localizadas en la membrana

citoplasmática de las células. El primer paso para la síntesis de las lipoproteínas es realizado por la proteína Lgt, que adhiere un residuo de diacilglicerol al grupo tiol de una cisteína ubicada en el motivo lipobox del péptido señal de la pre-lipoproteína (Figura 1) y que se encuentra conservada universalmente. En *E. coli*, la fracción lipídica de las proteínas se deriva del lípido de membrana fosfatidilglicerol, con cadenas compuestas de 16-20 átomos de carbono, en contraste con micobacterias, en donde las fracciones lipídicas de las lipoproteínas aún no han sido determinadas a nivel molecular. La proteína Lgt (Rv1614) de *M. tuberculosis* está compuesta de 468 aminoácidos (masa molecular 50.4 kDa), siendo considerablemente más grande que su homóloga en *E. coli* de 291 aminoácidos, además de que ambas contienen un pI diferente, el cual es de 9.66 en *E. coli* y de 4.45 en *M. tuberculosis*; aparentemente esta diferencia es debida a la gran cantidad de residuos de aspartato y glutamato presentes en la región C-terminal de la proteína (Rezwan, *et al.*, 2007).

Posterior a la modificación por Lgt, otra enzima denominada LspA es la encargada de procesar las pre-lipoproteínas; las pre-lipoproteínas tienen un peso molecular más alto de aproximadamente 2-3 kDa que las lipoproteínas maduras por lo que para su maduración, la LspA separa el péptido señal de la lipoproteína mediante el corte hidrolítico entre la cisteína y los aminoácidos del motivo lipobox (Figura 1). Se ha observado en estudios con mutantes “knockout” de LpsA en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* una reducida multiplicación en macrófagos y la ausencia total de patologías en los pulmones de ratones infectados, por lo que se sugiere un papel esencial de la síntesis de lipoproteínas durante la patogénesis de la bacteria (Rezwan, *et al.*, 2007). Los genes Rv1614 y Rv1539 que codifican las enzimas Lgt y LspA han sido identificados en el genoma de *M. tuberculosis* (Sutcliffe y Harrington, 2004).

En proteobacterias Gram negativas, pero no en bacterias Gram positivas, las lipoproteínas procesadas por LspA son modificadas posteriormente por la proteína Lnt, que adhiere un tercer residuo de acilo al grupo amino de la cisteína modificada. Estudios *in vitro* e *in vivo* han indicado que alguno de los tres fosfolípidos encontrados en la membrana celular de *E. coli* (fosfatidiletanolamina,

fosfatidilglicerol y cardiolipina) pueden servir como donadores del grupo acilo; la modificación por Lnt es un prerrequisito para el transporte de lipoproteínas a través del periplasma en *E. coli*. Se ha descrito una proteína codificada por el gen Rv2051c que posee dos dominios, siendo uno de ellos un motivo similar al motivo Lnt de *E. coli*, y el otro, parte de una proteína que ha sido caracterizada como una poliprenol monofosfomanosa sintasa (Ppm1) que transfiere manosa de GDP-manosa al poliprenol fosfato endógeno, siendo este último un importante intermediario en la síntesis de la pared celular micobacteriana constituida por lipomanano y lipoarabinomanano (Rezwan, *et al.*, 2007; Sutcliffe y Harrington, 2004). Recientemente se demostró que la enzima Ppm1 junto con otra denominada Ppm2, catalizan la transferencia de un residuo de ácido graso al grupo α -amino de una cisteína en el extremo N-terminal de las lipoproteínas, indicando que la actividad de Lnt en *E. coli* también se encuentra presente en *M. tuberculosis* (Tschumi, *et al.*, 2009).

Homólogos de Lnt también han sido encontrados en actinobacterias como *Streptomyces* y *Corynebacterium*. Un análisis exhaustivo de los genomas bacterianos de diferentes phyla sugiere que los homólogos de Lnt están presentes en microorganismos con una envuelta celular compleja, pero no en bacterias Gram positivas ordinarias.

La presencia de homólogos de Lnt y la localización de lipoproteínas en la pared celular de las micobacterias sugiere que éstas puedan ser transportadas mediante un sistema que podría ser homólogo o análogo al sistema Lol de *E. coli*, compuesto por un complejo de 3 proteínas denominado transportador ABC (LolC, LolD y LolE) que liberan las lipoproteínas de la membrana plasmática, una chaperona periplásmica (LolA) y un receptor encontrado en la membrana externa (Rezwan, *et al.*, 2007; Sutcliffe y Harrington, 2004). A pesar de que no se han encontrado homólogos del sistema Lol en *M. tuberculosis*, recientes análisis estructurales han revelado homologías estructurales de la lipoproteína LppX con las proteínas LolA y LolB de *E. coli* (Sulzenbacher, *et al.*, 2006).

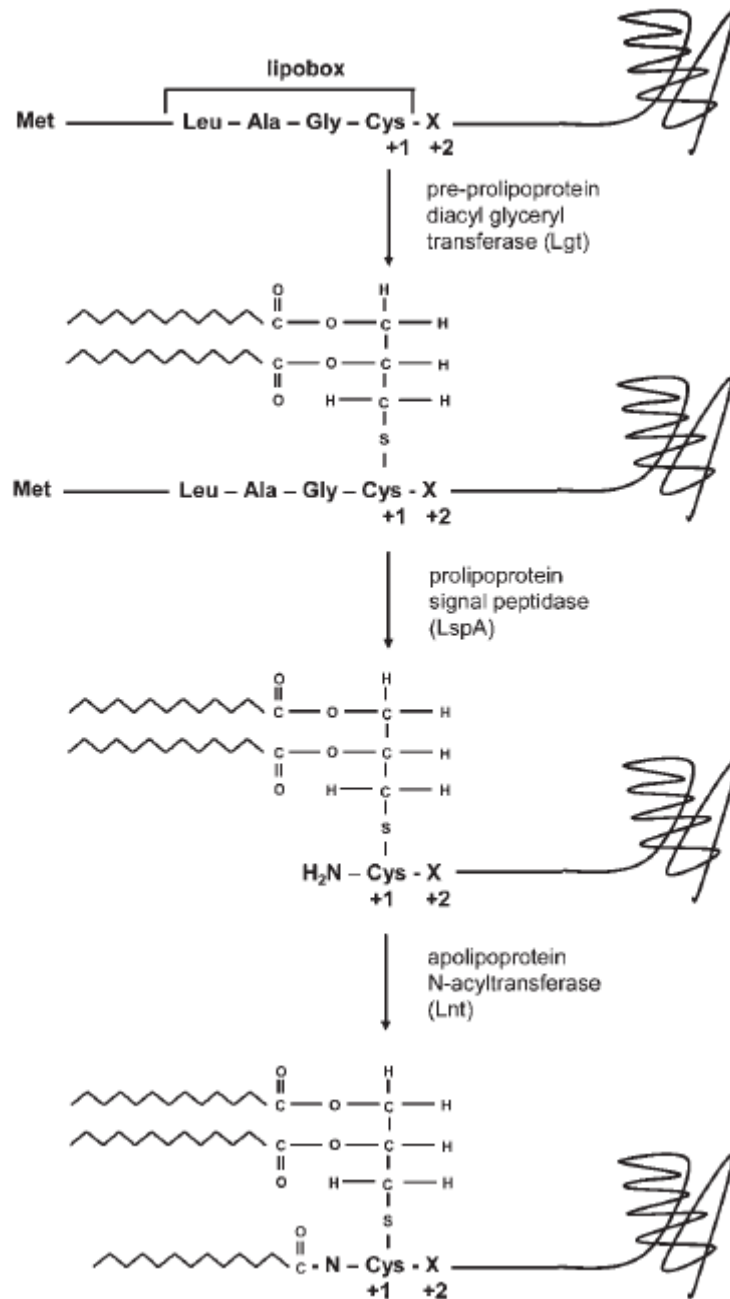


Figura 1. Biosíntesis de lipoproteínas en bacterias. Inicialmente la pre-pro-lipoproteína es modificada post-traduccionalmente mediante la adición de un diacil glicerol por acción de la enzima Lgt, posteriormente la enzima LpsA corta el péptido señal de la proteína entre la cisteína y los 3 aminoácidos de la caja de lipidación (Leu-Ala-Gly). Finalmente, en bacterias Gram negativas se observa la presencia de Lnt, cuyo papel es añadir un tercer residuo de diacil glicerol a la cadena lipídica (Tomada de Rezwan, *et al.*, 2007).

2.3. Glicosilación de lipoproteínas en *M. tuberculosis*

Anteriormente, se consideraba que únicamente las células eucariontes tenían la capacidad para glicosilar proteínas, sin embargo, en la década de los 90's, con la aplicación de nuevos métodos para el análisis de estructuras de biomoléculas, se encontró evidencia de que algunas proteínas podrían estar siendo glicosiladas en las bacterias. *Mycobacterium*, *Neisseria* y *Streptococcus* son algunos de los géneros en los que inicialmente se observaron proteínas glicosiladas; las bacterias pertenecientes a éstos son en su mayoría patógenas, lo que contribuyó a pensar que la glicosilación podría jugar un papel importante durante la infección de las bacterias. (Toumanen E., 1996).

Las glicoproteínas son proteínas que contienen oligosacáridos unidos en forma covalente; las cadenas de carbohidrato de una glicoproteína varían de longitud, de 1 hasta más de 30 residuos y pueden llegar a formar hasta el 80% de la masa total de la molécula. Las glicoproteínas son un grupo extraordinariamente diverso que abarca enzimas, hormonas, proteínas estructurales y proteínas de transporte, además de mostrar gran variabilidad en la composición de sus cadenas de oligosacáridos. Las cadenas de oligosacáridos de la mayor parte de las glicoproteínas están enlazadas a través de enlaces *O* o *N*- glicosídicos. En los oligosacáridos unidos por *O*, un residuo de azúcar se enlaza en forma típica a la cadena lateral de un residuo de serina o de treonina, mientras que en los oligosacáridos unidos por *N*, el residuo está unido al nitrógeno del grupo amido de un residuo de asparagina (Horton, *et al.*, 2008).

Existen varios tipos de *O*-glicosilación, como *O*-GalNac glicosilación, que constituye el tipo más abundante de glicosilación en proteínas; la *O*-GlcNac glicosilación, se encuentra en la mayoría de proteínas nucleares y citoplasmáticas en sistemas eucariontes; la *O*-fucosilación, una modificación post-traducciona es encontrada en proteínas que participan en procesos fisiológicos como señalización celular, coagulación o metástasis; *O*-glucosilación encontrada en factores de coagulación y la *O*-manosilación, que fue primeramente encontrada en levaduras, siendo una modificación en la cual un residuo de manosa se une a los

aminoácidos treonina y serina de las proteínas, resultando en la elongación de la cadena de oligosacáridos por la adición de manosa enlazada en *O* o *N* (Peter-Katalinic, 2005).

Actualmente, tanto la O-glicosilación como la N-glicosilación han sido reportadas en bacterias; específicamente, la O-manosilación ha sido observada en gran cantidad de antígenos provenientes de micobacterias, sin embargo, la forma en que ésta se lleva a cabo aún no está completamente clara.

2.3.1. Biosíntesis de proteínas O-manosiladas en bacterias

La O-manosilación de proteínas requiere glicosiltransferasas, sintasas nucleótido-azúcar y acarreadores lipídicos. El mecanismo de O-manosilación de proteínas es bien conocido en *Saccharomyces cerevisiae*, y ha servido para el entendimiento de las reacciones equivalentes en actinomicetos. En levaduras, la manosa es obtenida a partir de GDP-manosa, la cual es derivada de un intermediario de la glucólisis, fructosa-6-fosfato, mediante la acción secuencial de las enzimas fosfo-manosa-isomerasa (PMI), fosfomanomutasa (PMM) y GDP-manosapirofosforilasa (GMPP). Sin embargo, la manosilación ocurre en el lumen del retículo endoplásmico (RE) de la célula, y el primer paso no requiere la presencia de GDP-manosa, sino que la manosa sea activada por el acarreador lipídico dolicol, presente en el RE. El dolicol es un poli-isoprenoide que en levaduras está formado de 14-17 unidades de isopreno con un α -isoprenil saturado y que es manosilado por la acción de una dolicol-fosfato-manosintasintasa (DPM) que se encuentra anclada a la membrana citoplasmática mediante el extremo hidrofóbico C-terminal. El dolicol-fosfato-manosa es usado como sustrato para la transferencia de manosa a los grupos hidroxilo de los aminoácidos serina y treonina de la proteína que es secretada co-traduccionalmente; la transferencia de manosa es llevada a cabo por una dolicol-fosfo-manosamanosiltransferasa (PMT), que se encuentra en la membrana del RE y agrupada en tres familias (PMT1, PMT2 y PMT4), donde PMT1 y PMT2 actúan en complejos que participan en la glicosilación de diferentes proteínas y PMT4 en la glicosilación de proteínas de

membrana. Cabe destacar que las PMTs únicamente realizan la transferencia del ataque de la primera manosa en los residuos de aminoácidos, para que otras manosiltransferasas continúen con el elongamiento de la cadena (Espitia *et al.*, 2010; Lommel y Strahl, 2009).

Varios aspectos de la manosilación de proteínas en actinomicetos son similares en levaduras; sin embargo, existen algunas diferencias. La biosíntesis de manosa es esencial en micobacterias como *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, pero no en estreptomicetos. Al igual que en levaduras, la manosa debe ser activada en un acarreador lipídico para la manosilación de proteínas, sin embargo, el dolicol no está presente en actinomicetos, por lo que es necesario el uso de un lípido que lleve a cabo la misma función. El poliprenol fosfato es manosilado por la acción de la poliprenol-fosfo-manosintas (PPM), homóloga a la DPM sintasa de las levaduras y puede sustituir al dolicol. Esta PPM contiene un dominio N-terminal con hélices transmembranales que anclan la proteína a la membrana citoplasmática, homólogo a Lnt y a un dominio catalítico C-terminal, que en estreptomicetos y otras micobacterias son codificados por genes separados. Por otro lado, la transferencia de manosa a las proteínas es llevada a cabo por manosiltransferasas homólogas a la familia de PMT's en levaduras; sin embargo, se ha encontrado que en actinomicetos, sólo una PMT es codificada en su genoma, además de que las reacciones de manosilación de proteínas deben llevarse a cabo en la membrana citoplasmática debido a la ausencia del RE en bacterias (Espitia *et al.*, 2010).

Especialmente en *M. tuberculosis* se ha encontrado otra PPM que manosila el poliprenol fosfato directamente de GDP-manosa, además de que se ha observado que la manosilación en este organismo es dependiente de la traslocación mediada por el sistema Sec.

2.4. MPT83: uno de los principales antígenos de *M. tuberculosis*

Los primeros reportes de la proteína MPB70 se hicieron en 1960 en donde se identificó como una proteína altamente expresada por *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) que provocaba un tipo de hipersensibilidad retardada en conejillos de indias. El término 'MPB' refiere a la proteína de *M. bovis* y 'MPT' a la proteína proveniente de *M. tuberculosis*.

Posteriormente mediante la generación de anticuerpos y pruebas de radio inmunoensayos de inhibición, se observó que MPB70 se expresaba a diferentes niveles en las diferentes cepas de BCG. Debido a esto se hizo una clasificación de las cepas con base en los niveles de expresión de la proteína, por lo que las cepas BCG Tokyo, Moreau, Rusia, Suecia, Bergen y Rumania expresan altos niveles de MPB70 y las cepas BCG Pasteur, Danesa 1331, Glaxo, Tice y Beijin, presentan baja cantidad de MPB70, siendo todas distribuidas por el Instituto Pasteur con base en esta clasificación desde 1920. La baja presencia de MPB70 en extractos de células lisadas, previamente separadas del cultivo, indicó fuertemente que la proteína era secretada por la célula (Wiker, 2009) mediante el corte de su péptido señal de 30 aminoácidos cuya función es dirigir la translocación de la proteína a través de la membrana (Terasaka, *et al.*, 1989); además, la observación de que células muertas de la cepa BCG Tokyo inducían bajos niveles de hipersensibilidad cuando eran comparados con pequeñas dosis de células vivas BCG Tokyo reforzó esta idea. Posteriormente se descubrió otra proteína denominada MPB80 que resultó ser una isoforma de MPB70, siendo ambas proteínas codificadas por el mismo gen.

En estudios preliminares en los que se evaluó la reactividad de antígenos preparados a partir de filtrados de cultivo de *M. bovis* contra el suero de ganado infectado con la misma bacteria, se describió la presencia de 4 proteínas que reaccionaban fuertemente contra el suero, entre ellas la proteína MPB70 encontrada a un peso molecular de 22 kDa, y en menor cantidad, dos supuestas formas glicosiladas encontradas a 25 kDa y 23 kDa de ésta misma proteína (Fifis, *et al.*, 1992). Posteriormente, mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos

y SDS-PAGE, se mostró que la proteína de 23 kDa no era una forma glicosilada de MPB70, sino que era una proteína diferente que mantenía una movilidad relativa de 0.83, significativamente más alta que la movilidad de MPB70, por lo que se denominó MPB83. En el mismo estudio se analizó la secuencia de aminoácidos de la región N-terminal de ambas proteínas, mostrando que MPB70 y MPB83 eran altamente homólogas a pesar de presentar diferencias en sus cadenas polipeptídicas (Harboe M. , *et al.*, 1995). Después, mediante el análisis genético del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, se demostró que las proteínas MPT70 y MPT83 en su forma de 25 kDa se encuentran codificadas por genes diferentes, con el gen de MPT83 situado 2.4 kb río arriba del gen de MPT70. Además, con el análisis de la secuencia de aminoácidos, se observó que MPT83 es codificada por un marco de lectura abierto de 660 pb, con una composición de 220 aminoácidos y con un peso molecular de 22 kDa aproximadamente; adicionalmente se observó la presencia de un péptido señal de secreción típico en procariontes y un motivo LAGCS para el corte del péptido señal y posterior lipidación de la proteína (Hewinson, *et al.*, 1996).

Posteriormente, mediante el uso de anticuerpos monoclonales que reconocían un epítipo común de MPB70 y MPB83, se comparó la expresión de ambas proteínas en *M. bovis* BCG, *M. bovis* virulenta y *M. tuberculosis* mediante ensayos de Western-blot, observando que la variación en la expresión de MPB70 en las diferentes cepas de BCG también era aplicable para MPB83, y que además, ésta era expresada en grandes cantidades en *M. bovis* mientras que en *M. tuberculosis* H37Rv, MPT83 era expresada a bajos niveles cuando era crecida *in vitro*; adicionalmente, mediante ensayos de Inmuno-blot usando suero de ratones infectados *in vivo* con *M. tuberculosis* H37Rv, observaron que éste reaccionaba fuertemente con MPT83, indicando que la proteína era altamente inmunogénica durante la infección (Hewinson, *et al.*, 1996).

Estudios posteriores realizados con ensayos de Inmubo-blot, extracción con detergente (Triton X-114) y Citometría de flujo, indicaron que la proteína MPB83 en su forma de 25 kDa se encontraba en la superficie del bacilo de *M. bovis* BCG Tokyo, confirmando la localización de la proteína MPT83 en *M. tuberculosis*

(Harboe, *et al.*, 1998), en contraste con la forma de 23 kDa, encontrada principalmente en el filtrado de cultivo junto a MPB70 (Hewinson, *et al.*, 1996; Harboe, *et al.*, 1998).

Sin embargo, no fue hasta el año 2003, en que se demostró mediante Western-blot, análisis de afinidad a Concanavalina A, espectrometría de masas y análisis de carbohidratos, que la lipoproteína MPB83 está glicosilada con residuos de manosas mediante la unión de un enlace tipo (1 → 3), observando 9 posibles sitios de glicosilación dentro de los cuales dos residuos de treonina en las posiciones 48 y 49 fueron identificados directamente. Además, se confirmó mediante la secuenciación de la región amino-terminal realizada tanto a la forma predominante de 25 kDa y a la forma de 23 kDa de MPT83 presente en el filtrado de cultivo, que la forma de 23 kDa es generada mediante el corte proteolítico inmediatamente antes de la treonina ubicada en la posición 48 de la proteína MPT83 madura acilada de 25 kDa, por lo que la glicosilación de la proteína de 23 kDa en esos sitios podría funcionar como una señal para el corte proteolítico o como una medida preventiva contra la degradación de la proteína en la región N-terminal (Michell, *et al.*, 2003).

Posteriormente se demostró que los genes de MPT70 y MPT83 (nombre del gen: Rv2873) eran controlados por el mismo mecanismo y que forman parte de un operón (Juárez, *et al.*, 2001), y que la diferencia en los niveles de expresión de la proteína de *M. bovis* y *M. tuberculosis* era explicada por una mutación puntual en el gen SigK en *M. tuberculosis* que codifica un regulador transcripcional encargado de la expresión de ambas proteínas (Saïd-Salim, *et al.*, 2006).

El papel de ambas proteínas durante la infección de la bacteria no está claro, sin embargo, la presencia de un antiguo dominio de adhesión celular en las proteínas que es encontrado en insectos, animales y plantas y que se encuentra presente en células pulmonares y óseas en humanos, sugiere fuertemente un papel de adhesión celular de MPT83 y MPT70 durante la infección (Wiker, 2009).

2.5. *Streptomyces lividans* como hospedero para la producción de proteínas heterólogas

Dentro de las bacterias Gram-positivas se incluyen dos grandes grupos: los organismos con bajo contenido de G + C en su ADN, como *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, y aquellos con un alto contenido de ambos nucleótidos como los actinomicetos. Dentro de éstos, especialmente el género *Streptomyces* ha sido sujeto de numerosos estudios durante los últimos 30 años debido a su capacidad para producir una gran cantidad de antibióticos, ya que cerca de los 20,000 antibióticos de origen bacteriano que han sido reportados, el 45% son producidos por los estreptomicetos (Demain and Sanchez, 2011; Kieser, 2000; Anné J. y Lieve M., 1993). Los estreptomicetos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, y su habilidad para colonizar el suelo es facilitada por su crecimiento como una masa de hifas vegetativas que pueden diferenciarse en esporas y facilitar la expansión y persistencia de las bacterias. Como miembros de las bacterias con gran contenido de G + C, *Streptomyces* spp. tiene una de las más altas proporciones de estos residuos en su ADN cromosomal que permanece en un 70-74% (Kieser, 2000), además de mostrar la producción de enzimas extracelulares como parte de su ciclo de vida saprófito (Sanchez and Demain, 2011).

Especialmente, *Streptomyces lividans* ha sido usado como hospedero para la expresión de amplia variedad de genes provenientes de varios organismos. Sin embargo, aunque los altos niveles de expresión de genes clonados en la bacteria son aceptables, resulta necesario regular la expresión para prevenir efectos deletéreos en el crecimiento de la célula, con promotores como TipA que es inducido con thioestrepton. Una característica de *Streptomyces* spp., es la gran solubilidad que presentan las proteínas expresadas en comparación con organismos como *Escherichia coli*, en donde debido a la presencia de una membrana externa, las proteínas heterólogas son ineficientemente exportadas de la bacteria y almacenadas en cuerpos de inclusión con una conformación biológica inactiva (Kieser, 2000; Anné J. y Lieve M., 1993).

La secreción de proteínas en *Streptomyces* spp. ocurre en moléculas precursoras que contienen un péptido señal en la región N-terminal. Esta secuencia es proteolíticamente removida por una peptidasa señal durante o momentos después de la traslocación del precursor; un corto tramo de aminoácidos hidrofílicos con carga positiva en la región N-terminal de la proteínas es seguido por un largo núcleo en forma α -hélice de aminoácidos hidrofóbicos y una región C-terminal con un motivo que contiene aminoácidos que son reconocidos y cortados por una peptidasa señal (Kieser, 2000; Anné J. y Lieve M., 1993). Varios péptidos señal de *Streptomyces* han sido caracterizados, mostrando ser mucho más largos que en otros organismos.

3. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es una enfermedad altamente infecciosa causada por el bacilo *M. tuberculosis* que mata aproximadamente 1.7 millones de personas cada año y que es la segunda causa de mortalidad a nivel mundial provocada por un agente infeccioso. A pesar de la existencia de una vacuna contra la enfermedad, la BCG (Bacillus Calmette-Guérin) no ha mostrado ser completamente efectiva para evitar la infección primaria o la reactivación de la infección en estado latente dentro de los pulmones, que es la principal forma de esparcimiento de la enfermedad. Es por ello, que numerosas áreas como la inmunología y genómica han virado sus esfuerzos para entender completamente la manera de actuar del agente causal, sus mecanismos e interacciones y de esta manera generar nuevas vacunas y medicamentos que disminuyan el avance letal de la enfermedad.

En los últimos años, el estudio de proteínas antigénicas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* se ha incrementado y con ello, la expresión de proteínas recombinantes como los antígenos MPT83 y MPT70 en organismos no patógenos que disminuyan el riesgo de infección y que faciliten el trabajo experimental a la hora de expresarlas.

Particularmente, nosotros nos enfocamos al estudio de *S. lividans*, una bacteria Gram positiva no patógena que se encuentra dentro del orden Actinomycetales al igual que *M. tuberculosis* y que recientes estudios han demostrado una amplia homología con éste último. Además de esto, *S. lividans* posee la capacidad de glicosilar y secretar proteínas al medio extracelular, por lo que su uso en la expresión de proteínas recombinantes como MPT83 provenientes de *M. tuberculosis* nos resulta particularmente interesante.

4. OBJETIVOS

Generales

- Clonar el gen Rv2873 de *M. tuberculosis* en *S. lividans* y comprobar la expresión y glicosilación de su producto MPT83.

Particulares

- Creación de una construcción en un vector con el gen Rv2873 en *E. coli* sin la secuencia de su péptido señal, para la expresión y purificación de MPT83 y su posterior uso en la obtención de anticuerpos.
- Clonación del gen Rv2873 con la secuencia de su péptido señal en *S. lividans* para comprobar la expresión y glicosilación de su producto MPT83.
- Obtención de la proteína MPT83 recombinante unida con un péptido señal de secreción expresada en *S. lividans*, para observar su expresión y glicosilación.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Cepas Bacterianas y plásmidos utilizados

En el presente trabajo se utilizaron cepas de *E. coli* para la expresión del gen Rv2873 y la generación de anticuerpos anti-MPT83, y de *S. lividans* para la expresión de la proteína recombinante MPT83. La lista de las cepas junto con los plásmidos usados se encuentra en la Tabla 1 y Tabla 2, respectivamente.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F ⁻ endA1glnV44thi-1recA1relA1gyrA96deoRnupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ -	Grant, 1990
BL21(DE3)	F ⁻ ompThsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) pRARE (Cam ^R), plásmido Rossetta	Novagen
IBEC58	Δ dam Δ dcm Δ hsdRMS derivada de BW25113 Para obtener DNA plasmídico no metilado	González- Cerón, et al., 2009
ET12567/pUZ 8002	Con plásmido conjugativo para obtener mutantes con DNA no metilado y transferir plásmidos por conjugación a <i>Streptomyces</i> .	MacNeil et al., 1992
<i>S. lividans</i>		
1326	Silvestre	John Innes Centre

Tabla 1. Cepas bacterianas usadas en este trabajo

Plásmido	Descripción	Referencia
pUCBM21	Derivado de pUC18 con sitios de clonación adicionales dentro de <i>lacZα</i> . Ap ^R . Usado para secuenciación	Boheringer
pBIA1a	Derivado de pUCBM21 con gen completo Rv2873 clonado directamente de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	Este trabajo
pBIA1b	Gen Rv2873 sin secuencia original de péptido señal ni codón para cisteína de anclaje a membrana, clonado en pUCBM21	Este trabajo
pBIA1c	Gen RV2873 sin secuencia original de péptido señal, con secuencia de péptido señal de secreción de lipasa clonado en pUCBM21 a partir de pB103	Este trabajo
pET28a	Vector de expresión, 6xHis, Kan ^R	Novagen
pBIA2	Gen Rv2873 sin secuencia original de péptido señal ni codón para cisteína de anclaje a membrana, clonado en pET28a para purificación de proteína por columna de agarosa Ni-NTA	Este trabajo
pB103	Vector que contiene secuencia completa del péptido señal de una lipasa extracelular de <i>Streptomyces exfoliatus</i>	(Pérez <i>et al.</i> , 1993)
pIJ6902	Apra ^R , promotor <i>tipA</i> , sitio att del fago ΦC31	Huang <i>et al.</i> , 2005
pBIA5	Gen Rv2873 sin secuencia de péptido señal original, con secuencia de péptido señal de secreción de lipasa clonado en pIJ6902 a partir de pBIA1c	Este trabajo
pBIA6	Gen Rv2873 completo clonado en pIJ6902 para su expresión en bajo número de copias a partir de pBIA1a	Este trabajo
pIJ6021	Derivado de pIJ101, vector de expresión Kan ^R , contiene promotor inducible con thioestrepton, con expresión en alto número de copias	Takano, <i>et al.</i> , 1995
pBIA3	Gen Rv2873 sin secuencia de péptido señal original, con secuencia de péptido señal de secreción de lipasa clonado en pIJ6021 a partir de pBIA5	Este trabajo
pBIA4	Gen Rv2873 completo clonado en pIJ6021 para su expresión en alto número de copias obtenido a partir de pBIA6	Este trabajo

Tabla 2. Plásmidos usados en este trabajo

5.2. Obtención del gen Rv2873 de *Mycobacterium tuberculosis*

Para obtener el gen Rv2873 completo (gen Rv2873 con su péptido señal y codón para cisteína de anclaje a membrana) cuyo producto es el antígeno MPT83, se hizo un ensayo de PCR (Polymerase chain reaction) utilizando como templado el DNA cromosomal de *M. tuberculosis* H37Rv proporcionado por la Dra. Yolanda López Vidal y como oligonucleótidos: forward 5'-GCTCTAGACATATGATCAACGTTCA GGCCAA - 3' con sitios de restricción al inicio para las enzimas *Xba*I y *Nde*I (cuyo sitio de restricción contiene el codón de inicio ATG) más el inicio del gen Rv2873 y reverse 5' - GGAATTCGTGATCTATCGGCACGAAGC - 3' con la secuencia final del gen más un sitio de restricción para *Eco*RI.

El vector pUCBM21 y el producto de PCR se digirieron previamente con enzimas de restricción en los sitios de *Xba*I y *Eco*RI a 37°C toda la noche, se realizó una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) (Ver Anexo 10.2) al 0.6% tanto del vector como del producto de PCR. Posteriormente se hizo la ligación del producto de PCR con el vector mediante el uso de ligasa T4 y buffer de ligación 5X incubando durante una noche a temperatura ambiente. El plásmido producto de la ligación nombrado pBIA1a fue transformado en la cepa de *E. coli* DH5α mediante electroporación, se realizaron minipreparaciones de ADN de dichas células para aislar del DNA plasmídico y se analizó por patrón de restricción para identificar las construcciones correctas. El DNA se purificó y posteriormente fue mandado a secuenciar a la Unidad de secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

5.3. Clonación del gen Rv2873 y obtención de anticuerpos

Se hizo un ensayo de PCR usando como templado el DNA genómico de *M. tuberculosis H37Rv*. El oligonucleótido forward: 5' – CCCAAGCTTCATATG TCGAGCACCAAACCCGT – 3' se diseñó con los sitios de restricción *HindIII* y *NdeI*, más el sitio de inicio del gen sin la secuencia codificadora de su péptido señal y sin el codón para la cisteína de anclaje a membrana, y el reverse: 5' – GGAATTCGTGATCTATCGGCACGAAGC – 3' fue diseñado con la secuencia final del gen más un sitio de restricción para *EcoRI*.

Posteriormente, el producto de PCR y el vector pUCBM21 fueron digeridos en los sitios *HindIII* y *EcoRI*, los fragmentos fueron corridos en un LMP y el inserto fue purificado para realizar la ligación con el vector bajo las condiciones antes mencionadas. El plásmido obtenido nombrado pBIA1b fue checado por restricción y transformado mediante electroporación en la cepa *E. coli* DH5 α para su secuenciación. Después de verificar la secuencia, el producto de PCR fue ligado al vector de expresión pET28a bajo el mismo procedimiento que pBIA1b con el uso de las enzimas de restricción *NdeI* y *EcoRI*, el plásmido obtenido nombrado pBIA2 fue analizado por restricción y transformado en la cepa *E. coli* BL21(DE3) *rosetta* para inducir la expresión y posterior purificación de la proteína MPT83. Con ambos plásmidos, las células fueron crecidas en medio YT2X (Ver Anexo 10.1) con kanamicina a 37°C hasta llegar a una densidad óptica de 0.6 e inducidas con 0.1M de IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) a 18°C durante 5 horas. El vector pET28a fue usado para la expresión de MPT83 con una etiqueta de 6xHis y la purificación de la proteína se hizo mediante una columna de agarosa Ni-NTA.

5.3.1. Purificación de proteína MPT83 para la obtención de anticuerpos

Las células con el plásmido pBIA2 fueron centrifugadas y resuspendidas en buffer de lisis (MgCl₂ 1 M, DTT 4 Mm, 0.5 μ l RNAsa, pastillas inhibidoras de proteasas (ROCHE), Tris 25 mM pH=8) en hielo, usando un sonicador a 3 pulsos de 20 segundos y con 20 segundos de enfriamiento para promover su

rompimiento; posteriormente las células lisadas fueron centrifugadas a 6000 rpm/10 min a 4°C, guardando el sobrenadante.

Para la purificación de la proteína se utilizó una columna de agarosa Ni-NTA siguiendo el protocolo mostrado en el manual del producto. Se empacó la columna con resina Ni-NTA y se agregó en primer lugar 4 ml de buffer de lisis (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, pH=8) para equilibrar, posterior a su filtrado, se agregó el extracto de sobrenadante donde se encontraba la proteína MPT83. Se realizó un lavado de la columna con buffer de lavado (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, imidazol 20mM, pH=8) y una elución posterior con buffer de elución (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, imidazol 250mM, pH=8), colectándose seis fracciones. La proteína obtenida en cada una de las fracciones fue cuantificada por el método de Bradford (Bradford M., 1976) a una longitud de onda de 595 nm.

5.3.2. Obtención de Anticuerpos

Se corrió un gel de poliacrilamida al 12% con 50 µg de la proteína MPT83 purificada mediante columna de Ni-NTA; posteriormente se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa, ésta fue teñida con Rojo de Ponceau y marcada en el sitio donde se encontraba la proteína MPT83, cortada y enviada al laboratorio de la Dra. Clara Espitia para la generación de anticuerpos anti-MPT83 mediante la inmunización de conejas NZ de 4 meses de edad con un peso de 2500 g.

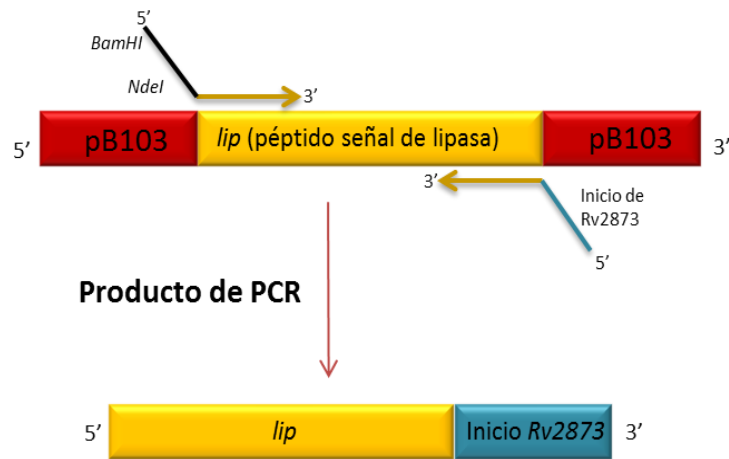
Se hicieron alícuotas de 1.5 ml de suero con los anticuerpos policlonales y se almacenaron a -70°C.

5.4. Clonación del gen RV2873 con péptido señal de lipasa

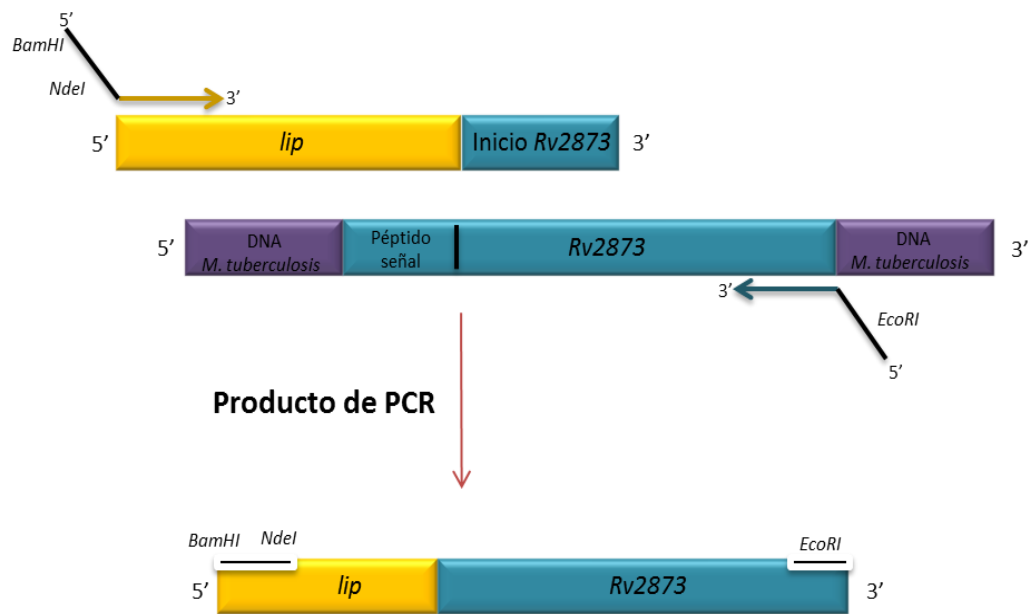
Para la obtención de la secuencia del péptido señal de la lipasa proveniente de *Streptomyces exfoliatus* (antes *Streptomyces* sp. M11), se procedió a hacer un PCR usando como templado el plásmido pB103 (Pérez *et al.*, 1993) que contiene el gen completo de la lipasa. Los oligonucleótidos fueron diseñados con sitios de restricción para su posterior clonación en vectores de expresión. Forward: 5'-GCGGATCCATATGCCCCAGCACCTCC – 3' con los sitios *Bam*HI y *Nde*I más el inicio de la secuencia del péptido señal de la lipasa y Reverse: 5'-GGCCGCGGCCGCCTGGGGGTTTGGTGCTCGAACA-3' con el final de la secuencia del péptido señal de la lipasa y el inicio del gen Rv2873. El producto de PCR contenía el gen del péptido señal de la lipasa (*lip*) con el inicio del gen Rv2873 sin cisteína de anclaje, después se purificó por un gel de agarosa LMP al 0.6% y posteriormente fue usado como templado junto con el DNA genómico de *M. tuberculosis*, ambos fueron usados en un segundo ensayo de PCR, utilizando el mismo oligonucleótido forward que en la primera reacción y como reverse: 5'-GGAATTCGTGATCTATCGGCACGAAGC-3' con la secuencia final del gen Rv2873 y un sitio de restricción para *Eco*RI (Figura 2).

El producto obtenido (gen Rv2873 más la secuencia del péptido señal de la lipasa de *S. exfoliatus*) y el vector pUCBM21 se digirieron con enzimas de restricción en los sitios *Bam*HI y *Eco*RI, se purificaron de partir de un gel de agarosa LMP al 0.6% y se ligaron, el plásmido resultante fue nombrado pBIA1c. Se transformó mediante electroporación *E. coli* DH5 α con el plásmido pBIA1c, se purificó el DNA y posteriormente se mandó a secuenciar.

1° PCR



2° PCR



Gen Rv2873 con péptido señal de lipasa de *S. exfoliatus*

Figura 2. Reacciones de PCR utilizadas para fusionar el péptido señal de la lipasa de *S. exfoliatus* (*lip*) con el gen Rv2873 sin péptido señal ni cisteína de anclaje. En la segunda reacción se utilizaron como templados el péptido señal (*lip*) con un fragmento al final del inicio del gen Rv2873 obtenido en la primera reacción de PCR y el DNA genómico de *M. tuberculosis*. El producto obtenido de la segunda reacción de PCR fue el gen Rv2873 fusionado con el péptido señal de la lipasa con los sitios de restricción *BamHI-NdeI* y *EcoRI* para su posterior clonación en vectores de expresión.

5.5. Clonación del gen Rv2873 con péptido señal y Rv2873 con péptido señal de la lipasa en *Streptomyces lividans* 1326

5.5.1. Clonación de los genes en vector monocopia pIJ6902

Se purificaron los plásmidos pBIA1a y pBIAc que contienen el gen Rv2873 completo y el gen Rv2873 con el péptido señal de la lipasa, respectivamente. Se hicieron digestiones con las enzimas *NdeI* y *EcoRI* de ambos plásmidos y del vector pIJ6902 cuya característica es ser replicativo en *E. coli* e integrativo en *Streptomyces*. Posteriormente las digestiones fueron sometidas a electroforesis en un gel de agarosa LMP al 0.6%; se purificaron las bandas que contenían ambas construcciones así como del vector, y se ligaron para obtener los plásmidos pBIA5 y pBIA6.

Ambas ligaciones fueron transformadas mediante electroporación en la cepa de *E. coli* DH5 α , se extrajo DNA plasmídico de colonias transformantes seleccionadas, se checó por patrón de restricción y los plásmidos correctos fueron introducidos mediante electroporación en la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002 que tiene la capacidad de conjugarse con *S. lividans*.

Las células de *E. coli* ET12567/pUZ8002 con los plásmidos pBIA5 y pBIA6 fueron conjugadas con *S. lividans* 1326 para introducir los plásmidos a partir de los cuales se expresa la proteína MPT83.

5.5.2. Clonación del gen Rv2873 en vector multicopia pIJ6021

Debido a que *S. lividans* 1326 posee un sistema de restricción para DNA metilado, se introdujeron por transformación los plásmidos pBIA5 y pBIA6 en *E. coli* IBEC58, la cual, al tener deletados los genes de los 3 sistemas de metilación de DNA de *E. coli* hizo posible la obtención de los plásmidos no metilados. Posterior a la transformación, se aislaron los plásmidos pBIA5 y pBIA6 a partir de esta cepa, se digirieron con *NdeI* y *EcoRI*, al igual que el vector multicopia pIJ6021. Posteriormente se purificaron los fragmentos a partir de un gel de

agarosa LMP y después se ligaron. Los productos de la ligación fueron introducidos por transformación de protoplastos en *S. lividans* 1326. Para identificar los plásmidos nombrados pBIA3 y pBIA4 con la construcción deseada se tomaron 12 colonias aisladas como producto de cada transformación, se resuspendieron en 100 µl de agua cada una, y se sembraron en sectores en cajas de petri con medio MS+ 50 µg/ml de kanamicina y se incubaron a 30°C durante 5 días. Posterior a la incubación, se cosecharon las esporas de cada sector y se inocularon en 3 ml de LB+sacarosa 25% con 50 µg/ml de kanamicina durante 36 hrs y se realizaron minipreparaciones de plásmido de cada sector.

Las minipreparaciones fueron digeridas con la enzima *Sst*I para el plásmido pBIA4 y con *Not*I para el pBIA3, corridas en una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y analizadas para ubicar aquellas que tuvieran el patrón deseado, y posteriormente reintroducidas en *S. lividans*.

5.6. Obtención de esporas

Para la obtención de esporas de las cepas transformadas de *S. lividans* 1326 con los plásmidos pBIA3 y pBIA4, se tomaron colonias aisladas provenientes de las cajas de retransformación y se resuspendieron en agua. Las esporas en suspensión se sembraron de manera uniforme con una varilla de vidrio en cajas de petri que contenían medio MS + 50 µg/ml de kanamicina y extracto de levadura 0.1%. Las cajas fueron incubadas a 30°C durante 5 días. Posterior a la esporulación, se añadió agua para cosechar las esporas con ayuda de un asa bacteriológica. Las esporas fueron filtradas a través de algodón para separar restos de micelio y centrifugadas a 3500 rpm durante 10 minutos, después se realizó un lavado con agua y se volvieron a centrifugar. Las pastilla de esporas obtenida se resuspendió en glicerol al 20% y almacenada a -20°C en viales de 3 ml.

Para obtener esporas de las cepas de *S. lividans* 1326 con los plásmidos pBIA5 y pBIA6 se utilizó apramicina 50 µg/ml en el medio MS.

5.7. Expresión de Proteínas

5.7.1. Crecimiento de cultivos de *Streptomyces lividans* 1326

Se pregerminaron 500 µl de una suspensión densa de esporas (almacenadas a -20°C en glicerol al 20%) en 10 ml de medio YT2X durante 6 horas a 37°C. Posteriormente, las esporas pregerminadas fueron obtenidas mediante centrifugación y utilizadas para inocular 100 ml de medio LB+sacarosa 25% conteniendo 50 µg/ml de kanamicina (en el caso de las esporas con plásmidos provenientes del vector pIJ6021) o con 50 µg/ml de apramicina (para las esporas con los plásmidos del vector pIJ6902) en matraces de 500 ml. Se incubaron a 30°C con agitación y después de 16 hrs se añadió thioestrepton 5 µg/ml para inducir la expresión de la proteína. Los cultivos se dejaron crecer hasta completar 36-40 hrs.

5.7.2. Separación de fracciones celulares de membrana, citoplasma, sobrenadante y obtención de proteínas.

Debido a que las células con plásmidos pBIA4 y pBIA6 contienen la secuencia de un péptido señal propia del gen para expresar la proteína MPT83 anclada a membrana, fue necesario separar las células del medio de cultivo, hacer una lisis celular mediante sonicación en buffer de lisis para *Streptomyces* (MgCl₂ 1 M, DTT 4 Mm, 0.5 µl RNAsa, pastillas inhibitoras de proteasas ROCHE, Tris 25 mM) y posteriormente fraccionamiento celular para separar la membrana plasmática de los demás componentes celulares como citoplasma, pared celular, etc. El fraccionamiento celular se realizó por ultra centrifugación, obteniendo muestras tanto de citoplasma como de membrana. Para saber la cantidad aproximada de proteína obtenida, ambas muestras fueron cuantificadas por el método de Bradford. Posteriormente, las proteínas de la fracción membranal fueron precipitadas por el método de metanol/cloroformo para eliminar impurezas y lípidos presentes que pudieran alterar el corrimiento de las proteínas.

La obtención de la proteína MPT83 en las células con los plásmidos pBIA3 y pBIA5 se hizo mediante centrifugación del cultivo celular para separar el sobrenadante en donde se esperaba encontrar a la proteína. El micelio fue sometido a lisis celular por sonicación, centrifugado, y las proteínas del sobrenadante se precipitaron por Metanol-Cloroformo.

5.7.3. Preparación de muestras de carga y electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Para la obtención de proteínas del sobrenadante de cultivo, se tomó 1 ml del sobrenadante y se realizó una precipitación por el método de metanol/cloroformo, las proteínas precipitadas fueron resuspendidas en 10 µl de buffer de carga para proteínas 2X (0.125 M Tris-HCl pH=6.8, SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%) y hervidas por un período de 5 min.

Las muestras de citoplasma y membrana fueron cuantificadas por el método de Bradford; la preparación de las muestras se basó en la cantidad aproximada de proteína presente, cuidando que ésta fuera de 10 µg/10-20 µl de buffer de carga para proteínas 2X, se hirvieron durante 5 minutos y se almacenaron a -20°C.

Se realizaron 3 ensayos de SDS-PAGE por cada construcción para observar la ubicación de la proteína en geles de poliacrilamida al 12 y 14%, con un grosor de 1.5 mm. En cada gel se cargó un marcador de peso molecular, un control positivo de la proteína MPT83 purificada de *E. coli* BL21 (DE3) rosetta, control negativo con proteínas expresadas por *S. lividans* con el vector vacío correspondiente, muestra de proteína en sobrenadante, citoplasma y membrana. Además, en el caso de los geles usados para detección de proteínas con concanavalina A se agregó un segundo control positivo de glicosilación, la proteína de 45/47 KDa purificada previamente en el laboratorio a partir de *S. lividans*. El primer gel fue teñido con azul brillante de Coomasie R-250, para observar la presencia en general de proteínas y ubicar la proteína de interés, MPT83. El segundo gel fue usado para comprobar la expresión de la proteína

MPT83 tanto en membrana, citoplasma y sobrenadante mediante ensayos de inmuno-blot con el uso de anticuerpos policlonales; y el tercer gel fue usado para demostrar si la proteína MPT83 se encontraba manosilada mediante la detección con concanavalina A.

5.7.4. Transferencia de proteínas a membranas PVDF (Difluoruro de polivinilideno)

Para la transferencia de las proteínas a membranas de PVDF se utilizó una cámara de transferencia húmeda (Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell BIO RAD) para los experimentos de detección con concanavalina A. Por otro lado para los experimentos de inmuno-blot, la transferencia se realizó con una cámara de transferencia semiseca (Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell BIO RAD), el procedimiento se realizó siguiendo los pasos descritos en el manual de usuario, utilizando buffer Tris-Glicina (14 mg de glicina, 3 mg de Tris, 200 ml de metanol, 800 ml de agua, pH=8.3) y dejando transferir durante 12-16 horas a 12 mA en cámara húmeda y durante 30-45 minutos a 15 mV en cámara semiseca.

Las membranas utilizadas para los ensayos de expresión por inmuno-blot fueron bloqueadas con TBS-Tween + leche descremada 5%, incubadas con el anticuerpo primario policlonal específico de la proteína en una dilución 1:100 para los ensayos de electroforesis en una dimensión y 1:500 para los ensayos de doble dimensión y posteriormente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo. Las membranas para ensayos de detección de manosas con concanavalina A se bloquearon con albúmina 1% (BSA) y posteriormente incubadas con concavalina A. La detección se realizó utilizando un Kit de quimioluminiscencia ROCHE.

Para algunos experimentos se usó 3,3'-Diaminobenzidina para revelar la presencia de proteínas transferidas mediante Western-blot, pesando 0.005 mg y diluyéndolos en 10 ml de TBS 1X con 10 µl de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Las membranas se tiñeron durante 1 minuto (variable) en constante agitación a temperatura ambiente y posteriormente lavadas con 10 ml de agua dejándose secar. La solución de tinción fue inactivada en un frasco con cloro para su

desecho.

5.8. Electroforesis de doble dimensión en geles de poliacrilamida

Se realizó una electroforesis de doble dimensión en geles de poliacrilamida a las muestras de proteína de membrana de las células con los plásmidos pBIA4 y pBIA6, Las condiciones de cultivo y obtención de la fracción membranal de las células fueron las mismas que en los ensayos de electroforesis en una dimensión, con la diferencia de que se hicieron 500 ml de cultivo inoculando con 2.5 ml de esporas.

Para la primera dimensión era necesario que la proteína estuviera lo más limpia posible, y debido a que las muestras de membrana contenían gran cantidad de lípidos, se realizó un desalado y limpieza de las muestras mediante una columna de sefarosa (HealthcareSephadex™D-25 DNA Grade). La proteína fue eluída con buffer PBS 10 mM(77.4 ml Na₂HPO₄ 1 M, 22.6 ml NaH₂PO₄ 1 M, CHAPS 10%),colectando fracciones de 1 ml en tubos Eppendorf. Se cuantificó la absorbancia de las fracciones a 280 nm para tener una estimación de la cantidad de proteína presente. Las fracciones con una cantidad mayor de proteína fueron mezcladas, y la cantidad de proteína fue cuantificada por el método de Lowry.

Posteriormente se precipitaron 100 µg de proteína con ácido tricloroacético (TCA) y desoxicolato de sodio (DOC) hasta llegar a una concentración final del 10% y 0.02% respectivamente. La primera dimensión de la electroforesis (electroenfoco) se corrió en tiras de poliacrilamida con un intervalo de pH de 3 a 10, por lo que era necesario rehidratar las muestras precipitadas con buffer de rehidratación (Urea 8 M, CHAPS 2%, anfolinas 0.5%, DTT 20 mM, azul de bromofenol 0.004% –adicionados al momento de rehidratar las muestras-). Las tiras de poliacrilamida fueron rehidratadas con 120 µl de la muestra disuelta en buffer de rehidratación, cubriendo con aceite mineral para evitar la desecación durante una noche. Posteriormente, la tiras rehidratadas fueron colocadas en el manifold con aceite mineral cuidando la orientación. La primera fue corrida en un Equipo de Isoelectroenfoco IPGphor III. Al terminar el programa de corrimiento, las tiras fueron almacenadas a -70°C y al momento de realizar la segunda

dimensión se hicieron dos lavados con 1 ml de buffer de equilibrio (1 μ l de DTT 100X por cada ml de buffer) durante 10 minutos cada uno.

La segunda dimensión se realizó en geles de poliacrilamida al 14% colocando la tira en un solo carril y corriendo a 60 V hasta que la muestra pasara el gel concentrador, donde se aumentó a 150 V para la separación de las proteínas. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF para los ensayos de Western-blot.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Expresión de la proteína MPT83 en *E. coli*

El gen Rv2873 amplificado directamente de DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv fue insertado sin la secuencia que corresponde al péptido señal en el vector pET28a, dando lugar al plásmido pBIA2. Este plásmido, además de permitir la expresión de la proteína, hizo posible la unión de una cola de 6 histidinas en la región N-terminal de la proteína (Figura 3) para que pudiera ser purificada mediante una columna de afinidad. Debido a que el plásmido pBIA2 se expresa en *E. coli*, la proteína MPT83 obtenida a partir de éste no está glicosilada.

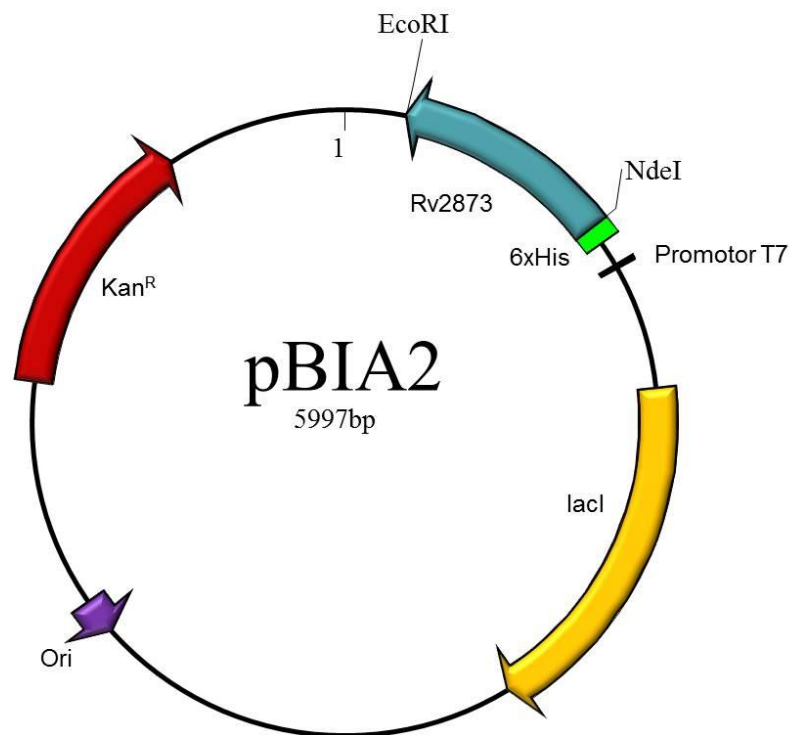


Figura 3. Plásmido pBIA2 que contiene el gen Rv2873 sin la secuencia del péptido señal. El plásmido contiene una etiqueta de 6xHis que permitió la unión de una cola de 6 histidinas en el extremo N-terminal de la proteína para su purificación mediante una columna Ni-NTA agarosa.

6.2. Purificación de la proteína MPT83 en columna de agarosa Ni-NTA

Debido a que, en *E. coli*, las proteínas sobre expresadas pueden irse tanto a la parte citoplasmática de la célula que representa la fracción soluble, como a cuerpos de inclusión cuya purificación resulta complicada, era necesario comprobar si la proteína MPT83 carente de péptido señal se expresaba en alguna de éstas fracciones. Para ello, se realizó un cultivo de células de *E. coli* BL21 Rosetta transformadas con el plásmido pBIA2, donde posterior a la inducción, fue centrifugado para separar las células del sobrenadante. Para obtener la fracción soluble, fue necesario romper las células mediante sonicación. Se centrifugó el extracto para obtener el sobrenadante en donde se esperaba encontrar a la proteína, y el pellet restante (cuerpos de inclusión comunes en *E. coli*), donde suelen localizarse muchas proteínas cuando son sobre expresadas y el cual fue solubilizado.

En la Figura 4, se observa que la proteína MPT83 únicamente se expresó en la fracción soluble de las células cuando eran inducidas con IPTG, por lo que dicha fracción fue utilizada para purificar la proteína mediante una columna de agarosa Ni-NTA.

En la Figura 5, se observa el enriquecimiento de una banda de un peso molecular aproximado de 23 kDa en los carriles C-H, que corresponden a diferentes fracciones de la elución de la proteína MPT83. La aparición de otras bandas en las fracciones de la proteína indicó que a pesar del uso de la columna Ni-NTA, otras proteínas aún se encontraban en las muestras, por lo que para la generación de anticuerpos, se utilizó la fracción 3 (Figura 8. Carril E) de la elución ya que ésta mostraba una mayor limpieza respecto a las demás. Para evitar que la presencia de otras proteínas interfiriera en la generación de los anticuerpos, dicha fracción fue corrida en un gel preparativo y transferida a una membrana de nitrocelulosa; la proteína MPT83 fue identificada mediante tinción con rojo de Ponceau, y la banda que correspondía con la proteína fue marcada y separada de la membrana, utilizándola para la inmunización de conejas y la generación de anticuerpos policlonales.

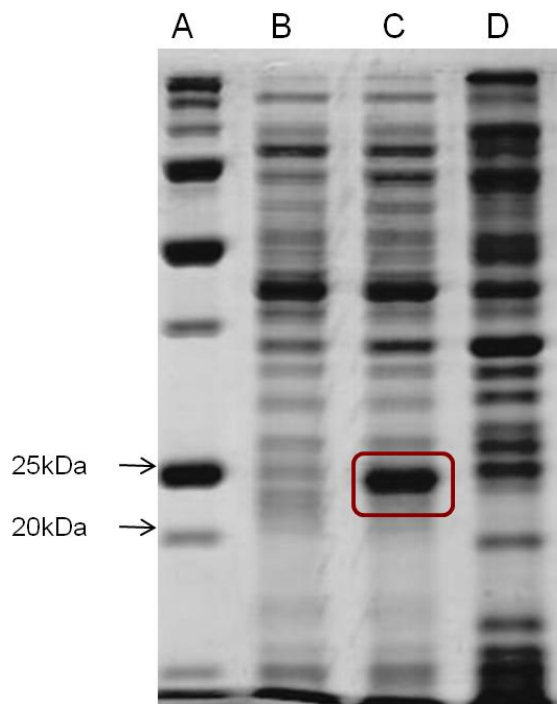


Figura 4. Tinción con Azul de Coomassie. Fracciones soluble e insoluble obtenidas del sonicado de células de *E. coli* transformadas con el plásmido pBIA2, inducidas con IPTG; donde: A) marcador de peso molecular, B) fracción soluble sin inducir, C) fracción soluble inducida, D) fracción no soluble (cuerpos de inclusión solubilizados en buffer con Urea). Se observa en el recuadro a la proteína MPT83 a un peso de 23kDa.

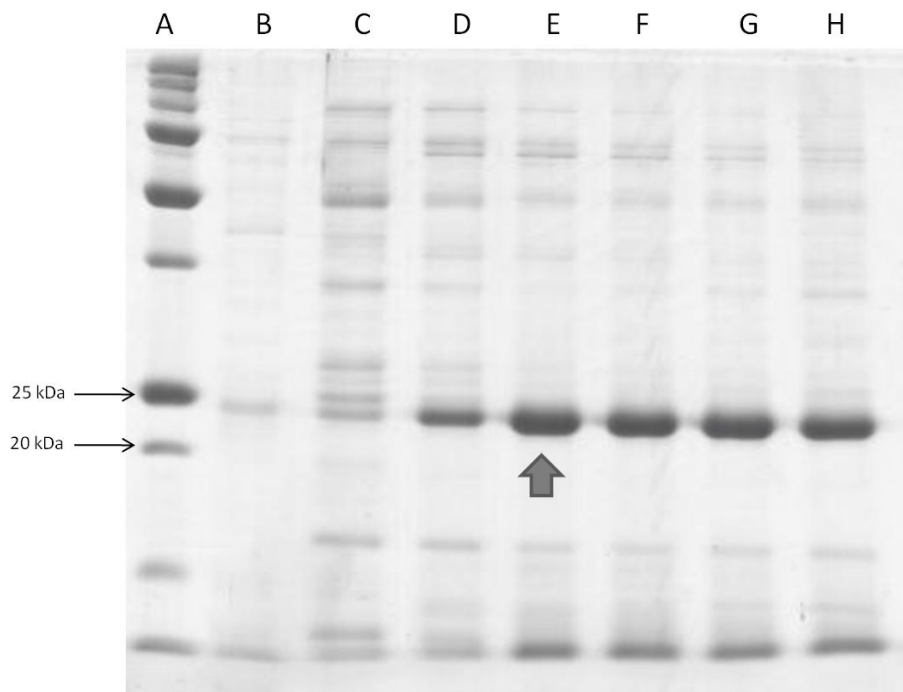


Figura 5. Tinción con azul de Coomassie de muestras de la proteína MPT83 purificada en columna de agarosa Ni-NTA, donde: A) marcador de peso molecular, B) proteína total y C-H) fracciones 1 a 6 de la elución de la proteína MPT83. La flecha indica la posición de la proteína MPT83 a un peso aproximado de 22 kDa y la fracción utilizada para la generación de anticuerpos.

6.3. Expresión de la proteína MPT83 en *S. lividans*

Los plásmidos pBIA3, pBIA4, pBIA5 y pBIA6 (Tabla 2) fueron introducidos por transformación y conjugación en *S. lividans* 1326 con la finalidad de expresar la proteína MPT83. En todos los ensayos de expresión se incluyó un cultivo control de células que contenían únicamente los vectores vacíos correspondientes, para comprobar que la presencia o ausencia de la proteína MPT83 estuviera involucrada únicamente con la presencia del gen Rv2873.

6.4. Expresión de la proteína MPT83 con péptido señal de secreción

El plásmido pBIA3 se construyó con la secuencia de un péptido señal de 48 aminoácidos proveniente de una lipasa extracelular de *S. exfoliatus* (Pérez, et al., 1993) cuya función es dirigir a la proteína hacia la ruta de secreción; además, la construcción tampoco contiene el codón de la cisteína de anclaje a membrana ubicado al inicio de la secuencia de la proteína madura (Figura 6). Dicho plásmido se introdujo a *S. lividans* 1326 con la finalidad de que la proteína MPT83 al estar siendo expresada con un péptido señal de secreción fuera recuperada directamente del sobrenadante por centrifugación, evitando de esta manera el fraccionamiento celular del micelio; adicionalmente se procedió a romper las hifas de éste mediante sonicación, para observar si el total de la proteína MPT83 era secretada al medio o si cierta cantidad de proteína permanecía aún dentro de las células. Además, se esperaba que la expresión de MPT83 se incrementara por el hecho de estar clonada en un vector de alto número de copias. Para el corrimiento de la electroforesis, se tomaron muestras de proteínas de cada una de las fracciones previamente precipitadas.

```

1          ATGCCCCAGCACCTCCTCCCCGCACGCCGACAGGCCGCGCGCCCGAGCCG
1          M P Q H L L P A R R Q A A R P S R

51         CCCCCGTACGCTGACGGGTCTGCTGGCCGCCGCGGGCGGCCACGGCCGGCCTCCTGCTCAG
18         P R T L T G L L A A A A A T A G L L L S

111        CGGCCTGGCCCCCTGGCGCCCAGGCGGCCGCGGCCCTCGAGCACCAAACCCGTGTGCAAGA
38         G L A P G A Q A A A A S S T K P V S Q D

171        CACCAGCCCGAAACCGGCGACCAGCCCAGGCGCGCCCGTACCACGGCGGCAATGGCTGA
58         T S P K P A T S P A A P V T T A A M A D

231        CCCCCGACGGACCTGATTGGTCGTGGGTGCGCGCAATACGCGGCGCAAATCCCACCGG
71         P A A D L I G R G C A Q Y A A Q N P T G

291        TCCCGGATCGGTGGCCGGAATGGCGCAAGACCCGGTGCCTACCGCGGCTTCCAACAACCC
98         P G S V A G M A Q D P V A T A A S N N P

351        GATGCTCAGTACCCTGACCTCGGCTCTGTGCGGCAAGCTGAACCCGGATGTGAATCTGGT
118        M L S T L T S A L S G K L N P D V N L V

411        CGACACCCTCAACGGCGGCGAGTACACCGTTTTTCGCCCCACCAACGCCGCATTTCGACAA
138        D T L N G G E Y T V F A P T N A A F D K

471        GCTGCCGGCGGCCACTATCGATCAACTCAAGACTGACGCCAAGCTGCTCAGCAGCATCCT
158        L P A A T I D Q L K T D A K L L S S I L

531        GACCTACCACGTGATAGCCGGCCAGGCGAGTCCGAGCAGGATCGACGGCACCCATCAGAC
175        T Y H V I A G Q A S P S R I D G T H Q T

591        CCTGCAAGGTGCCGACCTGACGGTGATAGGCGCCCGCGACGACCTCATGGTCAACAACGC
198        L Q G A D L T V I G A R D D L M V N N A

651        CGGTTTGGTATGTGGCGGAGTTACACCCGCCAACGCGACGGTGTACATGATCGATACGGT
218        G L V C G G V H T A N A T V Y M I D T V

711        GCTGATGCCCCCGGCACAGTAA
238        L M P P A Q *

```

Figura 6. Secuencia del gen Rv2873 fusionado con la secuencia del péptido señal de la lipasa. Se observa remarcada en verde la secuencia del péptido señal de la lipasa de *S. exfoliatus* justo arriba del codón TCG que codifica el primer aminoácido después de la cisteína de anclaje en la proteína madura (marcado con un recuadro rojo).

Como se observa en la Figura 7.1, mediante tinción con azul de Coomassie se muestra una banda de aproximadamente 22 kDa en el carril del sobrenadante de la construcción, la cual esta ausente en el sobrenadante de las células con el vector vacío. Estas primeras observaciones sugirieron que probablemente la

proteína MPT83 estaba siendo expresada por *S. lividans*, pero a un peso molecular ligeramente distinto al esperado, por lo que resultaba necesario realizar los ensayos de inmuno-blot y comprobar que dicha banda correspondía a la proteína MPT83.

En el inmuno-blot fue posible observar que los anticuerpos anti-MPT83 obtenidos en este trabajo reconocían una banda en el carril del control positivo (proteína purificada de *E. coli*), así como dos bandas de tamaño ligeramente menor en el sobrenadante de los cultivos que contenían el plásmido pBIA3 (Figura 7.II). La banda del control positivo correspondía a la proteína MPT83 no glicosilada purificada de *E. coli*, con una masa molecular teórica de 21 kDa y que en el presente trabajo es observada entre 23 y 24 kDa en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, indicando que el anticuerpo reconocía adecuadamente a la proteína MPT83. Las dos bandas encontradas en el carril del sobrenadante del cultivo que lleva al pBIA3 se observaron a 22 kDa y a 17-18 kDa (Figura 7. II), mostrándose ausentes en el sobrenadante de las células con el vector vacío.

La banda observada a 22 kDa correspondía con la observada previamente en el sobrenadante mediante la tinción de azul de Coomassie, a diferencia de la banda de 17-18 kDa, que no se había observado previamente. Éstos resultados indicaron que la proteína MPT83 estaba siendo expresada por *S. lividans* y que el péptido señal de la lipasa fusionado con la proteína mantenía su función en *S. lividans*, dirigiendo el total de la proteína expresada hacia su secreción al medio extracelular, ya que no se observó la presencia de bandas reconocidas por el anticuerpo en el extracto del micelio que lleva el pBIA3, por lo que se comprobó que la construcción hecha con la secuencia del péptido señal de la lipasa era reconocida de manera correcta por la bacteria.

El peso molecular de la proteína MPT83 madura y manosilada, expresada en *M. tuberculosis* es de 22 kDa (Harboe, *et. al.*, 1995), sin embargo, su ubicación en geles de poliacrilamida está reportado a 25 kDa en su forma predominante y a 23 kDa en una forma proteolizada secretada al sobrenadante, ambas conservando la glicosilación (Michell, *et al.*, 2003; Hewinson, *et al.*, 1996; Harboe, *et al.*, 1998), por lo que la presencia de una banda en el medio extracelular con un peso

molecular más bajo que el reportado, nos indicó que la proteína probablemente estaba siendo proteolizada también en *S. lividans* después de ser secretada fuera de la célula, ya que las especies de *Streptomyces* producen una gran cantidad de proteasas extracelulares.

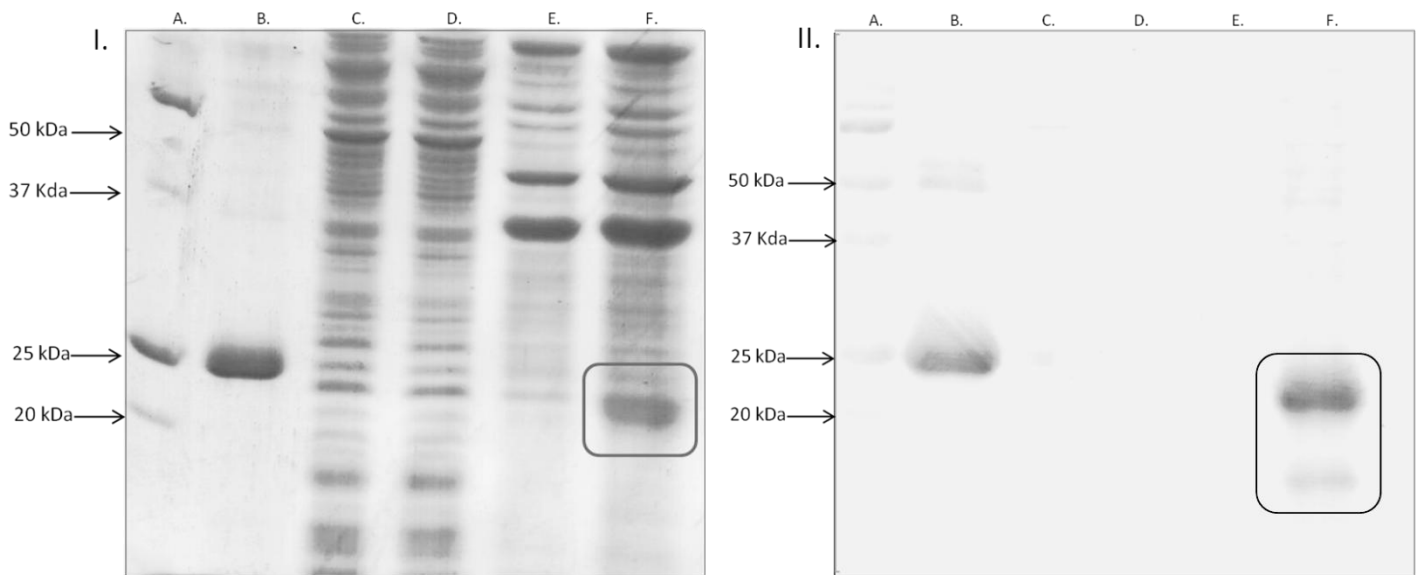


Figura 7. Geles con muestras de la proteína MPT83 con el péptido señal de la lipasa (plásmido pBIA3)obtenidos a partir de cultivos de *S. lividans*. I. Tinción con azul de Coomasie, donde: A) marcador de peso molecular, B) proteína purificada de *E. coli*, C) sonicado de células pIJ6021, D) sonicado de células pBIA3, E) sobrenadante pIJ6021, F) sobrenadante pBIA3. Puede observarse dentro del recuadro la banda que corresponde a la proteína MPT83 con un peso aproximado de 22 kDa. II. Ensayo de Inmuno-blot, en donde: A) es el marcador de peso molecular, B) proteína purificada de *E. coli*, C) sonicado de células pIJ6021, D) sonicado de células pBIA3, E) sobrenadante pIJ6021 y F) sobrenadante pBIA3. Las bandas dentro de los recuadros corresponden a la proteína MPT83 en forma proteolizada con un peso molecular de 22 kDa aproximadamente y en menor cantidad una forma de 17-18 kDa.

6.5. Glicosilación de MPT83 en *S. lividans* con el plásmido pBIA3

La glicosilación de proteínas es una modificación post-traduccional que ocurre de manera común en los organismos eucariontes, en contraste con los organismos procariontes. Sin embargo, dentro de las proteínas que se ha demostrado se encuentran glicosiladas en bacterias, las que mejor han sido descritas provienen de organismos patógenos como *M. tuberculosis*, incluyendo a importantes antígenos como la proteína APA de 45-47 kDa y la lipoproteína MPT83, sugieren que dicha modificación se encuentra ligada a la patogenicidad de la bacteria (Elaine, *et al.*, 1996).

Debido a que MPT83 tiene un papel significativo durante la infección de *M. tuberculosis*, era necesario comprobar que la proteína observada en el sobrenadante del cultivo de células con el plásmido pBIA3 se encontraba glicosilada a pesar de estar proteolizada. Para ello, se utilizó la lectina concanavalina A (Con A), usada comúnmente para identificar glicoconjugados de proteínas que se encuentran unidos principalmente a manosas.

Las muestras de proteínas fueron precipitadas a partir del sobrenadante utilizado para los ensayos con anticuerpos. Debido a que en dichos ensayos, la proteína MPT83 se mostraba ausente en el carril que pertenecía al sonificado de las células (Figura 7.II), éste se omitió en los ensayos de afinidad con ConA, ya que aparentemente el total de la proteína expresada era secretada al sobrenadante; además, se cargó una muestra de la proteína APA semipurificada a partir de *S. lividans* como control positivo de reconocimiento de manosas.

Se observaron únicamente dos bandas en el carril de la proteína APA (Figura 8. Carril D), la primera a una altura de 45-47 kDa aproximadamente, coincidiendo con el peso molecular reportado para esta proteína (Lara, *et al.*, 2004) y la segunda a 35 kDa, que pudiera ser degradación de la misma. Sin embargo, en el carril correspondiente al sobrenadante de cultivos con pBIA3 (Figura 8. Carril C) no se observó el reconocimiento de ninguna de las bandas vistas durante los ensayos de inmunoblot.

La presencia de la proteína APA, y la ausencia de bandas a un peso

molecular esperado en el sobrenadante de la construcción que habían sido previamente reconocidas por el anticuerpo, indicaron que ambas, tanto la banda de 22 kDa como la de 17-18 kDa correspondían a formas proteolizadas de la proteína MPT83 que estaban siendo secretadas al medio extracelular pero que se encontraban carentes de manosilación.

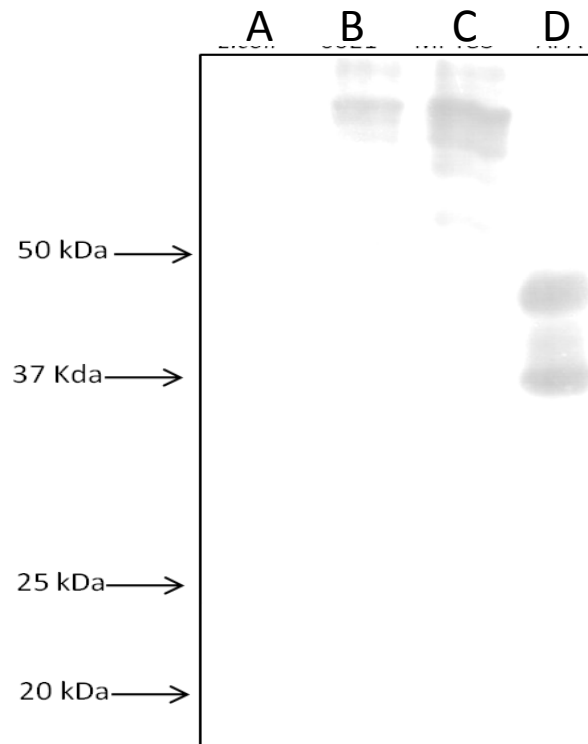


Figura 8. Western-blot revelado con ConA en donde se observa la fracción del sobrenadante de las células con el plásmido pBIA3 y la ausencia de reconocimiento de MPT83. A) Proteína purificada de *E. coli*, B) Sobrenadante del cultivo con vector vacío, C) Sobrenadante del cultivo con pBIA3, D) proteína APA. Se nota la ausencia de bandas a una altura de 20-25 kDa que concuerden con el peso molecular de MPT83.

6.6. Expresión de la proteína MPT83 con su propio péptido señal y su localización en la membrana citoplasmática

El plásmido pBIA4 contiene el gen Rv2873 completo que codifica para la lipoproteína MPT83, incluyendo la secuencia de 72 pares de bases que codifica al péptido señal de 24 aminoácidos y que dirige a la proteína hacia la membrana citoplasmática. Las últimas bases de la secuencia del péptido señal corresponden a una caja de lipidación, es decir, una secuencia de 12 pares de bases que codifica 4 aminoácidos (Leu-Ala-Gly-Cys) unidos al extremo N-terminal de la proteína, y que funcionan como un sitio de reconocimiento para la maquinaria de lipidación que une grupos acilo a la cisteína otorgándole un papel importante durante el anclaje de la lipoproteína a la membrana. La proteína MPT83 se glicosila principalmente en los aminoácidos treonina y en menor cantidad serina como puede observarse en la Figura 9, en donde se encuentran marcados los 9 sitios con mayor probabilidad de glicosilación ubicados con ayuda del software de análisis NetOGgly (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGgly/>).

La expresión de la proteína MPT83 se realizó usando cultivos de células que contenían el plásmido pBIA4, con la finalidad de observar si había diferencias en la expresión, ubicación y glicosilación de la proteína cuando ésta mantenía su propio péptido señal, además de que resultaba importante observar si el péptido señal era reconocido también por *S. lividans*. Se utilizaron 3 fracciones para realizar los ensayos de expresión, el sobrenadante obtenido mediante centrifugación del medio de cultivo, la fracción correspondiente a la membrana celular y la fracción correspondiente al citoplasma, para comprobar la presencia o ausencia de la proteína.

```

1      ATGATCAACGTTTCAGGCCAAACCGGCCGAGCAGCGAGCCTCGCAGCCATCGCGATTGCG
1      M I N V Q A K P A A A A S L A A I A I A

61     TTCTTAGCGGGT TGT TCGAGCACCAAACCGTGTGCGAAGACACCAGCCCCGAAACCGGGC
21     F L A G C S S T K P V S Q D T S P K P A

121    ACCAGCCCCGGCGGCCCGGTTACCACGGCGGCAATGGCTGACCCCGCAGCGGACCTGATT
41     T S P A A P V T T A A M A D P A A D L I

181    GGTCGTGGGTGCGCGCAATACGCGGCGCAAATCCCACCGGTCCCGGATCGGTGGCCGGA
61     G R G C A Q Y A A Q N P T G P G S V A G

241    ATGGCGCAAGACCCGGTTCGCTACCGGGCTTCCAACAACCCGATGCTCAGTACCCTGACC
81     M A Q D P V A T A A S N N P M L S T L T

301    TCGGCTCTGTGGGCAAGCTGAACCCGGATGTGAATCTGGTTCGACACCCTCAACGGCGGC
101    S A L S G K L N P D V N L V D T L N G G

361    GAGTACACCGTTTTTCGCCCCACCAACGCCGATTCGACAAGCTGCCGGCGGCCACTATC
121    E Y T V F A P T N A A F D K L P A A T I

421    GATCAACTCAAGACTGACGCCAAGCTGCTCAGCAGCATCCTGACCTACCACGTGATAGCC
141    D Q L K T D A K L L S S I L T Y H V I A

481    GGCCAGGCGAGTCCGAGCAGGATCGACGGCACCCATCAGACCCTGCAAGGTGCCGACCTG
161    G Q A S P S R I D G T H Q T L Q G A D L

541    ACGGTGATAGGCGCCCGCGACGACCTCATGGTCAACAACGCCGGTTTGGTATGTGGCGGA
181    T V I G A R D D L M V N N A G L V C G G

601    GTTCACACCGCCAACGCGACGGTGTACATGATCGATACGGTGCTGATGCCCCCGGCACAG
201    V H T A N A T V Y M I D T V L M P P A Q

661    TAA
221    *

```

Figura 9. Secuencia del gen Rv2873 completo con la secuencia de su péptido señal y cisteína de anclaje a la membrana. Además se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína MPT83. Los aminoácidos remarcados en azul corresponden a la secuencia del péptido señal, seguido del codón TGT que codifica una cisteína de anclaje a membrana (marcado en amarillo) y posteriormente la secuencia de bases que corresponden al resto de la proteína. Las pares de bases subrayadas junto con el codón de la cisteína, forman la caja lipídica o lipobox de la secuencia, la cual codifica los aminoácidos Leu-Ala-Gly-Cys que señalizan la lipidación en la cisteína. Los residuos de treonina y serina remarcados en morado y verde, respectivamente, corresponden a los 9 sitios probables de glicosilación en la proteína. Los residuos de treonina 48 y 49 son los primeros aminoácidos de la forma de 23 kDa de MPT83 encontrada en el sobrenadante.

Al realizar los ensayos de expresión, los geles teñidos con azul de Coomassie mostraron un patrón de bandeo errático. En el carril perteneciente a la membrana de las células con el plasmido pBIA4 (Figura 10.I, carril c), aparecía una distorsión en el corrimiento de las bandas justo entre los pesos moleculares de 20-25 kDa, impidiendo la visibilidad de alguna proteína que correspondiera a MPT83, la cual debería observarse aproximadamente a 25 kDa. Aparentemente, existe un problema con la tinción por azul de Coomassie cuando es aplicada a proteínas que se encuentran en muestras con alto contenido de lípidos como membranas celulares, ya que el corrimiento y migración de las proteínas dentro del gel se ven afectadas por la interferencia que causa la alta presencia de estas moléculas.

Como consecuencia, se aplicó a las muestras de la fracción membranal el método de precipitación de proteínas con el uso de metanol-cloroformo para eliminar residuos de detergentes y lípidos (Wessel y Flügge, 1983). Al realizar una electroforesis en gel con dichas muestras, se observó que el grado de distorsión de las bandas disminuía, notándose una mejora en cuanto a la migración y corrimiento de las proteínas cuando eran teñidas con azul de Coomassie (Figura 10.II).

Una banda en el carril perteneciente a la membrana de las células con el plásmido pBIA4 se observó a un peso molecular de 25kDa aproximadamente, ligeramente más alto que la banda que pertenecía a la proteína purificada y que no era observada en la membrana de las células del vector vacío. (Figura 10.II, carril d).

Al analizar el carril de la muestra de sobrenadante, se observó la presencia de una banda perteneciente a una proteína con peso molecular de aproximadamente 17-18 kDa (Figura 10.II, carril h), ausente en el vector vacío. La presencia de ambas bandas sugirió que la proteína se encontraba anclada en la membrana celular pero que probablemente también estaba siendo proteolizada en el sobrenadante.

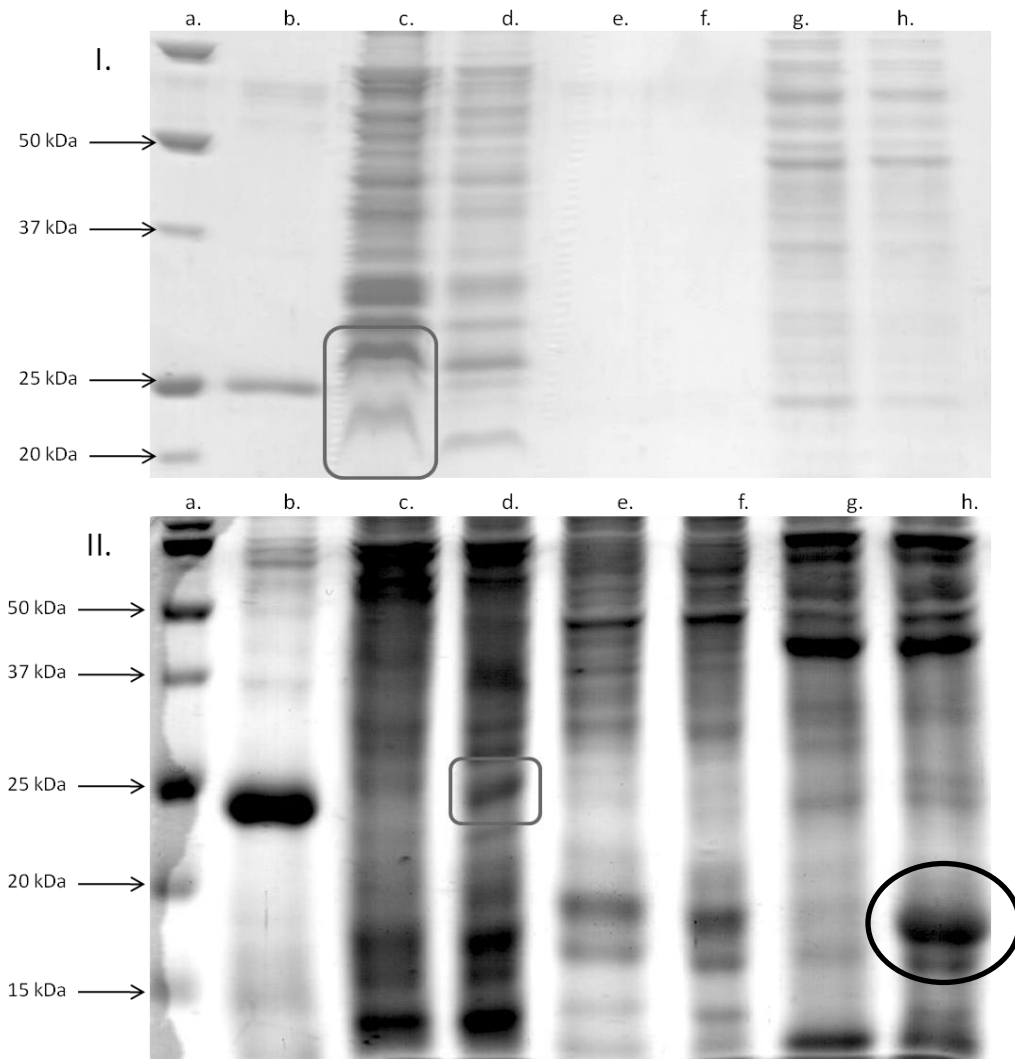


Figura 10. Geles de poliacrilamida teñidos con Azul de Coomassie con muestras de proteína MPT83 con su propio péptido señal. I.) Gel con muestras de membrana sin precipitar, en donde: a) marcador de peso molecular, b) proteína purificada de *E.coli*, c) membrana pBIA4, d) membrana vector vacío, e) citoplasma pBIA4, f) citoplasma vector vacío, g) sobrenadante de cultivo con pBIA4, h) sobrenadante de cultivo con el vector vacío. Se observa dentro del recuadro marcado la distorsión de corrimiento y falta de tinción en el gel cuando no es precipitado por metanol/cloroformo. II.) Gel con muestras de membrana precipitadas con metanol/cloroformo, en donde: a) marcador de peso molecular, b) proteína purificada de *E. coli*, c) membrana de células con el vector vacío, d) membrana de pBIA4, e) citoplasma vector vacío, f) citoplasma de pBIA4, g) sobrenadante vector vacío y h) sobrenadante de pBIA4. Dentro del recuadro se observa la presencia de la proteína MPT83 en la fracción membranal de las células cuando es precipitada con metanol-cloroformo. Además se observa la presencia de una banda (encerrada en el círculo) en el sobrenadante a un peso molecular de 17-18 kDa aproximadamente que pudiera ser la proteína proteolizada.

En los ensayos de inmuno-blot, el anticuerpo reconoció una banda a una altura de 25 kDa que concordó con el peso molecular reportado al que migra la proteína MPT83; además se observó la presencia de una banda en el carril del sobrenadante de cultivos con pBIA4 a 17-18 kDa aproximadamente, coincidiendo también con la observada en la tinción con azul de Coomassie (Figura 11). Previamente se había observado la presencia de una banda en la misma fracción y al mismo peso molecular durante los ensayos de expresión de la proteína MPT83 cuando ésta se encontraba unida al péptido señal de la lipasa (Figura 7.II).

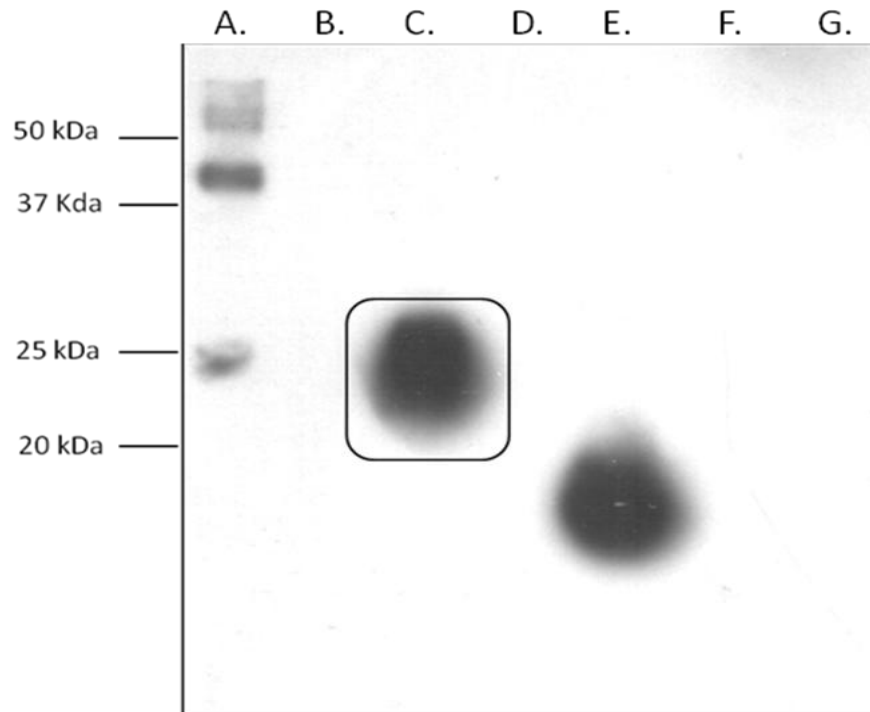


Figura 11. Inmuno-blot de la proteína MPT83 con su propio péptido señal, en donde: A) proteína purificada de *E. coli*, B) membrana vector vacío, C) membrana de pBIA4, D) sobrenadante vector vacío, E) sobrenadante de pBIA4, F) citoplasma de vector vacío y G) citoplasma de pBIA4. Puede apreciarse la presencia de la proteína MPT83 a una altura de 25 kDa aproximadamente en la fracción membrana (recuadro) y de una probable MPT83 proteolizada en el sobrenadante del cultivo a una altura de 17-18 kDa.

Estos resultados mostraron que la proteína MPT83 era expresada y dirigida de manera correcta a la membrana celular de la bacteria con una masa molecular igual a la esperada de 25 kDa, confirmando que el péptido señal nativo de la proteína MPT83, la cisteína de anclaje a membrana y la caja lipídica presente en la secuencia de la proteína eran reconocidos eficientemente por la maquinaria de *S. lividans*. Además, el hecho de que las bandas de la fracción del sobrenadante de las células con el plásmido pBIA4 como en aquellas que contenían el plásmido pBIA3 fueran observadas a pesos moleculares similares, siendo en ambos casos más pequeños que el esperado, nos confirmó que la proteína MPT83 estaba siendo proteolizada por peptidasas secretadas al sobrenadante, que dicha modificación ocurría posterior a su expresión en la membrana celular y que ésta era independiente de la forma en que la proteína se encontraba expresada, es decir, con su péptido señal o fusionada con el péptido señal de la lipasa.

6.7. Glicosilación de MPT83 en células con el plásmido pBIA4

Para detectar si la proteína MPT83 anclada a membrana era glicosilada en las células con el plásmido pBIA4 se realizó un ensayo utilizando ConA bajo las condiciones antes mencionadas. Debido a que en los ensayos de inmuno-blot no se observó la presencia de la proteína MPT83 en la fracción citoplasmática de las células, ésta fue omitida para ensayos posteriores.

Se observó la presencia de una banda de aproximadamente 25 kDa en el carril que correspondía a la membrana de las células con pBIA4 (Figura 12, carril D), además de la presencia de dos bandas en la fracción del sobrenadante (Figura 12, carril E), y que se mostraron ausentes en los carriles de las fracciones del vector vacío (Figura 12, carril C). Una de las bandas que se encontró en el sobrenadante de la construcción y que era reconocida por la ConA se observó a un peso molecular de aproximadamente 24 kDa, ligeramente más pequeño que la banda ubicada en la fracción membranal, además se observó también la presencia de una banda de 18-19 kDa aproximadamente, vista previamente en los ensayos de Inmuno-blot.

La banda de aproximadamente 25 kDa que se observó en la fracción membranal, pertenecía claramente a la proteína MPT83, ya que ésta se encontraba ausente en membranas de células con el vector vacío y además, correspondía con la banda encontrada anteriormente a 25 kDa en la fracción membranal reconocida con el anticuerpo. Estos resultados concordaron con el reconocimiento por parte de la ConA de una banda a una altura de 45-47 kDa que correspondía con la proteína APA y con la falta de reconocimiento de la proteína MPT83 proveniente de *E. coli*. El reconocimiento de la proteína MPT83 durante los ensayos de Western-blot con ConA nos indicó que la proteína se encontraba en la membrana celular y que efectivamente se encontraba glicosilada por *S. lividans* tanto en su forma madura de 25 kDa encontrada en la membrana, como en su forma proteolizada, ya que la banda de aproximadamente 24 kDa que se observó en el sobrenadante, pudiera ser la proteína MPT83 en su forma proteolizada de 23 kDa; en 2003 Michell y colaboradores reportaron que dicha

forma era encontrada en el sobrenadante y mediante secuenciación y espectrometría de masas comprobaron que se encontraba glicosilada (Michell, *et al.*, 2003).

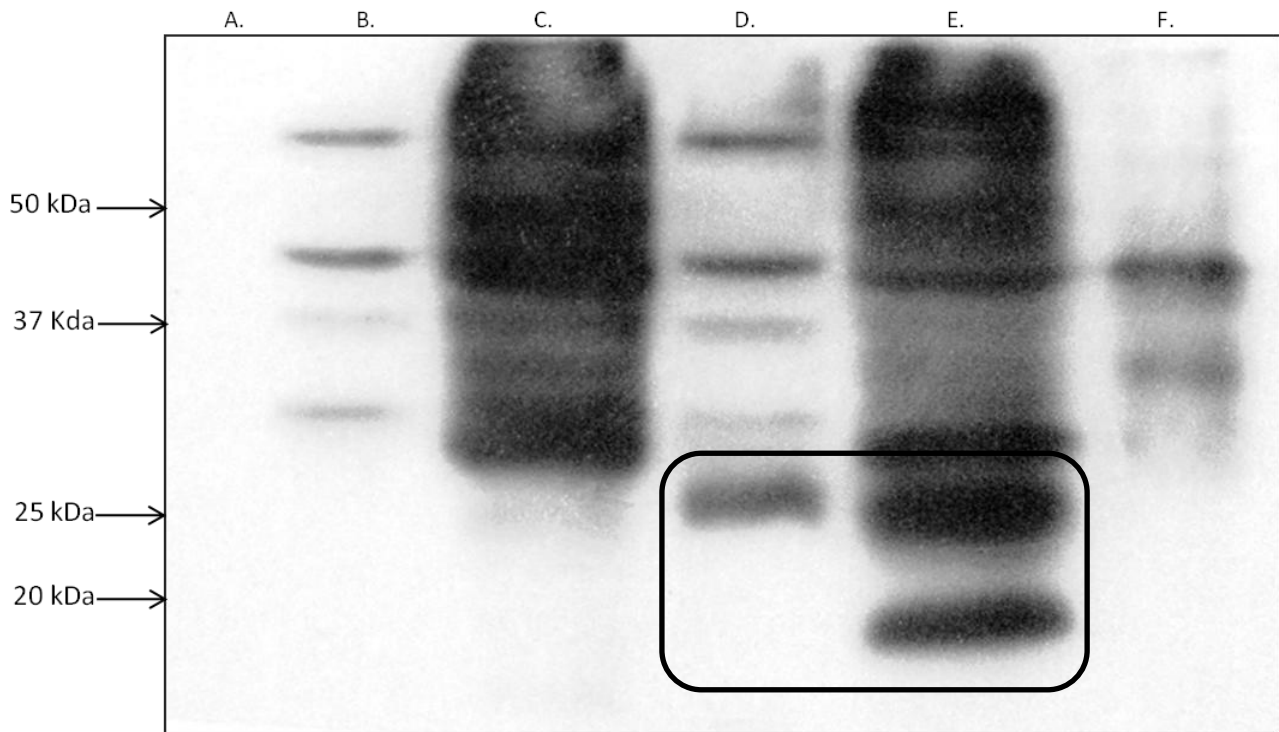


Figura 12. Western-blot con ConA de muestras de la proteína MPT83 con su propio péptido señal obtenidas a partir de cultivos de *S. lividans*, en donde: A) proteína purificada de *E. coli*, B) membrana de pIJ6021, C) sobrenadante de pIJ6021, D) membrana de pBIA4, E) sobrenadante de pBIA4 y F) proteína APA. Se nota la presencia de la proteína MPT83 a una altura de 25 kDa en la fracción membranal; en el sobrenadante de forma proteolizada a una altura de 24 kDa aproximadamente y otra forma de menor tamaño a 17-18 kDa.

El hecho de que se hayan observado dos bandas en la fracción del sobrenadante de la construcción, reconocidas por la ConA y vistas anteriormente en los ensayos de inmuno-blot, sugirió que a pesar de que la proteína MPT83 contenía su propio péptido señal y se encontraba en la fracción membranal, también estaba siendo proteolizada y liberada al sobrenadante. Se observó que las formas proteolizadas encontradas en el sobrenadante de las células con el

plásmido pBIA3, es decir, cuando la proteína se encuentra fusionada al péptido señal de la lipasa, no estaban manosiladas a diferencia de las formas proteolizadas de MPT83 con su propio péptido señal ubicadas en el sobrenadante de las células con el plásmido pBIA4, en las que se mostraba claramente tal modificación.

Estos resultados descartaron la posibilidad de que la ausencia de glicosilación en la proteína MPT83, cuando era secretada al sobrenadante por las células con el plásmido pBIA3, se debía a que la proteína se encontraba proteolizada, perdiendo de esta manera probablemente uno o más sitios de glicosilación. Sin embargo, al compararlas con las bandas encontradas en el sobrenadante de la proteína con su propio péptido señal visualizadas a pesos moleculares similares y observar que eran reconocidas por parte de la ConA, se desechó dicha posibilidad. El hecho de que en ambas construcciones se encontrara una probable proteína MPT83 en su forma de 23 kDa, en la que los dos primeros aminoácidos de treonina se encuentran glicosilados (Michell, *et al.*, 2003), y que tal modificación estuviera presente únicamente cuando la proteína mantiene su propio péptido señal, indicaba que era necesario que la proteína MPT83 estuviese anclada a la membrana citoplasmática para que pudiera ser glicosilada. Estos resultados concuerdan con el hecho de que en *M. tuberculosis*, la enzima PPM, que tiene un papel importante en la unión de residuos de manosa a los aminoácidos serina y treonina de las proteínas, se encuentra unida a la membrana celular por medio de su extremo N-terminal, el cual es homólogo a la proteína membranal Lnt, responsable de la lipidación. Además, el hecho de que la PMT es membranal probablemente indica que la lipidación, secreción y glicosilación de las lipoproteínas están llevándose a cabo en paralelo cuando éstas se encuentran ancladas a la membrana de la bacteria.

Los resultados anteriores mostraron que probablemente los mecanismos de secreción, lipidación y glicosilación de lipoproteínas en *S. lividans*, se realizan manera similar que en micobacterias, utilizando enzimas homólogas entre ellas, por lo que las proteínas en *S. lividans* pudieran estar siendo ancladas y glicosiladas de la misma forma que en *M. tuberculosis*.

6.8. Expresión de proteínas a partir del vector integrativo pIJ6902

El gen Rv2873 fue clonado en el vector integrativo pIJ6902 para expresar la proteína MPT83 unida a su propio péptido señal (plásmido pBIA6, Tabla 1), con la finalidad de aumentar la estabilidad del plásmido al insertarse dentro del genoma de la bacteria, y de esta manera evitar que la sobre expresión de la proteína MPT83 afecte directamente al microorganismo, reduciendo la eficiencia de mecanismos de modificación de proteínas tales como la glicosilación.

Se hicieron ensayos de inmuno-blot y de afinidad a ConA únicamente con las células que contenían el plásmido pBIA6, ya que anteriormente se había observado la ausencia de la manosiación cuando la proteína estaba unida al péptido señal de la lipasa, observándose únicamente cuando la proteína mantenía su propio péptido señal.

En los ensayos de inmuno-blot, se observó una banda aproximadamente a 25 kDa, que correspondía con la proteína MPT83 (Figura 13.I). Estas observaciones confirmaron que la proteína se encontraba expresada en la membrana de la bacteria cuando había sido transformada con el plásmido pBIA6. Además, las bandas observadas tanto en membrana como en sobrenadante, correspondían con las bandas vistas anteriormente en los ensayos de expresión con el plásmido pBIA4, y que pertenecían a la proteína MPT83, incluso cuando se encontraba proteolizada en la fracción del sobrenadante (Figuras 11 y 12). A pesar de ello, después de analizar el Western-blot con ConA, se observó que tanto en membrana como en sobrenadante, las bandas que corresponden a la proteína MPT83 no se distinguían claramente, mostrando incluso ausencia de reconocimiento en la fracción del sobrenadante y siendo muy inespecífica en la correspondiente a la membrana de la bacteria, en contraste con la proteína APA que logró observarse claramente a 45-47 kDa (Figura 13.II).

Estas observaciones se deben a que probablemente la cantidad de proteína expresada por la bacteria no era suficientemente alta para que el reconocimiento por parte de la ConA de las formas glicosiladas de la proteína pudieran observarse fácilmente en geles de una dimensión, aun cuando la proteína se encontrara en la

membrana y glicosilada por la bacteria.

Debido a que la electroforesis en gel de una dimensión separa proteínas únicamente con base en su peso molecular, se decidió hacer una electroforesis de dos dimensiones, con el objetivo de confirmar que la proteína MPT83 era expresada correctamente y glicosilada, ya que dicho ensayo permitía una primer separación basándose en el punto isoeléctrico de la proteína (pI) y posteriormente con base en su peso molecular, mostrando una separación de proteínas mayor y permitiendo la identificación de la proteína MPT83 con mayor claridad.

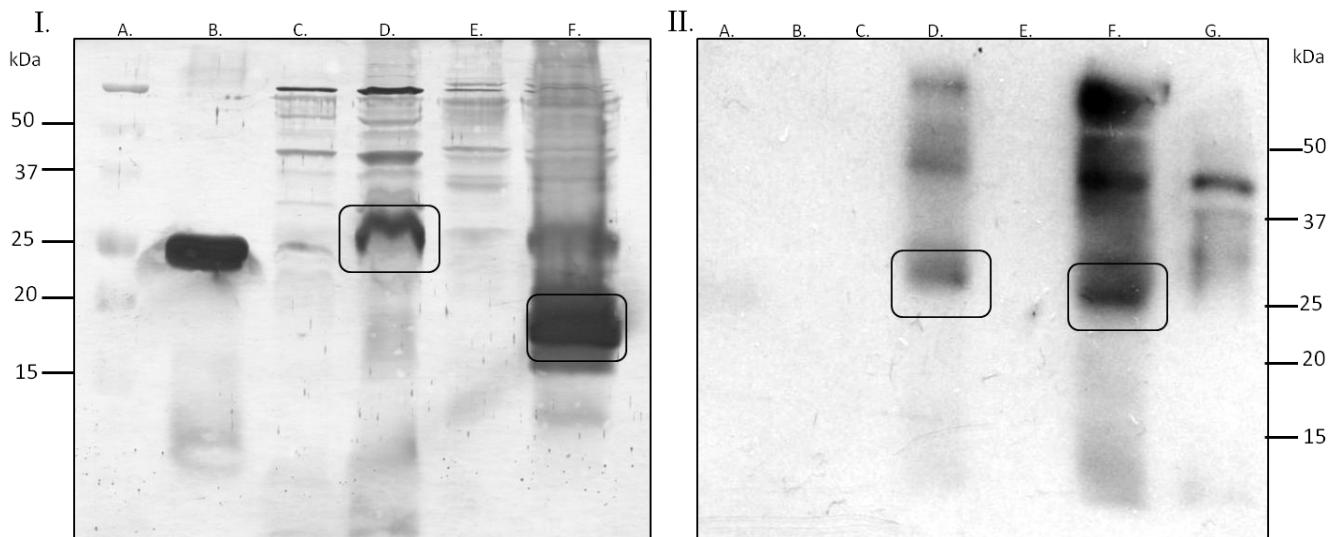


Figura 13. Corrimiento de proteínas provenientes de células transformadas con el vector pIJ6902 y su derivado pBIA6. I.- Ensayo de Inmuno-blot teñido con 3,3-diaminobenzoidina para identificar la presencia de la proteína en las fracciones de membrana y sobrenadante, donde A) marcador, B) proteína purificada de *E. coli*, C) membrana de células con vector vacío, D) membrana de células con pBIA6, E) sobrenadante de células con vector vacío y F) sobrenadante de células con pBIA6. Las bandas encerradas corresponden a la proteína MPT83 coincidiendo con las observadas en ensayos de Inmuno-blot en vector multicopia. II. Western-blot con ConA, A-F) Igual que en I (no es claro) y G) la proteína APA. Las bandas dentro de los recuadros corresponden posiblemente a la proteína MPT83 tanto en membrana como en sobrenadante.

6.9. Electroforesis en doble dimensión de la proteína MPT83 expresada a partir del plásmido pBIA4

Debido a que la proteína MPT83 fusionada con el péptido señal de la lipasa se observaba en estado proteolizado y carente de glicosilación al ser expresada a partir del plásmido pBIA3, se decidió realizar la electroforesis únicamente con muestras de la fracción membranal de la proteína MPT83 cuando se encuentra unida a su péptido señal (plásmidos pBIA4 y pBIA6). A pesar de que las formas proteolizadas ubicadas en el sobrenadante de las células cuando la proteína tiene su propio péptido señal se encontraban glicosiladas, no se hicieron electroforesis de doble dimensión con dichas muestras, ya que el peso molecular y el pI de ambas formas de la proteína no era muy claro.

Para cada electroforesis fue necesario utilizar 100 µg de muestra previamente desalada mediante una columna de sepharosa y debido a que las proteínas provenían de muestras de membrana celular, éstas fueron precipitadas por medio de ácido tricloroacético. Se realizaron 3 ensayos para observar la presencia de la proteína, tinción con azul de Coomassie, Inmuno-blot con anticuerpos e incubación con ConA.

El punto isoeléctrico de la proteína madura está reportado a 4.6 y en estudios previos en el que se analizaron las proteínas provenientes del filtrado de *M. tuberculosis* mediante electroforesis de doble dimensión y espectrometría de masas, la proteína MPT83 fue observada a un peso molecular cercano a los 31 kDa (González-Zamorano, *et al.*, 2008).

Mediante la tinción con azul de Coomassie, no se observó la presencia de algún punto que correspondiera con la proteína MPT83, ya que aparentemente el perfil proteico de las muestras de membrana de células con el plásmido pBIA4 se mantenía igual a las de células con el vector vacío (Figura 14. I y II). El hecho de que no se observara claramente un punto que correspondiera con la proteína, coincidió con los geles de una dimensión realizados con muestras de membrana en los que la proteína unida a su péptido señal presentaba dificultad para observarse en geles teñidos con azul de Coomasie.

Sin embargo, en el ensayo de Inmuno-blot se observó un reconocimiento muy específico de la proteína MPT83, pues a una altura de 31 kDa, se observaron dos puntos de gran tamaño a un pI muy cercano y que eran fuertemente reconocidos por el anticuerpo, lo que indicaba que la proteína MPT83 se encontraba sobre expresada en la membrana de *S. lividans* (Figura 14.III) y además, en dos probables isoformas. Sin embargo, a diferencia de las formas proteolizadas vistas en el sobrenadante de células con el plásmido pBIA4 durante los ensayos de una dimensión, en este caso, ambas isoformas de la proteína probablemente eran producidas por variaciones en las modificaciones postraduccionales que la proteína sufrió al momento de ser expresada. Adicionalmente, se observó la presencia de dos pequeños puntos reconocidos por el anticuerpo a una altura de 21-22 kDa (Figura 14.III) y que no se encontraban en la membrana del vector vacío (Figura 14.IV) por lo que se cree que pudieran ser formas proteolizadas de la proteína MPT83 expresadas en menor cantidad y que no lograron observarse en la electroforesis de una dimensión, ya que la resolución es mucho más baja.

En los ensayos de Western-blot con ConA, únicamente se observó un punto a una altura de 31 kDa y a un pI alrededor de 4, más bajo que la otra isoforma reconocida igualmente por el anticuerpo (Figura 14.V). De la misma manera, los dos puntos encontrados a 21-22 kDa no son reconocidos por la ConA, por lo que probablemente solo una de las formas encontradas de la proteína MPT83 es la que se encuentra manosilada y que es ésta la que se observa en la electroforesis de una dimensión. Además, se observó el reconocimiento de una banda de 45 kDa encontrada en el marcador de peso molecular y que pertenece a la ovoalbúmina que está reportada como una proteína glicosilada en 4 residuos de la proteína (Andrew, *et al.*, 1981), y que aparece también en el vector vacío (Figura 14.VI).

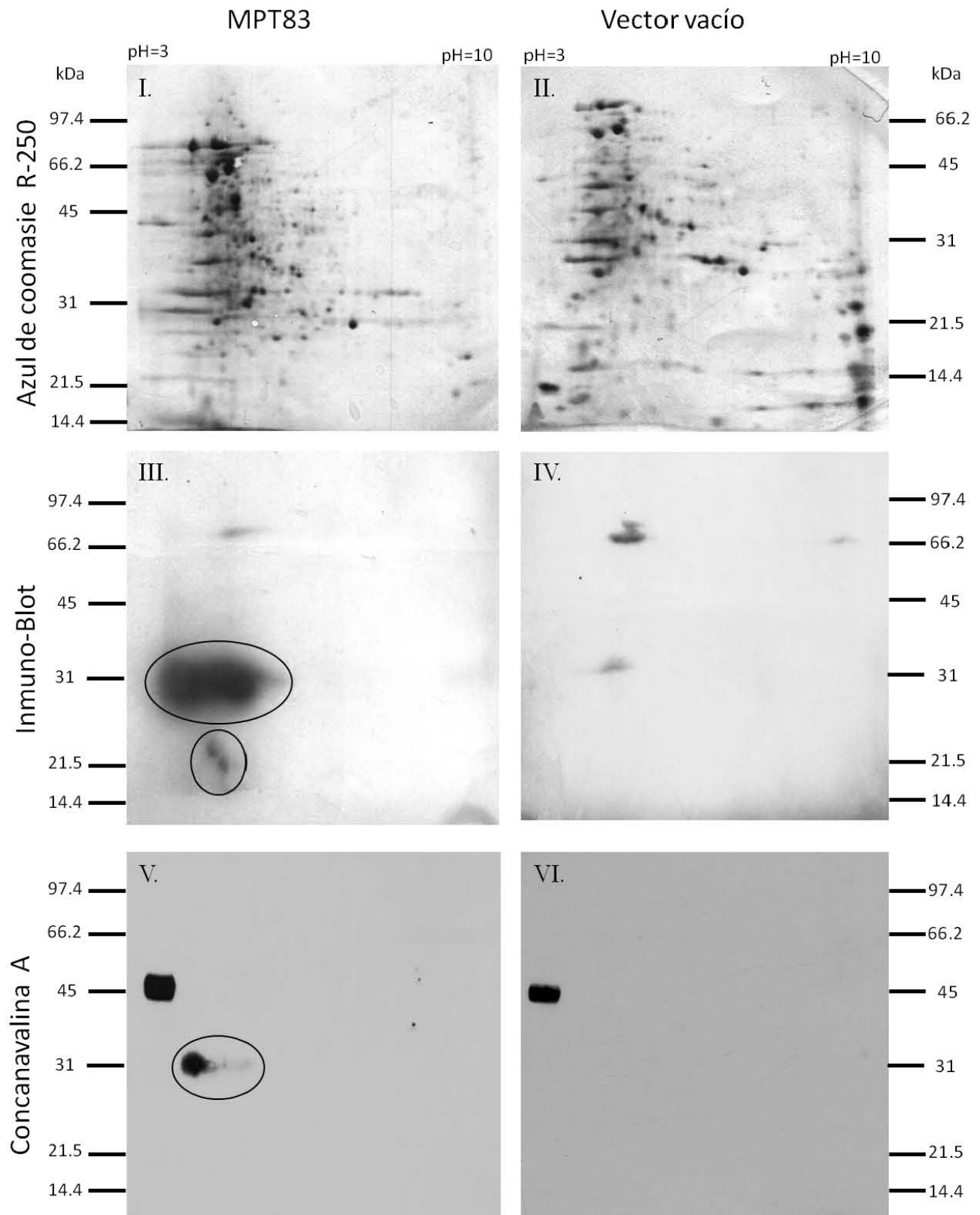


Figura 14. Electroforesis en doble dimensión con muestras de la proteína MPT83 con su péptido señal en la fracción membranal de las células con el plásmido pBIA4 (I,III y V) y del vector vacío pIJ6021(II,IV y VI). Se muestran los 3 ensayos aplicados a la proteína, tinción con azul de Coomassie (I y II), Inmuno-blot (III y IV) y Western-blot con ConA (V y VI). Los puntos encerrados corresponden a la proteína MPT83 y a las isoformas de la misma proteína.

6.10. Electroforesis en doble dimensión de la proteína MPT83, expresada a partir del plásmido pBIA6

Adicionalmente, se realizó una electroforesis en doble dimensión con las muestras que provenían de cultivos con el plásmido pBIA6, para comprobar que efectivamente la proteína se encontraba glicosilada, ya que en la electroforesis de una dimensión esta modificación no se observaba claramente. De manera similar, en la tinción con azul de Coomassie, no se apreció algún punto que correspondiera con la proteína MPT83 (Figura 15.I y II), sin embargo, en los ensayos de Inmuno-blot apareció un punto a la altura de 31 kDa, y dos puntos a una altura de 22 kDa (Figura 15.III), que coincidían exactamente con las isoformas de la proteína observadas en los ensayos de expresión en electroforesis de doble dimensión con el plásmido pBIA4 (Figura 14.III). Además, se notó la presencia de una mayor cantidad de puntos en la membrana del vector vacío (Figura 15.IV) y su ausencia en la membrana de células con pBIA6. Este hecho pudiera deberse a dos razones: las moléculas de inmunoglobulinas se unen en primer lugar a la proteína MPT83 expresada en mayor cantidad que las demás, quedando sólo algunas disponibles para su unión inespecífica con otras proteínas, caso contrario con las proteínas del vector vacío en el que no se encuentra la proteína MPT83; por otro lado la sobre expresión de la proteína MPT83 en las células de *S. lividans* pudiera estar afectando la expresión de otras proteínas de membrana por lo que éstas no estarían siendo expresadas en la misma cantidad durante los ensayos.

En los ensayos de unión a ConA, se observó la presencia de dos puntos muy cercanos a una altura de 31 kDa que corresponden a la proteína MPT83 (Figura 15.V) y que en el Inmuno-blot se aprecian como uno solo. Ambos puntos pudieran ser dos formas isoelectricas diferentes de la proteína y que probablemente tuvieran variaciones en la cantidad o posición de los residuos de serina y treonina que se encuentran manosilados, sin embargo, es necesario un análisis de las secuencias de dichas isoformas de la proteína para observar cuáles y en qué posiciones se encuentran las diferencias entre cada una de ellas.

Estos resultados confirmaron que la proteína MPT83 se encuentra

glicosilada aun cuando está clonada en un vector integrativo de bajo número de copias, por lo que su ausencia en la electroforesis de una dimensión en ambas construcciones se debe muy probablemente a la poca cantidad de proteína expresada.

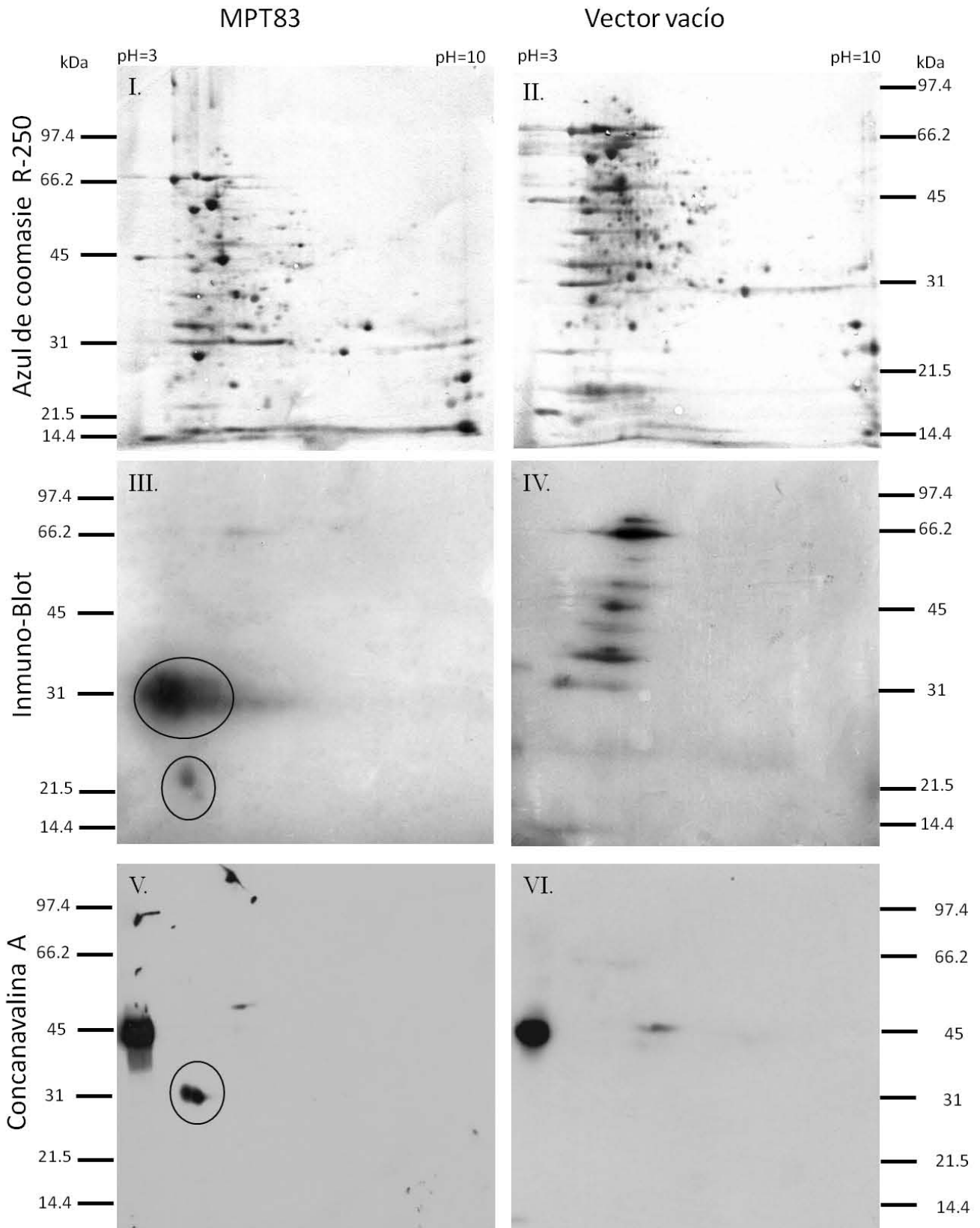


Figura 15. Electroforesis en geles de doble dimensión con muestras de la proteína MPT83 con su propio péptido señal en la fracción membranal pero obtenida de células con el plásmido pBIA6 de expresión monocopia (I,III y V) y del vector vacío pIJ6902(II,IV y VI). Se muestran los 3 ensayos aplicados a las muestras, teñidas con azul de Coomassie (I y II), Inmuno-blot (III y IV) y Western-blot con ConA (V y VI). Los puntos encerrados corresponden a la proteína MPT83.

7. CONCLUSIONES

La proteína MPT83 es expresada por *S. lividans* tanto en membrana celular como secretada al sobrenadante, indicando que el péptido señal nativo de la proteína así como el péptido señal de secreción son reconocidos por *S. lividans*.

Sin embargo, cuando la proteína MPT83 es expresada con su péptido señal nativo, ésta puede observarse en la fracción membranal con el peso molecular esperado, mientras que en el sobrenadante del cultivo la proteína es proteolizada observándose dos formas de menor tamaño. Tanto la proteína MPT83 ubicada en la fracción membranal como las formas proteolizadas en sobrenadante son reconocidas por la concanavalina A, indicando la presencia de residuos de manosa en la proteína.

La proteína MPT83 expresada en *S. lividans* con un péptido señal de secreción es secretada al sobrenadante del cultivo en donde se observa proteolizada. En este caso la proteína no es reconocida por la Concanavalina A, lo que indica que no se encuentra glicosilada.

Las diferencias en la presencia de glicosilación de la proteína dependiendo del péptido señal utilizado se deben muy probablemente a que el sistema de manosilación de *S. lividans* necesita que la proteína se encuentre anclada a la membrana para que ésta pueda ser glicosilada.

La expresión y glicosilación de la proteína MPT83 en *S. lividans* hace evidente la capacidad de esta bacteria para expresar proteínas antigénicas heterólogas de *M. tuberculosis*.

8. PERSPECTIVAS

Para comprobar que la proteína MPT83 expresada en *S. lividans* mantiene las propiedades que la proteína de *M. tuberculosis*, es necesario realizar la purificación de la proteína, tanto de las muestras provenientes de la fracción membranal como del sobrenadante del cultivo, con la finalidad de hacer una caracterización más detallada, que incluya la confirmación de la presencia de azúcares mediante espectrometría de masas, la determinación de los sitios de glicosilación, así como la determinación del sitio en que la proteína es proteolizada.

Mediante el uso de suero de pacientes infectados con *M. tuberculosis*, será importante determinar si los anticuerpos reconocen a la proteína MPT83 proveniente de *S. lividans*, tanto de la forma ubicada en la membrana como la que se observa proteolizada en sobrenadante, ya que resulta más eficiente obtener las proteínas a partir de esta última fracción. Este punto será importante no solamente para contribuir al conocimiento del mecanismo de glicosilación, sino para determinar el posible potencial biotecnológico de la proteína MPT83 producida por *S. lividans*.

9. BIBLIOGRAFÍA:

- Andrew N., Saundry R.H., Moir A.J., Fothergill L.A. and Fothergill J.E., 1981, *The complete amino-acid sequence of hen ovoalbumin*, European Journal of Biochemistry, Vol. 115, p. 335 – 345.
- Anné J. y Lieve V.M., 1993, *Streptomyces lividans as host for heterologous protein production*, FEMS Microbiology Letters, Vol. 114, p. 121 – 128.
- Brülle J.K., Grau T., Tschumi A., Auchli Y., Burri R., Polsfuss S., Keller P.M., Hunziker P., Sander P., 2010, *Cloning, expression and characterization of Mycobacterium tuberculosis lipoprotein LprF*, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 391, p.679 – 684.
- Daffé, M., Drapper P., 1998, *The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity*, Advances in Microbial Physiology, Vol. 39, p. 131-203.
- Demain A.L. and Sanchez, S., 2011, *Fermentation improvement of processes yielding natural products for industry*, Bioactive Natural Products Opportunities and Challenges in Medicinal Chemistry, Chapter 13th. World Scientific Publishing Co., NJ. p. 601 - 629.
- Espitia C., Servín González L. and Raúl Mancilla, 2010, *New insights into protein O-mannosylation in actinomycetes*, Molecular BioSystems, Vol. 6, p. 775-781.
- Fifi T., Costopoulos C., Corner L.A. and Wodd P.R., 1992, *Serological reactivity to Micobacteriumbovis protein antigens in cattle*, Veterinary Microbiology, Vol. 30, p. 343 – 354.
- González Cerón, Olivares O.J. and Servín 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 Mycrobiological Letters, Vol. 301, No.1, p. 35 – 43.
- González Zamorano M., Mendoza-Hernández G., Xolalpa W., Parada C., Vallecillo A.J., Bigi F. and Espitia C., 2008, *Mycobacterium tuberculosis Glycoproteomics Based on ConA-Lectin Affinity Capture of Mannosylated Proteins*, Journal of proteome research, Vol. 8, p. 721 – 733.

- Grant, S.G., Jessee J., Bloom F.R. and Douglas Hannan, 1990, Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 87, p. 4645 - 4649
- Harboe M., Nagai S., Wiker H.G., Sletten K. and Haga S., 1995, *Homology between the MPB70 and MPB83 Proteins of Mycobacterium bovis BCG*, *Scandinavian Journal of Immunology*, Vol. 42, p. 46 – 51.
- Harboe M., Wiker H.G., Ulvund G., Lund Pedersen B., Andersen B., Hewinson R.G. and Sadamu Nagai, 1998, *MPB70 and MPB83 as indicators of protein localization in mycobacterial cells*, *Infection and Immunity*, Vol.66, No.1, p. 289 – 296.
- Hewinson R.G., Michel S.L., Rusell W.P., McAdam R.A. and Jacobs W.R.,1996 *Molecular characterization of MPT83: a seroactive antigen of Mycobacterium tuberculosis with homology to MPT70*, *Scandinavian Journal of Immunology*, Vol. 43, p. 490 – 499.
- Horton, H.R, Perry M.D., Moran L.A., Rawn J.D. and Scrimgeour K. Gray, 2008, *Principios de bioquímica*, Prentice Hall, 4ª ed., USA, p. 274-278 y 241-243.
- Huang J., Shi J., Molle V., Sohlberg B., Weaver D., Bibb M.J., Karoonuthaisiri N., Lih C.J., Kao C.M., Buttner M.J. and Cohen S.N., 2005, *Cross-regulation among disparate antibioticbiosynthetic pathways of Streptomyces coelicolor*, *Molecular Microbiology*, Vol. 58, No. 5, p. 1276 – 1287.
- Juárez M.D., Torres A. and Clara Espitia, 2001, Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* región containing the mpt83 and mpt70 genes, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 203, No. 1, p. 95 – 102.
- Juliane K. Brülle, Thomas Grau, Andreas Tschumi, Yolanda Auchli, Reto Burri, Silke Polsfuss, Peter M. Keller, Peter Hunziker and Peter Sander, 2010, *Cloning, expression and characterization of Mycobacterium tuberculosis lipoprotein LprF*, *BBRC*, Vol. 391, p. 679-684
- Kaufmann, S.H.E., 2011, *Fact and fiction in tuberculosis vaccine research: 10 years later*, *Lancet Infectious Diseases*, Vol. 11, p. 633-40.
- Kieser T., 2000, *Practical Streptomyces genetics*, Norwich, England: John Innes Foundation.

- Lommel M. y Strhal S., 2009, Protein O-mannosylation: Conserved from bacteria to humans, *Glycobiology*, Vol.19, No.8, p. 816-828.
- McNeil D.J., Gewain K.M., Occi J.L. and FoOr F., 1992, *Vectors for generating nested deletions and facilitating subcloning G+C-rich DNA between Escherichia coli and Streptomyces sp.*, *Gene*, Vol.119, No.1, p. 149 – 50.
- Michell SL, Whelan A.O., Wheeler P.R., Panico M., Easton R.L., Etienne A.T., Haslam S.M., Dell A, Morris H.R., Reason A.J., Herrmann J.L., Young D.B., Hewinson R.G., 2003, *The MPB83 antigen from Mycobacterium bovis contains O-linked mannose and $\alpha(1 \rightarrow 3)$ mannosidose moieties*, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.278, p. 16423–16432.
- OMS, 2011, *WHO report 2011: Global tuberculosis control*, p. 5-25. En línea: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf
- Pérez C., Juárez K., García-Castells E., Soberón G. and Servín-González L., 1993, *Cloning, characterization, and expression in Streptomyces lividans 66 of an extracellular lipase-encoding gene from Streptomyces sp. M 11*, *Gene*, Vol. 123, p. 109 -114.
- Peter-Katalinić, 2005, *Methods in Enzymology: O-Glycosylation of Proteins*, *Methods in Enzymology*, Vol. 405, p. 139 – 171.
- Rezwan, M., Grau T., Tschumi A. and Peter Sander, 2007, Lipoprotein synthesis in mycobacteria, *Microbiology*, Vol. 153, p. 652-658.
- Saïd-Salim, B., Mostowy S., Kristof A.S. and Behr M.A., 2006, *Mutations in Mycobacterium tuberculosis Rv0444c, the gene encoding anti-SigK, explain high level expression of MPB70 and MPB83 in Mycobacterium bovis*, *Molecular Microbiology*, Vol. 62, No.5, p. 1251 – 1263.
- Sanchez and Demain, A.L., 2011, *Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical and biotechnological significance*, *Organic Process Research & Development*, Vol. 15, p. 224 – 230.
- Sulzenbacher G., Canaan S., Bordat Y., Neyrolles O., Stadthagen G., Roig-Zamboni V., Rauzier J., Maurin D., Laval F., Daffé M., Cambillau C., Gicquel B., Bourne Y and Mary Jackson, 2006, *LppX is a lipoprotein required for the*

translocation of phthioceroldimycocerosates to the surface of Mycobacterium tuberculosis, The EMBO Journal, Vol. 25, No. 7, p. 1436 – 1444.

- **Sutcliffe, I.C. and Harrington. D.J.**, 2004, *Lipoproteins of Mycobacterium tuberculosis: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components*, FEMS Microbiology Reviews, Vol. 28, p. 644-659.
- **Takano E., White J., Thompson C.J. and Bibb M.J.**, 1995, *Construction of thiostrepton-inducible, high copy-number expression vectors for use in Streptomyces spp.*, Gene, Vol.166, No.1, p. 133 – 137.
- **Terasaka K., Yamauchi R., Matsuo K., Yamazaki A., Nagai S. and Yamada T.**,1989, *Complete nucleotide sequence of the immunogenic protein MPB70 from Mycobacterium bovis BCG*, FEMS Microbiology Letters, Vol. 49, No. 2-3, p. 273 – 276.
- **Toumanen Elaine I.**, 1996, *Surprise? Bacteria Glycosylate Proteins Too*, The Journal of Clinical Investigation, Vol. 98, No. 12, p. 2659 -2660.
- **Tschumi A., Nai C., Auchli Y., Hunziker P., Gehrig, Keller P., Grau T. and Peter Sansder**, 2009, *Identification of ApolipoproteinN-Acyltransferase (Lnt) in Mycobacteria*, Journal of biological chemistry, Vol. 284, No. 40, p. 27146 – 27156.
- **Wessel D. and Flügge U.I.**, 1983, *A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids*, Analytical Biochemistry, Vol. 138, No. 1, p. 141 – 143.
- **Wiker H.G.**, 2009, *MPB70 and MPB83 – Major antigens of Mycobacterium bovis*, Scandinavian Journal of Immunology, Vol. 69, p. 492-499.

10.ANEXOS

10.1. Medios de Cultivo

LB + Sacarosa

-Bactotripton	1.0 g
-Extracto de levadura	0.5 g
-NaCl	1.0 g
-Sacarosa	25.0 g

Aforar a 100ml con agua Milli-Q, pH= 7.0

R2

Solución base:

Sacarosa	10.3 g
K ₂ SO ₄	0.025 g
MgCl ₂ -6H ₂ O	1.012 g
Glucosa	1.0 g
Casaminoácidos	0.01g

Aforar a 80ml con agua Milli-Q

Posterior a esterilización en autoclave:

KH ₂ PO ₄ (0.5%)	1 ml
CaCl ₂ -2H ₂ O(3.68%)	8 ml
L-Prolina	1.5 ml
Tris-Cl(3%, pH=7.2)	10.0 ml
Trazas R5*	0.2 ml
CuSO ₄	0.2ml
NaOH (1N)	0.2ml
Extracto de levadura (10%)	5.0 ml

*Trazas R5: ZnCl₂ 40mg, FeCl₃ 6H₂O 200mg, Cu Cl₂ 2H₂O 10mg, MnCl₂ 4H₂O 10mg, Na₂B₄O₇ 10H₂O 10mg, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4H₂O 10mg.

YEME

Peptona	0.5 g
Extracto de Malta	0.3 g
Extracto de levadura	0.3 g
Glucosa	1.0 g
Sacarosa	34.0 g
Aforar a 100 ml con agua Milli-Q, pH=7, adicionar después de esterilización en	
MgCl ₂ (1M)	0.5 ml
Glicina 10%	5.0 ml

YT2X

Bactotripton	1.6 g
Extracto de levadura	1.0 g
NaCl	0.5g
Aforar a 100 ml con agua Milli-Q, pH=7.2	

MS

Manitol	2.0 g
Harina de soya	2.0 g
Agar	0.2 g
Aforar a 100 ml con agua	

Agar suave para transformaciones

Tris-Cl (3%,pH=7.2)	10.0 ml
MgCl ₂	1.0 g
CaCl ₂ (5M)	0.4 ml
Sacarosa	10.3 g
Agar	0.65 g
Aforar a 100ml en agua Milli-Q	

10.2. Protocolos

PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA DE GELES DE AGAROSA DE BAJO PUNTO DE FUSIÓN (LMP)

- 1.- Correr el gel al 0.6% y teñir con Bromuro de etidio 1 µg/ml. Iluminar el gel con luz UV de onda larga y cortar las bandas deseadas, procurando cortar la agarosa lo más cerca del DNA para reducir el volumen de la rebanada.
- 2.- Fundir la rebanada de agarosa que contiene el DNA en un tubo Eppendorf a 65-70°C, durante 10 minutos. Añadir 1/10 del volumen de NaCl 5 M, mezclar y dejar otros 5 min a 65-70°C.
- 3.- Saturar un poco de fenol con NaCl de la siguiente forma: en un tubo Eppendorf mezclar 100 µl de NaCl 5 M, 400 µl de agua y 500 µl de fenol. Centrifugar 1 min, retirar la fase acuosa y mantener a 37°C.
- 4.- Mantener la agarosa fundida a 37°C, posteriormente añadir al tubo 2/3 de volumen del fenol saturado e inmediatamente agitar en vórtex durante 30 segundos. Centrifugar 5 min en la microfuga y transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
- 5.- Añadir al fenol 45 µg de TE o agua y 5 µl de NaCl 5 M y agitar en vórtex, centrifugar por 2 min y mezclar la fase acuosa con la anterior.
- 6.- Agregar 1 vol. de fenol/cloroformo a la fase acuosa, agitar 15 seg en vórtex y centrifugar por 2 min.
- 7.- Transferir la fase acuosa a un tubo limpio repetir el paso 6 pero sólo con cloroformo.
- 8.- Transferir a un tubo limpio la fase acuosa y añadir 1 vol. de isopropanol. Para aumentar la cantidad de DNA recuperado añadir 1 µg de glicógeno. Mantener a -20°C al menos dos horas.
- 9.- Centrifugar todo el DNA durante 10 min a 14,000 rpm en la microfuga, asegurándose de eliminar todo el alcohol con una micropipeta. Posteriormente secar el pellet y resuspenderlo en un volumen adecuado de TE.

MINIPREPARACIONES DE DNA PLASMÍDICO

- 1.- Resuspender el paquete de células o el micelio en 200 µl de Tris 25 mM, EDTA 25 mM, pH=8. En el caso de *Streptomyces* el TE 25 mM debe contener lisozima 2 mg/ml.
- 2.- Para *E.coli* incubar 5 minutos en hielo. Para *Streptomyces* al menos de 1 a 3 horas a 37°C o hasta que el micelio este visiblemente lisado (debe ponerse traslúcido y viscoso).
- 3.- Añadir 400 µl de una solución fresca de NaOH 0.2 N, SDS 1%. Mezclar por inversión vigorosa los tubos, hasta que el contenido se vea transparente, homogéneo y muy viscoso. Cuesta más trabajo mezclar bien las preparaciones de *Streptomyces*, por lo tanto, los tubos deben mezclarse de manera invertida en vórtex durante varios segundos, hasta que no se vea rastro de micelio. Incubar 10 minutos en hielo.
- 4.- Añadir 300 µl de acetato de potasio 3 M, pH=4.8, mezclar bien por inversión hasta que se pierda la viscosidad y se vea un precipitado blanco. Incubar 15 minutos en hielo. En el caso de *Streptomyces*, centrifugar a 13'000 rpm durante 10 minutos y pasar la fase acuosa a un tubo nuevo.
- 5.- Añadir al tubo 400 µl de fenol/cloroformo, agitar 30 segundos en vórtex y centrifugar 2 minutos en la microfuga.
- 6.- Pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir 600 µl de etanol absoluto frío. Dejar precipitando 5 minutos a temperatura ambiente.
- 7.- Centrifugar 10 minutos en la microfuga. Retirar todo el sobrenadante con una punta, dando un segundo pulso en la microfuga para eliminar todo el sobrenadante.
- 8.- Resuspender el pellet en 50 µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH=8). Añadir 150 µl de acetato de sodio 4 M, pH=6. Mezclar bien e incubar una hora a -20°C.
- 9.- Centrifugar 10 minutos en la microfuga. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio y añadir 200 µl de isopropanol, mezclar muy bien y precipitar 10 minutos en hielo.
- 10.- Centrifugar 10 minutos en la microfuga. Eliminar todo el sobrenadante.

Resuspender en 45 μ l de TE, mezclar bien, dar un pulso en la microfuga y añadir 5 μ l de acetato de sodio 3 M pH=6 y 125 μ l de etanol frío. Precipitar 10 minutos en hielo.

11.- Centrifugar 10 minutos en la microfuga. Eliminar todo el sobrenadante. Secar el pellet y resuspenderlo en 20-25 μ l de TE.

TRANSFORMACIÓN DE *Streptomyces*

1.- Inocular 100 μ l de una preparación densa de esporas en 25 ml de medio YEME suplementado con 125 μ l de $MgCl_2$ 1M y 1.25 ml de glicina al 10% e incubar a 30°C con agitación de 36 a 40 hrs en un matraz con resorte.

2.- Pasar a un tubo de centrifuga y enjuagar el matraz con 10 ml de sacarosa al 10.3%, agregándolo también al tubo. Mezclar y centrifugar a 3500 rpm, 10 minutos a 27°C.

3.- Resuspender el pellet en 20 ml de sacarosa 10.3% y centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos a 27°C. Repetir 2 veces y almacenar el pellet de micelio a -20°C.

4.- Pesar 7.5 mg de lisozima y agregar 5 ml de Buffer P, disolver y filtrar a través de un filtro Millipore de 0.45 μ m de poro. Agregar al micelio la solución de lisozima en buffer P. Mezclar e incubar a 30°C durante 1 hora con agitación suave cada 15 minutos. Tomar muestra para observar al microscopio y asegurarse que los protoplastos estén bien formados.

5.- Filtrar los protoplastos a través de algodón estéril, después agregar al filtro 5 ml de buffer P para lavar. Pasar el filtrado a un tubo con rosca y centrifugar a 3500 rpm, por 10 minutos a 27°C.

6.- Eliminar el sobrenadante y resuspender suavemente en la gota de buffer P que haya quedado en el tubo. Agregar 3 μ l de plásmido purificado (dependiendo de la concentración de plásmido). Inmediatamente agregar 0.6 ml de polietilenglicol (PEG1450) al 25% en buffer P con ayuda de una pipeta Pasteur y mezclar subiéndolo y bajando los protoplastos de la pipeta dos o tres veces. Agregar 5 ml de Buffer P y centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos.

- 7.- Eliminar el sobrenadante y resuspender en 0.3 ml de buffer P.
- 8.- Hacer diluciones y poner en cajas de medio R2 suplementado, 100 µl de cada dilución. Posteriormente agregar en cada caja 2.5 ml de agar suave hipertónico, procurando que ésta cubra toda la superficie. Incubar a 30°C durante 15-20 hrs. Después de pasado el tiempo, agregar antibiótico (variable dependiendo del plásmido) y dejar incubando a 30°C durante 1 semana o hasta que esporulen las colonias.

Suplementación de buffer P

- 1.- Agregar a 40 ml de buffer P: 100 µl de Trazas R5, 0.5 ml de fosfato monobásico (KH₂PO₄) al 0.5%, 5 ml de CaCl₂-2H₂O 0.25M y 5 ml de Tris-Cl 0.25 M pH=7.2.
- 2.- Dejar reposar durante 30 minutos y después pasar por un filtro para ser usado.

Preparación de Polietilenglicol (PEG)

- 1.- Pesar 0.5 mg de PEG y disolverlo en 1.5 ml de buffer P previamente filtrado

TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* POR ELECTROPORACIÓN

- 1.- Inocular 20 ml de medio SOB sin magnesio con 0.1 ml de un precultivo de toda la noche. Incubar a 37°C con agitación constante hasta llegar a una densidad óptica de 0.6 a 600 nm (aproximadamente de 2-3 hrs).
- 2.- Centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- 3.- En hielo, decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 20 ml de glicerol estéril frío al 10% y centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Repetir 2 veces.
- 4.- Eliminar el sobrenadante, dejando aproximadamente 100 µl para resuspender suavemente el pellet.
- 5.- Tomar 50 µl del pellet resuspendido y agregar 1 µl de DNA plasmídico (5 µl si es una ligación), mezclar bien y colocarlo en una celdilla de electroporación mantenida en hielo. Dar un pulso en el electroporador de 1.8 kv.
- 5.- Pasar las células a 1ml de medio SOB sin magnesio e incubar a 37°C por una hora.
- 6.- Pasar a un tubo Eppendorf y centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos. Resuspender el pellet en medio SOB sin magnesio y hacer diluciones.
- 7.- Inocular 0.1 ml de cada dilución en cajas con medio LB + antibióticos e incubar a 37°C durante toda la noche.
- 8.- Tomar una colonia aislada y resuspenderla en 100 µl de medio SOB. Poner un cultivo de 10 ml de medio SOB + antibióticos inoculando con las células resuspendidas e incubando a 37°C durante 8 hrs. Realizar minipreparaciones de plásmidos.

CONJUGACIÓN DE pIJ6902 Y SUS DERIVADOS DE *E.coli* A *S. lividans*

- 1.- Hacer un precultivo de *E. coli*/ET12567/pUZ8002 conteniendo el plásmido de interés en 3 ml de YT2X con 50 µg/ml de apramicina, 25 µg/ml de cloranfenicol y 50 µg/ml de kanamicina. Incubar a 37°C en agitación constante durante toda la noche.
- 2.- Inocular con el precultivo un matraz que contenga 20 ml de medio YT2X con los mismos antibióticos. Incubar a 37°C con agitación constante durante 6-7 horas hasta llegar a una densidad óptica de 0.6 a 600 nm.
- 3.- Centrifugar a 6000 rpm, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante.
- 4.- Resuspender el pellet en 20 ml de medio YT2X. Centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Repetir 3 veces. Resuspender en 300 µl de medio YT2X.
- 5.- Tomar 50 µl de una preparación densa de esporas de *Streptomyces lividans* 1326 en un tubo Eppendorf y centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos. Resuspender el paquete de esporas en 100 µl de agua y volver a centrifugar para eliminar residuos de glicerol. Resuspender las esporas en 100 µl de medio YT2X y dar un choque térmico a 50°C durante 10 minutos.
- 6.- En un tubo Eppendorf juntar las esporas de *Streptomyces lividans* 1326 con las células de *E. coli*, ambas resuspendidas en medio YT2X
- 7.- Hacer diluciones y plaquear en cajas de Petri con medio MS + MgCl₂ 10 mM sin antibióticos. Incubar a 30°C por 18-20 hrs.
- 8.- Diluir en 5 ml de agua 0.1 ml de una solución de ácido nalidíxico 50 mg/ml y 0.1 ml de apramicina 50 mg/ml. Inundar cada caja con 1ml de esta dilución, procurando que cubra toda la superficie. Incubar a 30°C hasta obtener colonias aisladas.
- 9.- Purificar las colonias de *S. lividans* exconjugantes mediante estrías en medio sólido para eliminar las células de *E. coli* en cajas de Petri con medio MS + ácido nalidíxico y apramicina 50 µg/ml. Incubar a 30°C hasta obtener colonias aisladas.
- 10.- Tomar una colonia aislada (preferiblemente bien esporulada) y resuspenderla

en 0.3 ml de agua. Colocar 0.1 ml de esta suspensión en cajas de medio MS+ extracto de levadura 0.1% + apramicina 50 µg/ml. Hacer confluentes e incubar a 30°C durante una semana para la obtención de esporas.

OBTENCIÓN DE PREPARACIONES DENSAS DE ESPORAS

- 1.- Inocular cajas de Petri con medio MS en forma confluyente e incubar hasta obtener esporulación. Agregar a cada caja 10 ml de agua estéril. Con ayuda de un asa bacteriológica raspar la superficie para separar las esporas del micelio.
- 2.- Recuperar los 10 ml de agua y pasarlos por un filtro de algodón para esporas.
- 3.- Agregar 5 ml de agua al filtro para recuperar la mayor cantidad de esporas.
- 4.- Centrifugar el filtrado de esporas a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- 5.- Eliminar el sobrenadante y lavar una vez con 10 ml de agua para eliminar los restos del medio. Centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- 6.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el paquete de esporas en 1 ml de glicerol al 20%. Colocar en viales pequeños y almacenar a -20°C.

CRECIMIENTO DE ESPORAS DE *STREPTOMYCES LIVIDANS* Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

Es necesario pregerminar las esporas antes de iniciar los cultivos

- 1.- Tomar 500 μ l de una preparación densa de esporas en glicerol al 20% y pasarlas a un tubo Eppendorf. Centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos y retirar el sobrenadante con una micropipeta.
- 2.- Añadir 500 μ l de agua para eliminar todo el glicerol, mezclar y centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y resuspender las esporas en 0.1 ml de medio YT2X. Añadir la suspensión de esporas a un matraz de 250-ml con 10 ml de medio YT2X. Incubar a 37°C durante 5-6 horas.
- 3.- Después de terminado el tiempo, observar una muestra al microscopio para asegurar que hubo buena germinación. Centrifugar todo el medio a 6000 rpm durante 10 minutos. Eliminar rápidamente el sobrenadante.
- 4.- Añadir 10 ml de agua, resuspender el pellet y centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Resuspender el pellet en 10 ml de medio LB+sacarosa 25%. Pasar a un matraz de 500 ml con 100 ml del mismo medio con los antibióticos adecuados. Incubar a 30°C durante 16 horas con agitación constante.
- 6.- Posterior a las 16 horas inducir la expresión mediante la adición de 5 μ g/ml de thioestreptón. Incubar a 30°C hasta completar 36-40 horas con agitación constante.
- 7.- Posteriormente, centrifugar todo el cultivo a 7500 rpm durante 10 minutos a 10°C. Guardar muestra de sobrenadante para el aislamiento de proteínas, y el micelio someterlo a fraccionamiento celular.

FRACCIONAMIENTO CELULAR

- 1.- Centrifugar el cultivo a 7500 rpm durante 10 minutos a 10°C. Lavar el pellet de micelio con 100 ml de Tris 20mM pH=8. Dar 4 lavados.
- 2.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en el poco líquido que quede. Congelar 30 minutos a -70°C y descongelar.
- 3.- Resuspender el pellet en 25 ml de buffer para sonicar. Sonicar las muestras con 30 pulsos de 20 segundos cada uno.
- 4.- Centrifugar el extracto a 7000 rpm durante una hora a 4°C.
- 5.- Colectar el sobrenadante y pasarlo a un tubo para ultracentrifuga. Centrifugar a 33000 rpm durante 1 hora a 4°C. Terminado el tiempo, colectar el sobrenadante para determinar las proteínas del citoplasma.
- 6.- Lavar el pellet con 50 mM de NaCl (1.1 ml de NaCl 5 M, 109 ml de Tris 20 mM pH=8) y volver a centrifugar a 33000 rpm durante 30 minutos a 4°C.
- 7.- Resuspender el pellet en 100 µl de buffer para sonicar con ayuda de una micropipeta y almacenar a -70°C para determinación de proteínas de membrana.
- 8.- Cuantificar la cantidad de proteína en las diferentes fracciones por el método de Bradford.

PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON METANOL/CLOROFORMO

- 1.- En hielo, colocar 1 ml de muestra de sobrenadante en un tubo con tapa de rosca. Agregar 4 ml de metanol, 1 ml de cloroformo y 3 ml de agua. Mezclar con vórtex después de cada adición. Centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- 2.- Eliminar la fase superior teniendo cuidado de no tocar la interfase. Posteriormente agregar 3 ml de metanol y mezclar con vórtex.
- 3.- Pasar 1.5 ml de la suspensión a un tubo Eppendorf y centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos en la microfuga. Eliminar el sobrenadante con cuidado de no llevarse el pellet. Centrifugar todo en el mismo tubo.
- 4.- Eliminar el sobrenadante y dejar evaporar el metanol durante 10 minutos en la campana de extracción.
- 5.- Agregar al pellet 10 µl de buffer para proteínas 2X. Hervir por 5 minutos y almacenar a -20°C.

PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (TCA) y DESOXICOLATO (DOC)

- 1.- Colocar en un tubo Eppendorf 100 µl de muestra de proteína o la necesaria para tener 10 µg de proteína o 100 µg en el caso de la electroforesis 2-D. Agregar DOC hasta obtener una concentración final de 0.02%. Mezclar en vórtex y dejar reposando 15 min a T.A.
- 2.- Agregar un volumen igual de TCA al 10%. Dejar reposar 50 minutos en hielo.
- 3.- Pasado el tiempo, centrifugar a 14000 rpm durante 15 minutos en la microfuga. Eliminar el sobrenadante.
- 4.- Resuspender el pellet en 300 µl de acetona fría. Centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos. Repetir 3 veces.
- 5.- Remover el sobrenadante y secar el pellet durante 10 minutos en la campana de extracción.
- 6.- Resuspender el pellet en 10 µl de Buffer para proteínas 2X y almacenar a -20°C.

DETECCIÓN DE PROTEÍNAS CON ANTICUERPOS (INMUNO-BLOT)

- 1.- Después de secar la membrana de PVDF en la cual se transfirieron previamente las proteínas, remojarla con metanol y dejar secar nuevamente por 5 minutos.
- 2.- Bloquear la membrana con 10 ml de Buffer Tris-Salino (TBS –Tween 20 al 0.005%) + leche descremada 5% durante 12-16 horas a temperatura ambiente y con agitación constante.
- 3.- En un tubo de ensayo con 10 ml de TBS –Tween 20 al 0.005% + leche 5%, agregar el anticuerpo primario a una dilución 1:100, correspondiendo a 100 µl en 10 ml de buffer.
- 4.- Pasado el tiempo, retirar el buffer de bloqueo e incubar la membrana con los 10 ml de anticuerpo diluido durante 12-16 horas a 4°C y con agitación constante.
- 5.- Posteriormente tirar la solución del anticuerpo primario y dar un lavado a la membrana con 10 ml de agua Milli-Q a temperatura ambiente. Dar dos lavados más con TBS –Tween 20 al 0.005% de 5 minutos cada uno.
- 6.- Incubar la membrana con 5 ml de anticuerpo secundario (anti IgG de conejo) diluido 1:1000 en TBS-Tween 20 al 0.005% + leche 5% durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 7.- Realizar 3 lavados con 10 ml de TBS-Tween 20 al 0.005% durante 5 minutos. Posteriormente revelar membrana con tinción de 3,3'-Diaminobenzidina o con el kit de quimioluminiscencia de ROCHE.

DETECCIÓN DE PROTEÍNAS GLICOSILADAS CON CONCAVALINA A

- 1.- Después de secar la membrana de PVDF en la cual se transfirieron previamente las proteínas, remojarla con metanol y dejar secar nuevamente por 5 minutos.
- 2.- Bloquear la membrana con 10 ml de TBS 1X+BSA (albúmina) 1% durante una hora a Temperatura ambiente.
- 3.- Lavar la membrana con 5 ml de TBS durante 5 minutos.
- 4.- Incubar la membrana con 10 ml de Concanavalina A a una dilución de 1:1000 en TBS 1X, agregando 1 mM de CaCl_2 , 1 mM de MnCl_2 y 1 mM de MgCl_2 a la dilución. Incubar por 16 horas en agitación constante a temperatura ambiente.
- 5.- Después de las 16 horas, retirar la Concanavalina A y lavar con 5 ml de TBS 1X durante 5 minutos. Repetir 3 veces.
- 6.- Revelar con 3,3'-Diaminobenzidina o por quimioluminiscencia.

DESALADO DE PROTEÍNAS POR COLUMNA DE SEFAROSA

La columna se encuentra conservada con etanol para evitar contaminación y desecación

- 1.- Retirar el etanol de la columna lavando poco a poco con 20 ml de H₂O milli-Q.
- 2.- Al terminar de pasar los 20 ml, equilibrar la columna adicionando 15 ml de Buffer PBS 10mM sin cloruro de sodio (1 M Na₂HPO₄, CHAPS 2%, pH=7)
- 3.- Posteriormente pasar 500 µl de la muestra de proteínas y dejar que esta entre a la sepharosa, inmediatamente agregar 500 µl de buffer PBS para eluir la proteína e ir colectando fracciones de 1 ml. Monitorear la absorbancia de las fracciones a 280 nm. Cuando la absorbancia llega a 0.05 significa que la columna ya no contiene proteínas.
- 4.- Mezclar y alicuotar en tubos Eppendorf de 1 ml. Cuantificar la cantidad de proteína mediante el método de Bradford o de Lowry y analizar las muestras mediante una electroforesis.

ISOELECTROENFOQUE

- 1.- Preparar el equipo de Isoelectroenfoco IPGphor III a 20°C. Recubrir el manifold con aproximadamente 110 ml de aceite mineral.
- 2.- Humedecer con 150 µl de H₂O desionizada los pads de contacto con el electrodo y absorber con papel filtro para eliminar el exceso de agua.
- 3.- Una vez rehidratadas las tiras IPG se colocan en el manifold cuidando la orientación de la tira; el lado ácido (+) hacia el ánodo.
- 4.- Colocar los pads rehidratados sobre cada extremo de la tira y situar los electrodos sobre ellos de manera que se asegure el contacto con la plataforma de corriente.
- 5.- Correr la primera dimensión en el IPGphor con el siguiente programa:
 - Por pasos: 100 V 150 V/h
 - Por pasos: 300 V 200 V/h
 - Por gradiente: 1000 V 300 V/h
 - Por gradiente: 5000 V 4500 V/h
 - Por gradiente: 5000 V 2000 V/h
- 6.- Una vez focalizadas las tiras, se almacenan a -70°C hasta su uso posterior.