



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Utilización del péptido señal de la glicoproteína
APA de *Mycobacterium tuberculosis* para la
secreción y glicosilación de lipoproteínas en
Streptomyces

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

EDUARDO JAVIER AGUILAR RANGEL



DIRECTOR DE TESIS:
DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ
2015

Ciudad Universitaria, D. F.



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.

Success is not final, failure is not fatal: it is the courage to continue that counts.

(Winston Churchill)

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Aguilar
Rangel
Eduardo Javier
55317883
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308038761

2. Datos del tutor

Dr.
Luis
Servín
González

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Víctor Manuel
Valdés
López

4. Datos de sinodal 2

Dr.
Sergio
Sánchez
Esquivel

5. Datos de sinodal 3

Dra.
Rocío Jetzabel
Alcántara
Hernández

6. Datos de sinodal 4

M. en C.
Gabriela
González
Cerón

7. Datos del trabajo escrito

Utilización del péptido de la glicoproteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* para la secreción y glicosilación de lipoproteínas en *Streptomyces*

90p.

2015

**A mis Padres, mi tío y Blanca por ser mi soporte, mi
inspiración y mi fuente inagotable de amor.**

Agradecimientos

A la UNAM y a la Facultad de Ciencias, por haber invertido en mí sus recursos académicos y económicos con la esperanza de encontrar en mí el futuro de mi país. En especial a mis profesores que se esforzaron en transmitir su conocimiento.

Al Dr. Luis Servín, por aceptarme en su laboratorio, tenerme paciencia y transmitirme un sinnúmero de conocimientos y consejos prácticos que me forjaron como científico.

A la M. en C. Gabriela González por haberme iniciado en el mundo de la biología molecular y además guiado para concretar el éxito de este proyecto.

A los Doctores Víctor Valdés, Sergio Sánchez y Rocío Alcántara por su paciencia para leer y corregir este trabajo, y sobre todo por el enriquecimiento del mismo.

A la Unidad de Biología Molecular del IFC, UNAM, a cargo de la Dra. Laura Ongay-Larios y a Guadalupe Codiz, su técnico, cuyos servicios en la secuenciación fueron primordiales para esta investigación.

A la Dra. Clara Espitia y la M. en C. Cristina Parada, por su colaboración en este proyecto y su participación en la elaboración de algunos anticuerpos utilizados en este trabajo.

A la Dra. Gloria Soberón y su laboratorio, por ser parte de nuestro grupo de trabajo, así como por la retroalimentación en los seminarios llevados a cabo.

A todos los compañeros del laboratorio: Isaí (Master), Manuel, Martí, Tania, Christian, Kevin, Mauricio, Erick, Eli, Yersain, Karen, Monserrat, y los que no eran de mi laboratorio como Ana Laura con los que compartí más de dos años de mi vida y que convirtieron el laboratorio en un segundo hogar.

A CONACyT por haber brindado el apoyo necesario para la realización del proyecto #220020.

A mis hermanos Epsilon, Pancho y Alex por demostrar que una tarde de videojuegos y pizza pueden crear compañeros inalcanzables.

A mi familia, por brindarme su apoyo incondicional y estar ahí en mis momentos lúcidos y sombríos. Sin ustedes este éxito en mi vida no hubiera sido posible.

A Blanca, que a pesar de haber sido miembro del laboratorio, ella decidió continuar a mi lado y compartir un poco más de su vida conmigo.

A mis amigos de la Facultad: Sandra, Mike, Aletz, Kika, Buen Abad, Suave, Porfi y demás que me brindaron su cariño y confianza.

A los demás miembros del elenco de mi vida, que han aportado su granito de arena para que este sea mi destino. Gracias.

Índice

Resumen	8
Introducción	10
Bacterias Gram-positivas: Actinomicetos	10
La tuberculosis y <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
Estreptomicetos	12
Sistemas bacterianos de secreción de proteínas	14
Péptido señales	14
Sistema de secreción Sec	16
Sistema de secreción Tat	18
Modificaciones postraduccionales	20
Biogénesis de lipoproteínas	20
Glicosilación de proteínas	22
Proteínas de interés para el estudio de la tuberculosis	24
APA	25
Lipoproteínas	25
Antecedentes	27
Justificación	28
Objetivos	29
Hipótesis	30
Material y métodos	31
Cepas y plásmidos	31
Construcciones génicas	33
Obtención del gen Rv1860	33
Sustitución del péptido señal de la proteína APA por el de la lipasa extracelular	34
Fusión del péptido señal de la proteína APA con los genes Rv2873 y Rv3763	35
Clonación de los diferentes genes modificados en un vector de expresión multicopia de <i>Streptomyces</i>	37
Obtención de esporas	39
Expresión de proteínas	39
Obtención de proteínas de sobrenadante y membrana	40
Purificación de proteínas por columna de afinidad de Ni-NTA	40
Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	41
Transferencia de proteínas de geles de poliacrilamida-SDS a membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF)	41
Western blot	42
Determinación de actividad de la lipasa extracelular de <i>S. exfoliatus</i> M11	42
Resultados	43
Amplificación y clonación de los genes Rv3763 y Rv2873 modificados para sustituir la secuencia correspondiente al péptido señal	43
Subclonación de los genes Rv1860, Rv3763 y Rv2873 quiméricos en el vector multicopia de expresión pIJ6021	45
Expresión y purificación de las proteínas MPT83 y LpqH quiméricas en <i>S. lividans</i>	46
Evaluación de la glicosilación de MPT83 y LpqH con el péptido señal de APA	47

Evaluación del efecto del péptido señal de la lipasa extracelular de <i>S. exfoliatus</i> M11 sobre la glicosilación de APA	51
Análisis del péptido señal de la proteína APA	52
Expresión de la proteína APA en cepas mutantes carentes del sistema Tat	54
Confirmación del péptido señal de la lipasa extracelular de <i>S. exfoliatus</i> M11 como sustrato Sec	56
Discusión	60
Conclusiones	64
Perspectivas	65
Referencias	66
Anexos	75
Reactivos y sustancias empleadas	75
Protocolos	79

Resumen

La tuberculosis es una grave enfermedad que afecta a un gran número de personas a nivel mundial, sobre todo en países de bajos recursos o con sistemas de salud deficiente. Como respuesta a este problema de salud, se creó la vacuna BCG a partir de una bacteria relacionada (*Mycobacterium bovis*) inocua al ser humano y además atenuada. Pero, debido a que la efectividad de la vacuna no ha sido la óptima, sobre todo en zonas tropicales, surgió la idea de hacer una nueva vacuna a partir de proteínas recombinantes.

Para llevar a cabo tal proyecto, se han seleccionado ciertas proteínas que se caracterizan por estar modificadas postraduccionalmente, principalmente por lípidos y azúcares, dado que representan una opción altamente inmunogénica. Para poder expresar estas proteínas, seleccionamos un hospedero inocuo para el ser humano y que también modifique las proteínas como *Streptomyces lividans*, el cual ya ha sido comprobado como un buen hospedero de proteínas heterólogas.

En un estudio anterior, se había podido observar que las proteínas LpqH y MPT83 de *Mycobacterium tuberculosis* con su propio péptido señal se anclan a la membrana y se manosilan. En cambio cuando su péptido señal se sustituía por el de la lipasa de *Streptomyces exfoliatus* M11 estas se secretaban al medio, pero no se glicosilaban. Por lo que se utilizó una proteína nativa de *M. tuberculosis* que es secretable y además está glicosilada como la glicoproteína APA, que además se caracteriza por ser la única proteína glicosilada de *M. tuberculosis* que no es una lipoproteína.

Para poder hipotetizar acerca de la influencia del péptido señal en la glicosilación de proteínas, primero fue esclarecido el tipo de péptido señal que presenta APA, y aunque el resultado no fue concluyente podemos afirmar que su secreción en la mutante Tat es anormal, en comparación a la secreción de la lipasa de *S. exfoliatus* que inclusive mantenía la actividad enzimática en la misma mutante.

Posteriormente en el presente trabajo, los genes Rv3763 y Rv2873 que codifican a las proteínas LpqH y MPT83 respectivamente, fueron modificados, sustituyéndoles la secuencia que correspondía al péptido señal de las prelipoproteínas, por la secuencia correspondiente al péptido señal de la proteína APA codificada por el gen Rv1860, además se agregó una etiqueta de seis histidinas en el extremo 3'. Estas proteínas de fusión fueron purificadas por columna de afinidad y se observó que al sustituir el péptido señal de estas lipoproteínas, estas fueron secretadas directamente al sobrenadante y además

conservaron la manosilación. Esto nos indica que seguramente el péptido señal de APA contiene una señal interna que permite la glicosilación de estas lipoproteínas.

Además, para comprobar la influencia del péptido señal de la lipasa de *Streptomyces exfoliatus* M11 en la glicosilación, se sustituyó el péptido señal de la proteína APA por el de la lipasa y también le fue agregado una etiqueta de histidinas para purificarla. Se pudo observar que la proteína era secretada y también manosilada. Por lo que podemos concluir que seguramente existe algún motivo interno en la proteína APA que permite la glicosilación de esta.

Introducción

1. Bacterias Gram-positivas: Actinomicetos

Las bacterias Gram positivas son una agrupación taxonómica caracterizada por tener solamente una membrana interna (la membrana citoplásmica) y poseer una pared celular que, por lo general, es más gruesa que la de las bacterias Gram-negativas. Las bacterias Gram positivas pueden dividirse a su vez en bacterias con bajo contenido de guanina y citosina en su DNA (por ejemplo los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, etc.) y en bacterias con alto contenido de guanina y citosina, entre las cuales se encuentran los actinomicetos o actinobacterias.

Los actinomicetos representan un taxón relativamente grande dentro del dominio Bacteria en cuestión de variedad y número de especies. Las actinobacterias representan una agrupación sumamente diversa en cuestiones morfológicas (Fig. 1), fisiológicas y ecológicas (Lechevalier, et al. 1967; Nolan & Cross, 1988; Chandra & Chater, 2014). Este tipo de características les brindan una gran importancia en la industria debido al aporte de metabolitos secundarios y en la medicina (Ventura, 2007). Aunque la mayoría se considera inocua, existen grupos de actinomicetos que pueden ser patógenos, sobre todo, los pertenecientes al taxón de las micobacterias y algunas especies de los estreptomicetos como *Streptomyces scabies*. En general, las condiciones óptimas de crecimiento para este tipo de organismos son temperaturas entre 25°C a 30°C con un pH entre 5-9, siendo el pH neutral el óptimo (Solans & Vobis, 2013).

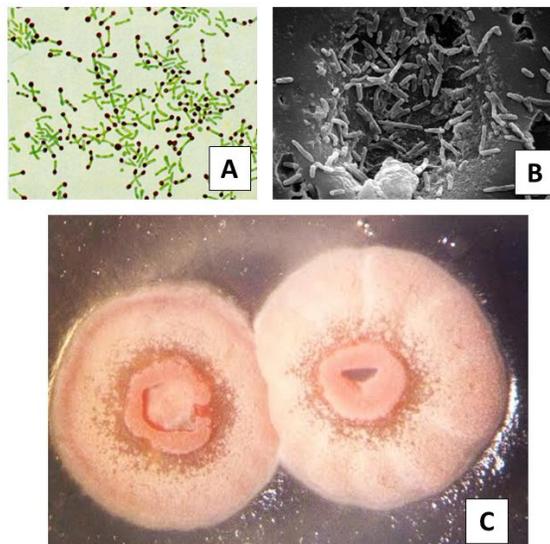


Figura 1. Diversidad morfológica de las actinobacterias. (A) bacilos de *Corynebacterium diphtheriae*; (B) bacilos de *M. bovis*; (C) colonias de *Streptomyces lividans*.

1.a. La Tuberculosis y *Mycobacterium tuberculosis*.

La tuberculosis es una grave infección altamente contagiosa causada por la actinobacteria *Mycobacterium tuberculosis*. En el siglo XIX, Robert Koch descubrió que este organismo era el causante de la enfermedad, por lo que dicho procarionte fue llamado bacilo de Koch, y a pesar de que fue una de las primeras infecciones en las que se detectó el microorganismo causante de la enfermedad, las vacunas con las que se cuenta actualmente suelen ser poco efectivas. La única vacuna actualmente disponible y usada es la BCG (*Bacillus* Camette-Guérin) derivada de una cepa de la bacteria *M. bovis* atenuada (Fine, 1989). La eficiencia de esta vacuna varía desde el 0 al 80% dependiendo de la edad y zona geográfica, inclusive se ha visto una eficacia más baja en las regiones tropicales y en los adultos (ten Dam, 1984; Fine, 1995; Brandt et al., 2002). Debido a estos problemas con la vacuna y a los tratamientos con antibióticos, la enfermedad representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial, siendo considerada por la OMS en 2013 como la segunda causa de muerte en la población mundial provocada por agentes infecciosos, solo detrás del VIH/SIDA, ya que ocasiona la muerte de 2 a 3 millones de personas y la infección entre 8 y 10 millones de personas por año (Raviglione, et al., 1995; Doherty, 2005). Ante tal problemática y con las nuevas herramientas moleculares el genoma de la cepa H37Rv aislada en 1905 fue secuenciado y analizado en 1998 con la esperanza de encontrar alguna pista para el control de la enfermedad. (Cole, et al. 1998; Brosch, et al. 1998).

La tuberculosis es una enfermedad cosmopolita, que puede ser prevenida e incluso ser curada. Esta enfermedad se transmite a través del aire o por medio de saliva expulsada por los infectados cuando tosen o estornudan; la bacteria entra al organismo a través de la superficie de la mucosa de las vías respiratorias, depositándose en los alveolos pulmonares en forma de gotas. Debido a lo anterior y al alto grado de virulencia que llegan a presentar algunas cepas, se calcula que cerca de la tercera parte de la población a nivel mundial está infectada, aunque la bacteria se mantiene en forma latente, por lo que no se desarrollan síntomas de la enfermedad, o es solo una cepa inocua que se encuentra en el ambiente (CDC, 1996). Los principales síntomas de la tuberculosis son tos, fiebre, sudor nocturno, pérdida de peso, debilidad y dolores torácicos entre otros menos comunes, aunque suelen estar atenuados cuando la enfermedad apenas se está desarrollando (OMS, 2015). El tratamiento actual se basa en la administración de antibióticos de forma constante durante alrededor de 6 meses, aunque debido al brote de cepas multiresistentes el tratamiento de antibióticos se ha vuelto obsoleto en muchos casos. Una alternativa es la vacuna BCG creada por Albert Calmette y

Camille Guérin basada en la atenuación de *M. bovis*, una bacteria muy cercana a *M. tuberculosis* (Doherty, et al. 2005; CDC, 1996; Brandt et al., 2002).

Mycobacterium tuberculosis es una bacteria perteneciente al taxón de las micobacterias. Es un bacilo no motil de crecimiento lento con necesidades metabólicas relativamente sencillas, es un organismo aerobio obligado. Así mismo tiene la capacidad de permanecer en estado quiescente (Cole, et al. 1998). Poseen un gran contenido lipídico en su superficie celular, lo que le confiere una gran resistencia contra agentes químicos. Aunado a lo anterior, las micobacterias se caracterizan por la presencia de ácido micólico, fenolthicerol y ácido micocerósico, que está unido covalentemente a la pared celular, confiriéndole una naturaleza altamente hidrofóbica que hace que las colonias sean más compactas.

1.b. Estreptomicetos.

Los estreptomicetos son un género cosmopolita o ubicuo perteneciente a los actinomicetos. Su forma de vida saprófita se ve favorecida en la colonización del suelo por la extensión como micelio hifal; adicionalmente la diferenciación a esporas es sumamente útil como estrategia de supervivencia y de dispersión a través del suelo. Se piensa que un alto número de estreptomicetos del suelo se encuentran en estado latente en forma de esporas (Sigle, et al., 2015).

Los estreptomicetos poseen un ciclo de vida complejo en comparación con otras bacterias, ya que se ha observado que el crecimiento miceliar de *Streptomyces* es muy similar al de algunos hongos, aunque con ligeras diferencias. Comienza cuando una espora uninucleada ha alcanzado las condiciones óptimas de temperatura, nutrientes y humedad, ésta germina y forma un tubo germinal que terminará desarrollándose como una hifa (Chater, et al., 2010; Emerson de Lima Procopio, et al., 2012). Este crece a lo largo del medio en micelio vegetativo que se encuentra adherido al sustrato, y hacia la parte de arriba formando micelio aéreo, que en los extremos superiores se podrá diferenciar para formar esporas en cadena (Ohnishi, et al. 2008).

Los estreptomicetos son bacterias importantes en procesos ecológicos, industriales, médicos y científicos. El género representativo de este grupo de bacterias es el género *Streptomyces* que está bien delimitado, tanto bioquímicamente (homologías de rRNA 16S y comparación química de patrones lipídicos y de ácidos grasos de la pared) como morfológicamente (micelio aéreo y sustrato específico) (Kieser, et al., 2000). El genoma de diversas especies de *Streptomyces* como *Streptomyces coelicolor* o *Streptomyces griseus* ha sido secuenciado (Bentley, et al., 2002; Ohnishi, et al., 2008; Anné, et al., 2012), y por

medio de estudios computacionales ha sido posible detectar una amplia gama de genes involucrados en la formación de metabolitos secundarios y en el desarrollo de la bacteria.

La forma de vida y el hábitat han hecho que los estreptomicetos posean una amplia batería enzimática extracelular (amilasas, celulasas, proteasas, etc.), necesaria para obtener nutrientes de la degradación de compuestos orgánicos, que además colabora con el reciclaje de nutrientes, por lo que los estreptomicetos tienen un papel muy importante en la ecología del suelo (Anné, et al. 2012). Adicionalmente, los estreptomicetos tienen la capacidad de sintetizar una amplia gama de metabolitos secundarios, que generan una diferenciación bioquímica entre las especies del género, produciendo cerca de la mitad de antibióticos conocidos (Bibb, 1996; Emerson de Lima Procopio, et al., 2012). Estos metabolitos secundarios y enzimas son de amplio interés biotecnológico e industrial, ya que una gran variedad de antibióticos, herbicidas, etc. se han logrado aislar y purificar y ahora son comercializados con un gran éxito (Bibb, 1996; De Keersmaecker, et al., 2005).

El género *Streptomyces* también es conocido por ser un hospedero importante para la producción de proteínas heterólogas, e inclusive es ampliamente usado para la expresión de proteínas recombinantes eucariontes (Binnie et al., 1997, Morosoli, et al., 1997). Además el género presenta ventajas prácticas en comparación con otros organismos modelos procariontes como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, sobre todo en cuestiones de eficiencia de secreción, plegamiento correcto de proteínas, insolubilidad de las proteínas, citotoxicidad y modificaciones postraduccionales como la glicosilación (Lara, et al., 2004; Anné, et al., 2012; Binda, et al., 2013).

Streptomyces lividans es una bacteria Gram-positiva perteneciente a la familia de los estreptomicetos. Esta especie ha ganado importancia en los últimos años, debido a que se ha convertido en uno de los hospederos predilectos para la producción de proteínas recombinantes. Se caracteriza por secretar altos niveles de proteínas bioactivas al medio, tanto procariontes como eucariontes, además de ser más efectiva que otros estreptomicetos debido a la limitada actividad de proteasas en el medio y la ausencia de un sistema fuerte de modificación/restricción del DNA que significa un problema para la manipulación genética en otros hospederos como la especie cercana *S. coelicolor* (Schaerlaekens, et al., 2004). Además ha sido demostrada su eficacia tanto en la expresión y la glicosilación de las proteínas recombinantes (MacLeod, et al., 1992).

2. Sistemas bacterianos de secreción de proteínas

El transporte de iones y moléculas a través de la membrana es un proceso vital para cualquier tipo de célula. Una de las moléculas más importantes en este proceso son las proteínas, ya que muchas de ellas deben ser secretadas, por que cumplen importantes funciones fuera de la célula (Wu, et al. 2000). Se ha calculado que entre el 25 y el 30% del proteoma de *E. coli* y *S. coelicolor* (dos importantes hospederos para la producción de proteínas recombinantes) es secretado completa o parcialmente por la célula (Berks BC, et al. 2005).

Actualmente se conocen tres principales mecanismos de secreción de proteínas en estreptomicetos: la vía Tat, la vía ESX-1/tipo VII y la vía Sec que puede dividirse en dos, dependiendo de si el proceso de exportación de la proteína es cotraduccional o postraduccional (Widdick et al, 2011). Entre las proteínas que se exportan se caracterizan por tener en su extremo amino terminal un péptido señal, que es la etiqueta de exportación para las maquinarias de secreción (Dittmar, et al., 2013).

2.a. Péptidos señales.

Los péptidos señales son pequeñas cadenas aminoacídicas, con una longitud de 15 a 30 aminoácidos, encontradas en el extremo N-terminal de ciertas proteínas. El péptido señal está presente sólo en proteínas que son secretadas, y estos constituyen la señal que dirige a la proteína a la maquinaria de secreción o excreción. Cabe resaltar que los péptidos señales suelen ser muy variados en cuanto a secuencia de aminoácidos y longitud, ya que estos varían dependiendo de la proteína y del correspondiente sistema de secreción/excreción al que estarán dirigidos. Esta variación determina la capacidad del péptido señal para dirigir la secreción de la proteína, y ha sido aprovechada con fines biotecnológicos, ya que recientes estudios han tratado de identificar al péptido señal ideal para todas las proteínas (Low, et al., 2013).

Aunque los péptidos señales son diferentes entre sí, se han podido identificar tres regiones básicas que los constituyen: la región N, la región H y la región C (Fig. 2), que están presentes en la mayoría de los péptidos señales.



Figura 2. Estructura típica de un péptido señal

La región N tiene una longitud aproximada entre 5 y 8 aminoácidos y su característica especial consiste en tener carga positiva y su posición en el extremo N-terminal. La región H es la región central (también llamada núcleo) compuesta regularmente por 8 a 12 residuos hidrofóbicos; esta región adopta una conformación de α -hélice que interacciona con la proteína SecA del sistema de secreción Sec. Por último, se encuentra el sitio C, que se encuentra del lado del carboxilo terminal del péptido señal, que se caracteriza por tener una carga polar y el sitio de corte de la peptidasa señal (Hiller, et al. 2004; Käll, et al. 2004).

Los péptidos señales suelen dividirse en 4 tipos dependiendo del tipo de proteína al que pertenecen y al sistema de secreción al que serán dirigidos. Como se observa en la figura 3, los primeros dos pertenecen al sistema de secreción Sec, dado que su región N es más corta, mientras que los siguientes dos (Fig. 3.b) corresponden a péptidos señales Tat. Los péptidos señales que contienen el motivo AXA suelen pertenecer a proteínas que serán secretadas al medio, mientras que los que contienen el motivo (L(A,V)-L-A(S)-G(A)-C₍₊₁₎) también llamado lipobox suelen pertenecer a lipoproteínas que se anclan a la membrana (Hutchings, et al. 2009).

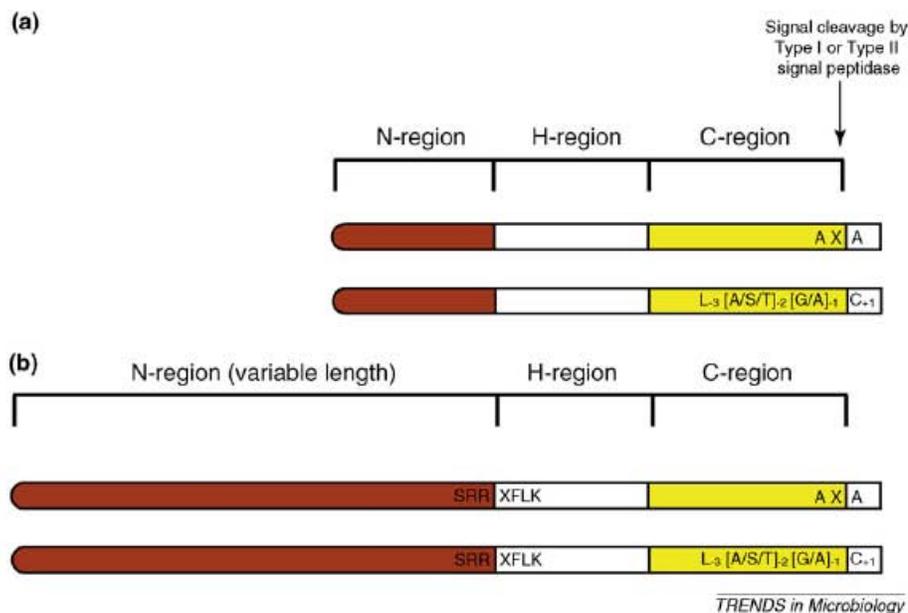


Figura 3. Tipos de péptidos señales (tomada de Hutchings, et al. 2009)

2.b. Sistema de secreción Sec

El sistema general de secreción de proteínas Sec es un complejo de secreción/excreción que destaca por ser una vía esencial y por lo tanto la más importante para la translocación de proteínas a través de la membrana citoplásmica desde el citosol en las bacterias. Está presente en todos los dominios de la vida, ya que está presente desde el retículo endoplásmico y tilacoides de células eucariontes hasta la membrana citoplásmica en procariontes. (Mori & Ito, 2001; Hutchings et al. 2009).

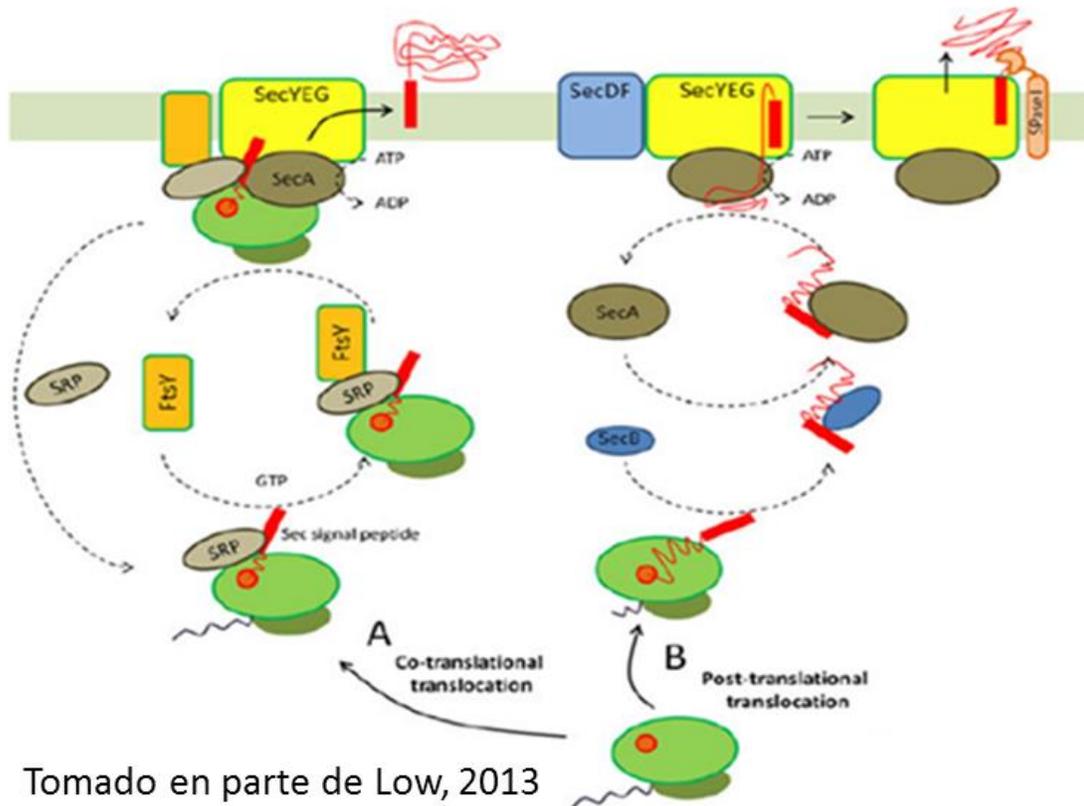
El sistema Sec en bacterias se caracteriza por ser una vía postraduccional o cotraduccional que transporta proteínas no plegadas o poco plegadas a través de un poro pasivo, obteniendo energía del ATP y de la fuerza protón motriz para lograr el transporte a través de la membrana (Vrancken, et al. 2007). Estas proteínas son dirigidas a la maquinaria de secreción debido a que contienen un péptido señal en su extremo amino terminal.

Existen dos procesos para la secreción por la vía Sec. Si bien, son muy parecidos se diferencian en la parte inicial del proceso, ya que uno está acoplado a la traducción y el otro es independiente de ésta, en la figura 4 se pueden observar ambos procesos.

En el modelo cotraduccional o acoplado a la traducción, la ribonucleoproteína SRP (signal recognition particle) se une a los péptidos señales de preproteínas que están sintetizándose en el ribosoma; por lo regular, estas preproteínas se convertirán en proteínas de membrana. Cabe recalcar que los péptidos señales de estas proteínas suelen ser muy hidrofóbicos, incluso más hidrofóbicos que los dirigidos a la maquinaria Sec en el proceso postraduccional. Una vez que SRP se ha unido al péptido señal de la proteína que será exportada se forma el complejo SRP-cadena naciente del ribosoma (Low, 2013); posteriormente una segunda proteína llamada FtsY interacciona con SRP cuando hay presencia de GTP. FtsY es una proteína con función de receptor, encargada de dirigir al complejo SRP-cadena naciente del ribosoma al complejo proteico que constituye el translocón Sec presente en la membrana.

En la vía postraduccional, la proteína SecB interacciona con el péptido señal (por lo regular poco hidrofóbico) de un polipéptido que ha sido sintetizado recientemente por el ribosoma. En este caso SecB impedirá el plegamiento de la proteína, además de que la guiará al translocón de la membrana. Los pasos posteriores suelen ser muy similares en ambas rutas, ya que la proteína SecA (asociada al poro SecYEG), reconocerá al péptido señal de la proteína que será secretada y guiará a la preproteína para que atraviese al poro SecYEG. El poro en

el sistema Sec está localizado en la membrana citoplásmica de la célula y está conformado por tres proteínas: SecY, SecE y SecG, que juntas logran el complejo SecYEG que funciona como translocón (Brundage, et al. 1990). La energía necesaria para que la preproteína pueda pasar a través del poro es proporcionada por la hidrólisis de ATP llevada a cabo por la actividad de ATPasa de la proteína SecA (Economou & Wickner, 1994). En ciertas bacterias como *E. coli* se ha podido observar que existe otro complejo formado por las proteínas SecD y SecF que por medio de la fuerza protón motriz colaboran con la secreción de la preproteína (Economou, 1999; Rigel & Braunstein, 2008). Finalmente una peptidasa señal escindirá el péptido señal de la preproteína, el cual es degradado, mientras que el polipéptido que es liberado, se pliega en el sobrenadante o periplasma según sea el caso (Zwizinski & Wickner, 1980).



Tomado en parte de Low, 2013

Figura. 4. Sistema de secreción de proteínas Sec. (A) Modelo cotraduccional. Mientras la preproteína se está sintetizando la partícula SRP interacciona con el péptido señal y la molécula FstY interacciona con SRP para llevarla al translocón localizado en la membrana, donde la proteína es secretada a través del poro SecYEG mientras se está sintetizando. La energía necesaria es aportada por la hidrólisis de ATP realizada por la proteína SecA y por la FPM provocada por el complejo SecDF. (B) Modelo postraduccional. Cuando la proteína ha sido sintetizada por completo la proteína SecB se adhiere al péptido señal y dirige a la proteína al translocón Sec.

2.c. Sistema de secreción Tat

El sistema Tat (twin-arginine translocation pathway) de secreción/excreción es una vía ampliamente distribuida, presente en los tres dominios y representa la segunda vía de secreción de proteínas más importante en bacterias (Keller, 2012; Goosens, et al. 2014). Estudios bioinformáticos han predicho que la vía Tat es un sistema de secreción general en muchos procariontes debido al alto número de sustratos Tat putativos encontrados por análisis de secuencias. Lo anterior fue demostrado experimentalmente primero en la membrana de los tilacoides de cloroplastos y subsecuentemente en estreptomicetos (Widdick, et al., 2006).

En estudio del 2006, Widdick y colaboradores demostraron que la vía de translocación Tat es una vía de secreción de proteínas sumamente importante en bacterias Gram-positivas de alto contenido G+C, en especial en estreptomicetos. Estos autores lograron demostrar experimentalmente en *Streptomyces coelicolor* que de todas las proteínas encontradas fuera de la célula experimentalmente, aproximadamente el 30% (27 proteínas) correspondían a sustratos Tat. Los análisis bioinformáticos aunados a métodos experimentales, como geles de dos dimensiones y MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology) lograron revelar que 43 proteínas que son exportadas podrían ser sustratos Tat.

El sistema Tat se caracteriza por transportar proteínas ya plegadas a través de la membrana citoplasmática. Comúnmente estas proteínas contienen cofactores o grupos prostéticos que sólo pueden ser agregados en el citoplasma celular o bien necesitan de un rápido plegamiento (Berks, 1996; Low, 2013; Dittmar, et al. 2014). Estas proteínas contienen en su extremo amino terminal un péptido señal con una región N más larga de lo común, y sobre todo por tener un motivo consenso especial en la región H del péptido señal del tipo S/T-RR-X-ΦΦ, donde X puede corresponder a cualquier aminoácido y Φ corresponde a aminoácidos hidrofóbicos (Berks, 1996; De Keersmaecker, et al., 2005), aunque cabe mencionar que la secuencia consenso puede cambiar entre autores (Fig. 5). Asimismo se han podido definir diferencias básicas con los péptidos señales Sec, entre las que destacan que la región N de los péptidos señales Tat es más grande, además de una región H menos hidrofóbica y por último la presencia del motivo de dos argininas en la unión de las regiones N y H del péptido señal Tat. En la actualidad sigue en discusión la importancia del par de argininas encontradas en el péptido señal de los sustratos Tat, ya que autores como Berks, et al. (2005) lograron comprobar que las argininas del péptido señal de algunos sustratos Tat son indispensables, debido a que si una de éstas llega a ser sustituida por otro aminoácido se abate el transporte del sustrato Tat. Por otro lado se ha reportado también que en ocasiones el cambio es tolerado permitiendo el transporte de los

sustratos Tat; aunque se han encontrado sustratos Tat que carecen del motivo de argininas (Goosens, et al. 2014)

El sistema Tat está compuesto generalmente por 3 proteínas integrales de membrana: TatA, TatB y TatC, aunque en *E. coli* se han descubierto por lo menos otras dos proteínas: TatD, cuya función permanece desconocida y TatE que se presume ser una duplicación de TatA, que puede ser intercambiable en algunos casos (Berks, et al. 2005).

La vía de secreción Tat (fig. 5) inicia cuando la proteína ha sido sintetizada con un péptido señal Tat en el citoplasma, ha sido plegada y por lo regular modificada por la adición de cofactores, siendo auxiliada por chaperonas que aseguran el correcto plegamiento de la proteína. Esta proteína es dirigida a la maquinaria Tat que se encuentra en la membrana citoplásmica, donde es reconocida por la proteína TatC del complejo TatBC, derivado de la interacción de las proteínas TatB y TatC (Rollauer, et al., 2012). Cuando el péptido señal de la proteína ha sido reconocido por TatC, el complejo TatBC induce la formación del poro del translocón conformado por la interacción de pequeñas proteínas TatA que se encuentran en estado dinámico a través de la membrana (Alcock, et al. 2013). La proteína que se encontraba cercana a TatB pasa a través del poro conformado por anillos de TatA, donde una vez que ha sido exportada completamente, una peptidasa señal corta el péptido señal de la proteína, para que esta pueda madurar por completo. Al final de la exportación proteica el poro TatA es desensamblado, al igual que el complejo TatBC (Alcock, et al. 2013; Goosens, et al. 2014).

En otros estudios se ha encontrado la presencia de bacterias que carecen de la proteína TatB, como *B. subtilis* (Wu, et al. 2000) y a pesar de lo anterior la maquinaria de secreción Tat es funcional (Palmer & Berks, 2012). Esto indica que TatB no es completamente esencial para el funcionamiento de la vía Tat (Benoit & Maier, 2014); lo anterior se debe a que en ciertos casos las proteína TatA puede realizar la misma función que TatB (De Keersmaeker, et al., 2005; Berks, et al. 2005). Así mismo, fueron identificadas ambas proteínas en la fracción soluble, donde llevan la función de reclutar sustratos Tat para poder conducirlos y presentarlos a la maquinaria de secreción (De Keersmaeker, et al., 2005).

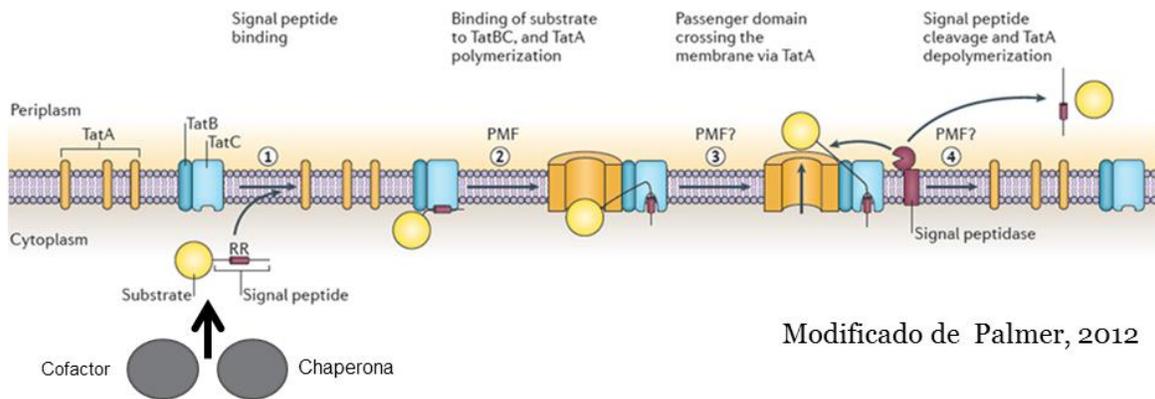


Figura 5. Vía de secreción de proteínas Tat. (Modificado de Palmer, 2012)

3. Modificaciones postraduccionales

Muchas proteínas se sintetizan de una forma simple como la quimiotripsina, pero en la naturaleza existen también proteínas que son modificadas (Nelson & Cox, 2008). Las bacterias al igual que los eucariontes modifican sus proteínas por diferentes procesos, que les dan un rol en ciertos papeles biológicos (VanderVen, et al. 2005). Tal proceso se lleva a cabo después de la traducción y durante o después del plegamiento; muchas proteínas adquieren alteraciones por diversos procesos llamadas modificaciones postraduccionales. Estas pueden ser a nivel local por la modificación de aminoácidos individuales, o a nivel general.

3.a. Biogénesis de lipoproteínas

Las lipoproteínas bacterianas son una agrupación heterogénea especial de proteínas modificadas de membrana que tienen funciones de obtención de nutrientes, auxiliares en el desarrollo celular, señalización y virulencia principalmente. Forman un gran grupo, ya que se ha calculado por análisis bioinformáticos que cerca del 2% del proteoma de las Gram-positivas corresponde a tal tipo de proteínas (Hutchings et al., 2009; Widdick, et al., 2011). La primera lipoproteína identificada en bacterias fue la proteína de Braun en *E. coli*. Esta proteína se encuentra triacilada (N-acilglicerol y S-diacilglicerol) en la cisteína del extremo N-terminal (Braun & Rehn, 1969; Tamil Selvan & Sankaran, 2006)

Las lipoproteínas en los actinomicetos son muy abundantes, y aunque no está esclarecida la función de muchas de ellas, la importancia de esta clase de proteínas no está en duda. Recientemente estudios computacionales del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, han demostrado que contiene alrededor de 100

lipoproteínas putativas, de las cuales no se conoce la función de la mitad. La otra mitad contiene lipoproteínas involucradas en sistemas reguladores, biogénesis de componentes de la pared celular y regulación de la respuesta inmune (Mohiman, et al., 2012). En el caso de los estreptomicetos, se comprobó la importancia de las lipoproteínas en la virulencia, crecimiento y desarrollo principalmente (Widdick, et al., 2011).

Este tipo de lipoproteínas se exportan regularmente por la vía Sec o por la vía Tat, por lo que poseen un péptido señal en su extremo amino terminal, además se quedan ancladas a la membrana citoplasmática por medio de dos o tres cadenas de acilos que se unen covalentemente a una cisteína conservada de la lipoproteína en el extremo amino terminal. Esta cisteína forma parte de un motivo conocido como “lipobox”, que es reconocido por la maquinaria de acilación proteica de la membrana. Este motivo “lipobox” es una secuencia aminoacídica consenso (L(A,V)-L-A(S)-G(A)-C(+1)) localizada en la región C del péptido señal, que se convertirá en la región amino terminal de la lipoproteína (Widdick, et al., 2011; Mohiman, et al., 2012).

La biogénesis de lipoproteínas comienza con la síntesis de prelipoproteínas, que contienen en su extremo amino terminal aun su péptido señal que incluye al motivo lipobox. Estas prelipoproteínas son secretadas al medio ya sea por la vía Sec o Tat. Cuando la proteína ha sido secretada la enzima Lgt (diacilgliceril transferasa de prelipoproteínas), utiliza sustratos lipídicos de la membrana para adherir un grupo diacilglicerol al grupo SH de la cisteína del lipobox, formando un enlace tioéter con el grupo tiol de la cadena lateral de la cisteína. Posteriormente una peptidasa señal especial llamada Lsp (peptidasa señal de lipoproteínas) corta el péptido señal dejando solo la cisteína del motivo lipobox como el aminoácido +1 localizado en el extremo amino-terminal de la lipoproteína madura. Anteriormente se pensaba que las bacterias Gram positivas, solo poseían las enzimas Lgt y Lsp, puesto que no presentan una membrana externa (Fig. 6), pero recientemente se ha observado la actividad de Lnt en micobacterias y estreptomicetos (Tschumi, et al., 2009; Mohiman, et al., 2012). En el caso de las Gram-negativas la enzima Lnt (lipoproteína N-acil transferasa) une covalentemente una tercera cadena de acilo al grupo amino de la cisteína; esta acilación constituye la señal para que la lipoproteína sea llevada a la membrana externa por medio de la vía Lol (*lipoprotein localisation*). Posteriormente se observó que los estreptomicetos poseen dos proteínas homologas a Lnt, mientras que en las micobacterias se ha encontrado una sola proteína con dos dominios, que tiene actividad de Lnt en el N-terminal y en el C-terminal una sintasa, y por último en el caso de las corinebacterias, existe un operón en el que la Ppm sintasa y la Lnt coexisten y trabajan conjuntamente (Hutchings, et al., 2009; Mohiman, et al., 2012).

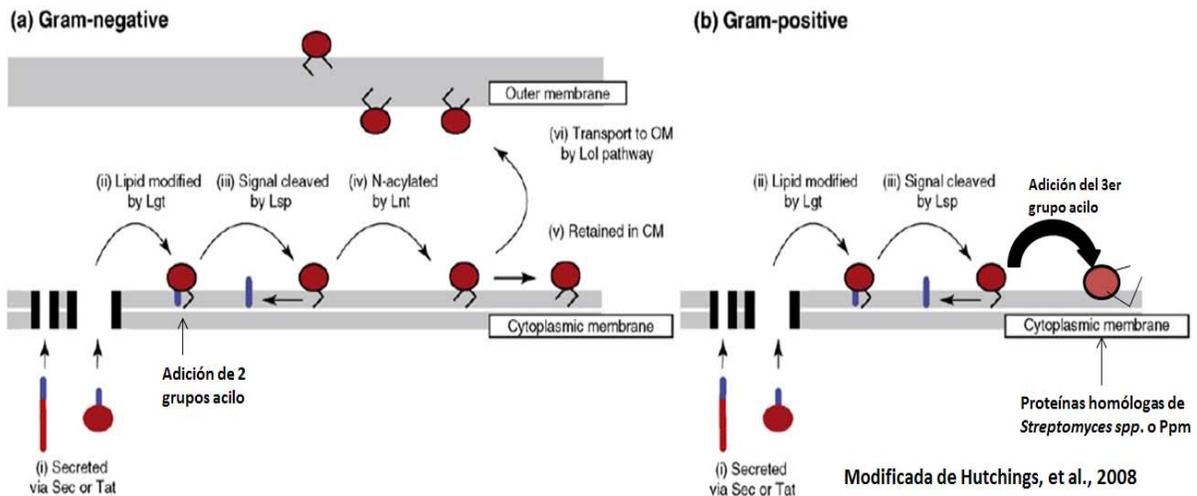


Figura 6. Biogénesis de lipoproteínas. (A) La biogénesis lipoprotéica en bacterias Gram-negativas. La prelipoproteína es secretada por la vía Sec o Tat, posteriormente es diacilada por Lgt, Lsp corta el péptido señal y Lnt acila el grupo amino de la cisteína+1, finalmente es llevada a la membrana externa por la vía Lol. (B) La biogénesis lipoprotéica en Gram-positivas. La prelipoproteína es secretada por la vía Sec o Tat, diacilada por Lgt en el grupo tiol de la cisteína+1, posteriormente Lsp corta el péptido señal y al final es agregado un grupo acilo por las homologas de Lnt o por Ppm.

3.b. Glicosilación de proteínas

La glicosilación es una importante modificación postraduccional de las proteínas encontrada en los tres dominios de la vida que sirve para diversificar el proteoma. Ha sido ampliamente estudiada en eucariontes y recientemente descubierta en procariontes; anteriormente se pensaba que estos organismos no podían llevar a cabo el proceso de glicosilación debido a la ausencia de organelos especializados. Desde el día en que se descubrió la glicosilación en procariontes, específicamente la glicosilación en la arquea *Halobacterium halobium* se han dilucidado nuevos reportes en procariontes que revelan la existencia de maquinarias de glicosilación en varios organismos (Lechner & Wieland, 1989; Messner, 1997). Sobre todo en eubacterias patógenas como *Campylobacter jejuni*, *M. tuberculosis* o *Pseudomonas aeruginosa*, aunque no se cuenta con generalidades de un sistema común para los procariontes (Moens & Vanderleyden, 1997). Las glicoproteínas cumplen diversas funciones, dependiendo del tipo de proteína y el azúcar conjugado que contienen, entre éstas destacan la adhesión celular, protección contra la proteólisis, incremento de la solubilidad y virulencia de la célula (Córdova-Dávalos, 2009).

Las glicoproteínas son proteínas que tienen unidos covalentemente uno o varios oligosacáridos, y son usualmente encontradas en la cara externa de la

membrana citoplasmática. Las glicoproteínas pueden dividirse en dos grandes grupos dependiendo del sitio de unión del carbohidrato a la proteína. La *N*-glicosilación corresponde a la unión de un oligosacárido a la amida de la cadena lateral de un residuo de asparagina de la proteína y es común encontrarla en la secuencia consenso N-P-S(T); y la *O*-glicosilación se presenta cuando el oligosacárido se une covalentemente a través del grupo hidroxilo de un residuo de serina o de treonina de la proteína en secuencias ricas en glicina, prolina y valina, en este tipo de glicosilación no se ha encontrado un motivo consenso de glicosilación y lo más cercano es un acercamiento a posibles sitios de glicosilación (Smith, et al., 2014). Las glicoproteínas suelen tener unidas una gran variedad de oligosacáridos, que fluctúan en complejidad y tamaño, que pueden llegar a representar la etiqueta personalizada de la glicoproteína y la que le confiere funciones específicas (Nelson y Cox, 2008; Lommel & Strahl, 2009).

La *O*-manosilación es un tipo de glicosilación importante en las bacterias y levaduras, organismos en las que fue descubierta en 1968 por Sentandreu y Northcote. Este tipo de glicosilación ha sido bien estudiada en *Saccharomyces cerevisiae* y ha sido encontrada también en los actinomicetos (Strahl-Bolsinger, et al. 1999; Lommel & Strahl, 2009). La biogénesis comienza cuando la fructosa-6-fosfato genera GDP-manosa por la acción de tres enzimas: fosfomanosa isomerasa (PMI), fosfomanomutasa (PMM) y GDP-manosapirifosforilasa (GMPP) (Lommel y Strahl, 2009). La manosa, necesita ser activada por moléculas de poliprenoles fosforilados, que son transportadores de manosa localizados en la membrana citoplásmica. La activación de la manosa es llevada a cabo por la enzima poliprenol fosfato manosa sintasa (Ppm), que se encarga de unir covalentemente una molécula de manosa, proveniente de GDP manosa, al poliprenol fosforilado en el lado intracelular de la membrana citoplásmica. Posteriormente el poliprenolfosfato manosilado expone la manosa del lado extracelular de la membrana mediante una “voltereta” (flipping) a través de la membrana. Finalmente la proteína de membrana manosil transferasa de proteínas (Pmt) manosilará a la proteína que se está secretando, acción que ocurre en el lado extracelular de la membrana (Fig. 7) (Vanderven, et al. 2005; Espitia et al., 2010).

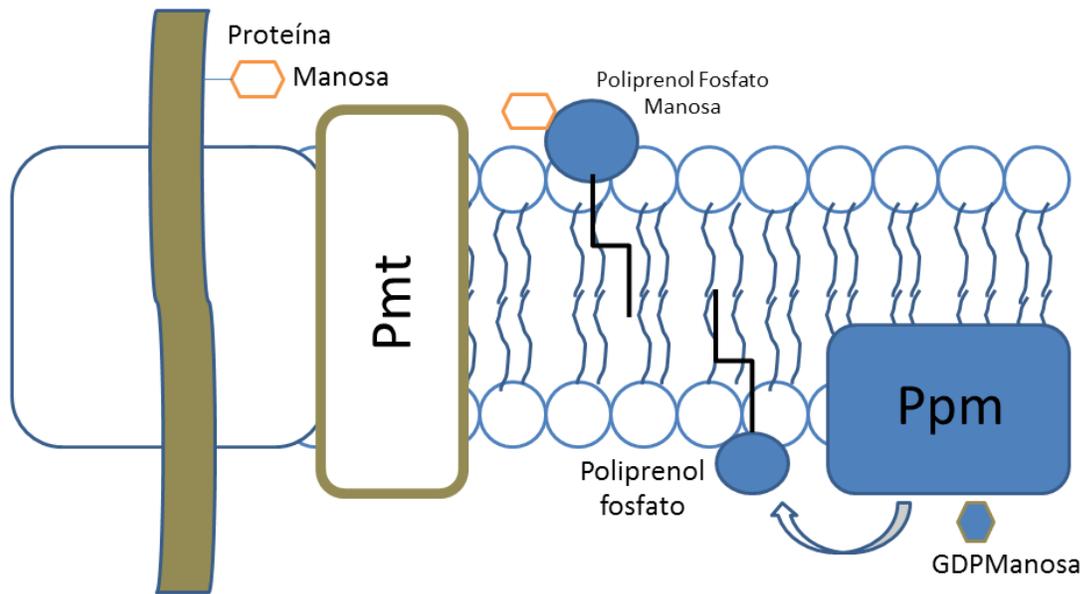


Figura 7. Glicosilación de Proteínas.

4. Proteínas de interés para el estudio de la tuberculosis

Las proteínas secretadas por *M. tuberculosis* son antígenos potenciales que el sistema inmune humano logra reconocer para montar una respuesta en contra de la bacteria. Las glicoproteínas, las lipoproteínas y las glicolipoproteínas representan una gran opción, ya que su calidad como antígenos es mayor a la de una proteína no modificada, por lo que, mediante el análisis del proteoma por medio de la lectina concanavalina A de filtrados de cultivo de *M. tuberculosis*, se detectaron una gran cantidad de proteínas glicosiladas (manosiladas) altamente inmunogénicas (González-Zamorano, et al. 2009), presentes en el sobrenadante de los cultivos y en la membrana, lo que implica una asociación de la proteína con lípidos, entre las proteínas detectadas destacaron 3 consideradas como antígenos prominentes: las proteínas de 45 kDa, 38 kDa y 19 kDa (Hermann, et al. 1996; Schmidt, et al. 2003; Córdova-Dávalos, 2009).

4.a. APA

La proteína APA (*alanine and proline-rich antigen*) es un antígeno encontrado en gran cantidad en el sobrenadante de cultivos de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG (Laqueyrie, et al., 1995). Está codificada en el gen Rv1860 de *M. tuberculosis* y está considerada como una proteína que podría actuar en el sistema de transporte de molibdeno (Lara, et al. 2004). Actualmente es reconocida como uno de los antígenos más importantes de *M. tuberculosis* y sobre todo uno de las mejores caracterizadas.

APA fue la primera proteína manosilada descrita en actinomicetos y migra en un gel SDS-Page a 45 y 47 kDa. Actualmente se ha encontrado esta proteína en varias especies de micobacterias como *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium leprae* (Coddeville, et al., 2012; Schorey, et al., 1995). Esta proteína se ha hecho recombinante en especies de *Streptomyces*, debido a las ventajas que este presenta en comparación a las micobacterias. En *Streptomyces* se ha observado que se expresa y se glicosila, aunque el patrón de glicosilación puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo (Lara, et al. 2004; Gamboa-Suasnavart, et al., 2011).

El rol que desempeña APA en *M. tuberculosis* no es claro, pero esta reportada como una adhesina que interactúa con receptores de lectina del huésped que influye directamente en la invasión y proliferación de las células en el huésped (Ragas, et al., 2007; Liu et al., 2013). Se ha podido observar que la glicosilación de APA es indispensable para que se lleve a cabo la respuesta inmune por medio de células T (Horn, et al. 1999).

4.a. Lipoproteínas

Las lipoproteínas son un subgrupo de proteínas muy importantes a nivel inmunológico, dado que participan en la interacción huésped-patógeno o inclusive en la composición de la envoltura celular (Sander, et al, 2004; Sutcliffe & Harrington, 2004). Dentro de las lipoproteínas sobresale un subgrupo más que corresponde al de las lipoproteínas glicosiladas que representan a un grupo aún más importante en el papel inmunológico que las anteriores, entre las que se destacan las proteínas de 19 kDa, de 38 kDa y MPT83.

El antígeno de 19 kD o proteína LpqH, está codificada por el gen Rv3763. Fue originalmente identificada por anticuerpos obtenidos a partir del extracto de un cultivo y fue identificado como un potencial objetivo en la respuesta inmune en la infección (Ivanyi & Thole, 1994). Esta proteína está identificada como una adhesina que interactúa con el receptor de manosa para promover la fagocitosis de la micobacteria (Díaz-Silvestre, et al., 2005). LpqH también induce la respuesta

inmune mediada por células y se piensa que actúa como antagonista del receptor Toll-like 2 disminuye la presentación de antígenos a las células T (Noss, et al., 2001; Sánchez, et al., 2012).

La proteína MPT83, esta codificada por el gen Rv2873 y tiene una masa molecular de aproximadamente 25 kDa; se piensa que es homóloga a MPB70 y MPB83 de *M. bovis*, proteínas que también suelen ser muy inmunoreactivas (Kao, et al., 2012). Su función aun no es clara, aunque en base a análisis bioinformáticos se presume podría ser una adhesina (Hewison, et al., 1996).

Antecedentes

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que afecta entre 8 y 10 millones de personas por año, por lo que representa un gran reto sanitario sobre todo en países subdesarrollados. Actualmente se dispone de la vacuna BCG y de tratamientos con antibióticos para combatir la enfermedad, pero debido a que no son completamente efectivos, se ha decidido tomar alternativas como la elaboración de una nueva vacuna con proteínas recombinantes. Estudios en sueros de pacientes infectados han detectado proteínas que tienen un efecto inmunogénico importante durante la infección. Cabe mencionarse que todas ellas se encuentran glicosiladas y entre las que destacan APA, MPT83, LpqH y PstS1.

La bacteria *S. lividans* ha sido un buen hospedero para la producción de proteínas recombinantes de diversos organismos. Inclusive se ha demostrado que funciona como una alternativa viable en la producción de proteínas modificadas. Tal característica ha sido aprovechada para la obtención de proteínas heterólogas glicosiladas y lipidadas de *M. tuberculosis*, como es el caso de la proteína APA (45/47 kDa) que fue obtenida de cultivos de *S. lividans* para su posterior caracterización (Lara, et al., 2004). APA se considera especial ya que es la única proteína de *M. tuberculosis* que está glicosilada sin ser lipoproteína, probablemente porque se trata de un sustrato Tat como sucede en *E. coli*, por lo que podría ser modificada dentro de la célula (Marrichi, et al., 2008).

En otros estudios se ha observado que *Streptomyces* también puede producir proteínas aciladas y glicosiladas como son MPT83 y LpqH, que se encontraron ancladas a la membrana. El que estas proteínas se encuentren en la membrana representa un problema metodológico para su purificación, por lo que, en un intento para facilitar su purificación se removió el péptido señal original y se sustituyó por el de la lipasa extracelular de *Streptomyces exfoliatus*, una proteína secretada en grandes cantidades (Torres Rodríguez. 2012; Arista Carrera, 2013).

Justificación

La tuberculosis es una enfermedad severa que afecta a una parte de la población. Desafortunadamente los tratamientos actuales para controlarla y curarla, no han tenido el efecto esperado. Dada tal situación, es necesario buscar alternativas y una de ellas podría ser una vacuna elaborada a partir de proteínas recombinantes que tuvieran un gran efecto inmunogénico en el paciente.

Muchas de las proteínas que han provocado una respuesta en el paciente se encuentran modificadas, ya sea por lípidos o por azúcares. Por lo que el siguiente paso sería, producirlas en un hospedero eficiente como *Streptomyces*, caracterizarlas molecularmente y posteriormente probar su reactividad con sueros de pacientes.

La gran mayoría de estas glicoproteínas de *M. tuberculosis* presentan una gran desventaja metodológica, y es que al ser lipoproteínas, estas se encuentran ancladas a la membrana, por lo que su purificación es menos eficiente. Para abordar dicho problema, una de las soluciones es sustituir el péptido señal nativo por el de una proteína que se secrete al medio. Además, en relación a la propuesta de VanderVen *et al.* del 2005 se usó un sustrato Sec, para así asegurar que las proteínas fueran glicosiladas. Este tipo de intentos han sido infructuosos ya que aunque son secretadas, no fueron glicosiladas como las proteínas ancladas a la membrana, Tal fue el caso de las proteínas PstS-1, MPT83 y LpqH, a las que les fue retirado su péptido señal original y les fue añadido el de la lipasa de *S. exfoliatus* M11.

Por lo tanto, otra alternativa podría ser usar el péptido señal de otra proteína, pero ahora nativa de *M. tuberculosis* como APA, que se caracteriza por ser la única glicoproteína secretada de esta bacteria. APA es una proteína que en *E. coli* se secreta por medio del sistema Tat (Marrichi, M. *et al.* 2008), y que tal vez el péptido señal de APA sería el indicado para secretar las lipoproteínas y que estas puedan ser glicosiladas.

Objetivos

Generales

- Evaluar la influencia del péptido señal de la proteína APA en la secreción y glicosilación de las proteínas recombinantes MPT83 y LpqH.
- Determinar si la proteína APA en *Streptomyces* es secretada por el sistema Tat.

Particulares

- Realizar un análisis con programas de predicción a la proteína APA para determinar el tipo de péptido señal que presenta.
- Comprobación experimental del tipo de péptido señal de la proteína APA mediante el uso de una cepa carente de sistema de secreción Tat.
- Confirmación de la lipasa extracelular de *S. exfoliatus* M11 como un sustrato Sec.
- Expresión y purificación de las lipoproteínas MPT83 y LpqH secretadas utilizando el péptido señal de APA.
- Expresión de la proteína APA utilizando tanto su péptido señal nativo como el de la lipasa extracelular y su purificación.
- Evaluación de la manosiación de las proteínas APA, MPT83 y LpqH secretadas utilizando los diferentes péptidos señales.

Hipótesis

- El péptido señal de APA hará que las proteínas LpqH y MPT83 sean exportadas al medio, por medio del sistema de secreción Tat. Además este contiene una señal interna que conducirá a estas proteínas a la maquinaria de glicosilación.

Material y métodos.

Cepas y plásmidos.

En el presente trabajo se usaron diferentes plásmidos para la clonación, secuenciación y posterior expresión de las proteínas relevantes de este estudio. A continuación se presentan los plásmidos empleados para dicha investigación.

Plásmido	Descripción	Referencia
pBluescript II SK	Vector de clonación multicopia para <i>E. coli</i> derivado de ColEI, con sitio de clonación múltiple. Resistencia a ampicilina.	Short, et al., 1988
pUC18	Vector de clonación multicopia para <i>E. coli</i> , derivado de ColEI. Resistencia a ampicilina.	Norlander, et al. 1983
pIJ6021	Vector de expresión derivado del pIJ101, multicopia, con resistencia a kanamicina, promotor <i>P_{tipA}</i> inducible con thioestrepton.	Takano, et al., 1995
pSET152	Plásmido que contiene el sitio <i>attP</i> y el gen de la integrasa del fago Φ C31. Resistencia a Apramicina	Bierman, et al. 1992
pSET152-Lip+APA	Plásmido derivado del pSET152 con el gen Rv1860 modificado para expresar APA con el péptido señal de la lipasa M11	Este trabajo
pSET152-Lip+APA6H	Plásmido derivado del plásmido pSET152-Lip+APA que contiene el gen Rv1860 modificado para expresar APA con el péptido señal de la lipasa y una etiqueta de seis histidinas en el extremo C-terminal	Este trabajo
pSET-APA6H	Plásmido derivado del pSET152 que contiene la secuencia completa del gen Rv1860 modificado para expresar APA con una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal	Este trabajo
pUC18-A+2873	Plásmido derivado del pUC18 que contiene el gen Rv2873 modificado para expresar MPT83 con el péptido señal de la proteína APA	Este trabajo
pUC18-A+3763	Plásmido derivado del pUC18 que contiene el gen Rv3763 modificado para expresar LpqH con el péptido señal de la proteína APA	Este trabajo
pUC18-	Plásmido derivado del pUC18 que contiene el gen Rv2873 modificado para expresar MPT83	Este trabajo

A+28736H	con el péptido señal de la proteína APA y una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal	
pUC18-A+37636H	Plásmido derivado del pUC18 que contiene el gen Rv3763 modificado para expresar LpqH con el péptido señal de la proteína APA y una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal	Este trabajo
pIJ6021-APA6H	Plásmido pIJ6021 con el gen Rv1860 modificado para expresar APA con su propio péptido señal y contiene un tag de histidinas.	Este trabajo
pIJ6021-Lip+APA6H	Plásmido pIJ6021 con el gen Rv1860 modificado para expresar APA con el péptido señal de la lipasa de <i>S. exfoliatus</i> M11, derivado de pSET-Lip+APA6H.	Este trabajo
pIJ6021-A+MPT6H	Plásmido pIJ6021 con el gen Rv2873 modificado para expresar MPT83 con el péptido señal de APA, derivado de pUC18-A+28736H	Este trabajo
pIJ6021-A+LpqH6H	Plásmido pIJ6021 con el gen Rv3763 modificado para expresar LpqH con el péptido señal de APA, derivado de pBA3.1	Este trabajo
pBD3.1	Plásmido pIJ6021 con el gen Rv3763 silvestre.	Torres, D. (2012)
pBIA4	Plásmido pIJ6021 con el gen Rv2873 silvestre	Arista, I. (2013)
pB104	Plásmido derivado del pIJ6021 con el gen <i>lipA</i> clonado bajo el promotor <i>tipA</i> .	Servín-González, et al. 1997.

También se usaron diferentes cepas de la bacteria *Escherichia coli* para las diferentes clonaciones y el manejo de DNA plasmídico. Por otra parte la cepa de *Streptomyces lividans* se utilizó principalmente para la expresión de proteínas de interés de este trabajo. A continuación se enlistan las cepas utilizadas:

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F endA1 <i>hsdR17</i> (rk- mk-) <i>supE44</i> <i>thi-1</i> λ - <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169	Grant et al., 1990.
IBEC58 (BW triple)	Derivada de la cepa BW25113. Δ <i>dam</i> Δ <i>dcm</i> Δ <i>hsd</i> . Esta cepa fue utilizada para obtener DNA plasmídico no metilado.	González-Ceron, et al., 2009.

<i>S. lividans</i>		
1326	Cepa Silvestre	John Innes Centre
ΔSli3509	Cepa derivada de 1326 con una mutación nula en el gen que codifica la manosil-transferasa de proteínas (Δ <i>pmt</i>) Incapaz de glicosilar proteínas.	Arista, I. Comunicación personal.
<i>S. coelicolor</i>		
M145	Cepa silvestre	John Innes Centre
IB78	Cepa derivada de M145 con una mutación nula que elimina los genes del sistema Tat (Δ <i>tatAC</i>)	Este trabajo

Construcciones génicas

Para este trabajo se realizaron 3 construcciones originales a partir de genes de *M. tuberculosis*: con la finalidad de obtener las siguiente proteínas:

- 1.- A partir del gen Rv1860 que codifica para la proteína APA silvestre, se sustituyó la región que codifica el péptido señal original por la región que codifica el péptido señal de la lipasa extracelular de *S. exfoliatus* M11.
- 2.- A partir del gen Rv2873 que codifica para la proteína MPT83, se sustituyó la región que codifica el péptido señal original por la región que codifica el péptido señal de la proteína APA.
- 3.- A partir del gen Rv3763 que codifica para la proteína LpqH, se sustituyó la región que codifica el péptido señal original por la región que codifica el péptido señal de la proteína APA.

Estas sustituciones de péptidos señales se realizaron como se describe a continuación.

Obtención del gen Rv1860

Para llevar a cabo esta sustitución, primero fue necesario obtener el gen Rv1860 silvestre de *M. tuberculosis*. Este gen fue amplificado a partir de DNA genómico de *M. tuberculosis* H36Rv, el cual fue amablemente donado por la Dra. Yolanda López Vidal (Facultad de Medicina, UNAM) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El PCR fue llevado a cabo utilizando los siguientes oligonucleótidos.

- Rv1860UP:
GCGGATCCATATGCATCAGGTGGACCCC

En este oligonucleótido fueron colocados dos sitios de restricción (*Bam*HI y *Nde*I en ese respectivo orden) que se usaron para la clonación en los vectores. A continuación de los sitios de restricción se encuentra el inicio de la secuencia del gen Rv1860.

- APA Down 6H:
GGGGAATTCAGTGGTGGTGGTGGTGGGCCGGTAAGGTCCGCT

Para este oligonucleótido, solo fue colocado un sitio de restricción (*Eco*RI) que igualmente fue utilizado para la clonación en el vector, además de las últimas bases del gen Rv1860.

Posteriormente a la amplificación del gen Rv1860, el producto de la reacción de PCR se purificó por medio de un gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 0.6%.

Sustitución del péptido señal de la proteína APA por el de la lipasa extracelular

Para obtener el gen Rv1860 con el péptido señal de la lipasa fue necesario amplificar el péptido señal de la lipasa a partir del plásmido pBIA1c donado por el Biol. Isaí Arista (Arista, 2013), que además contuviera el inicio de la secuencia del gen Rv1860. Para esta reacción de PCR se usaron los siguientes oligonucleótidos:

- Forward:
GCGGATCCATATGCCCCAGCACCTCC

Este primer fue diseñado con dos sitios de restricción (*Bam*HI y *Nde*I) que se utilizaron para la posterior clonación en el vector. En este primer se incluye en inicio de la secuencia del gen de la lipasa.

- PsM11+Rv1860FUSION:
GGGGCGCTGGCTCCGGATCGGCCGCGGCCGCCTGG

Este oligonucleótido fue diseñado con las últimas bases del péptido señal del gen LipA y las primeras bases de la secuencia correspondiente a la proteína madura de APA.

Posteriormente para llevar a cabo la fusión fue necesario realizar una nueva reacción de PCR que utilizara como templado el gen Rv1860 recién amplificado. Para llevarlo a cabo se utilizó el oligonucleótido forward de la lipasa y en el caso del reverse se usó el mismo oligonucleótido reverse que se usó para amplificar el gen Rv1860. Primero fue amplificado por PCR el péptido señal de la lipasa que contenía el principio del gen Rv1860, y posteriormente este sustituyó al péptido señal nativo del gen Rv1860 por medio de PCR. El producto obtenido (substitución del péptido señal de la lipasa en el gen Rv1860: PsM11+APA) fue purificado por un gel de agarosa LMP al 0.6%. El vector Pset152 fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV* dejando extremos romos. A partir de esta digestión se purificó el fragmento por medio de un gel de agarosa LMP al 0.6% y se ligó a la banda purificada del PsM11+APA, agregando Ligasa T4 H.C. La ligación fue transformada por electroporación en *E. coli* DH5 α y plaqueada en medio LB con antibiótico (Apr). Se purificó el DNA plasmídico por medio de Midipreps y fue secuenciado en la unidad de secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Fusión del péptido señal de la proteína APA con los genes Rv2873 y Rv3763.

Para la realización de esta construcción fue necesario amplificar la parte correspondiente al péptido señal del gen Rv1860 que contuviera el inicio de la secuencia de los genes Rv2873 y Rv3763 respectivamente. Esta fusión fue realizada por medio de una PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos:

- Rv1860 UP
- PsAPA+Rv2873Fusion:
GCGACACGGGTTTGGTGCTCGAGGCGTTGGCGGTCGCG
- PsAPA+Rv3763Fusion:
CGCTTCCTGTAGTAGCGACTTGTTGCTTGAGGCGTTGGCGGTCGCG

El producto de estas PCR fue purificado por medio de un gel de agarosa de bajo punto de fusión y utilizados para la fusión con sus respectivos genes Rv2873 y Rv3763. Para hacer esta fusión se utilizaron los plásmidos pBD3.1 y pBIA4 realizados en los trabajos de tesis del Biol. Isaí Arista (Arista, 2013) y la Biol. Daniela Torres (Torres, 2012). En donde estaba contenida la secuencia original de los genes Rv2873 y Rv3763. Estos plásmidos fueron usados como templados para la PCR y así obtener la fusión de la secuencia del péptido señal de APA y los genes Rv2873 y Rv3763. Los oligonucleótidos usados fueron los siguientes:

- Rv1860 UP

En este oligonucleótido fueron colocados dos sitios de restricción (*Bam*HI y *Nde*I) y el inicio de la secuencia de APA.

- Rv2873 Reverse: GGAATTCGTGATCTATCGGCACGAAGC
- Rv3763 Reverse: GGAATTCCGCATCGACACGTTTAG

En este oligonucleótido esta contenido un sitio de restricción (*Eco*RI) y los últimos nucleótidos de los genes Rv2873 y Rv3763 respectivamente.

Posteriormente al PCR se digirieron las dos bandas primero con la enzima *Bam*HI toda la noche y posteriormente con *Eco*RI (ambas a 37°C). El vector en este caso pUC18 también fue digerido con las mismas enzimas y posteriormente fue ligado a las bandas por separado. Fue transformado en competentes *E. coli* DH5α por medio de electroporación y plaqueado en medio LB con su antibiótico (Amp). A partir de estas transformantes se purificó el DNA plasmídico y se secuenció.

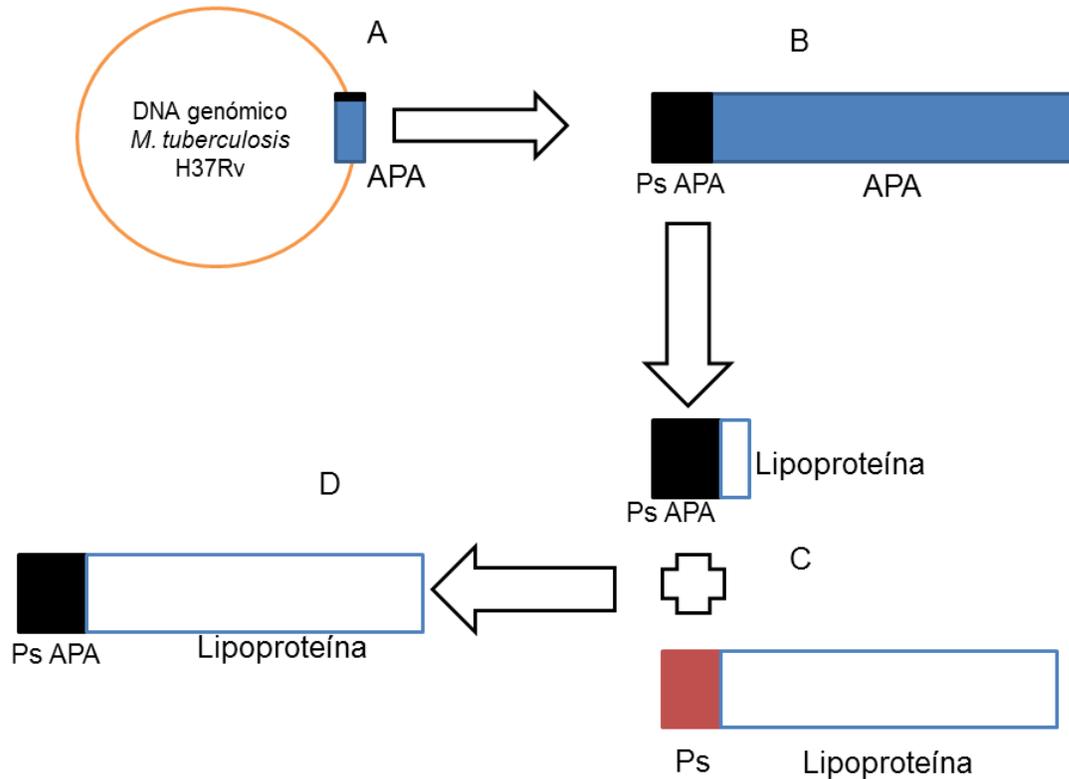


Figura 8. Representación gráfica de la sustitución del péptido de las lipoproteínas LpqH y MPT83 por el de APA. A, DNA genómico de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* que contiene el gen Rv1860. B, Amplificación del gen Rv1860 con su propio péptido señal. C, obtención del péptido señal del gen Rv1860 con un fragmento del gen Rv3763 o Rv2873 según corresponda, y obtención de los genes Rv3763 y Rv2873 completos. D, obtención del gen correspondiente a las proteínas químicas MPT83 y LpqH con el péptido señal de APA.

Clonación de los diferentes genes modificados en un vector de expresión multicopia de *Streptomyces*.

Streptomyces posee un sistema muy específico de restricción de DNA metilado, por lo que fue preciso utilizar la cepa de *E. coli* IBEC58. Esta cepa tiene mutados los sistemas de metilación de DNA, por lo que el DNA plasmídico que fue purificado a partir de esta cepa no se encontraba metilado.

Las células competentes de la cepa IBEC58 fueron transformadas por electroporación con los siguientes plásmidos:

- Pset152 – Lip+APA
- Pset152 – APA
- pUC18 – A+2873
- pUC18 – A+3763

Posteriormente, las transformantes fueron plaqueadas en medio LB y adicionadas con su antibiótico correspondiente. Se picaron colonias aisladas y se pusieron a crecer 3ml de cada una. De las colonias aisladas se hicieron minipreparaciones y se comprobó por restricción que el plásmido estuviera correcto. A continuación se pusieron cultivos de 100ml de las colonias que habían tenido un patrón de restricción correcto y por medio de midipreparación el plásmido fue purificado. Posteriormente, fue digerido con la enzima de restricción *NdeI* y se realizó una electroforesis en gel de agarosa para comprobar que el plásmido estuviera linearizado, prueba de que la enzima había cortado exitosamente. Después se le agregó la endonucleasa *EcoRI* con la que se sacó el fragmento completo, luego se purificó y se obtuvo la banda de los genes con los extremos cohesivos por medio de un gel de agarosa LMP 0.8%.

Por otro lado, a partir de una preparación plasmídica derivada de trabajos anteriores, se purificó el plásmido pB104 que contenía el gen que codifica para la lipasa por medio de una Midipreparación.

Aunado a esto se hizo el mismo proceso de corte con las enzimas *NdeI* y *EcoRI* al plásmido pIJ6021 e igual se purificó por medio de un gel de agarosa LMP 0.6%. Al final se llevó a cabo la ligación entre el vector linearizado y los fragmentos purificados. Obteniendo los siguientes plásmidos:

- pIJ6021-Lip+APA6xH
- pIJ6021-Lip
- pIJ6021 – APA 6xH
- pIJ6021 – A+2873 6xH
- pIJ6021 – A+3763 6xH

Todos los plásmidos anteriores fueron introducidos mediante transformación de protoplastos a la cepa *S. lividans* 1326. Los plásmidos pIJ6021, pIJ6021-Lip+APA6xH, pIJ6021-Lip y pIJ6021-APA6xH por su parte, fueron transformados en las cepas de *S. coelicolor* M145 e IB78. Por último el plásmido pIJ6021-APA6xH fue también transformado pero en la mutante $\Delta Si3509$ de *S. lividans*. Los protoplastos fueron plaqueados en medio R2, y en el caso de la mutante en medio R2 adicionado con 1mL de glucosa 50%, para que recuperar la pared celular que habían perdido por la adición de lizozima. Dieciséis horas después fue adicionado kanamicina a las cajas y las transformantes se dejaron crecer por una semana esperando a que estas esporularan.

De las colonias aisladas se machacaron y se plaquearon en medio MS adicionado con extracto de levadura 0.1% y en el caso de la mutante IB78 con

glucosa 0.5%, se formaron sectores y se dejaron esporular por 7 días. Las esporas de cada uno de los sectores fueron cosechadas por medio de un asa bacteriológica y agua, para posteriormente colocarlas en un tubo de ensaye con 3ml de medio líquido LB + sacarosa 25%. Con los cultivos anteriores se realizaron minipreparaciones y por medio de restricción con la enzima *KpnI* se determinó cuáles colonias contenían el fragmento correcto.

Obtención de esporas

Las minipreparaciones que resultaron ser correctas se usaron para volver a transformar a *S. lividans* 1326 y a *S. coelicolor* M145 e IB78. Se tomaron colonias aisladas, se trituraron y se resuspendieron en agua, para que posteriormente pudieran plaquearse con ayuda de un asa de vidrio en cajas Petri con medio MS suplementado con extracto de levadura 0.1%

Los tapetes bacterianos confluentes resultantes de la retransformación se dejaron crecer y esporular por 1 semana a 30°C. A continuación se cosecharon las esporas con ayuda de agua estéril y un asa bacteriológica. Las esporas se filtraron por algodón, se concentraron por centrifugación a 3500rpm por 10 min, se lavaron con agua una vez y se resuspendieron en glicerol al 20% para ser almacenadas a -20°C.

Expresión de proteínas

Se tomaron 200 µl de las esporas almacenadas en glicerol 20% y se lavaron con 500 µl de agua estéril. Posteriormente se adicionaron 10ml de medio YT2X y se incubaron a 37°C con agitación alrededor de 6 horas, para pregerminar las esporas. Posteriormente las esporas fueron centrifugadas a 6000rpm por 10 minutos para retirar el medio y lavadas con 10ml de agua estéril. Las esporas pregerminadas fueron resuspendidas en 10ml de medio LB + azúcar 25% e inoculadas en matraces de 250ml provistos de un resorte de acero inoxidable en el fondo (para evitar la formación de pastillas muy grandes de micelio) con 50ml de medio LB + sacarosa 25% con 50 µg/ml de kanamicina (en el caso de la mutante IB78 el medio solo contenía 12.5% de sacarosa).

Los cultivos se mantuvieron en agitación constante a una temperatura de 30°C. La inducción se llevó a cabo a las 16 horas por medio de la adición de thioestrepton para dar una concentración final de 5 µg/ml. Los cultivos se incubaron por otras 24 horas después de la inducción.

Obtención de proteínas de sobrenadante y membrana.

Los cultivos fueron centrifugados a 6000 rpm por 10 min para separar el sobrenadante del micelio. Las proteínas del sobrenadante fueron precipitadas por medio de metanol/cloroformo, en el que el sobrenadante era mezclado con 4 volúmenes de metanol, 1 volumen de cloroformo y 3 volúmenes de agua, posteriormente era centrifugado a 13000 rpm por 10 min y retirado la fase superior. A continuación se le adicionaban 3 volúmenes más de metanol y se era centrifugado de nuevo bajo las mismas condiciones que el anterior para retirar por completo la fase acuosa. La fase sólida fue resuspendida en 8 μ l de colorante para proteínas 2x (2- β -mercaptoetanol 10%, Tris-HCl [pH 6.8] 0.125 M, SDS 4%, glicerol 20%) por cada ml de sobrenadante procesado. Las muestras fueron hervidas por 10 min y almacenadas a -20°C .

El micelio por su parte fue lavado cuatro veces con 100 mL de Tris-Cl 20mM pH 8.0 y congelado a -70°C por 30 minutos. Posteriormente el micelio congelado fue resuspendido en buffer de lisis (MgCl_2 1 M, DTT 4mM, pastillas inhibidoras de proteasas [cOmplete de ROCHE], 0.5 μ l de RNAsa y Tris 20 mM). Y luego el micelio fue lisado por medio de sonicación. Se comprobó que el micelio estuviera totalmente lisado observándolo en el microscopio óptico. El sonificado se centrifugó a 7500 rpm durante una hora a 4°C . El sobrenadante fue ultracentrifugado a 38,000 rpm durante 40 minutos para separar la fracción membranal de los otros componentes celulares. El pellet resultante fue lavado con Tris-Cl 20 mM con NaCl 50 mM y ultracentrifugado nuevamente a 30,000 rpm durante 30 min. Finalmente el pellet fue resuspendido en el mismo buffer de lisis, manteniendo en frío la muestra. Posteriormente las proteínas de la fracción de membrana fueron precipitadas por medio de una extracción metanol/cloroformo. Las muestras se cuantificaron por el método colorimétrico de Bradford. A partir de esta cuantificación se prepararon muestras con 7 μ g de proteína en 10 μ l de buffer de carga para proteínas 2x, fueron hervidas y almacenadas a -20°C .

Purificación de proteínas por columna de afinidad de Ni-NTA.

Para la purificación de proteínas secretadas, se procesaron los sobrenadantes de los cultivos (normalmente de 100 mL). Una vez cumplidas las 40 horas, los cultivos fueron centrifugados a 6000 rpm, y el sobrenadante fue filtrado utilizando un papel filtro Whatman [Qualitative 1] utilizando para ello un embudo colocado en un matraz Kitasato conectado a una línea de vacío; esto se realizó para evitar que fragmentos pequeños de micelio contaminaran el sobrenadante. El sobrenadante fue aforado a 100mL con agua desionizada y posteriormente se añadió sulfato de

amonio hasta alcanzar una saturación del 80%, y se mantuvo con agitación constante por una hora a 4°C. Posteriormente se centrifugó por una hora a 14,000 rpm y 4°C. El sobrenadante fue decantado y las proteínas precipitadas fueron resuspendidas en un volumen mínimo de agua desionizada. Por separado se preparó una membrana de diálisis (con poro de 10,000-12,000 Da) donde fueron colocadas las proteínas resuspendidas. Esta muestra fue dializada con 500 mL de buffer Tris 20 mM por 4 horas, cambiando el buffer cada hora.

Mientras tanto se preparó la columna de afinidad con solo 2 mL de la resina de agarosa Ni-NTA (QIAGEN), y posteriormente se equilibró con 10 mL de buffer Tris 20 mM [pH=8]. La muestra ya dialisada fue pasada dos veces por la columna, y luego la columna fue lavada con 10 mL de Tris 20 mM + 10 mM imidazol y después con 10mL de Tris 20 mM + 20 mM imidazol. Al final, la muestra fue eluida con 10 mL de Tris 20 mM + 250 mM imidazol, se colectaron fracciones de 1 mL y éstas fueron almacenadas a -20°C.

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Las muestras anteriormente obtenidas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (29:1) bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Estos geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie R-250 directamente, o transferidos a membranas de PVDF para realizar ensayos de Western blot.

Los geles para las proteínas Mpt83 y LpqH se hicieron a una concentración de poliacrilamida del 14%, los geles correspondientes a la lipasa se elaboraron a una concentración del 12%, mientras que los geles para la proteína APA se hicieron a una concentración de poliacrilamida del 10%. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron BioRad® de 10-250kDa.

Transferencia de proteínas de geles de poliacrilamida-SDS a membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF)

Para poder llevar a cabo los ensayos de Western blot fue necesario transferir las proteínas a una membrana de PVDF. Para el caso de los ensayos de Western blot en los que la detección se realizó por medio de anticuerpos la transferencia se llevó a cabo en una cámara de transferencia semiseca BIO RAD, por un período de 15 a 30 min a 15 mV, según el protocolo incluido en el manual del aparato, utilizando buffer de Tris-Glicina (14 g de glicina, 3 g de Tris, 200 mL de metanol y 800 mL de agua, pH=8.3). Por otro lado cuando la detección en el Western blot se realizó con concanavalina A (ConA) la transferencia se realizó en una cámara

húmeda de BIO RAD por 12 a 16 h a 12 mA en el mismo buffer de Tris-Glicina con agitación constante.

Western blot

Para los ensayos de Western-blot con anticuerpo las membranas fueron bloqueadas por 12 horas con TBS–Tween 20+leche semidescremada 5% con agitación constante a 4°C. Posteriormente fueron agregados los anticuerpos primarios policlonales de conejo en dilución 1:500 para Mpt83 y 1:1000 para LpqH en TBS–Tween 20+leche semidescremada 5% por 2 horas con agitación constante a 4°C. Las membranas se lavaron una vez con agua desionizada y dos veces más con TBS-Tween20. Luego fueron incubadas 2 horas más con el anticuerpo secundario o Anti-IgG de conejo (Sigma) a una dilución 1:1000 en TBS–Tween 20 + Leche semidescremada 5%. La membrana fue lavada con TBS-Tween 20 tres veces y fue revelada con el kit de quimioluminiscencia ROCHE.

En el caso los experimentos de Western blot en los que la detección se realizó con la lectina ConA las membranas fueron bloqueadas por 2 horas con TBS + Albumina 1% e incubadas por 12 horas con una dilución 1:1000 de ConA (Sigma) en TBS, a esta dilución se le adicionó 1mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂ y 1 mM de MnCl₂. Finalmente las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS y reveladas con el kit de quimioluminiscencia ROCHE.

Determinación de actividad de la lipasa extracelular de *S. exfoliatus* M11.

Para la determinación de actividad de lipasa se preparó un stock de la mezcla de reacción disolviendo 2.5 µmol de *p*-nitrofenil laurato en 420 µl de Tritón X100 en un tubo Corex previamente precalentado. A esta mezcla se añadieron con agitación 10 mL de buffer TES 100 mM (pH=7.2) y finalmente fue añadido con 8.6 mL de agua desionizada.

Primero se colocaron los 0.95mL de la mezcla de reacción a precalentar en tubos a 37°C por 5 min. Una vez precalentada la mezcla de reacción a cada tubo se le añadió 0.05 mL de sobrenadante de cultivo. Por cada sobrenadante se realizaron dos reacciones, de 5 y 10 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 2 mL de acetona, e inmediatamente se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. El blanco se obtuvo añadiendo acetona antes del sobrenadante del cultivo.

Resultados

Amplificación y clonación de los genes Rv3763 y Rv2873 modificados para sustituir la secuencia correspondiente al péptido señal.

Con el fin de determinar si el péptido señal de la proteína APA era funcional para la secreción y glicosilación de las proteínas LpqH y MPT83 se procedió a sustituir el péptido señal de cada una de estas dos lipoproteínas por el péptido señal de la proteína APA. Para esto se diseñaron oligonucleótidos que permitieran amplificar sus respectivos genes (Rv3763 y Rv2872) sustituyendo la parte de cada gen correspondiente al péptido señal por la secuencia que codifica el péptido señal de la proteína APA; adicionalmente se modificó cada gen para introducir una etiqueta de seis histidinas en el extremo carboxilo-terminal de las proteínas. En la figura 9 se puede ver la secuencia correspondiente al gen Rv2873 modificado, mientras que en la figura 10 se muestra la secuencia del gen Rv3763 modificado. Adicionalmente, a partir de los plásmidos construidos por Torres (2012) y Arista (2013) se reamplificaron ambos genes silvestres con oligonucleótidos que añadían una etiqueta de seis histidinas en el extremo carboxilo-terminal de las proteínas. Los diferentes productos de PCR fueron digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI y ligados con el vector pUC18 digerido con las mismas enzimas

Las construcciones fueron transformadas en *E. coli* DH5 α , para luego aislar el DNA plasmídico de colonias aisladas. Los plásmidos purificados fueron digeridos con las mismas enzimas utilizadas para la clonación y se seleccionó un plásmido de cada construcción con la estructura adecuada, el cual fue enviado a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para confirmar que tuvieran la secuencia correcta. En todos los casos se obtuvo la secuencia esperada.

```

1      GCGGATCCATATGCATCAGGTGGACCCCAACTTGACACGTCGCAAGGGACGATTGGCGGC
1      R I H M H Q V D P N L T R R K G R L A A

61     ACTGGCTATCGCGGCGATGGCCAGCGCCAGCCTGGTGACCGTTGCGGGTGCCCGGACCGC
21     L A I A A M A S A S L V T V A V P A T A

121    CAACGCCTCGAGCACCAAACCCGTGTCGCAAGACACCAGCCCGAAACCGGCGACCAGCCC
41     N A S S T K P V S Q D T S P K P A T S P

181    GCGCGCGCCCGTTACCACGGCGGCAATGGCTGACCCCGCAGCGGACCTGATTGGTCGTGG
61     A A P V T T A A M A D P A A D L I G R G

241    GTGCGCGCAATACGCGGCGCAAAATCCACCGGTCCCGGATCGGTGGCCGGAATGGCGCA
81     C A Q Y A A Q N P T G P G S V A G M A Q

301    AGACCCGGTCGCTACC GCGGCTTCCAACAACCCGATGCTCAGTACCCTGACCTCGGCTCT
101    D P V A T A A S N N P M L S T L T S A L

361    GTCGGGCAAGCTGAACCCGGATGTGAATCTGGTCGACACCCTCAACGGCGGCGAGTACAC
121    S G K L N P D V N L V D T L N G G E Y T

421    CGTTTTCGCCCCACCAACGCCGCATTCGACAAGCTGCCGGCGGCCACTATCGATCAACT
141    V F A P T N A A F D K L P A A T I D Q L

481    CAAGACTGACGCCAAGCTGCTCAGCAGCATCCTGACCTACCACGTGATAGCCGGCCAGGC
161    K T D A K L L S S I L T Y H V I A G Q A

541    GAGTCCGAGCAGGATCGACGGCACCCATCAGACCCTGCAAGGTGCCGACCTGACGGTGAT
181    S P S R I D G T H Q T L Q G A D L T V I

601    AGGCGCCCGCGACGACCTCATGGTCAACAACGCCGGTTTGGTATGTGGCGGAGTTACAC
201    G A R D D L M V N N A G L V C G G V H T

661    CGCCAACGCGACGGTGTACATGATCGATACGGTGCTGATGCCCCCGGCACAGCACCACCA
221    A N A T V Y M I D T V L M P P A Q H H H

721    CCACCACCACTAAGGAATTCC
241    H H H * G I

```

Figura 9. Secuencia del gen Rv2873 modificado, al cual le fue sustituida la secuencia del péptido señal por la secuencia del péptido señal de la proteína APA, la cual se encuentra subrayada. En color azul se encuentra marcado el sitio BamHI con el que fue clonado al vector pUC18y en color

rojo el sitio de *NdeI* con el que fue clonado al vector pIJ6021. En color verde el sitio de *EcoRI* ocupado en ambas clonaciones.

```

1      GCGGATCCATATGCATCAGGTGGACCCCAACTTGACACGTCGCAAGGGACGATTGGCGGC
1      R I H M H Q V D P N L T R R K G R L A A

61     ACTGGCTATCGCGGCGATGGCCAGCGCCAGCCTGGTGACCGTTGCGGTGCCCGCGACCGC
21     L A I A A M A S A S L V T V A V P A T A

121    CAACGCCTCAAGCAACAAGTCGACTACAGGAAGCGGTGAGACCACGACCGCGGCAGGCAC
41     N A S S N K S T T G S G E T T T A A G T

181    GACGGCAAGCCCCGGCGCCGCTCCGGGCCGAAGGTCGTCATCGACGGTAAGGACCAGAA
61     T A S P G A A S G P K V V I D G K D Q N

241    CGTCACCGGCTCCGTGGTGTGCACAACCGCGCCGGCAATGTCAACATCGCGATCGGCGG
81     V T G S V V C T T A A G N V N I A I G G

301    GGCGGCGACCGGCATTGCCGCGTGCTCACCGACGGCAACCCTCCGGAGGTGAAGTCCGT
101    A A T G I A A V L T D G N P P E V K S V

361    TGGGCTCGGTAACGTCAACGGCGTCACGCTGGGATACACGTCGGGCACCGGACAGGGTAA
121    G L G N V N G V T L G Y T S G T G Q G N

421    CGCCTCGGCAACCAAGGACGGCAGCCACTACAAGATCACTGGGACCGCTACCGGGGTCGA
141    A S A T K D G S H Y K I T G T A T G V D

481    CATGGCCAACCCGATGTCACCGGTGAACAAGTCGTTGAAATCGAGGTGACCTGTTCCCA
161    M A N P M S P V N K S F E I E V T C S H

541    CCACCACCACCACCTAAGGAATTCC
181    H H H H H * G I

```

Figura 10. Secuencia del gen Rv3763 modificado al que le fue sustituida la secuencia del péptido señal por la secuencia del péptido señal de la proteína APA, la cual se encuentra subrayada. En color rojo se encuentra marcado el sitio de *BamHI* ocupado para la clonación en el vector pUC18 y en azul el sitio de *NdeI* que fue usado para la clonación en el vector pIJ6021. En verde está marcado el sitio *EcoRI* utilizado en ambas clonaciones.

Subclonación de los genes Rv1860, Rv3763 y Rv2873 quiméricos en el vector multicopia de expresión pIJ6021.

Para poder expresar las proteínas a partir de las construcciones génicas ya hechas era necesario subclonaras en un vector de expresión multicopia que se replicara en las bacterias *S. coelicolor* y *S. lividans*, con la finalidad de poder expresar una cantidad suficiente de las proteínas para su purificación. Se escogió el vector pIJ6021 (Takano, 1995), el cual utiliza al promotor fuerte e inducible P_{tipA} . Todos los genes descritos en las secciones anteriores fueron amplificados incluyendo un sitio de *NdeI* que contiene el codón de inicio, y fueron clonados como fragmentos *NdeI-EcoRI* en el plásmido pIJ6021, dando lugar a fusiones traduccionales con el fragmento del vector que contiene el promotor P_{tipA} y el sitio de unión a ribosomas.

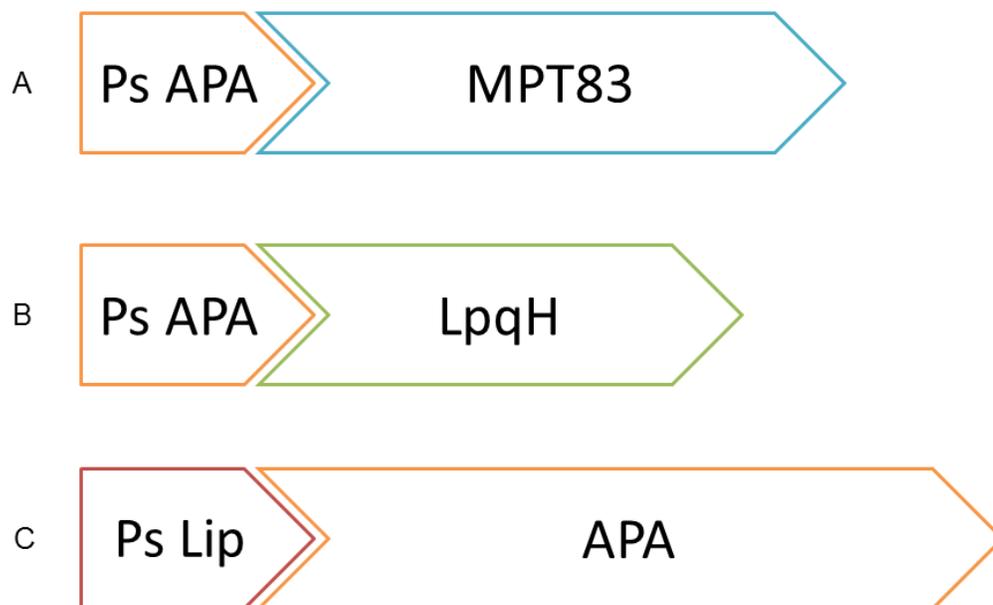


Figura 11. Ejemplo gráfico de las construcciones realizadas. En la figura A y B se muestran las proteínas MPT83 y LpqH a las que les fue sustituido su péptido señal por el de la glicoproteína APA. En la figura C se observa a la proteína APA a la que le fue cambiado su péptido señal por el de la lipasa extracelular.

Expresión y purificación de las proteínas MPT83 y LpqH quiméricas en *S. lividans*

Posteriormente se comprobó que las lipoproteínas MPT83 y LpqH a las que se les había sustituido el péptido señal por el de la glicoproteína APA se secretaron al sobrenadante (datos no mostrados), y posteriormente fueron purificadas de sobrenadante de cultivos de *S. lividans* mediante una columna de afinidad (Ni-NTA), utilizando para esto le etiqueta de seis histidinas.

En la figura 12 se muestra un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie en el que se muestran las diferentes fracciones de la purificación de MPT83 que contienen a las proteínas puras.

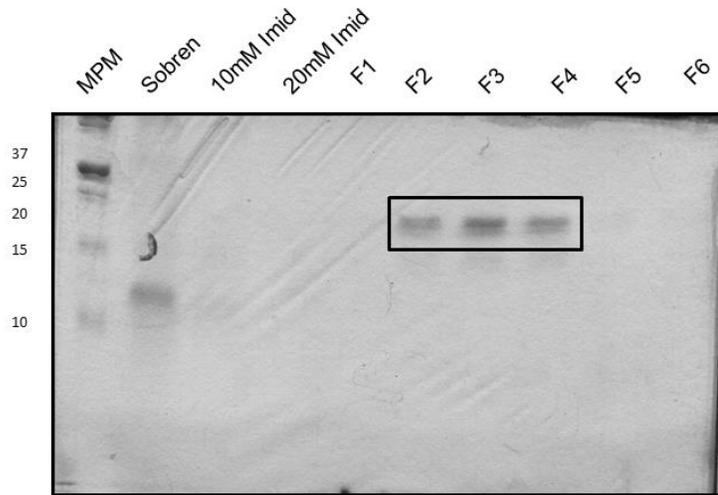


Figura 12. Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie de la purificación de MPT83 con el péptido señal de APA. La proteína puede observarse pura en las fracciones 2, 3 y 4 con un tamaño cercano a los 20 kDa (F2-F4).

A continuación en la figura 13 , se muestra un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie que muestra a la proteína LpqH quimérica en las fracciones 2, 3, 4,5 y 6.

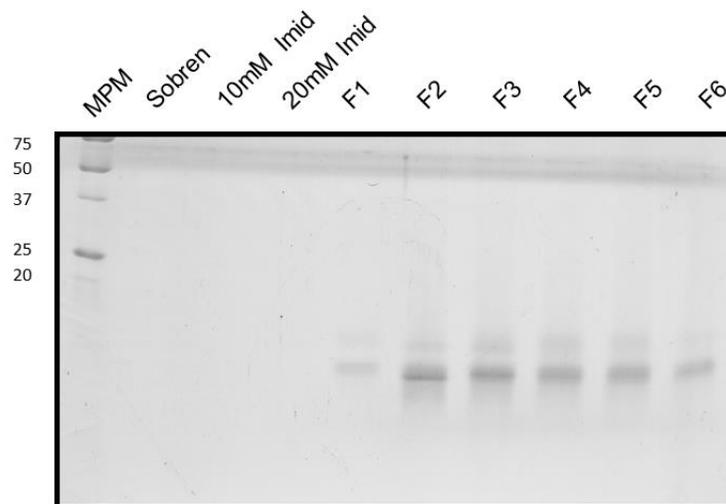


Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie de la purificación de LpqH con el péptido señal de APA. Se puede observar la proteína pura y en abundancia en las fracciones 2, 3, 4, 5 y 6 (F2-F6).

Evaluación de la glicosilación de MPT83 y LpqH con el péptido señal de APA.

Una vez que se comprobó que las proteínas LpqH y MPT83 de *M. tuberculosis* pudieron ser secretadas utilizando el péptido señal de la glicoproteína APA, se analizó si estas eran capaces de glicosilarse, a diferencia de cuando fueron secretadas mediante el péptido señal de la lipasa extracelular de *S. exfoliatus*. Esto se realizó mediante un análisis de Western blot, utilizado para la detección tanto anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra las proteínas, como la lectina concanavalina A (ConA). Como controles positivos se utilizaron las lipoproteínas silvestres purificadas tanto de membrana como las secretadas utilizando su propio péptido señal, y como control negativo las proteínas purificadas de una mutante nula Δ Sli3509 de *S. lividans* que carece del gen para la Pmt, responsable de la glicosilación de las proteínas.

En la figura 14A se muestra el Western blot de anticuerpo de la proteína MPT83. En él se puede observar en todos los carriles que la proteína ha sido identificada por el anticuerpo. En el carril 1, correspondiente a la proteína con su péptido señal nativo, podemos observar que la proteína presente en la fracción membranal tiene un tamaño de 24kDa, o sea el esperado. Por el contrario, la proteína purificada del sobrenadante (carril 2) es más chica, lo cual concuerda con lo reportado por Arista (2013), y se debe a que la proteína presente en el sobrenadante proviene de la membrana mediante la acción de proteasas que la “rasuran” de la membrana. En el carril 3 se puede observar a la proteína purificada de sobrenadante de la mutante carente de Pmt, la cual es de un tamaño ligeramente menor a la observada en el sobrenadante de la cepa silvestre debido a que la proteína no fue glicosilada. Por último, en el carril 4 es posible observar a la proteína MPT83 que fue secretada mediante el péptido señal de la proteína APA; es posible observar que esta es tan solo ligeramente menor a la MPT83 silvestre presente en la membrana, debido a que esta carece de señales de lipidación en el péptido señal, y por lo tanto no fue lipidada ni anclada a la membrana.

En la figura 14B podemos ver que tanto la proteína MPT83 purificada de la membrana (carril 1) como la de sobrenadante (carril 2) fueron detectadas por la ConA, lo que nos indica que el péptido señal nativo de lipoproteína permite que la proteína sea glicosilada. En el caso de la proteína purificada de la mutante carente de Pmt (carril 3) no se observa ninguna banda lo que nos indica la ausencia de glicosilación, como se esperaba. Por último, podemos ver que la proteína MPT83 secretada mediante el péptido señal de APA sí puede ser detectada por la

concanavalina A, lo que indica que la proteína fue glicosilada aun cuando fue secretada al medio.

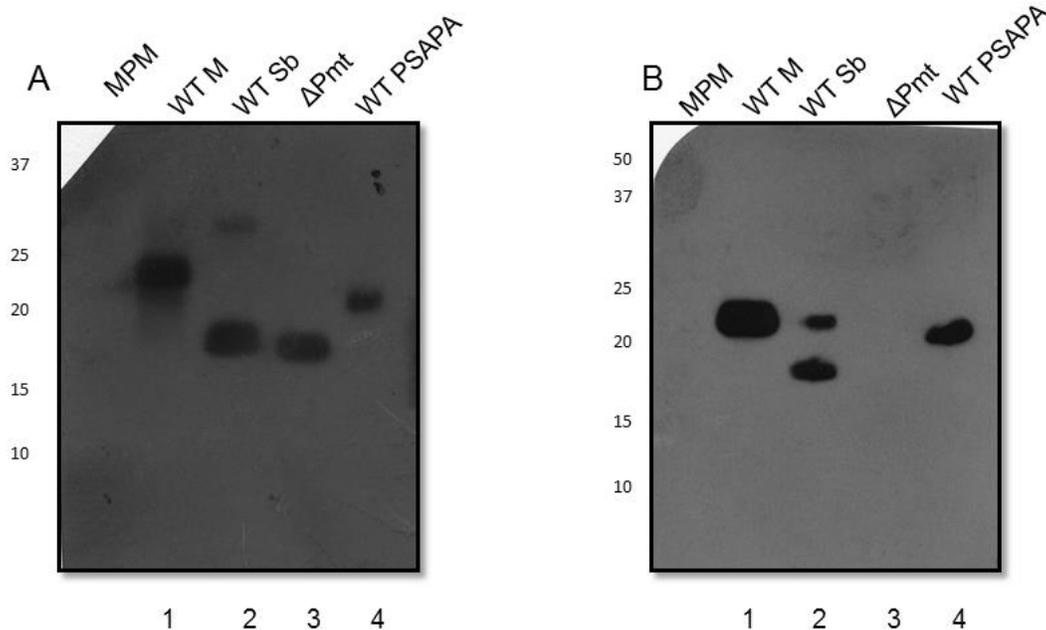


Figura 14. Western Blot para la proteína MPT83. En la figura A se observa el Western blot con anticuerpos específicos de la lipoproteína, en el que se muestran las proteínas silvestres de membrana (1) y sobrenadante (2) como controles positivos, así como la proteína purificada de la mutante Pmt como control negativo (3) y al final la proteína con el péptido señal de APA (4). En la figura B se observa el Western blot realizado con concanavalina A realizado a las muestras relacionadas a la proteína MPT83 para detectar su glicosilación, las muestras se encuentran en el mismo orden que la figura A. La lectina detectó bandas en los carriles correspondientes a los controles positivos (1 y 2) así como en la proteína quimérica (4), lo que indica que el péptido señal de APA es suficiente para conducir a MPT83 a la maquinaria de glicosilación.

La figura 15A muestra el Western blot equivalente a la figura 14A, pero para la proteína LpqH. Es posible observar un patrón similar al observado para MPT83, ya que la proteína que conserva su péptido señal nativo purificada de la fracción membranal en la cepa silvestre es la proteína más grande, y ésta corresponde a los 19kDa reportados en la literatura (carril 1). Asimismo fue posible reconocer un doblete de bandas presentes en el sobrenadante de un tamaño menor (carril 2), que provienen de la proteína rasurada de la membrana, lo cual corresponde a lo observado por Torres (2012). La proteína purificada de la membrana de la cepa mutante carente de Pmt es ligeramente más pequeña que la obtenida de la membrana de cepa silvestre (carril 3). Por último en el carril 4 se observa que la proteína LpqH secretada mediante el péptido señal de APA da el mismo doblete

que se observó en la proteína de sobrenadante que la secretada mediante su péptido señal.

En la figura 15B se muestra la detección de las mismas proteínas mediante la concanavalina A. Es posible observar que la proteína LpqH con su péptido señal nativo esta glicosilada tanto en la fracción membranal (carril 1) como en la del sobrenadante del cultivo (carril 2), aunque solo la banda superior. La proteína obtenida de la mutante Pmt no fue reconocida por la ConA lo que indica que no fue glicosilada, como se esperaba (carril 3). Por otro lado, la proteína LpqH secretada mediante el péptido señal de APA sí fue reconocida por la concanavalina A (carril 4), lo que indica que fue secretada al medio y glicosilada

En resumen, estos dos experimentos demuestran que el péptido señal de la proteína APA es suficiente para que las proteínas MPT83 y LpqH sean secretadas y reconocidas por la maquinaria de glicosilación, sin necesidad de anclarse a la membrana como lipoproteínas. Esto contrasta con la observación previa obtenida con el péptido señal de la lipasa extracelular, que permitió la secreción de MPT83 y LpqH, pero no su glicosilación (Torres, 2012; Arista, 2013).

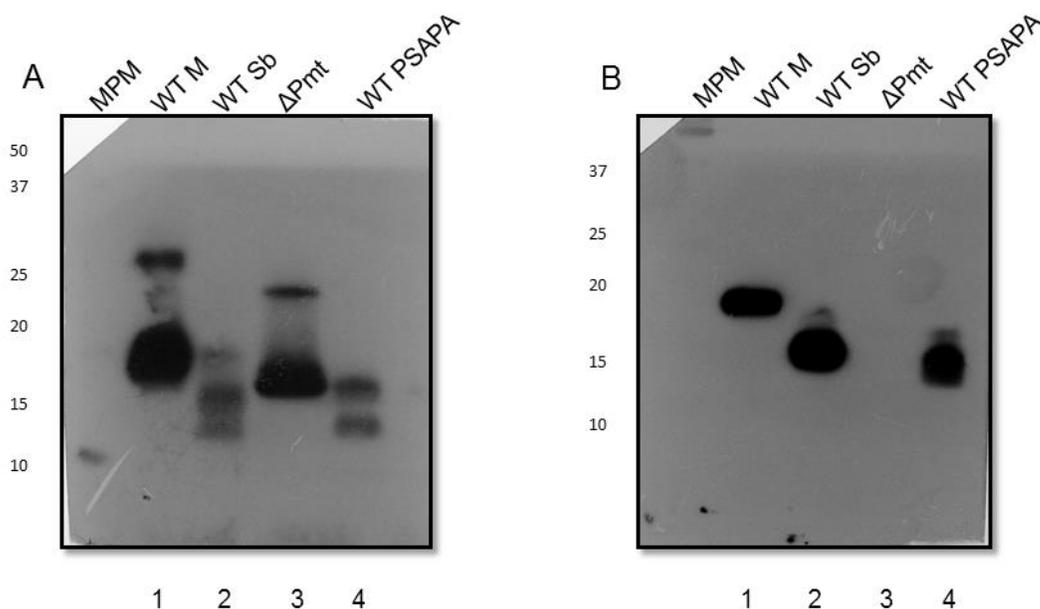


Figura 15. Western Blot para la proteína LpqH. En la figura A se observa el Western blot con anticuerpos policlonales que reconocen a la lipoproteína LpqH. Como controles positivos se encuentran las muestras puras de membrana (1) y de sobrenadante (2) que conservan su propio péptido señal, como control negativo fue utilizada la proteína purificada de la cepa Δ pmt (3) y posteriormente la proteína quimérica (4) . En la figura B se observa el western blot realizado con la lectina realizado a las muestras de la proteína LpqH. El orden es el mismo al de la figura A. La señal se limita a los controles positivos correspondientes a las proteínas que conservan su péptido

señal original (1 y 2) y a la proteína que contiene el péptido señal de APA (4) indicando que LpqH puede glicosilarse con el péptido señal de APA.

Evaluación del efecto del péptido señal de la lipasa extracelular de *S. exfoliatus* M11 sobre la glicosilación de APA.

Dados los resultados anteriores, y su contraste con las observaciones de Torres (2012) y Arista (2013), decidimos analizar si la proteína APA seguiría glicosilándose en el caso de que su péptido señal fuera sustituido por el de la lipasa extracelular. Para responder a esta pregunta el péptido señal de APA fue sustituido por el de la lipasa y fue expresada en la misma forma que las proteínas MPT83 y LpqH, a partir del vector pIJ6021. Como control se clonó también el gen de la proteína APA silvestre; en ambos casos se adicionó una etiqueta de seis histidinas en el extremo carboxilo-terminal, lo cual permitió la purificación de las proteínas a partir del sobrenadante. La proteína APA silvestre se expresó y purificó adicionalmente de la cepa de *S. lividans* carente de Pmt, como control negativo. Los resultados se muestran en la figura 16. Es posible observar que la proteína APA fue secretada eficientemente al medio, tanto con su propio péptido señal como con el péptido señal de la lipasa (Fig. 16A, carriles 2 y 3); por otro lado en el caso de la proteína APA expresada en la mutante sin Pmt, la proteína se encontró mayoritariamente degradada, lo cual es consistente con la observación de que la glicosilación la protege de la degradación por proteasas como se observa en el carril 1 (Córdova-Dávalos et al., 2014).

En la figura 16B podemos observar la detección mediante la concanavalina A. La proteína expresada en la mutante sin Pmt (carril 1) no reaccionó a la concanavalina A, como se esperaba; por otro lado la proteína APA secretada mediante su propio péptido señal reaccionó a la lectina (carril 2) al igual que APA secretada mediante el péptido señal de la lipasa (carril 3). Este resultado nos indica que la proteína APA es reconocida por la maquinaria de glicosilación independientemente del péptido señal por medio del cual se haya secretado, y por lo tanto presenta un comportamiento diferente al observado para las lipoproteínas MPT83 y LpqH, las cuales no se glicosilaron cuando fueron secretadas mediante el péptido señal de la lipasa extracelular.

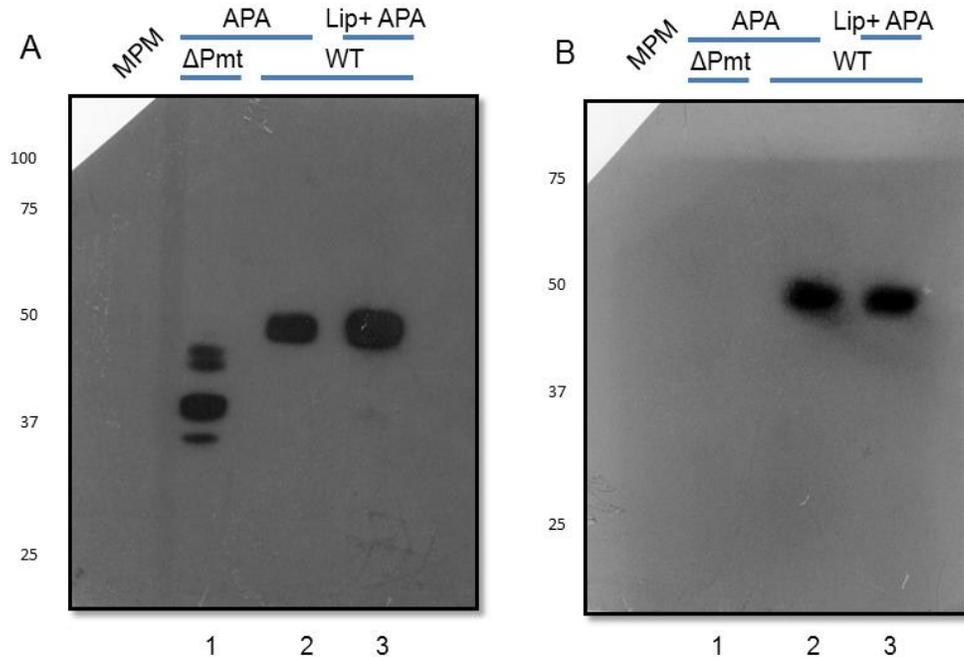


Figura 16. Western Blot para la proteína APA que contiene el péptido señal de la lipasa extracelular. En la figura A se observa el western blot con el anticuerpo 6A3 específico para la glicoproteína APA, este reconoce a la proteína APA purificada de la mutante Pmt (1) usada como control negativo, a la proteína APA silvestre que fue usada como control positivo (2) y a la que le fue sustituido su péptido señal por el de la lipasa (3). En la figura B se observa el western blot con la lectina realizado a las muestras de la proteína APA. La lectina reaccionó con las muestras correspondientes al control positivo (2) y a la quimérica (3) indicando que aun sin su péptido señal nativo APA se glicosila.

Análisis del péptido señal de la proteína APA.

Los resultados anteriores muestran que la glicosilación de proteínas es afectada por el tipo de péptido señal empleado para la secreción, ya que en el caso de las proteínas MPT83 y LpqH, estas solamente se glicosilaron cuando son secretadas mediante el péptido señal de la proteína APA o cuando son secretadas y ancladas a la membrana mediante su propio péptido señal de lipoproteínas, pero no cuando son secretadas mediante el péptido señal de la lipasa. Con el objeto de profundizar en las características del péptido señal de la proteína APA, y dado que Marrichi et al. (2008) reportaron que APA es secretada por medio del sistema Tat en *E. coli*, se decidió realizar análisis bioinformáticos con los programas PRED-TAT (<http://www.compgen.org/tools/PRED-TAT/>) y TatP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>) para poder esclarecer si la maquinaria de secreción influye en la glicosilación de las proteínas.

La figura 17 muestra el resultado del análisis con el programa TatP y la figura 18 el análisis con el programa PRED-TAT.

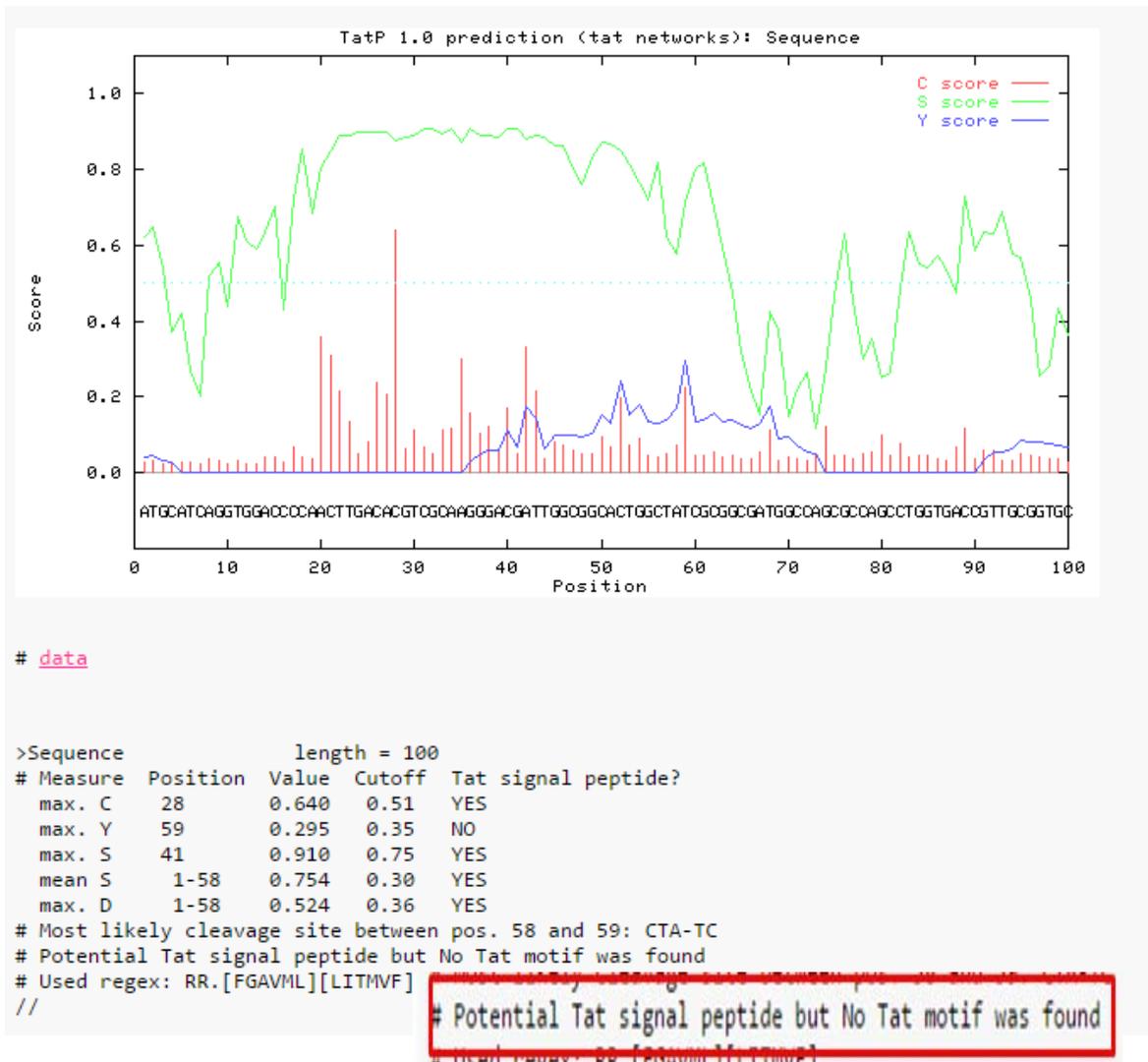
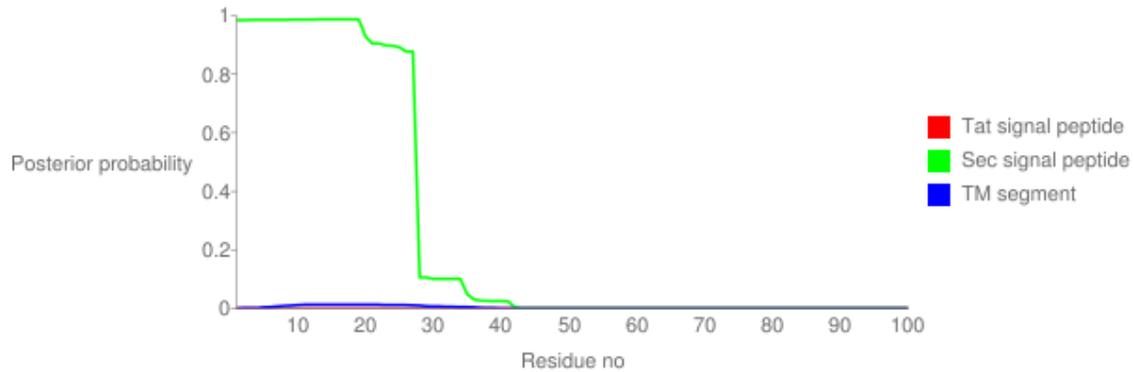


Figura 17. Análisis realizado por el programa TAT P, que predice el péptido señal de APA como un potencial sustrato del sistema Tat debido a las características presentes en el péptido pero sin el motivo canónico (RR). El programa predice dos probables sitios de corte de la peptidasa señal en el sitio 59 del gen (max. Y value) y en el sitio 28 (max. C value).

PRED-TAT

Submit one or more sequences (up to 500) in fasta format



Sec signal peptide predicted. Most likely cleavage site: 1 - 27 [ACA-CG]

Reliability score: 0.979

Figura 18. Análisis del péptido señal por parte del programa PRED-TAT, que otorga un alto puntaje al péptido señal de APA para ser considerado como un sustrato Sec. El sitio predice el sitio de corte del péptido señal en la posición 27 de la secuencia génica.

El resultado de ambos análisis no fue claro, ya que como se muestra en la figura 17 el programa TatP predice a APA como un sustrato del sistema Tat, aunque sin el motivo canónico de las dos argininas (RR). Por otro lado el programa PRED-TAT predijo contundentemente que el péptido señal era dirigido a la maquinaria del sistema Sec (Fig. 18). Ambos resultados eran contradictorios, por lo que se decidió abordar esta pregunta de forma experimental.

Expresión de la proteína APA en cepas mutantes carentes del sistema Tat.

En nuestro laboratorio se contaba con la cepa mutante de *S. coelicolor*, IB78 la cual tiene mutados los genes que corresponden al poro de secreción y la proteína que reconoce el péptido señal en la maquinaria de secreción Tat, es decir es una mutante nula $\Delta tatAC$, obtenida por recombinación a partir de la cepa silvestre M145 (Montserrat Buendía, comunicación personal). Para este experimento se analizaron no solamente las proteínas de sobrenadante, sino también extractos

crudos del micelio de ambas cepas, dada la posibilidad de encontrar a la proteína APA dentro de la célula, en caso de que no pudiera ser secretada, además del vector vacío como control negativo. Para la detección se utilizó el anticuerpo monoclonal 6A3, el cual es específico para la proteína APA (Lara et al., 2004); el Western blot se muestra en la figura 19.

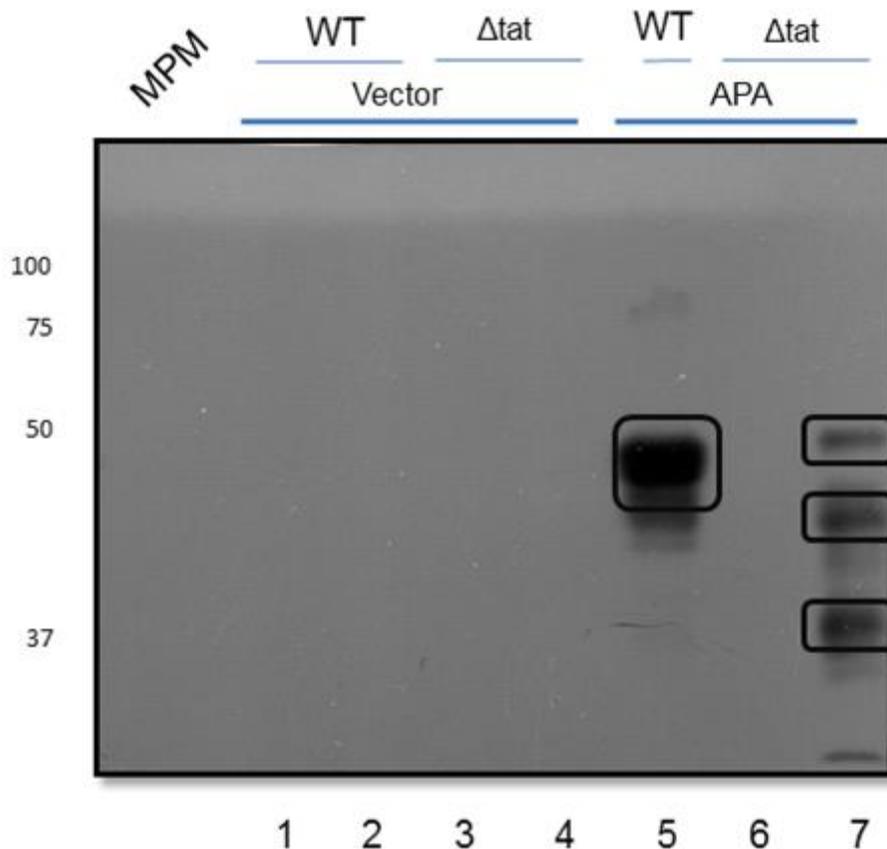


Figura 19. WB con anticuerpo 6A3 sobre muestras de APA en la mutante IB78. Las muestras se realizaron con extractos crudos. Los controles negativos correspondientes al vector vacío en la cepa silvestre y en la mutante Tat tanto en membrana (1 y 3) como en sobrenadante (2 y 4) respectivamente, como control positivo fue colocado la proteína APA de la cepa silvestre (5) y en los siguientes carriles fue colocado la fracción celular (6) y la del sobrenadante (7) obtenidas de la mutante IB78. En el carril 5 se observa a APA en cantidad abundante a una altura de 47kDa, mientras que en el carril 7 se observan 3 bandas correspondientes a una secreción anormal de la proteína APA a 48kDa, 42-43 kDa y 38kDa de forma correspondiente.

Es posible observar que el anticuerpo no detectó ninguna proteína ni en el extracto celular o el sobrenadante de la cepa silvestre M145, ni en el extracto celular o el sobrenadante de la cepa IB78, cuando éstas llevaban solamente el vector vacío pIJ6021 (carriles 1, 2, 3 y 4, respectivamente). Por otro lado, la

proteína APA fue detectada por el anticuerpo solamente en dos muestras, que corresponden a los sobrenadantes de la cepa silvestre M145 y de la cepa IB78. En el caso de la cepa silvestre la banda observada corresponde a la proteína APA resultante de una secreción normal en la cepa silvestre (carril 6) mientras que en el caso de la cepa mutante es posible observar tres bandas de menor intensidad; dos de estas son más pequeñas y podrían corresponder a productos de degradación proteica (carril 8). En ninguno de los dos extractos celulares (carriles 5, y 7) se observó presencia de la proteína APA, es decir que la proteína APA sí fue secretada pero se observó una secreción anormal por parte de la mutante IB78.

Aunque el resultado no fue lo suficientemente claro, podemos observar que la secreción de APA en la cepa IB78 no fue comparable con la encontrada en la cepa silvestre M145. Es posible observar que la banda de mayor tamaño del carril 7 migra ligeramente menos que la banda del carril de la cepa silvestre (carril 5), probablemente porque su péptido señal no fue escindido o fue procesada en otro sitio durante la secreción. También es claro que la cantidad de proteína detectada en entre ambas cepas difiere en gran medida, dado que la banda correspondiente a la cepa silvestre es significativamente más intensa que observada en la cepa IB78. Por último cabe resaltar que existen diferencias claras en el grado de degradación de la proteína, ya que aunque la proteína de la cepa silvestre se nota ligeramente degradada (debido a la gran cantidad de proteasas que secreta *S. coelicolor* al medio), es mucho mayor la degradación observada en la proteína de la mutante carente del sistema Tat. Cabe resaltar que la proteína APA no fue encontrada en ninguna de las fracciones celulares, como se esperaría si es que no pudiera ser secretada; podemos hipotetizar que la proteína APA podría haber salido de las células por otro sistema de secreción o que debido al alto grado de expresión de la proteína, esta salió de forma anormal de la célula, debido a que su principal sistema secretor estaba afectado.

Confirmación del péptido señal de la lipasa extracelular de *S. exfoliatus* M11 como un sustrato Sec.

Dados los reportes de Torres (2012) y Arista (2013) en los que se comprobó que el péptido señal de la lipasa de *S. exfoliatus* M11 hacía secretables las lipoproteínas pero estas no se glicosilaban, y la observación de que la proteína APA sí era glicosilada cuando era secretada mediante dicho péptido señal, consideramos necesario comprobar experimentalmente que dicho péptido señal es efectivamente sustrato del sistema Sec.

Para esto se utilizó de nuevo la cepa IB78 ($\Delta tatAC$) al igual que la cepa silvestre M145 de *S. coelicolor* para comprobar si la lipasa era secretada aun en la ausencia del sistema de secreción Tat. Para dicha comprobación se introdujo a ambas cepas el plásmido pB104, el cual contiene al gen de la lipasa extracelular clonado en el vector pIJ6021. Fueron realizadas dos pruebas, una para detectar la presencia de la lipasa en el sobrenadante por medio de Western blot y la otra para comprobar la presencia de actividad enzimática de lipasa. Reportes anteriores demuestran que la lipasa extracelular de *S. exfoliatus* M11 es secretada en grandes cantidades (Pérez et al., 1993; Servín-González et al., 1997), por lo que es posible identificar a la proteína directamente en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomasie. En la figura 20 es posible observar que la proteína de 27 kDa fue sobreexpresada y secretada adecuadamente tanto en la cepa silvestre (carril 3), como en la cepa IB78 (carril 4); la banda correspondiente a la lipasa no fue observada en ninguna de las dos cepas con el vector vacío (carriles 1 y 2). Este resultado indica que la lipasa es efectivamente secretada por el sistema Sec.

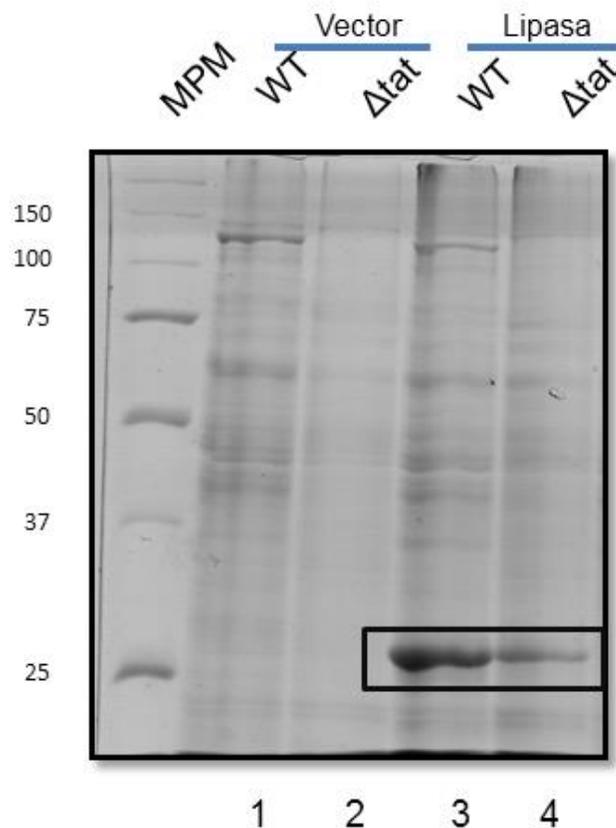


Figura 20. Gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie con las muestras de la lipasa extracelular. El recuadro marca la lipasa sobreexpresada en la cepa silvestre (3) y en la mutante Tat (4). Mientras que en los controles negativos correspondientes al vector vacío en la cepa silvestre (1) y mutante (2) se encuentra ausente la misma banda.

Posteriormente para confirmar que la banda observada en abundancia en el gel teñido con azul de Coomassie fuera en realidad la lipasa extracelular se realizó un Western blot con los mismos sobrenadantes, el cual fue revelado con anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra la lipasa de *S. exfoliatus* M11. En la figura 21 se muestra la placa resultante del Western blot, donde es posible observar a la lipasa secretada en cantidades similares y sin degradaciones importantes tanto por la cepa silvestre M145 como por la mutante IB78. Este resultado nos indica que la lipasa es un sustrato Sec, dado que la secreción de esta proteína es normal en la mutante carente del sistema Tat.

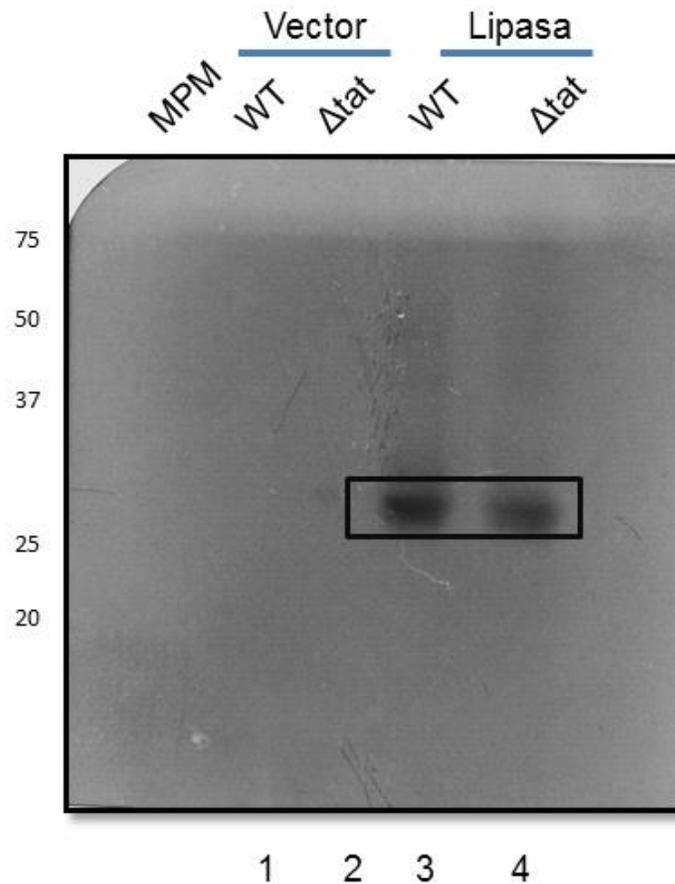


Figura 21. Western Blot con anticuerpo policlonal que reconoce a la lipasa. Como controles negativos fueron colocadas las muestras con el vector vacío de la cepa silvestre (1) y de la cepa que carece del sistema de secreción Tat (2). Las bandas que fueron reconocidas por el anticuerpo están enmarcadas y corresponden a la lipasa de la cepa silvestre (3) usada como control positivo y la lipasa secretada por la mutante Δ tat (4).

Por último, para comprobar que la cantidad de lipasa secretada por la mutante era equivalente a la silvestre fue realizada una prueba de actividad usando como sustrato *p*-nitrofenil-laurato. Se realizaron tres cultivos

independientes para cada una de las cepas y se determinó la actividad volumétrica en el sobrenadante.

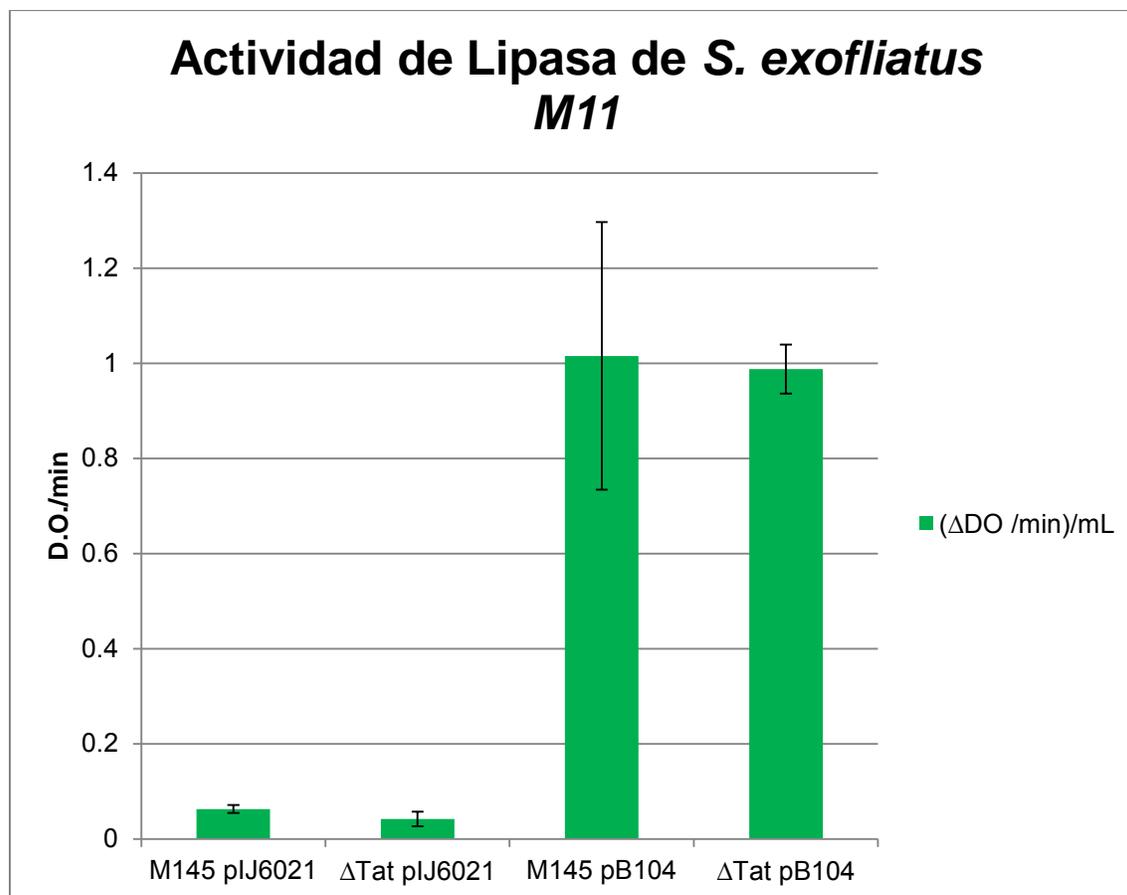


Figura 22. Actividad de Lipasa extracelular de *S. exfoliatus* M11. En el gráfico se localiza el valor correspondiente al cambio en la densidad óptica por minuto en cada mililitro de muestra de p-nitrofenil-laurato. Las dos primeras barras corresponden a la cepa silvestre y la mutante tat con el vector pJ6021 como control negativo y posteriormente las bandas que corresponden a la cepa silvestre y la mutante que contenían el plásmido pB104.

En la figura 22 podemos observar los resultados de la determinación de actividad enzimática de lipasa. Es posible observar que los sobrenadantes de las cepas que contienen el vector vacío tienen solamente una actividad basal debida a lipasas propias de la célula que se expresan en nivel bajo. Por su parte, tanto en la cepa silvestre como en la mutante que contienen el plásmido pB104 se observa una actividad enzimática de lipasa elevada en ambas. Una prueba de *t* de Student confirmó que no existe diferencia significativa entre la actividad observada en sobrenadantes de la cepa IB78 y la cepa silvestre ($p=0.05$). Con base a los experimentos anteriores podemos afirmar que la lipasa de *S. exfoliatus* M11 es secretada por el sistema Sec y conserva su actividad.

Discusión

La glicosilación en las proteínas es una importante modificación en cuestiones inmunogénicas, ya que se ha demostrado que la ausencia de esta modificación afecta gravemente el grado de infección de ciertas especies patógenas como *M. tuberculosis* (Horn, et al. 1999). Es por eso que el estudio de este tipo de proteínas es indispensable.

En estudios anteriores se demostró que lipoproteínas de *M. tuberculosis* como LpqH y MPT83 podían ser expresadas de manera heteróloga en una bacteria no patógena como *S. lividans*, la cual era capaz de glicosilarlas. Estas proteínas eran ancladas a la membrana, lo cual indicaba que *S. lividans* era capaz de reconocerlas como lipoproteínas, lo cual representaba una desventaja metodológica, ya que al estar ancladas a la membrana, su purificación y análisis es más difícil. Por esta razón se sustituyó el péptido señal silvestre de lipoproteína, que contiene las señales de anclaje a la membrana, por uno de secreción de una proteína exportada al medio, que fuera nativo de *Streptomyces* y que conservara la característica de ser un sustrato del sistema Sec, ya que según el modelo de VanderVen et al. (2005) es necesaria la secreción por este sistema para que las proteínas se glicosilen. Se escogió el péptido señal de la lipasa extracelular de *S. exfoliatus* M11, y los resultados no fueron los esperados ya que estas proteínas quiméricas no eran glicosiladas por la célula (Torres, 2012 y Arista, 2013). Adicionalmente las proteínas observadas en el sobrenadante eran de un tamaño menor al predicho, indicando cierto grado de proteólisis.

En el presente trabajo fueron estudiadas las mismas lipoproteínas, LpqH y MPT83 de *M. tuberculosis*, solo que ahora fue sustituido su péptido señal por el de la glicoproteína APA, también de *M. tuberculosis*. Esta glicoproteína es considerada un caso especial en el glicoproteoma de *M. tuberculosis* ya que es la única glicoproteína que no es también lipoproteína. Estas proteínas fueron directamente secretadas al sobrenadante y no fueron encontradas en la membrana, como se esperaba, ya que el péptido señal de APA es un péptido carente de lipobox, al igual que el de la lipasa extracelular. Por lo tanto, el péptido señal de la proteína APA, cuando sustituye al péptido señal nativo de una lipoproteína, es suficiente para que ésta sea exportada al medio. Esto concuerda con la observación de Lara et al (2004) en el sentido de que la proteína APA es exportada al medio eficientemente por *S. lividans*.

En este trabajo observamos que, cuando a LpqH y MPT83 se les sustituyó su péptido señal por el de APA, ambas lipoproteínas se secretaron al medio, y su tamaño fue parecido al de la proteína membranal con el péptido señal nativo; es

decir que las proteínas se secretaron completas. Cabe destacar que el tamaño de las lipoproteínas quiméricas era ligeramente menor con respecto a las silvestres ya que no eran lipidadas por la célula para anclarlas a la membrana. Cabe destacar que los experimentos de Western blot revelaron que, contrario a lo que ocurre con el péptido señal de la lipasa, tanto LpqH como MPT83 secretadas mediante el péptido señal de APA fueron reconocidas por la ConA, indicando que habían sido glicosiladas. Esto nos indica que el péptido señal de APA, a diferencia del de la lipasa extracelular, fue suficiente para poder conducir a las lipoproteínas a la maquinaria de glicosilación, y que posee alguna característica interna de la cual el péptido señal de la lipasa carece.

El resultado anterior nos indica que las lipoproteínas que conservan su péptido señal original necesitan estar ancladas a la membrana celular para que puedan ser glicosiladas; esto es congruente con el hallazgo de Mohiman, et al. (2012), quien describió que en *Corynebacterium glutamicum* es necesario que la maquinaria de glicosilación (Pmt) interaccione con la maquinaria de lipidación (Lnt) para que haya glicosilación. Sin embargo, en este trabajo demostramos que el péptido señal de APA posee una señal interna que conduce a las proteínas hacia la maquinaria de glicosilación aunque estas no sean lipoproteínas. Esta hipótesis es congruente con los datos obtenidos por Córdova-Dávalos et al (2014), que demuestran que en *Streptomyces* la enzima Pmt no es dependiente de una interacción con Lnt para ser funcional, como sí ha sido demostrado para *C. glutamicum*. Sin embargo, esto no elimina el hecho de que están estrechamente relacionadas las maquinarias que producen ambas modificaciones, pues la inmensa mayoría de glicoproteínas conocidas de actinomicetos son lipoproteínas (González-Zamorano, et al. 2009).

Dados los resultados anteriores, resultaba interesante construir una proteína APA quimérica que fuera secretada mediante el péptido señal de la lipasa extracelular, y determinar si dejaba de glicosilarse. El resultado de esta sustitución del péptido señal fue que la proteína APA quimérica sí se glicosilaba, pues fue reconocida por la ConA. Este resultado igualmente contrasta con lo reportado por Torres (2012) y Arista (2013) quienes describieron que las lipoproteínas con el péptido señal de la lipasa no eran glicosiladas por la célula. Esto podría deberse a que la lipasa no es una proteína que se glicosile, por lo que su péptido señal no tendrían las características para conducir a la proteína a la maquinaria de glicosilación. Dado que el péptido señal de la lipasa no es suficiente para conducir a otras proteínas a la maquinaria de glicosilación, el hecho de que APA sí sea glicosilada cuando es secretada con dicho péptido señal indica que muy probablemente existen motivos internos en la proteína que la llevan a esta misma maquinaria independientemente del péptido señal. Este resultado indica que APA

es una proteína especial ya que probablemente contiene señales tanto en el péptido señal como en la proteína madura que la conducen a la maquinaria de glicosilación.

Para explorar sobre las posibles diferencias entre el tipo de péptido señal de la proteína y el de la lipasa extracelular se realizó un análisis bioinformático con dos programas de predicción en línea que utilizan algoritmos completamente diferentes. El programa PRED-TAT (<http://www.compgen.org/tools/PRED-TAT/>; Bagos, et al. 2010) otorgó un alto puntaje al péptido señal de APA para ser considerado como un sustrato Sec; por otro lado el programa TatP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>; Bendtsen, et al. 2005) lo identificó como un sustrato Tat pero sin el motivo característico de las dos argininas. Esta incongruencia fue encontrada de igual forma en el análisis del péptido señal de la lipasa extracelular, ya que PRED-TAT lo identificó como un sustrato Sec y el programa TatP como uno Tat. Analizando más a fondo las predicciones de ambos programas fue posible observar que el programa PRED-TAT identificaba los sitios de corte por la peptidasa señal tal cual fueron reportados por la literatura.

Ante esta incertidumbre en la predicción, se realizaron las comprobaciones experimentales sobre el tipo de péptido señal de la proteína APA y la lipasa extracelular. Ambas proteínas fueron expresadas tanto en la cepa silvestre M145 como en la mutante IB78 que carece de las proteínas TatA y TatC. En el caso de la lipasa extracelular, ésta fue claramente comprobada como un sustrato Sec, ya que ante la ausencia de la maquinaria de secreción Tat ésta se secretaba en una cantidad similar a la silvestre y además conservaba su actividad. Por otro lado, en el caso de APA el resultado no fue claramente concluyente; aunque se observaron bandas en el carril correspondiente al sobrenadante crudo de la cepa IB78 éstas mostraron diferencias con respecto al control positivo, pues la intensidad de las mismas se encontraba disminuida y aparentemente una parte de la proteína se encontraba degradada; fue posible incluso observar un banda correspondiente a un tamaño ligeramente mayor que la observada en la cepa silvestre, indicando que probablemente una fracción de la proteína conservaba el péptido señal. En todo caso, es evidente que la secreción de la proteína APA por la mutante IB78 no fue normal, indicando que probablemente sea secretada por el sistema Tat. El hecho de que se observen bandas correspondientes a APA en el sobrenadante de la mutante podría indicar que también pudiera secretarse con menor eficiencia por otro sistema que no es Tat, lo cual incluso podría ser facilitado por el hecho de que existe una sobreproducción de la proteína las condiciones experimentales empleadas. En base a este par de experimentos podemos decir que el programa PRED-TAT fue más acertado debido a que coincidió con el ensayo experimental de que la lipasa extracelular es un sustrato Sec, como se pensaba.

Con base al resultado anterior que confirma a la lipasa como un sustrato Sec suponemos que no todos los péptidos señales que conducen a esta maquinaria de secreción asegurarán la glicosilación de la proteína aunque es muy probable que la maquinaria de glicosilación se encuentre asociada al sistema de secreción Sec ya que las lipoproteínas de *M. tuberculosis* que son glicosiladas son sustrato Sec. En el caso específico de APA podría tratarse de un sustrato Tat (debido su secreción anormal en la mutante IB78) por lo que la interacción de la maquinaria de glicosilación con el sistema Tat podría considerarse una excepción, o tal vez un complemento al modelo de VanderVen et al (2005). Pero además, APA es considerado un caso especial en el grupo de las glicoproteínas, porque es la única secretada al medio en *M. tuberculosis*, esto debido probablemente a que la proteína interacciona con posibles motivos internos en el péptido señal y en la proteína madura directamente con la maquinaria de glicosilación.

Conclusiones

La proteína APA es un antígeno importante de *M. tuberculosis* y presenta posibles características especiales que la convierten en un blanco importante para su estudio, dado que es la única proteína glicosilada que no es lipoproteína del glicoproteoma de la micobacteria. En este trabajo fue resaltado el papel del péptido señal de esta glicoproteína en el direccionamiento a la maquinaria de glicosilación.

Así mismo fue comprobado que las lipoproteínas de *M. tuberculosis* como LpqH y MPT83 cuando conservan su péptido señal necesitan ser secretadas por el sistema de secreción Sec y anclarse a la membrana para que puedan ser glicosiladas, esto debido probablemente a una interacción entre la máquina de secreción y la de glicosilación. Aunque la secreción por el sistema Sec no asegura que la proteína sea conducida al sistema de glicosilación.

Sin embargo, la glicoproteína APA podría tratarse de una excepción debido a que esta se secreta al medio, probablemente por otro sistema de secreción como Tat. En este trabajo los resultados nos hacen especular acerca de una probable señal proveniente tanto del péptido señal como de la proteína madura que dirige directamente a la proteína a la maquinaria de glicosilación, ya que el péptido señal fue suficiente para conducir a las lipoproteínas a la maquinaria e inclusive la propia APA fue glicosilada con un péptido señal ajeno, que anteriormente no había sido capaz de dirigir a las mismas lipoproteínas a la misma maquinaria.

Perspectivas

Para poder esclarecer el tipo de péptido señal que presenta APA, es necesario realizar un experimento donde pueda compararse la secreción de APA en una cepa que tenga temporalmente bloqueada la secreción por medio del sistema de secreción Sec con la cepa que tiene mutado el sistema Tat. Además de analizar individualmente las proteínas secretadas por la mutante Tat que fueron reconocidas por el anticuerpo 6A3. Ya que el comprobar que APA es un sustrato Tat nos haría sospechar del mecanismo de glicosilación de la misma.

Así mismo es necesario comprobar si un sustrato Tat confirmado en *Streptomyces* spp. como lo es la agarasa es capaz de secretar igualmente a las lipoproteínas de *M. tuberculosis* y además conducir las a la maquinaria de glicosilación.

También será necesario realizar un análisis por masas (MALDI-TOF) de la lipoproteínas que contenían el péptido señal de la proteína APA, y compararlas con las lipoproteínas que contengan su péptido señal nativo, para poder observar si el patrón de glicosilación cambia o si la proteína secretada por el péptido señal de APA está completa.

Por último, es imprescindible realizar pruebas serológicas (ELISA) con las proteínas puras en muestras de pacientes que padezcan la enfermedad, para evaluar un probable reconocimiento de las proteínas por parte del sistema inmune, primero en animales modelo y por último en humanos. Por último deben compararse los resultados con las muestras purificadas con su péptido señal nativo.

Referencias.

- Alcock F, Baker MA, Greene NP, Palmer T, Wallace MI, Berks BC. 2013. Live cell imaging shows reversible assembly of the TatA component of the twin-arginine protein transport system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(38).
- Anné J, Maldonado B, Van Impe J, Van Mellaert L, Bernaerts K. 2012. Recombinant protein production and streptomycetes. *J Biotechnol.* 158(4):159-67.
- Arista Carrera I. 2012. Clonación, expresión y glicosilación de la lipoproteína antigénica MPT83 (Rv2873) de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*. Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Bagos PG, Nikolaou EP, Liakopoulos TD, Tsirigos KD. 2010. Combined prediction of Tat and Sec signal peptides with hidden Markov models. *Bioinformatics.* 26(22):2811-7. (<http://www.compgen.org/tools/PRED-TAT/>)
- Bendtsen JD, Nielsen H, Widdick D, Palmer T, Brunak S. 2005. Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics.* 6:167. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>)
- Benoit SL, Maier RJ. 2014. Twin-arginine translocation system in *Helicobacter pylori*: TatC, but not TatB, is essential for viability. *MBio.* 5(1)
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 417(6885):141-7.
- Berks BC. 1996. A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors?. *Mol Microbiol.* 22(3):393-404.
- Berks BC, Palmer T, Sargent F. 2005. Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr Opin Microbiol.* 8(2):174-81.
- Bibb M. 1996. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology.* 142 (Pt 6):1335-44.

- Binda E, Marcone GL, Berini F, Pollegioni L, Marinelli F. 2013. *Streptomyces* spp. as efficient expression system for a D,D-peptidase/D,D-carboxypeptidase involved in glycopeptide antibiotic resistance. BMC Biotechnol. 13:24.
- Binnie C, Cossar JD, Stewart D. 1997. Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. Trends in Biotechnology. Vol 15, Issue 8, Aug 1997: 315–320.
- Brandt L, Feino Cunha J, Weinreich Olsen A, Chilima B, Hirsch P, Appelberg R, Andersen P. 2002. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. Infect Immun. 70(2):672-8.
- Braun V & Rehn K. 1969. Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the *E. coli* cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure. Eur J Biochem. 10(3):426-38.
- Brosch R, Gordon SV, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Soravito C, Barrell BG, Cole ST. 1998. Use of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics. Infect Immun. 66(5):2221-9.
- Brundage L, Hendrick JP, Schiebel E, Driessen AJ, Wickner W. 1990. The purified *E. coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. Cell. 62(4):649-57.
- Centers for Disease Control and Prevention. The role of BCG vaccine in the prevention and control of tuberculosis in the United States: a joint statement by the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis and the Advisory Committee on Immunization Practices. MMWR 1996;45.
- Chandra G & Chater KF. 2014. Developmental biology of *Streptomyces* from the perspective of 100 actinobacterial genome sequences. FEMS Microbiol Rev. 38(3):345-79.
- Chater K, Biró S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. 2010. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. FEMS Microbiol. Rev 34. 171–198.
- Coddeville B, Wu SW, Fabre E, Brassart C, Rombouts Y, Burguière A, Kremer L, Khoo KH, Ellass-Rochard E, Guérardel Y. 2012. Identification of the *Mycobacterium marinum* Apa antigen O-mannosylation sites reveals important glycosylation variability with the *M. tuberculosis* Apa homologue. J Proteomics. 75(18):5695-705.

- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaiia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393(6685):537-44.
- Córdova-Dávalos LE. 2009. Glicosilación de proteínas en bacterias patógenas. *El Residente*. Vol. IV Número 3-2009: 105-110.
- Córdova-Dávalos LE, Espitia C, González-Cerón G, Arreguín-Espinosa R, Soberón-Chávez G, Servín-González L. 2014. Lipoprotein N-acyl transferase (Lnt1) is dispensable for protein O-mannosylation by *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiol Lett*. 350(1):72-82.
- De Keersmaecker S, Van Mellaert L, Schaerlaekens K, Van Dessel W, Vrancken K, Lammertyn E, Anné J, Geukens N. 2005. Structural organization of the twin-arginine translocation system in *Streptomyces lividans*. *FEBS Lett*. 579(3):797-802.
- Diaz-Silvestre H, Espinosa-Cueto P, Sanchez-Gonzalez A, Esparza-Ceron MA, Pereira-Suarez AL, Bernal-Fernandez G, Espitia C, Mancilla R. 2005. The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria. *Microb Pathog*. 39(3):97-107.
- Dittmar J, Schlesier R, Klösigen RB. 2014. Tat transport of a Sec passenger leads to both completely translocated as well as membrane-arrested passenger proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1843(2):446-53.
- Doherty TM & Andersen P. 2005. Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress. *Clin Microbiol Rev*. 18(4):687-702.
- Economou A. 1999. Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol*. 7(8):315-20.
- Economou A, Wickner W. 1994. SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell*. 78(5):835-43.
- Espitia C, Servín-González L, Mancilla R. 2010. New insights into protein O-mannosylation in actinomycetes. *Mol Biosyst*. 6(5):775-81.

- Fine, P. 1989. The BCG story: lessons from the past and implications for the future. *Rev Infect Dis.* 1989 Mar-Apr;11 Suppl 2:S353-9.
- Fine, P. 1995. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet.* 346(8986):1339-45.
- Gamboa-Suasnavart RA, Valdez-Cruz NA, Cordova-Dávalos LE, Martínez-Sotelo JA, Servín-González L, Espitia C, Trujillo-Roldán MA. 2011. The O-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 KDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flasks. *Microb Cell Fact.* 10:110.
- González-Zamorano M, Mendoza-Hernández G, Xolalpa W, Parada C, Vallecillo AJ, Bigi F, Espitia C. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* glycoproteomics based on ConA-lectin affinity capture of mannosylated proteins. *J Proteome Res.* 8(2):721-33.
- Goosens VJ, Monteferrante CG, van Dijl JM. 2014. The Tat system of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1843(8):1698-706.
- Herrmann JL, O'Gaora P, Gallagher A, Thole JE, Young DB. 1996. Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19 kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO J.* 15(14):3547-54.
- Hewinson RG, Michell SL, Russell WP, McAdam RA, Jacobs WR Jr. 1996. Molecular characterization of MPT83: a seroreactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPT70. *Scand J Immunol.* 43(5):490-9.
- Hiller K, Grote A, Scheer M, Münch R, Jahn D. 2004. PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions. *Nucleic Acids Res.* (1):32.
- Horn C, Namane A, Pescher P, Rivière M, Romain F, Puzo G, Bâzru O, Marchal G. 1999. Decreased capacity of recombinant 45/47-kDa molecules (Apa) of *Mycobacterium tuberculosis* to stimulate T lymphocyte responses related to changes in their mannosylation pattern. *J Biol Chem.* 274(45):32023-30.
- Hutchings MI, Palmer T, Harrington DJ, Sutcliffe IC. 2009. Lipoprotein biogenesis in Gram-positive bacteria: knowing when to hold 'em, knowing when to fold 'em. *Trends Microbiol.* 17(1):13-21.
- Ivanyi J, Thole J. 1994. Specificity and Function of T- and B-Cell Recognition in Tuberculosis, p 437-458. In Bloom B (ed), *Tuberculosis*. ASM Press, Washington, DC.

- Käll L, Krogh A, Sonnhammer EL. 2004. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol.* 338(5):1027-36.
- Kao FF, Mahmuda S, Pinto R, Triccas JA, West NP, Britton WJ. 2012. The secreted lipoprotein, MPT83, of *Mycobacterium tuberculosis* is recognized during human tuberculosis and stimulates protective immunity in mice. *PLoS One.* 2012;7(5).
- Keller R, de Keyzer J, Driessen AJ, Palmer T. 2012. Co-operation between different targeting pathways during integration of a membrane protein. *J Cell Biol.* 199(2):303-15.1
- Laqueyrie A, Militzer P, Romain F, Eiglmeier K, Cole S, Marchal G. 1995. Cloning, sequencing, and expression of the *apa* gene coding for the *Mycobacterium tuberculosis* 45/47-kilodalton secreted antigen complex. *Infect Immun.* 63(10):4003-10.
- Lara M, Servín-González L, Singh M, Moreno C, Cohen I, Nimtz M, Espitia C. 2004. Expression, secretion, and glycosylation of the 45- and 47-kDa glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans*. *Appl Environ Microbiol.* 70(2):679-85.
- Lechevalier HA & Lechevalier MP. 1967. Biology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol.* 21:71-100.
- Lechner J. & Wieland F. 1989. Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. *Annu Rev Biochem.* 58:173-94.
- Liu CF, Tonini L, Malaga W, Beau M, Stella A, Bouyssié D, Jackson MC, Nigou J, Puzo G, Guilhot C, Burlet-Schiltz O, Rivière M. 2013. Bacterial protein-O-mannosylating enzyme is crucial for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(16):6560-5.
- Lommel M. & Strahl S. 2009. Protein O-mannosylation: conserved from bacteria to humans. *Glycobiology.* 19(8):816-28.
- Low KO, Muhammad Mahadi N, Md Illias R. 2013. Optimisation of signal peptide for recombinant protein secretion in bacterial hosts. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97(9):3811-26.
- MacLeod AM, Gilkes NR, Escote-Carlson L, Warren RA, Kilburn DG, Miller RC Jr. 1992. *Streptomyces lividans* glycosylates an exoglucanase (Cex) from *Cellulomonas fimi*. *Gene.* 121(1):143-7.

- Marrichi M, Camacho L, Russell DG, DeLisa MP. 2008. Genetic toggling of alkaline phosphatase folding reveals signal peptides for all major modes of transport across the inner membrane of bacteria. *J Biol Chem.* 283(50):35223-35.
- Messner P. 1997. Bacterial glycoproteins. *Glycoconj J.* 14(1):3-11.
- Moens S & Vanderleyden J. 1997. Glycoproteins in prokaryotes. *Arch Microbiol.* 168(3):169-75.
- Mohiman N, Argentini M, Batt SM, Cornu D, Masi M, Eggeling L, Besra G, Bayan N. 2012. The ppm operon is essential for acylation and glycosylation of lipoproteins in *Corynebacterium glutamicum*. *PLoS One.* 7(9).
- Mori H & Ito K. 2001. The Sec protein-translocation pathway. *Trends Microbiol.* 9(10):494-500.
- Morosoli R, Shareck F, Kluepfel D. 1997. Protein secretion in streptomycetes. *FEMS Microbiol Lett.* 146(2):167-74.
- Nelson, D. & Cox, M. 2008. Amino Acids, Peptides, and Proteins. En Lehninger, Principles of Biochemistry. 5ta edic. Pp. 82-85. USA. W.H. Freeman and Company.
- Nolan, R. & Cross, T. 1988. Isolation and Screening of Actinomycetes. En M. Goodfellow, S. Williams & M. Mordarski (eds), Actinomycetes in biotechnology. 1era Ed. Pp. 1-32. London, UK. T.J. Press.
- Norrander J, Kempe T, Messing J. 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene.* 26(1):101-6.
- Noss EH1, Pai RK, Sellati TJ, Radolf JD, Belisle J, Golenbock DT, Boom WH, Harding CV. 2001. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 167(2):910-8.
- Ohnishi Y1, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita A, Hattori M, Horinouchi S. 2008. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol.* 190(11):4050-60.
- Palmer T & Berks BC. 2012. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat Rev Microbiol.* 10(7):483-96.
- Pérez C, Juárez K, García-Castells E, Soberón G, Servín-González L. 1993. Cloning, characterization, and expression in *Streptomyces lividans* 66 of an

extracellular lipase-encoding gene from *Streptomyces* sp. M11. *Gene*. 123(1):109-14.

- Procópio RE, Silva IR, Martins MK, Azevedo JL, Araújo JM. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis*. 16(5):466-71.

- Ragas A, Roussel L, Puzo G, Rivière M. 2007. The *Mycobacterium tuberculosis* cell-surface glycoprotein APA as a potential adhesin to colonize target cells via the innate immune system pulmonary C-type lectin surfactant protein A. *J Biol Chem*. 282(8):5133-42.

- Raviglione MC, Snider DE Jr, Kochi A. 1995. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA*. 273(3):220-6.

- Rigel NW & Braunstein M. 2008. A new twist on an old pathway-accessory Sec systems. *Mol Microbiol*. 69(2):291-302.

- Rollauer SE, Tarry MJ, Graham JE, Jääskeläinen M, Jäger F, Johnson S, Krehenbrink M, Liu SM, Lukey MJ, Marcoux J, McDowell MA, Rodriguez F, Roversi P, Stansfeld PJ, Robinson CV, Sansom MS, Palmer T, Högbom M, Berks BC, Lea SM. 2012. Structure of the TatC core of the twin-arginine protein transport system. *Nature*. 492(7428):210-4.

- Sánchez A, Espinosa P, García T, Mancilla R. 2012. The 19 kDa *Mycobacterium tuberculosis* lipoprotein (LpqH) induces macrophage apoptosis through extrinsic and intrinsic pathways: a role for the mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012:950503.

- Sander P, Rezwan M, Walker B, Rampini SK, Kroppenstedt RM, Ehlers S, Keller C, Keeble JR, Hagemeyer M, Colston MJ, Springer B, Böttger EC. 2004. Lipoprotein processing is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 52(6):1543-52.

- Schaerlaekens K, Lammertyn E, Geukens N, De Keersmaecker S, Anné J, Van Mellaert L. 2004. Comparison of the Sec and Tat secretion pathways for heterologous protein production by *Streptomyces lividans*. *J Biotechnol*. 112(3):279-88.

- Schmidt MA, Riley LW, Benz I. 2003. Sweet new world: glycoproteins in bacterial pathogens. *Trends Microbiol*. 11(12):554-61.

- Schorey JS, Li Q, McCourt DW, Bong-Mastek M, Clark-Curtiss JE, Ratliff TL, Brown EJ. 1995. A *Mycobacterium leprae* gene encoding a fibronectin binding

protein is used for efficient invasion of epithelial cells and Schwann cells. *Infect Immun.* 63(7):2652-7.

- Sentandreu R, Northcote DH. 1968. The structure of a glycopeptide isolated from the yeast cell wall. *Biochem J.* 109(3):419-32.

- Servín-González L, Castro C, Pérez C, Rubio M, Valdez F. 1997. bldA-dependent expression of the *Streptomyces exfoliatus* M11 lipase gene (*lipA*) is mediated by the product of a contiguous gene, *lipR*, encoding a putative transcriptional activator. *J Bacteriol.* 179(24):7816-26.

- Short JM, Fernandez JM, Sorge JA, Huse WD. 1988. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* 16(15):7583-600.

- Sigle S, Ladwig N, Wohlleben W, Muth G. 2015. Synthesis of the spore envelope in the developmental life cycle of *Streptomyces coelicolor*. *Int J Med Microbiol.* 305(2):183-9

- Smith GT, Sweredoski MJ, Hess S. 2014. O-linked glycosylation sites profiling in *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins. *J Proteomics.* 97:296-306.

- Solans, M & Vobis, G. 2013. Biology of Actinomycetes in the Rhizosphere of Nitrogen-Fixing Plants. En Amoroso, J. Benimeli, C. Cuozzo, S. (eds). *Actinobacteria*. 1era Edic. Pp. 1-26. USA. CRC Press.

- Strahl-Bolsinger S, Gentsch M, Tanner W. 1999. Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta.* 1426(2):297-307.

- Sutcliffe IC & Harrington DJ. 2004. Lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components. *FEMS Microbiol Rev.* 28(5):645-59.

- Takano E, White J, Thompson CJ, Bibb MJ. 1995. Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. *Gene.* 166(1):133-7.

- Tamil Selvan A & Sankaran K. 2006. Bacterial lipid modification in vitro: Synthetic peptide substrate for phosphatidylglycerol—Prolipoprotein diacylglyceryl transferase. *Indian Journal of Biotechnology* Vol5 (suppl) July 1006, pp 327-331.

- ten Dam, H. 1984. Research on BCG vaccination. *Adv Tuberc Res.* 21:79-106.

- Torres Rodriguez MD. 2012. Clonación y expresión de la glicoproteína de 19kDa de *Mycobacterium tuberculosis* (Gen Rv3763) en *Streptomyces lividans*. Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Tschumi A, Nai C, Auchli Y, Hunziker P, Gehrig P, Keller P, Grau T, Sander P. 2009. Identification of apolipoprotein N-acyltransferase (Lnt) in mycobacteria. *J Biol Chem.* 284(40):27146-56.
- VanderVen BC, Harder JD, Crick DC, Belisle JT. 2005. Export-mediated assembly of mycobacterial glycoproteins parallels eukaryotic pathways. *Science.* 309(5736):941-3.
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D. 2007. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71(3):495-548.
- Vrancken K, De Keersmaecker S, Geukens N, Lammertyn E, Anné J, Van Mellaert L. 2007. *pspA* overexpression in *Streptomyces lividans* improves both Sec- and Tat-dependent protein secretion. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73(5):1150-7.
- Widdick DA, Dilks K, Chandra G, Bottrill A, Naldrett M, Pohlschröder M, Palmer T. 2006. The twin-arginine translocation pathway is a major route of protein export in *Streptomyces coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(47):17927-32.
- Widdick DA, Hicks MG, Thompson BJ, Tschumi A, Chandra G, Sutcliffe IC, Brülle JK, Sander P, Palmer T, Hutchings MI. 2011. Dissecting the complete lipoprotein biogenesis pathway in *Streptomyces scabies*. *Mol Microbiol.* 80(5):1395-412.
- Wu LF, Ize B, Chanal A, Quentin Y, Fichant G. 2000. Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2(2):179-89.
- Zwizinski C, Wickner W. 1980. Purification and characterization of leader (signal) peptidase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 255(16):7973-7.
- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/> [Febrero, 2015]

Anexos

Reactivos y sustancias empleadas.

Medios de cultivo celular.

- LB

Bactotripton	1.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl	1.0 g
Aforar a 100 mL con agua Mili-Q, ajustar pH 7.0	

* LB + Sacarosa: Adicionar 25 g de sacarosa al medio

- YT2X

Bactotripton	1.6 g
Extracto de levadura	1.0 g
NaCl	0.5 g
Aforar a 100 mL con agua Mili-Q, ajustar pH 7.0	

- SOB

Triptona	2.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl	0.05 g
Ajustar el volumen a 100mL, ajustar pH a 7	

- 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	0.01 g

*Aforar a 80 mL con agua Mili-Q y esterilizar en autoclave

Suplementación del medio

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	0.2 mL
NaOH (1 N)	0.2 mL
Extracto de levadura (10%)	5.0 mL

-YEME

Extracto de levadura	0.3 g
Peptona	0.5 g
Extracto de malta	0.3 g
Glucosa	1.0 g
Sucrosa	34.0 g

Ajustar el volumen a 100 mL con agua Mili-Q

- MS

Manitol	2.0g
Harina de soya	2.0g
Agar	0.2g

Aforar a 100 mL con agua

Buffer

- TE 10 mM

- TE 25 mM

- Buffer P

Sacarosa 51.5 g

MgCl₂ · 6H₂O 1.01 g

KS₂O₄ 0.125 g

Disolver en 300mL de agua Mili-Q, ajustar a 400mL con agua Mili-Q y se esteriliza

- Buffer para sonicar

MgCl₂ 1 M 0.11 mL

DTT 0.5 M 0.11 mL

Inhibidor de proteasas Roche 1 pastilla

Tris 20 mM (pH=8) 26.28 mL

RNAsa 0.5 µL

- Buffer de carga de proteínas 2X

Tris-HCl (pH=6.8) 2.5 mL

SDS 10% 4.0 mL

Glicerol 2.0 mL

2-mercaptoetanol 1.0 mL

Agua Mili-Q 0.5 mL

Azul de bromofenol 0.0005 g

- Buffer de transferencia

Tris base	3.0 g
Glicina	14.0 g
* Disolver en 500 mL de agua Mili-Q	
Metanol	200 mL
* Aforar a 1 L con agua Mili-Q	

- Buffer TBS (Tris-salino)

Tris base	6.05 g
NaCl	8.76 g
Disolver en 800 mL de agua Mili-Q y ajustar el pH=7.5. Aforar a 1 L	
* Si es necesario agregar Tween20 al 0.05%	

Sustancias varias

- Trazas R5

ZnCl ₂	4.0 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	20.0 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	1.0 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.0 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	1.0 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1.0 mg

Disolver en 100 mL, realizar alícuotas de 10mL cada uno y esterilizar

- Solución de desteñido I

Metanol	50 mL
Ácido acético	10 mL
Agua Mili-Q	40 mL

- Solución de desteñido II

Metanol	5.0 mL
Ácido acético	7.0 mL
Agua Mili-Q	88.0 mL

Protocolos

Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa de bajo punto de fusión (LMP).

- 1.- Realizar la electroforesis en un gel de agarosa LMP y teñir con Bromuro de etidio 1 µg/mL por 10 min. Iluminar el gel con luz UV de onda larga y cortar las bandas deseadas.
- 2.- Fundir la rebanada de agarosa que contiene el DNA en un tubo Eppendorf a 65°C durante 10 minutos. Añadir 1/10 del volumen de NaCl 5M, mezclar y dejar otros 5 min a 65°C.
- 3.- Saturar fenol con NaCl de la siguiente forma (mezclar 100µl de NaCl 5M, 400µl de agua y 500µl de fenol). Centrifugar 1 min a 13000 rpm, luego 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 a 13000 rpm y transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
- 5.- Añadir al fenol 45 µl de TE 10 mM o agua y 5µl de NaCl 5M 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 s. 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 10 µg de glicógeno. Mantener a -20°C al menos dos horas.

9.- Centrifugar todo el DNA durante 10 min. a 13000 rpm en la microcentrífuga, asegurándose de eliminar todo el alcohol con una micropipeta. Posteriormente secar el pellet y resuspenderlo en un volumen adecuado de TE 10 mM.

Minipreparaciones de DNA plasmídico

1.- Resuspender el paquete de células o el micelio en 200µl de Tris 25mM, EDTA 25mM, pH=8. En el caso de *Streptomyces* el buffer TE 25mM debe contener lisozima 2 mg/mL.

2.- En el caso de *Streptomyces* se incuba con la lisozima alrededor de 1 hora a 37°C o hasta que el micelio este visiblemente lisado (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. El micelio de *Streptomyces* es difícil de lisar, por lo que 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 por inversión hasta que se pierda la viscosidad y se vea un precipitado blanco. Incubar 15 minutos en hielo. Posteriormente centrifugar a 13000 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 un volumen de isopropanol. Dejar precipitando 5 minutos a temperatura ambiente.

7.- Centrifugar 10 minutos en la microfuga. Retirar todo el sobrenadante con una pipeta Pasteur, dando un segundo pulso en la microfuga para eliminar todo el sobrenadante.

8.- Resuspender el pellet en 50µl de TE (Tris 10mM, EDTA 0.1 mM, pH=8). Añadir 150µl de acetato de sodio 4M, pH=6. Mezclar bien e incubar una hora a -20°C.

9.- Centrifugar 10 minutos en la microcentrífuga. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio y añadir 200µl de isopropanol, mezclar muy bien y precipitar 10 minutos en hielo.

10.- Centrifugar 10 minutos en la microfuga. Eliminar todo el sobrenadante. Resuspender en 45µl de TE, mezclar bien, dar un pulso en la microfuga y añadir 5µl de acetato de sodio 3M pH=6 y 125µl 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 20-25µl de TE 10mM.

Transformación de *E. coli* por electroporación

1.- Inocular 20 mL de medio SOB con 0.1 mL de un precultivo de células de *E. coli* DH5α toda la noche.

2.- Incubar a 37°C con agitación constante hasta llegar a una densidad óptica de 0.6 a 600 nm (aproximadamente de 2-3hrs).

3.- Centrifugar a 6000rpm durante 10 minutos a 4°C.

4.- En hielo, decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 20 mL de glicerol estéril frío al 10% y centrifugar a 6000rpm durante 10 minutos a 4°C. Repetir 2 veces.

- 5.- Eliminar el sobrenadante, dejando aproximadamente 100µl para resuspender suavemente el pellet.
- 6.- Tomar 50µl del pellet resuspendido y agregar 1µl de DNA plasmídico (5µl si es una ligación), mezclar y colocarlo en una celdilla de electroporación Bio-Rad® y mantenerlo en hielo.
- 7.- Dar un pulso en el electroporador de 1.6kV.
- 8.- Pasar las células a 1 mL de medio YT2X e incubar a 37°C por una hora, para que las células se recuperen.
- 9.- Pasar a un tubo Eppendorf y centrifugar a 6000rpm durante 10 minutos. Resuspender el pellet en medio YT2X y realizar las diluciones correspondientes.
- 10.- Inocular 0.1 mL de cada dilución en cajas con medio LB más su antibiótico correspondiente e incubar a 37°C durante toda la noche.
- 11.- Tomar una colonia aislada con ayuda de un palillo y resuspenderla en 3 mL de medio YT2X. Posteriormente reinocular en un cultivo de 100 mL de medio YT2X + antibióticos e incubar a 37°C durante 12h en agitación constante.

Transformación de *Streptomyces*

- 1.- Inocular 100µl de una preparación densa de esporas en 25 mL de medio YEME suplementado con 125 µl de MgCl₂ 1 M y 1.25 mL de glicina al 10% e incubar a 30°C con agitación de 36 a 40h en un matraz con resorte.
- 2.- Pasar a un tubo de centrifuga y enjuagar el matraz con 10ml de sacarosa al 10.3%, agregándolo también al tubo. Mezclar y centrifugar a 3500 rpm, 10 minutos a temperatura ambiente.
- 3.- Resuspender el pellet en 20 mL de sacarosa 10.3% y centrifugar a 3500 rpm durante 10 min a 27°C. Repetir 2 veces y almacenar el pellet de micelio a -20°C.

4.- Pesar 7.5mg de lisozima y agregar 5 mL de Buffer P, disolver y filtrar a través de un filtro Millipore de 0.45 μm de poro. Descongelar el micelio y agregar la solución de lisozima en Buffer P. Mezclar e incubar a 30°C durante 1 hora con agitación suave cada 15 min. 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 min a 27°C.

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

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 h. 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 40ml de Buffer P: 100 μl de Trazas R5, 0.5ml de fosfato de potasio (KH_2PO_4) al 0.5%, 5 mL de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25 M y 5 mL de Tris-Cl 0.25 M pH=7.2.

2.- Dejar reposar durante 30 min 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, posteriormente filtrar la solución.

Obtención de preparaciones densas de esporas

1.- Inocular cajas de Petri con medio MS la preparación celular de *Streptomyces*. Incubar alrededor de una semana o hasta obtener esporulación.

*En el caso de la mutante Δ tatAC agregar 1 mL de glucosa 50%.

2.- Para cosechar, se agregan 10 mL de agua estéril a cada caja. Con ayuda de un asa bacteriológica raspar la superficie para separar las esporas del micelio.

3.- Recuperar los 10 mL de agua y pasarlos por un filtro de algodón para esporas.

4.- Agregar 5 mL de agua al filtro para recuperar la mayor cantidad de esporas.

5.- Centrifugar el filtrado de esporas a 3500 rpm durante 10 min a 4°C.

6.- Eliminar el sobrenadante y lavar una vez con 10 mL de agua para eliminar los restos del medio. Centrifugar a 3500 rpm durante 10 min a 4°C.

7.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el paquete de esporas en la cantidad pertinente de glicerol al 20%. Colocar en viales pequeños y almacenar a -20°C.

Crecimiento de esporas de *Streptomyces lividans* y expresión de proteínas.

Pregerminación:

1.- Tomar 500 μ l de una preparación densa de esporas en glicerol al 20% y colocarlas en un tubo Eppendorf. Centrifugar a 6000 rpm durante 10 min 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 min. Eliminar el sobrenadante y resuspender las esporas en

0.1 mL de medio YT2X. Añadir la suspensión de esporas a un matraz de 250ml con 10 mL de medio YT2X. Incubar a 37°C durante 5-6 horas en agitación constante.

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.

Cultivo:

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.

*En el caso de la mutante Δ tat A-C se utiliza medio LB+sacarosa 11%.

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 totales con agitación constante.

7.- Posteriormente, centrifugar todo el cultivo a 7500 rpm durante 10 minutos a 10°C, para separar la fracción celular del sobrenadante.

Fraccionamiento celular

1.- Centrifugar el cultivo a 7000 rpm durante 10 minutos a 10°C. Lavar el pellet de micelio con 100 mL de Tris 20 mM 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 38000 rpm durante 40 minutos 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 38000rpm durante 20 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 3mL 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 μ l de buffer para proteínas 2X. Hervir por 5 minutos y almacenar a -20°C .

Electroforesis en gel de Poliacrilamida

1.- Limpiar los vidrios con etanol y preparar la cámara para realizar el gel.

2.- Realizar el gel según la concentración deseada.

	10%	12%	14%
Agua bidestilada	4 mL	3.3 mL	2.7 mL
Acilamida:bis-acilamida (29:1)	3.3 mL	4 mL	4.6 mL
Buffer 1.5 M Tris-HCl pH=8.8	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
SDS 10%	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
Persulfato de amonio 10%	0.1 mL	0.1mL	0.1 mL
TEMED	10 μ L	10 μ L	10 μ L
Volumen final	10 mL	10 mL	10 mL

3.- Una vez vaciado, agregar etanol al 70% hasta el límite superior.

4.- Una vez que polimerizó el gel separador, eliminar el etanol.

5.- Preparar el gel concentrador.

Acrilamida:bis-acrilamida (29:1)	1.3 mL
Buffer 0.5 M Tris-HCl pH=6.8	5 mL
SDS 10%	0.1 mL
Agua bidestilada	3.4 mL
Persulfato de amonio 10%	50 μ L
TEMED	10 μ L
Volumen final	10 mL

6.- Agregar el gel concentrador y posteriormente colocar el peine.

7.- Correr el gel a 115 Volts constantes.

Tinción con azul de Coomassie

1.- Teñir 40 minutos con solución de tinción Coomassie

2.- Desteñir 40 minutos con la solución de desteñido I.

3.- Desteñir 30 minutos con solución de desteñido II

4.- Dejar 30 minutos en agua bidestilada

Transferencia a membrana PVDF en cámara húmeda

1.- Realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida

2.- Recortar 2 rectángulos de papel filtro 1 cm más grande por lado que el gel, y la membrana de PVDF al tamaño del gel.

3.- Activar la membrana de PVDF sumergiéndola en metanol por 5 s.

4.- Realizar el sándwich de transferencia en el buffer de transferencia (sitio negro del casete, esponja, papel filtro, gel, membrana, papel filtro, esponja y sitio transparente del casete) cuidando que no queden burbujas entre las capas.

5.- Colocar el casete de transferencia en la cámara húmeda.

6.- Colocar el buffer de transferencia restante en la cámara húmeda o hasta el punto indicado.

7.- Realizar la transferencia toda la noche a 12mA con agitación constante o por 2 horas a 200mA (colocar la tableta refrigerante).

* Cuando la transferencia acabe, secar la membrana sumergiéndola en metanol y dejándola orear.

Detección de proteínas con anticuerpos (Western 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 –Tween20 0.05%) + 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–Tween20 0.05% + leche 5%, agregar el anticuerpo primario (con su dilución correspondiente).

4.- Pasado el tiempo, retirar el buffer de bloqueo e incubar la membrana con los 10ml de anticuerpo diluido durante 2 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. Posteriormente dar dos lavados más con TBS–Tween20 0.005% de 5 minutos cada uno.

6.- Incubar la membrana con 5 mL de anticuerpo secundario diluido 1:1000 en TBS-Tween20 0.05% + leche 5% durante 2 horas a temperatura ambiente.

7.- Realizar 3 lavados con 10ml de TBS-Tween20 0.05% durante 5 minutos. Posteriormente revelar membrana por quimioluminiscencia.

Detección de proteínas glicosiladas con concanavalina 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 10ml de TBS 1X+BSA (albúmina) 1% durante una hora a temperatura ambiente.

3.- Lavar la membrana con 5 mL de TBS durante 5 minutos tres veces.

4.- Incubar la membrana con 10ml 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 2 horas en agitación constante a temperatura ambiente.

5.- Después de las 2 horas, retirar la Concanavalina A y lavar con 5 mL de TBS 1X durante 5 minutos. Repetir 3 veces.

6.- Revelar por quimioluminiscencia.