



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización de lipoproteínas de *Mycobacterium tuberculosis* producidas
en *Streptomyces lividans*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
ISAÍ ARISTA CARRERA

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. Luis Servín González
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dra. Clara Inés Espitia Pinzón
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros
[Instituto de Química, UNAM](#)

Ciudad de México, abril de 2016



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.

*A quién más sino a mis padres
Inocencio Arista y Valentina
Carrera y a mis hermanos Jonás
Arista y Osiris Arista.*

FINANCIAMIENTO

- Este trabajo fue financiado por el Proyecto No. **220020** del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).
- Durante la realización del proyecto fui beneficiado con la beca para estudiantes de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). No. de registro: **277364**.
- El Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) me apoyó financieramente para asistir al III Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias celebrado en Cuatro Ciénegas, Coahuila, del 3 al 7 de octubre de 2013.

AGRADECIMIENTOS

- A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por el inigualable regalo de educación, formación de principios y conocimiento que me dio y por ser una segunda casa en la cual podemos refugiarnos en conocimiento.
- Al **Dr. Luis Servín González** por la oportunidad de trabajar en su laboratorio, además de su asesoría y apoyo en la dirección del presente proyecto.
- A la **M. en C. Gabriela González Cerón** por el apoyo técnico brindado al presente proyecto.
- A la **Dra. Laura Elena Córdova Dávalos** por el apoyo técnico brindado al presente proyecto.
- Al **Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros** por su asesoría y sugerencias en la elaboración del presente proyecto, así como su apoyo y dirección en la realización de los ensayos de espectrometría de masas.
- A la **M. en C. Cristina Parada Colín** por el apoyo en la realización de los ensayos de ELISA presentes en este proyecto.
- A la **Dra. Clara Inés Espitia Pinzón** por su asesoría, sugerencias, correcciones y seguimiento durante la elaboración del presente proyecto.
- Al **Dr. Sergio Sánchez Esquivel** por las correcciones realizadas a este escrito.
- Al **Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay** por las correcciones realizadas a este escrito.
- A la **Dra. María Elena Flores Carrasco** por las correcciones realizadas a este escrito.
- A la **Dra. Bertha González Pedrajo** por las correcciones realizadas a este escrito.

- A la **Dra. Yolanda López Vidal** por los comentarios realizados a este escrito.
- Al **Laboratorio de Espectrometría de Masas** del Instituto de Química, UNAM.
- A la **Unidad de Secuenciación** del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
- Al **Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP)** por brindar el apoyo para que los alumnos de posgrados asistamos a congresos nacionales e internacionales.

ABREVIATURAS

LpqH	Lipoproteína glicosilada antigénica de <i>M. tuberculosis</i>
Mpt83	Lipoproteína glicosilada antigénica de <i>M. tuberculosis</i>
Apa	Antígeno rico en alanina y prolina de <i>M. tuberculosis</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pmt	Proteína manosiltransferasa
Ppm	Poliprenol fosfato manosa sintasa
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
ADN	Ácido desoxirribonucleico
LMP	Electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión
LDAO	Lauril dimetil amina N-óxido
Ni-NTA	Agarosa que usa ácido nitrilotriacético para unir iones de níquel (Ni^{2+}) en cuatro sitios coordinados. Se utiliza como resina para purificar proteínas con una etiqueta de 6 histidinas.
MALDI-TOF	Técnica de espectrometría de masas (Desorción/ionización láser asistida por matriz – tiempo de vuelo -)
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
PM	Marcador de peso molecular
D.O	Densidad óptica/absorbancia
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
BSA	Albúmina de suero bovino

En imágenes:

PT	Extracto total de proteínas
AC	Anticuerpos
M	Proteínas provenientes de membrana
S	Proteínas provenientes de sobrenadante
WT	Cepa tipo silvestre
m/z	Masa/carga

Contenido

I. RESUMEN	- 8 -
II. INTRODUCCIÓN.....	- 10 -
Importancia del estudio de la Tuberculosis	- 10 -
Características del proceso de infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	- 11 -
Lipoproteínas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	- 13 -
Síntesis de lipoproteínas en micobacterias.....	- 14 -
Sistemas de secreción Tat y Sec en <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	- 17 -
<i>Sistema Sec</i>	- 18 -
<i>Sistema Tat</i>	- 19 -
Importancia y funciones de las glicoproteínas en bacterias	- 21 -
Glicoproteínas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	- 23 -
Biosíntesis de proteínas O-manosiladas en bacterias.....	- 26 -
MPT83: uno de los principales antígenos de <i>M. tuberculosis</i>	- 28 -
Características de la proteína de 19kDa (LpqH) de <i>M. tuberculosis</i>	- 31 -
<i>La bacteria Streptomyces lividans</i> como hospedera para la producción de proteínas heterólogas	- 33 -
III. JUSTIFICACIÓN	- 35 -
IV. OBJETIVOS	- 36 -
V. METODOLOGÍA	- 37 -
Cepas y plásmidos utilizados	- 37 -
Adición de una etiqueta de seis histidinas a los genes Rv2873 y Rv3763.....	- 39 -
<i>Clonación del gen Rv2873 en vector multicopia pIJ6021</i>	- 40 -
Expresión de proteínas en cultivos celulares	- 41 -
Construcción de la cepa mutante Δpmt de <i>S. lividans</i>	- 41 -
Purificación de proteínas glicosiladas mediante cromatografía de afinidad a Concanavalina A.....	- 42 -
<i>Precipitación de proteínas con sulfato de amonio</i>	- 42 -
<i>Purificación de proteínas por columna de afinidad a Concanavalina A</i>	- 42 -
Purificación de proteínas con una etiqueta de 6 histidinas	- 43 -
<i>Purificación de proteínas Mpt83 y LpqH membranales mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA</i>	- 43 -
<i>Purificación de proteínas Mpt83 y LpqH del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA</i>	- 44 -
Análisis de proteínas por electroforesis y “Western-Blot”	- 44 -

Preparación de las muestras de proteínas para su análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF	- 45 -
Preparación de las muestras de proteínas para el análisis de la reactividad de sueros mediante ensayos de ELISA.....	- 46 -
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 47 -
Precipitación de la proteína MPT83 en sobrenadante a diferentes concentraciones de sulfato de amonio	- 48 -
Ensayos de purificación por columna de afinidad con Concanavalina A	- 49 -
Ensayos de Western Blot con anticuerpos y Concanavalina A de la proteína MPT83 membranal	- 51 -
Purificación mediante cromatografía de afinidad a concanavalina A de las proteínas MPT83 y LpqH provenientes de la membrana celular de <i>S. lividans 1326</i>	- 52 -
Adición de una etiqueta de 6 histidinas a las proteínas Mpt83 y LpqH para su purificación por columna de afinidad a níquel	- 55 -
Purificación de proteínas por columna de afinidad a Ni-NTA	- 57 -
Purificación de las proteínas Mpt83 y LpqH provenientes de sobrenadantes de cultivo de <i>S. lividans</i>	- 60 -
Purificación de la proteína LpqH fusionada con el péptido señal de secreción de una lipasa extracelular de <i>S. exfoliatus</i>	- 63 -
Análisis de la proteína LpqH de membrana mediante espectrometría de masas MALDI TOF	- 67 -
Análisis de la reactividad de sueros de personas sanas, pacientes con tuberculosis e individuos infectados contra las lipoproteínas LpqH y Mpt83 purificadas de <i>S. lividans</i>	- 70 -
Análisis de la reactividad de sueros de personas sanas, pacientes con tuberculosis e individuos infectados contra las proteínas LpqH y Mpt83 no glicosiladas	- 74 -
VII. CONCLUSIONES	- 78 -
VIII. PERSPECTIVAS.....	- 79 -
IX. BIBLIOGRAFÍA	- 80 -
X. ANEXOS	- 88 -
XI. PROTOCOLOS.....	- 90 -

I. RESUMEN

Los genes Rv2873 y Rv3763 codifican para las lipoproteínas glicosiladas Mpt83 y LpqH respectivamente, que en su forma nativa se encuentran ancladas a la membrana de *Mycobacterium tuberculosis*. Ambas proteínas son dos de los antígenos inmunodominantes de la bacteria.

Mediante amplificación por PCR de los genes Rv2873 y Rv3763 a partir del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, se añadió una etiqueta de 6 histidinas en el extremo C-terminal de las proteínas Mpt83 y LpqH. Ambos genes fueron clonados en el vector de alto número de copias pIJ6021 que contiene el promotor fuerte e inducible *P_{tipA}*. Las construcciones se hicieron con el péptido señal nativo de cada lipoproteína, los cuales contienen un motivo “lipobox” que dirige a las proteínas hacia la membrana celular bacteriana y que resulta necesario para la lipidación en el extremo N-terminal de la proteína madura y para el corte por una peptidasa señal tipo II. De igual manera se hicieron construcciones reemplazando el péptido señal nativo de la proteína LpqH por el péptido señal de la lipasa extracelular LipA de *S. exfoliatus* M11. Las diferentes proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad Ni-NTA y se analizaron mediante ensayos de Western Blot usando anticuerpos específicos y la lectina Concanavalina A. Se observó que las proteínas Mpt83 y LpqH se encuentran glicosiladas cuando son dirigidas a la membrana de *S. lividans* por el péptido señal nativo de lipoproteína así como una grave disminución en la glicosilación de la proteína LpqH cuando el péptido señal nativo es reemplazado por el péptido señal de la lipasa LipA. Mediante espectrometría de masas MALDI-TOF se confirmó que la proteína LpqH producida por *S. lividans* se encuentra glicosilada con al menos 12 unidades de manosa.

Finalmente, se hicieron ensayos de ELISA para probar la reactividad de los sueros de personas enfermas por tuberculosis frente a las proteínas LpqH y Mpt83 producidas por *S. lividans*. Las formas glicosiladas de ambas proteínas mostraron una gran reactividad frente a los sueros, en comparación con las formas no glicosiladas de las proteínas Mpt83 y LpqH (obtenidas de una cepa mutante de *S.*

lividans que carece de la enzima Pmt que es crucial para la glicosilación) las cuales no mostraron reactividad frente a los mismos sueros. Estos resultados confirman que la glicosilación de estas proteínas en *S. lividans* se realiza de forma similar que en *M. tuberculosis* y que permite el reconocimiento inmune de ambos antígenos expresados de forma heteróloga.

II. INTRODUCCIÓN

Importancia del estudio de la Tuberculosis

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

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

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

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

Características del proceso de infección por *Mycobacterium tuberculosis*

Las micobacterias son un grupo de bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium*, generalmente ácido resistentes y que pueden habitar una gran variedad de reservorios ambientales, mostrando gran resistencia ante las variaciones en su entorno. Se encuentran dentro del orden *Actinomycetales* que incluye tanto a bacterias no patógenas así como aquellas altamente patógenas, como en el caso de *M. tuberculosis*, *M. leprae* y *M. ulcerans*. Las micobacterias pueden crecer en fluidos ambientales, formar agregados, biopelículas e incluso invadir células como macrófagos (Singh, *et al.*, 2010)

Mycobacterium, así como otras actinobacterias productoras de ácido micólico como *Corynebacterium*, *Gordona*, *Nocardia* y *Rhodococcus* generalmente muestran una morfología de tipo barra o bacilo pleomórfica. *M. tuberculosis*, una actinobacteria patógena obligada, infecta macrófagos humanos dentro de estructuras granulomatosas en los pulmones en donde tienen alteraciones morfológicas hacia filamentos dentro de las células del hospedero. Posteriormente, el crecimiento vegetativo es suprimido por la respuesta inmune que induce la formación de bacterias 'persistentes' caracterizadas por tener una pared celular muy gruesa y con la capacidad de sobrevivir en un estado de latencia durante años (Scherr *et al.*, 2009).

A pesar de que en *M. tuberculosis* no se observan cambios morfológicos en períodos de tiempo concretos existen características similares con el ciclo de vida de algunos eucariontes parásitos, por lo que puede considerarse que las distintas

fases de la infección forman un “ciclo de vida inmunológico” que consta de 4 etapas principales.

En la etapa 1, que corresponde con la infección y la activación de los mecanismos de respuesta inmune innata, el organismo es transmitido al hablar o como un aerosol al estornudar en pequeñas gotas de saliva, alojándose principalmente en células fagocíticas de los pulmones, incluyendo neutrófilos, monocitos y células dendríticas en forma de granulomas. En otras enfermedades infecciosas, el reclutamiento de fagocitos restringe e incluso elimina a los patógenos invasivos; sin embargo, durante la tuberculosis los fagocitos brindan nichos celulares adicionales para la expansión y colonización de *M. tuberculosis*. Esta etapa se caracteriza además por la activación de múltiples receptores en el hospedero debida a componentes de la bacteria e así como por la activación de células efectoras, etc. (Smith, 2003; Ernst, 2012).

La etapa 2, considerada como del equilibrio inmunológico, se caracteriza por un retraso en la respuesta inmune adaptativa de hasta 42 días después de la infección, sin embargo, una vez que inicia la activación, el sistema inmune puede detener el crecimiento de la población bacteriana pero no eliminarla, promoviendo que la infección se vuelva asintomática y latente. Durante la etapa 3 se inicia la reactivación de la infección latente caracterizada por la presencia de *M. tuberculosis* en secreciones de vías respiratorias. La reactivación puede ocurrir incluso 10 años después de la infección inicial y generalmente se atribuye a un debilitamiento o fallo en el sistema inmune. Algunas condiciones médicas como la *diabetes mellitus* o el tratamiento con glucocorticoides se ha observado que pueden incrementar el riesgo de reactivación de la tuberculosis (Ernst, 2012).

El último paso de la infección corresponde a la transmisión de la bacteria hacia nuevos hospederos. En el caso de la tuberculosis, esto ocurre a través de una ruta aérea en la que *M. tuberculosis* es expulsada (generalmente mediante la tos o estornudos) de un individuo con la enfermedad activa y luego se inhala por otros individuos que son huéspedes potenciales.

Lipoproteínas de *Mycobacterium tuberculosis*

Las membranas celulares contienen proteínas especializadas enlazadas a la membrana. Esas proteínas se dividen en tres clases según su modo de asociación a la bicapa lipídica: proteínas integrales de membrana, proteínas periféricas de membrana y proteínas de membrana unidas a lípidos (lipoproteínas). Las proteínas integrales de membrana, llamadas también proteínas transmembranales, contienen regiones hidrofóbicas incrustadas en el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica; además se encuentran incrustadas con una parte expuesta sobre la superficie externa, y una parte expuesta a la superficie interna. Las proteínas periféricas de membrana se asocian a una cara de la membrana, mediante interacciones no covalentes tipo puentes de hidrógeno o Van der Waals con las proteínas integrales de membrana o con los grupos polares de los lípidos de membrana (Horton *et al.*, 2008). Las lipoproteínas se encuentran unidas a la membrana mediante un enlace covalente con un lípido, en donde una cadena lateral de aminoácidos se une por un enlace de amida o éster a un grupo de ácido graso. Otras lipoproteínas de membrana están enlazadas de forma covalente a una cadena isoprenoide a través del átomo de azufre de un residuo de cisteína en el dominio C de la proteína (Horton *et al.*, 2008).

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

Las lipoproteínas son una subclase de proteínas que se encuentran comúnmente en la envoltura celular de las bacterias; aproximadamente, entre el 1% y 3% del genoma bacteriano codifica lipoproteínas. Existe una gran cantidad de funciones en las que éstas se encuentran involucradas, como el transporte y plegamiento de proteínas, resistencia a antibióticos, sistemas de transporte ABC en donde actúan como proteínas de unión a sustrato y en la señalización celular

(Juliane *et al.*, 2010). Entre las lipoproteínas de *M. tuberculosis* que más se han estudiado se encuentran Mpt83, LppX, LpqW, LpqH (proteína de 19kDa) y PstS1 (proteína de 38 kDa).

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

Síntesis de lipoproteínas en micobacterias

Las lipoproteínas son sintetizadas como pre-lipoproteínas y su maduración ocurre mediante modificaciones post-traduccionales. Estas modificaciones son realizadas por enzimas que se encuentran localizadas en la membrana citoplasmática de las células. El primer paso para la síntesis de las lipoproteínas es realizado por la proteína Lgt, que adhiere un residuo de diacilglicerol al grupo tiol de una cisteína ubicada en el motivo lipobox del péptido señal de la pre-lipoproteína (Figura 1) y que se encuentra conservada universalmente. En *E. coli*, la fracción lipídica de las proteínas se deriva del lípido de membrana fosfatidilglicerol, con cadenas compuestas de 16 a 20 átomos de carbono, en contraste con micobacterias, en donde las fracciones lipídicas de las lipoproteínas

aún no se han determinado a nivel molecular. La proteína Lgt (Rv1614) de *M. tuberculosis* está compuesta de 468 aminoácidos (masa molecular 50.4 kDa), siendo considerablemente más grande que su homóloga en *E. coli* de 291 aminoácidos, además de que ambas tienen un punto isoeléctrico (pI) diferente, el cual es de 9.66 en *E. coli* y de 4.45 en *M. tuberculosis*; aparentemente esta diferencia es debida a la gran cantidad de residuos de aspartato y glutamato presentes en la región C-terminal de la proteína Lgt de *M. tuberculosis* (Rezwan, *et al.*, 2007).

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

En proteobacterias Gram-negativas, pero no en bacterias Gram-positivas, las lipoproteínas procesadas por LspA son modificadas posteriormente por la proteína Lnt, que adhiere una tercera cadena de acilo al grupo amino de la cisteína modificada. Estudios *in vitro* e *in vivo* han indicado que cualquiera de los tres principales fosfolípidos encontrados en la membrana celular de *E. coli* (fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y cardiolipina) pueden servir como donadores del grupo acilo; la modificación por Lnt es un prerrequisito para el transporte de lipoproteínas a través del periplasma en *E. coli* hacia la membrana externa. Una proteína codificada por el gen Rv2051c se ha descrito que posee dos dominios, siendo uno de ellos un motivo similar al motivo Lnt de *E. coli*, y el otro, parte de una proteína que se ha caracterizado como una poliprenol

monofosfomanosa sintasa (Ppm1) que transfiere manosa de GDP-manosa al poliprenol fosfato endógeno, siendo este último un importante intermediario en la síntesis de la pared celular micobacteriana constituida por lipomanano y lipoarabinomanano (Rezwan *et al.*, 2007; Sutcliffe y Harrington, 2004). Recientemente se demostró que la enzima Lnt cataliza la transferencia de un residuo de ácido graso al grupo α -amino de una cisteína en el extremo N-terminal de las lipoproteínas, indicando que la actividad de Lnt también se encuentra presente en *M. tuberculosis* a pesar de ser una bacteria Gram positiva (Tschumi *et al.*, 2009).

Homólogos de Lnt también se han encontrado en actinobacterias como *Streptomyces* y *Corynebacterium*. Un análisis exhaustivo de los genomas bacterianos de diferentes *phyla* sugiere que los homólogos de Lnt están presentes en microorganismos con una envoltura celular compleja, pero no en bacterias Gram positivas ordinarias por lo que es sorprendente la presencia de dos homólogos de Lnt en *Streptomyces* (Widdick *et al.*, 2011).

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

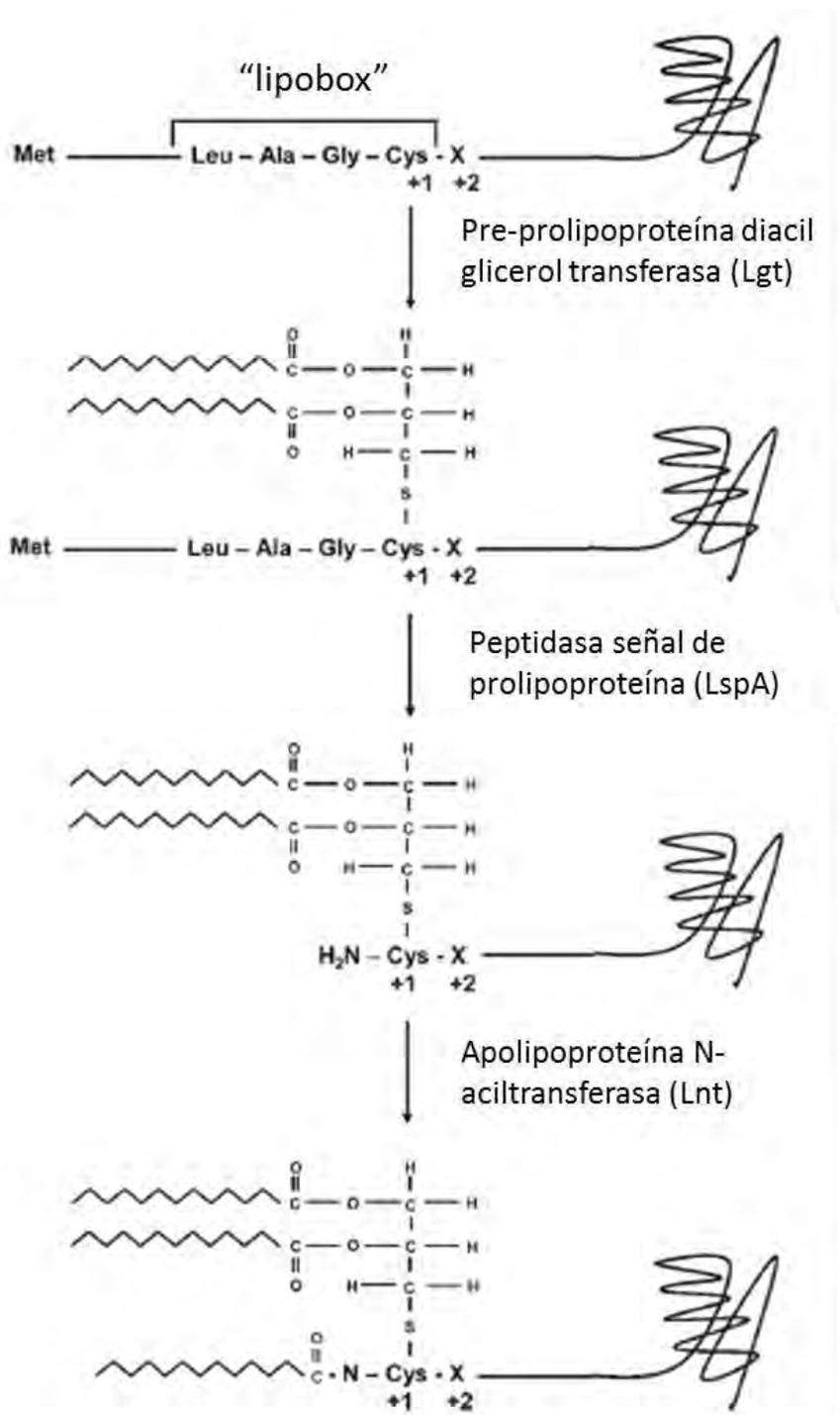


Figura 1. Biosíntesis de lipoproteínas en bacterias. Inicialmente la pre-prolipoproteína es modificada post-traduccionamente mediante la adición de un diacil glicerol por acción de la enzima Lgt, posteriormente la enzima LspA corta el péptido señal de la proteína entre la cisteína y los 3 aminoácidos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

Sistemas de secreción Tat y Sec en *Mycobacterium tuberculosis*

Sistema Sec

En *M. tuberculosis* existen dos sistemas de secreción de proteínas altamente conservados responsables de la mayoría del transporte de proteínas a través de la membrana de la bacteria: Sec y Tat. El sistema Sec se encuentra presente en todas las bacterias actuando como ruta principal de secreción de proteínas; debido a que muchas de las proteínas transportadas por Sec realizan funciones vitales y de virulencia que requieren de un transporte apropiado, el sistema Sec de secreción es esencial para la viabilidad de la bacteria.

Antes de ser secretadas, las proteínas deben ser sintetizadas con un péptido señal que se encuentra dividido en tres regiones de forma independiente a su vía de secreción (Sec o Tat). La primer región N se encuentra cargada de forma positiva, seguida por una región altamente hidrofóbica (región H) y finalizando con la región de corte C, que contendrá en el extremo C terminal un motivo que determinará si el péptido señal es escindido de la proteína por la peptidasa señal I (AXA) o II (LAGC o 'lipobox'), siendo este último específico para lipoproteínas (Figura 2) (Hutchings *et al.*, 2009).

Las proteínas deben permanecer en un estado no plegado para ser secretadas por Sec. Este sistema se compone principalmente por la proteína SecA que junto con el canal heterotrimérico SecYEG secretan las proteínas a través de la membrana citoplasmática. SecA, una ATPasa que provee de la energía necesaria para 'empujar' a las lipoproteínas a través del canal SecYEG, reconoce y se une al péptido señal, así como a porciones de la preproteína. El complejo SecYEG es el canal mediante el cual las proteínas transportadas viajan a través de la membrana citoplasmática. SecYEG junto con SecA forman el complejo mínimo necesario (translocón) para secretar proteínas. Una vez que las proteínas se han transportado a través de la membrana, el péptido señal de éstas es removido mediante la acción de la peptidasa señal tipo I 'LepB' o por la peptidasa señal tipo II 'LspA' en el caso de las lipoproteínas (Ligon *et al.*, 2012).

Sistema Tat

El sistema de translocación de argininas gemelas (twin-arginine transport) o sistema Tat se encuentra tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, pero a diferencia del sistema Sec, este no se encuentra en todas las bacterias. En *M. tuberculosis*, este sistema desempeña un papel importante en el transporte de factores de virulencia y resistencia a fármacos, etc. Al igual que el sistema Sec, Tat transporta proteínas de manera postranscripcional que son sintetizadas con un péptido señal. Este se distingue del péptido señal de Sec por la presencia de un motivo Tat que contiene dos residuos de arginina conservados situados entre la región N y la región H del péptido señal. Además del péptido señal, el sistema Tat requiere que todas las proteínas transportadas se encuentren completamente plegadas y en Gram-negativas es utilizado fundamentalmente para la secreción de proteínas que requieren cofactores (Ligon *et al.*, 2012).

El sistema Tat de secreción se encuentra formado por tres proteínas: TatA, TatB y TatC. TatA y TatB son proteínas homólogas de pequeño tamaño que contienen cada una un solo dominio transmembranal. TatC es una proteína más grande que contiene 6 dominios transmembranales. TatB y TatC forman un complejo que contiene el sitio de unión para las preproteínas. Después de que éstas se unieron a TatBC, TatA es reclutada al complejo. El modelo exacto en que las proteínas son secretadas a través de la membrana aún es desconocido, sin embargo, se ha observado que TatA forma oligómeros de tamaños variados, que brindarían la flexibilidad necesaria para transportar proteínas ensambladas. Sin embargo, estudios recientes y cristalografía de rayos X en *Aquifex aeolicus* y *Bacillus subtilis* han mostrado que TatA no es suficiente para formar el canal de secreción, siendo TatC la proteína que reconoce el péptido señal y forma el núcleo del complejo de secreción (Rollauer *et al.*, 2012; Beck *et al.*, 2013). Al finalizar el transporte, de forma similar que en Sec, el péptido señal es cortado por LepB o LspA. La energía necesaria para secretar a las proteínas es provista por la fuerza protón motriz.

La importancia del sistema Tat de secreción puede observarse en el género *Streptomyces*, ya que análisis proteómicos en *S. coelicolor* M145

demuestran que Tat es un sistema general de secreción que puede transportar una gran variedad de proteínas y que las peptidasas señal tipo I y tipo II pueden reconocer y cortar proteínas señalizadas para ser secretadas por Tat (Widdick *et al.*, 2006).

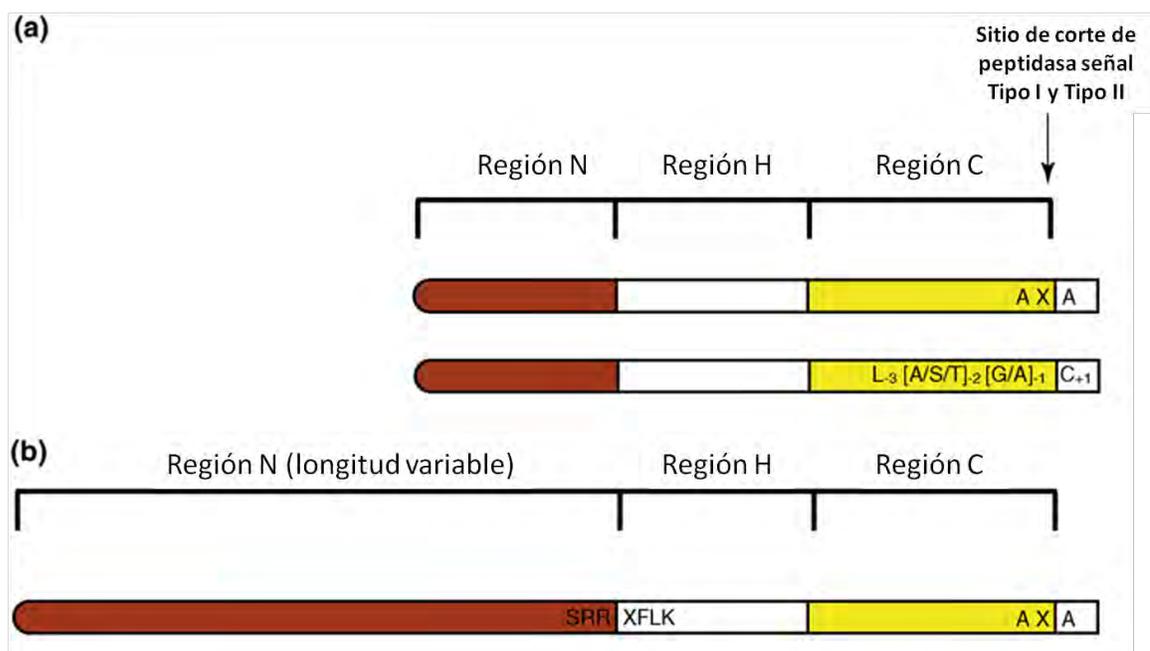


Figura 2. Péptidos señal de proteínas secretadas por Sec (a) y por Tat (b). Ambos péptidos contienen 3 regiones bien definidas: Región N cargada positivamente, Región H hidrofóbica y por último la región C, que contiene un motivo AXA de reconocimiento para el corte por la peptidasa señal tipo I (LepB) o LAGC para la peptidasa señal tipo II (LspA). Como puede observarse en (b), entre la región N y H del péptido señal, se ubica un motivo con dos argininas conservadas (S-RR-XFLK) cuando las proteínas son secretadas por el sistema Tat. (Modificada de Ligon *et al.*, 2012.)

Importancia y funciones de las glicoproteínas en bacterias

Los glicanos son una de las clases más abundantes y variadas de biopolímeros que existen en la naturaleza, con gran importancia en las células al formar uniones covalentes con proteínas y lípidos, incrementando de esta manera la variación estructural en los sistemas biológicos. Los vertebrados y especialmente los mamíferos, han evolucionado un repertorio altamente complejo de glicanos que es distinto al de invertebrados, protistas y procariontes (Otshubo K., 2006).

Los glicanos participan en una amplia variedad de procesos biológicos que se han estudiado principalmente en mamíferos, encontrando funciones tanto de tipo estructural, cuando estos forman parte de proteínas asociadas a las membranas, como de adhesión celular, tráfico molecular, activación de receptores, transducción de señales, etc., procesos regulados principalmente por la actividad de enzimas que participan en el catabolismo y anabolismo celular como glicosiltransferasas y glicosidasas (Otshubo, 2006).

Las glicoproteínas son proteínas que contienen oligosacáridos unidos en forma covalente; las cadenas de carbohidrato de una glicoproteína varían de longitud, de 1 hasta más de 30 residuos y pueden llegar a formar hasta el 80% de la masa total de la molécula. Las glicoproteínas son un grupo extraordinariamente diverso que abarca enzimas, hormonas, proteínas estructurales y proteínas de transporte, además de mostrar gran variabilidad en la composición de sus cadenas de oligosacáridos. Las cadenas de oligosacáridos de la mayor parte de las glicoproteínas están enlazadas a través de enlaces *O*-glicosídicos o *N*-glicosídicos. En los oligosacáridos unidos por enlace *O*-, un residuo de azúcar se enlaza en forma típica a la cadena lateral de un residuo de serina o de treonina, mientras que en los oligosacáridos unidos por enlace *N*-, el residuo está unido al nitrógeno del grupo amido de un residuo de asparagina (Horton *et al.*, 2008, Benz y Schmidt, 2002).

La modificación covalente de proteínas por carbohidratos se ha reconocido como una estrategia clave para modular la estructura y función proteica. La

investigación de proteínas glicosiladas en eucariontes ha resultado en un acercamiento muy detallado del mecanismo de glicosilación, observando la participación coordinada de varios organelos celulares. A pesar de la enorme importancia de la glicosilación en proteínas, anteriormente se consideraba que este tipo de modificación postraducciona era exclusivo de las células eucariontes, sin embargo, en las últimas décadas dicha creencia ha cambiado debido al incremento en la identificación de numerosas glicoproteínas bacterianas (Toumanen, 1996).

En procariontes, los primeros ejemplos de glicosilación de proteínas fueron encontrados en Arqueas, las cuales únicamente presentan glicosilación en la capa externa de la célula, encontrándose así glicoproteínas en bacterias como *Halobacterium halobium* (salinarum) y *Clostridia* (Benz and Schmidt, 2002).

Generalmente, las glicoproteínas descritas en bacterias patógenas se encuentran modificadas en primer lugar por cadenas cortas de carbohidratos (con sustituyentes mono a trisacáridos). Los carbohidratos tanto en eucariontes como en procariontes se unen a la proteína por N-glicosilación o por O-glicosilación como se describió previamente (Benz and Schmidt, 2002). Existen varios tipos de O-glicosilación, como la glicosilación con N-acetilglucosamina (O-GalNac glicosilación), que constituye el tipo más abundante de glicosilación en proteínas; la O-GlcNac glicosilación se encuentra en la mayoría de las proteínas nucleares y citoplasmáticas en sistemas eucariontes; la O-fucosilación, una modificación postraducciona es frecuente en proteínas que participan en procesos fisiológicos como señalización celular, coagulación o metástasis; O-glucosilación encontrada en factores de coagulación y la O-manosilación, que se describió primero en levaduras, siendo una modificación en la cual un residuo de manosa se une a los aminoácidos treonina y serina de las proteínas, resultando en la elongación de la cadena de oligosacáridos por la adición de manosa enlazada en O o N (Peter-Katalinic, 2005).

Tanto en procariontes como en eucariontes, los glicanos unidos a las proteínas son muy heterogéneos, siendo de un solo tipo o varios, o en algunos casos observándose incompletos o modificados.

Algunos glicanos de procariontes tales como O-antígenos de bacterias Gram negativas forman un patrón repetitivo de manera similar a las glicoproteínas de la capa externa de bacterias como *Paenibacillus alvei*, *Clostridium symbiosum* y *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*. En procariontes, es común encontrar diferencias en la composición de los glicanos, incluso cada cepa individual de una especie de bacterias muestra un marcado grado de heterogeneidad en cuanto a la organización estructural y composición química de una glicoproteína. Todas las glicoproteínas de procariontes reportadas, basándose en su localización, pueden ser clasificadas en 5 tipos generales: glicoproteínas de la capa exterior (subunidades de glicoproteína presentes en la monocapa exterior de la envuelta celular); glicoproteínas asociadas a membrana (unidades de glicoproteínas que se encuentran distribuidas tanto en la capa interna como externa de una célula, así como en el espacio periplásmico); glicoproteínas de superficie celular como aquellas que se encuentran asociadas con los pili o flagelos de una bacteria; glicoproteínas de secreción y exoenzimas; y glicoproteínas celulares localizadas dentro de la célula con funciones variadas (Upreti, 2003).

Algunas de las funciones de las glicoproteínas bacterianas pueden observarse en la figura 3.

Glicoproteínas de *Mycobacterium tuberculosis*

En *M. tuberculosis*, la glicosilación es una modificación postraduccional con amplia presencia en antígenos tanto de la membrana y pared celular, así como de aquellos que son secretados durante la infección. Estudios realizados con la proteína de 45-47 kDa (Apa), un antígeno secretado, en los cuales se analizó la reacción inmune de conejos (activación de linfocitos T) con una proteína Apa recombinante no glicosilada expresada en *E. coli*, mostraron que no existía reacción inmune del organismo cuando la proteína carecía de glicosilación (Horn, 1999).

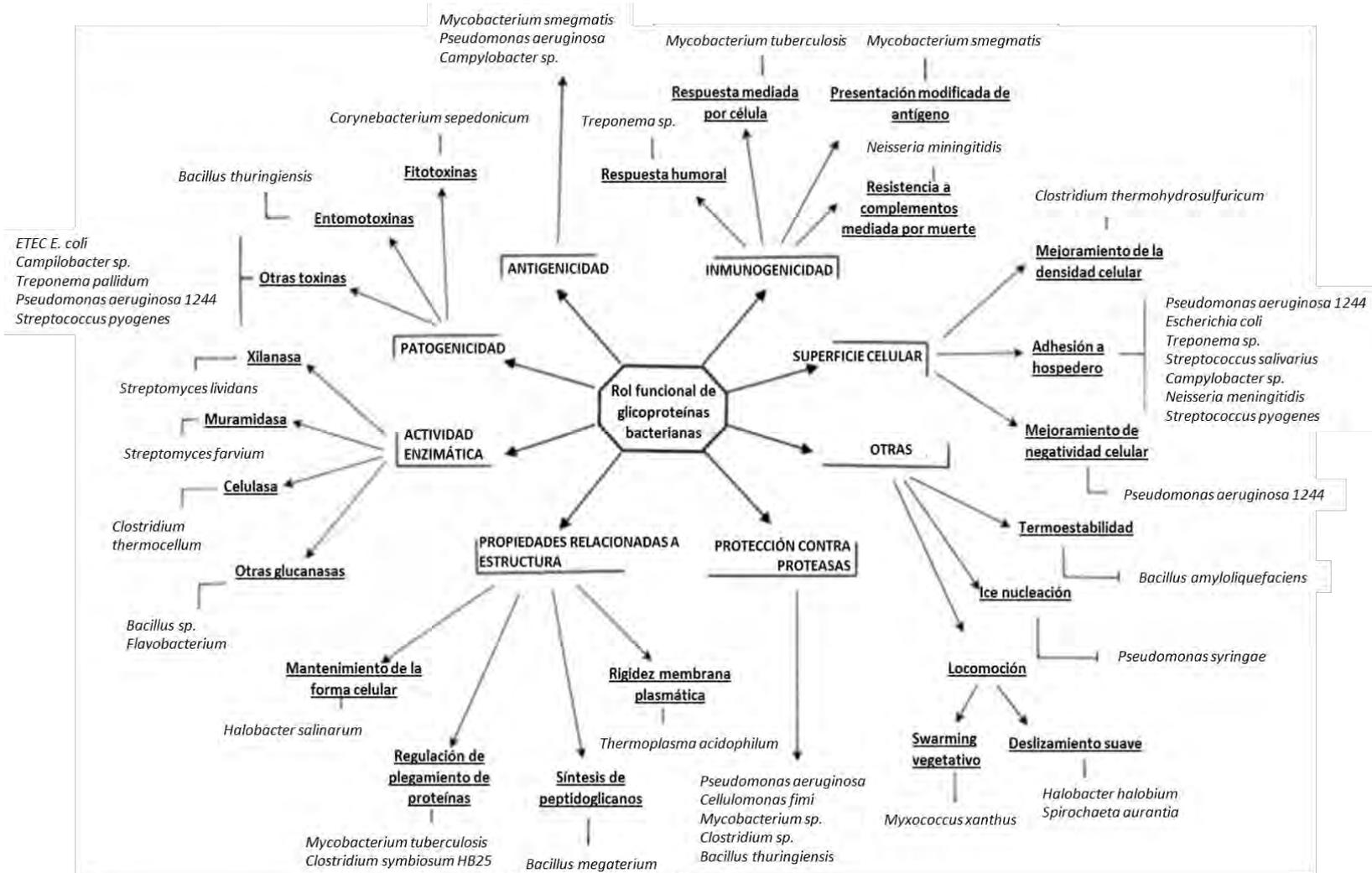


Figura 3. Diagrama que muestra la variedad de funciones relacionadas con glicoproteínas bacterianas. (Modificada de Upreti et al., 2003)

Varias glicoproteínas se han reportado en micobacterias (*M. bovis*, *M. smegmatis*, *M. tuberculosis*, BCG) basándose en el análisis de proteínas presentes en el filtrado del cultivo celular y observando su reacción con lectinas tales como la concanavalina A. Específicamente se ha observado que la glicosilación presente en *M. tuberculosis* es de tipo *O*-manosilación (Espitia y Mancilla, 1989). En 2008, González-Zamorano y colaboradores, realizaron el análisis del filtrado del cultivo de *M. tuberculosis*, encontrando mediante técnicas de cromatografía de afinidad, electroforesis bidimensional y espectrometría de masas, 41 glicoproteínas con 34 de ellas como probables proteínas manosiladas. Dentro de ellas se encontraron a proteínas que intervienen en la infección de la bacteria, inducción de respuesta a citocinas como LprG y LprA, así como otras proteínas comúnmente relacionadas a la patogenicidad de la bacteria como LpqH (19kDa), Mpt83, PstsS-1 y la proteína Apa. Cabe resaltar que de todas las proteínas que se observaron glicosiladas, únicamente la proteína Apa no es una lipoproteína, hecho que demuestra la importante relación existente entre la glicosilación y la lipidación de las proteínas para la infección bacteriana.

Se han tratado de purificar proteínas de *M. tuberculosis* empleando a otras bacterias no patógenas y de crecimiento más rápido como portadores, con el propósito de incrementar la producción de antígenos a mayor escala. Sin embargo, debido a que la glicosilación de proteínas juega un papel fundamental durante la infección, resulta indispensable que dichos antígenos se encuentren glicosilados.

Streptomyces lividans, un estreptomiceto cercanamente relacionado a *M. tuberculosis*, ha mostrado la capacidad de expresar la proteína Apa y modificarla con manosas en los mismos sitios que la proteína nativa en *M. tuberculosis*, siendo reconocida eficientemente por el suero de pacientes infectados por la bacteria (Lara *et.al.*, 2004).

Biosíntesis de proteínas O-manosiladas en bacterias

La O-manosilación de proteínas requiere glicosiltransferasas, sintasas nucleótido-azúcar y acarreadores lipídicos. El mecanismo de O-manosilación de proteínas es bien conocido en *Saccharomyces cerevisiae*, y ha servido para el entendimiento de las reacciones equivalentes en actinomicetos. En levaduras, la manosa es obtenida a partir de GDP-manosa, la cual es derivada de un intermediario de la glucólisis, fructosa-6-fosfato, mediante la acción secuencial de las enzimas fosfo-manosa-isomerasa (PMI), fosfomanomutasa (PMM) y GDP-manosapirofosforilasa (GMPP). Sin embargo, la manosilación ocurre en el lumen del retículo endoplásmico (RE) de la célula, y el primer paso no requiere la presencia de GDP-manosa, sino que la manosa sea activada por el acarreador lipídico dolicol, presente en el RE. El dolicol es un poli-isoprenoide que en levaduras está formado de 14-17 unidades de isopreno con un α -isoprenil saturado y que es manosilado por la acción de una dolicol-fosfato-manosa sintasa (DPM) que se encuentra anclada a la membrana citoplasmática mediante el extremo hidrofóbico C-terminal. El dolicol-fosfato-manosa es usado como sustrato para la transferencia de manosa a los grupos hidroxilo de los aminoácidos serina y treonina de la proteína que es secretada co-traduccionalmente; la transferencia de manosa es llevada a cabo por una dolicol-fosfo-manosa protein-manosiltransferasa (PMT) que se encuentra en la membrana del RE. En levaduras existen varias PMTs que se agrupan en tres familias (PMT1, PMT2 y PMT4), donde PMT1 y PMT2 actúan en complejos que participan en la glicosilación de diferentes proteínas y PMT4 en la glicosilación de proteínas de membrana. Cabe destacar que las PMTs únicamente realizan la transferencia y unión de la primera manosa en cada residuo de aminoácido, para que otras manosiltransferasas continúen con el elongamiento de la cadena (Espitia *et al.*, 2010; Lommel y Strahl, 2009).

Varios aspectos de la manosilación de proteínas en actinomicetos son similares en levaduras; sin embargo, existen algunas diferencias. La biosíntesis de manosa es esencial en micobacterias como *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, pero

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

Especialmente en *M. tuberculosis* se ha encontrado otra PPM que manosila el poliprenol fosfato directamente de GDP-manosa, además de que se ha observado que la manosilación en este organismo es dependiente de la traslocación mediada por el sistema Sec (VanderVen *et al.*, 2005).

Homólogos de Lnt están presentes en micobacterias, corinebacterias y estreptomicetos. Un reciente estudio en *Corynebacterium glutamicum* mostró que los dominios Ppm1 (con actividad de Lnt) y Ppm2 son indispensables para que la glicosilación de lipoproteínas pueda llevarse a cabo, ya que la completa delección del gen *ppm2* elimina por completo esta modificación en las proteínas (Mohiman *et al.*, 2012). Sin embargo, la presencia de Lnt no es indispensable para la glicosilación en todas las actinobacterias, ya que recientemente se observó que en *Streptomyces coelicolor*, la actividad de Lnt no es indispensable para que la proteína APA de *M. tuberculosis* (expresada de forma heteróloga) sea glicosilada, así como tampoco es necesaria para la glicosilación del receptor del bacteriófago ϕ C31 (Córdova-Dávalos *et al.*, 2013).

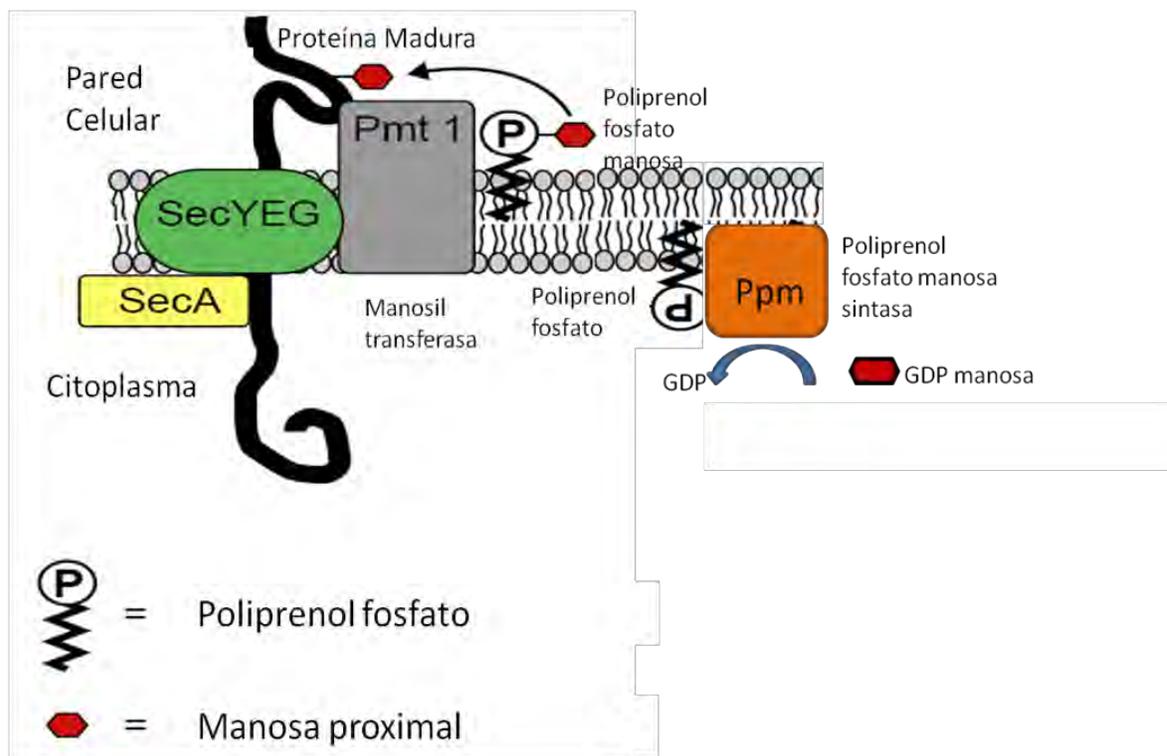


Figura 4. Mecanismo de glicosilación de proteínas en micobacterias propuesto por VanderVen en 2005, en el cual la glicosilación es llevada a cabo mediante la acción secuencial de las enzimas Ppm y Pmt, tomando manosa a partir de GDP manosa y activándola a través del poliprenol fosfato. En este modelo puede apreciarse que la glicosilación se realiza mientras la proteína está secretándose por el sistema Sec. (Modificado de VanderVen *et al.*, 2005)

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

Los primeros reportes de la proteína MPB70 (homóloga a MPT83) se hicieron en 1960 en donde se identificó como una proteína altamente expresada por *M. bovis* BCG, la cual provocaba un tipo de hipersensibilidad retardada en conejillos de indias. El término 'MPB' refiere a la proteína de *M. bovis* y 'MPT' a la proteína proveniente de *M. tuberculosis*.

Posteriormente mediante la generación de anticuerpos y pruebas de radio inmunoensayos de inhibición, se observó que MPB70 se expresaba a

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

En estudios preliminares en los que se evaluó la reactividad de antígenos preparados a partir de filtrados de cultivo de *M. bovis* contra el suero de ganado infectado con la misma bacteria, se describió la presencia de 4 proteínas que reaccionaban fuertemente contra el suero, entre ellas la proteína MPB70 encontrada a un peso molecular de 22 kDa, y en menor cantidad, dos supuestas formas glicosiladas encontradas a 25 kDa y 23 kDa de ésta misma proteína (Fifis, *et al.*, 1992). Posteriormente, mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos y electroforesis en gel desnaturizante (SDS-PAGE), se mostró que la proteína de 23 kDa no era una forma glicosilada de MPB70, sino que era una proteína diferente que mantenía una movilidad relativa de 0.83, significativamente más alta que la movilidad de MPB70, por lo que se denominó MPB83. En el mismo estudio se analizó la secuencia de aminoácidos de la región N-terminal de ambas proteínas, mostrando que MPB70 y MPB83 eran homólogas a pesar de presentar diferencias en sus cadenas polipeptídicas (Harboe *et al.*, 1995). Después, mediante el análisis genético del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, se demostró que las proteínas MPT70 y MPT83 en su forma de 25 kDa se encuentran

codificadas por genes diferentes, con el gen de MPT83 situado 2.4 kb río arriba del gen de MPT70. Además, con el análisis de la secuencia de aminoácidos, se observó que MPT83 es codificada por un marco de lectura abierto de 660 pb, con una composición de 220 aminoácidos y con un peso molecular de 22 kDa aproximadamente; adicionalmente se observó la presencia de un péptido señal de secreción típico en procariontes y un motivo LAGCS para el corte del péptido señal y posterior lipidación de la proteína (Hewinson *et al.*, 1996).

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

Estudios posteriores realizados con ensayos de Inmuno-blot, extracción con detergente (Triton X-114) y citometría de flujo, indicaron que la proteína MPB83 en su forma de 25 kDa se encontraba en la superficie del bacilo de *M. bovis* BCG Tokyo, confirmando la localización de la proteína MPT83 en *M. tuberculosis* (Harboe *et al.*, 1998), en contraste con la forma de 23 kDa, encontrada principalmente en el filtrado de cultivo junto a MPB70 (Hewinson *et al.*, 1996; Harboe *et al.*, 1998).

Sin embargo, no fue sino hasta el año 2003, en que se demostró mediante Western-blot, análisis de afinidad a Concanavalina A, espectrometría de masas y análisis de carbohidratos, que la lipoproteína MPB83 está glicosilada con residuos de manosas mediante la unión de un enlace tipo $\cdot (1 \rightarrow 3)$, observando 9 posibles sitios de glicosilación dentro de los cuales dos residuos de treonina en las posiciones 48 y 49 fueron identificados directamente. Además, se confirmó

mediante la secuenciación de la región amino-terminal realizada tanto a la forma predominante de 25 kDa y a la forma de 23 kDa de MPT83 presente en el filtrado de cultivo, que la forma de 23 kDa es generada mediante el corte proteolítico inmediatamente antes de la treonina ubicada en la posición 48 de la proteína MPT83 madura acilada de 25 kDa, por lo que la glicosilación de la proteína de 23 kDa en esos sitios podría funcionar como una señal para el corte proteolítico o como una medida preventiva contra la degradación de la proteína en la región N-terminal (Michell *et al.*, 2003).

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

El papel de ambas proteínas durante la infección de la bacteria no está totalmente claro, sin embargo, existe en ellas un antiguo dominio de adhesión celular también encontrado en insectos, animales, plantas y en células pulmonares y óseas en humanos, sugiriendo así fuertemente un papel de adhesión celular de Mpt83 y LpqH durante la infección (Wiker, 2009).

Características de la proteína de 19kDa (LpqH) de *M. tuberculosis*

La glicolipoproteína de 19 kDa es un antígeno inmunodominante codificado por el gen Rv3763 que es reconocido por células T y suero de pacientes con tuberculosis. Su glicosilación es de tipo *O*-manosilación. Cuando *M. tuberculosis* entra a los macrófagos y otras células fagocíticas, la glicolipoproteína expuesta en la superficie causa eventos de señalización en el hospedero así como su interacción con receptores TLR2 (Smith, 2003, González-Zamorano *et al.*, 2008).

En 1996, Herrman y colaboradores, analizaron la composición glicosídica de la proteína mediante mutagénesis dirigida, observando que la mutación en dos grupos de treoninas (posiciones 13, 14, 15, 19 y 20) por otros residuos de

aminoácidos reducían significativamente la unión de la lectina concanavalina A. Además, observaron que la sustitución de ciertos residuos de treonina en dichos grupos provocaba la formación de pequeños péptidos como resultado de proteólisis, otorgando un papel de regulación proteolítica a la glicosilación de esta proteína.

La delección del gen de la proteína LpqH en *M. tuberculosis* H37Rv provoca que la multiplicación de células bacterianas se vea considerablemente disminuida en comparación con la cepa silvestre. Además, durante la infección se observa una reducción del MHC-II (Complejo Mayor de Histocompatibilidad II) en células fagocíticas infectadas con la cepa silvestre, efecto que no puede apreciarse cuando las células son infectadas con la cepa carente del gen Rv3763. Estos resultados mostraron que la proteína juega un papel importante con efectos pleiotrópicos durante la interacción de *M. tuberculosis* en fagocitos (Stewart *et al.*, 2005).

La función específica de la proteína de 19 kDa aún es poco clara, sin embargo, se ha reportado que la adición de esta proteína a MDM's (monocitos derivados de macrófagos) humanos causan la sobre expresión de interleucinas importantes durante la respuesta inmune, además de promover la activación de neutrófilos (Smith, 2003).

En 2005, Díaz-Silvestre y colaboradores, demostraron que la proteína de 19 kDa actúa como una adhesina que interactúa con los receptores de manosa en macrófagos, los cuales podrían estar interactuando con los residuos de manosa de varias glicoproteínas de *M. tuberculosis*, promoviendo la fagocitosis durante la infección por la bacteria.

Recientemente se demostró mediante citometría de flujo y análisis de ELISPOT (del inglés "Enzyme Linked-ImmunoSpot") que la *O*-manosilación de la proteína antigénica Apa de *M. tuberculosis* es crucial para el reconocimiento antigénico de células T en humanos y ratones posterior a la infección. Sin embargo, la vacunación con ambas formas, manosilada y no manosilada, imparte niveles similares de protección contra retos de infección por *M. tuberculosis*. Además, se observó que la proteína brinda menor protección comparada con la

vacuna BCG, sin embargo, cuando ratones son vacunados con BCG junto con la proteína APA en ambas formas, la protección se incrementa considerablemente. Estos resultados demuestran que la *O*-manosilación de la proteína Apa es indispensable para la antigenicidad, pero es dispensable para la inmunogenicidad y protección posterior al reconocimiento antigénico (Nandakumar *et al.*, 2013).

***La bacteria Streptomyces lividans* como hospedera para la producción de proteínas heterólogas**

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

Especialmente, *S. lividans* se ha usado como hospedero para la expresión de una amplia variedad de genes provenientes de varios organismos. Sin embargo, aunque los altos niveles de expresión de genes clonados en esta bacteria son aceptables, resulta necesario regular la expresión para prevenir efectos deletéreos en el crecimiento de la célula, con promotores como TipA que

es inducido con thiostrepton. Una característica de *Streptomyces* spp., es la gran solubilidad que presentan las proteínas secretadas expresadas, en comparación con organismos como *Escherichia coli*, en donde debido a la presencia de una membrana externa, las proteínas heterólogas son ineficientemente exportadas de la bacteria y almacenadas en cuerpos de inclusión con una conformación biológica inactiva (Kieser, 2000; Anné y Lieve, 1993).

La secreción de proteínas en *Streptomyces* spp. ocurre mediante los sistemas Sec y Tat con moléculas precursoras que contienen un péptido señal en la región N-terminal. Esta secuencia es proteolíticamente removida por una peptidasa señal durante o momentos después de la traslocación del precursor; un corto tramo de aminoácidos hidrofílicos con carga positiva en la región N-terminal de la proteínas es seguido por un largo núcleo en forma α -hélice de aminoácidos hidrofóbicos y una región C-terminal con un motivo que contiene aminoácidos que son reconocidos y cortados por una peptidasa señal (Kieser, 2000; Anné y Lieve, 1993).

III. JUSTIFICACIÓN

Una de las enfermedades infecciosas que provoca más muertes por año es la tuberculosis causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* que infecta a personas de cualquier edad, siendo más peligrosa en personas adultas. Trabajar con *M. tuberculosis* resulta difícil, tardado y peligroso debido a su crecimiento lento y a la necesidad de trabajar en laboratorios de alto nivel de bioseguridad.

Debido a la importancia de la glicosilación durante la infección de la bacteria resulta indispensable trabajar con una bacteria emparentada con *M. tuberculosis*, que secrete proteínas heterólogas y que posea los mecanismos de glicosilación que permitan la obtención de antígenos glicosilados correctamente.

Particularmente, en el laboratorio del Dr. Servín hemos trabajado en la expresión de proteínas antigénicas de *M. tuberculosis* en *S. lividans*, organismo taxonómicamente relacionado con las micobacterias, no patógeno, de crecimiento relativamente rápido, fácil manipulación y con una capacidad ampliamente estudiada para secretar proteínas al medio extracelular. Hemos observado que los antígenos inmunodominantes Mpt83 y LpqH al ser expresados en *S. lividans* mantienen la glicosilación y son recuperados fácilmente.

Debido a la importancia de la glicosilación para el reconocimiento antigénico, en el siguiente estudio nos dedicamos a analizar las propiedades de los antígenos Mpt83 y LpqH, tales como su ubicación, glicosilación y su capacidad para ser detectados por sueros de personas con tuberculosis. Lo anterior se lleva a cabo mediante experimentos de expresión, detección y caracterización de proteínas como Cromatografía de afinidad, electroforesis, transferencia y detección de proteínas en membrana (Western Blot), espectrometría de masas MALDI-TOF (por sus siglas en inglés “Matrix-assisted laser desorption/ionization – Time of Flight”) y ensayos de inmuno detección enzimática (ELISA).

IV. OBJETIVOS

Generales

- Hacer una caracterización a nivel molecular de las lipoproteínas MPT83 y LpqH producidas en *S. lividans* para confirmar que la glicosilación de ambas proteínas se realiza de forma similar que en *M. tuberculosis*.

Particulares

- Hacer una construcción para cada lipoproteína con su péptido señal nativo, que contenga una etiqueta de seis histidinas para su purificación por columna de níquel Ni-NTA.

- Hacer una construcción para reemplazar el péptido señal nativo de la proteína LpqH por el péptido señal de una lipasa extracelular.

- Determinar la composición de manosas presentes en ambas proteínas mediante un análisis de MALDI-TOF

- Observar si ambas proteínas son reconocidas como antígenos por el suero de pacientes infectados con *M. tuberculosis*.

- Determinar si la glicosilación en las proteínas LpqH y MPT83 expresadas de forma heteróloga en *S. lividans* es necesaria para mostrar reactividad frente a los sueros de personas infectadas y enfermas con tuberculosis.

V. METODOLOGÍA

Cepas y plásmidos utilizados

En el presente trabajo se utilizaron cepas de *S. lividans* y de *Escherichia coli* para la expresión de las proteínas Mpt83 y LpqH (19 kDa) y para la construcción de los diferentes plásmidos (Tabla 1). Los plásmidos utilizados (Tabla 2.) fueron pBD3.1 y PBIA4, los cuales contienen el gen Rv3763 que codifica para la proteína LpqH y el gen Rv2873 que codifica para la proteína Mpt83 respectivamente, además del vector multicopia pIJ6021 a partir del cual están diseñados los dos plásmidos anteriores. Previamente en el laboratorio del Dr. Luis Servín González se transformó *S. lividans* 1326 con ambos plásmidos en experimentos separados, comprobando que las proteínas Mpt83 y LpqH se expresaban y glicosilaban correctamente en la membrana de la bacteria.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F ⁻ endA1glnV44thi-1recA1relA1gyrA96deoRnupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _k ⁻ m _k ⁺), λ -	Grant, 1990
IBEC58	Δ dam Δ dcm Δ hsdRMS derivada de BW25113 Para obtener DNA plasmídico no metilado	González-Cerón et al., 2009
<i>S. lividans</i>		
1326	Silvestre	John Innes Centre
Δ pmt	Derivada de <i>S. lividans</i> 1326 con el gen SI3509 deletado, el cual codifica para la manosil transferasa Pmt.	Este trabajo

Adición de una etiqueta de seis histidinas a los genes Rv2873 y Rv3763

Para añadir una etiqueta de seis histidinas (6xHis) a las proteínas Mpt83 y LpqH codificadas por los genes Rv2873 y Rv3763 respectivamente, los plásmidos pBD3.1 y pBIA4 se digirieron con las enzimas NdeI y EcoRI cortando en sitios del plásmido que flanquean las secuencias de ambos genes con la intención de obtener los insertos y utilizarlos como sustrato para la amplificación por PCR. Las digestiones se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 1.2% y las bandas correspondientes a los insertos de Rv2873 y Rv3763 (700 y 517 pb respectivamente) se purificaron posteriormente. Se diseñaron dos oligonucleótidos río arriba (forward) con el inicio de la secuencia de los genes ya mencionados, más dos sitios de corte para XbaI y NdeI, y los oligonucleótidos río abajo (reverse) con la secuencia de seis codones que codifican para histidina, un codón de paro y el sitio de corte para EcoRI. En la tabla 3 se encuentran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

El vector pUC18 y los productos de PCR se digirieron previamente con enzimas de restricción en los sitios de XbaI y EcoRI a 37°C toda la noche, se realizó una electroforesis en gel de agarosa LMP al 1.2 % tanto del vector como de los productos de PCR. Posteriormente se hizo la ligación de los productos de PCR (de cada uno de los genes con su péptido señal, codón para cisteína de anclaje a membrana y etiqueta 6xHis) con el vector mediante el uso de Ligasa T4 (Invitrogen) incubando durante una noche a temperatura ambiente. Los plásmidos pBA28H y pBA37H que se obtuvieron como producto de las ligaciones se transformaron en la cepa de *E. coli* DH5 α mediante electroporación y posteriormente su estructura se confirmó mediante digestión con enzimas de restricción. La secuencia de los genes modificados se comprobó mediante secuenciación utilizando el método de Sanger, realizada en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Clonación del gen Rv2873 en vector multicopia pIJ6021

Después de verificar mediante secuenciación que los plásmidos pUC18mpt y pUC18lpq tuvieran los genes con la secuencia correcta, y debido a que *S.lividans* 1326 posee un sistema de restricción para DNA metilado, ambos plásmidos se introdujeron por transformación en *E. coli* IBEC58, la cual carece de los 3 sistemas de metilación de DNA propios de la bacteria, lo que hizo posible la obtención de los plásmidos no metilados. Posterior a la transformación, se aislaron los plásmidos pBA28H y pBA37H a partir de esta cepa, se digirieron con NdeI y EcoRI al igual que el vector multicopia pIJ6021. Posteriormente se purificaron los fragmentos a partir de un gel de agarosa LMP y después se ligaron, los plásmidos obtenidos como resultado de las ligaciones se nombraron pBIA4H6 y pBD3.1H6. Ambos plásmidos se introdujeron por transformación mediante protoplastos en *S.lividans* 1326. Para verificar que había células transformantes con la construcción deseada se tomaron 6 colonias aisladas como producto de cada transformación, se resuspendieron en 100µl de agua cada una y se sembraron por sectores en cajas de Petri con medio Manitol - Soya (MS) + 50 µg/ml de kanamicina, incubándose a 30°C durante 5 días. Transcurrido el tiempo se cosecharon las esporas de cada sector, se inocularon en 3 ml de LB + sacarosa 25 % con 50 µg/ml de kanamicina durante 36 hs y los plásmidos se purificaron haciendo minipreparaciones de las células de cada sector.

Los plásmidos purificados de los 6 sectores de cada construcción se cortaron con la enzima SstII y se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1 % para observar el patrón de digestión correcto y asegurar que los plásmidos tuvieran integrados los genes de interés. Finalmente se transformó nuevamente a *S. lividans* 1326 con los plásmidos que mostraron el patrón correcto de digestión, se obtuvieron colonias aisladas de células transformantes y se realizaron tapetes bacterianos en cajas de Petri con medio MS sólido para la obtención de esporas (almacenadas a -20 °C en glicerol al 20 %).

Expresión de proteínas en cultivos celulares

Para la expresión de proteínas se pre-germinaron 400 μ l de una preparación densa de esporas en 10 ml de medio Extracto de levadura – Triptona (YT2X) durante 6 h a 37°C con agitación constante. Posteriormente el medio se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min y la pastilla celular “pellet” fue resuspendida en 10ml de medio LB + azúcar 25 %. Se inoculó con la suspensión anterior 100 ml de medio LB + azúcar 25 % con 50 μ g/ml de kanamicina en un matraz de 500 ml y se incubó durante 16 h a 30 °C con agitación constante. Pasadas las 16 h, se indujo la expresión de las proteínas de interés con 5 μ g/ml de tiostreptón, incubando nuevamente a 30 °C hasta cumplir 36-40 h.

Posterior a las 40 h, el cultivo fue centrifugado a 7500 rpm y el sobrenadante fue almacenado a -20 °C. El pellet obtenido que contiene al micelio fue sometido a fraccionamiento celular para obtener la fracción membranal.

Construcción de la cepa mutante Δpmt de *S. lividans*

La generación de la mutante en el gen *SL3509* de *S. lividans* que codifica a la enzima Pmt que añade el primer residuo de manosa en el proceso de glicosilación de proteínas se llevó a cabo siguiendo el método de recombinación descrito por Gust y colaboradores en 2004 (REDIRECT). Debido a que los genomas de *S. lividans* y *Streptomyces coelicolor* son prácticamente iguales, se utilizó el cósmido StE87 que previamente se utilizó para la generación de una mutante en la enzima PMT (*SCO3154*) de *S. coelicolor* (Córdova-Dávalos *et al.*, 2013). La mutante nula se verificó por PCR para confirmar el reemplazo correcto del gen por una secuencia llamada cicatriz así como con la prueba de infección por el fago Φ C31 cuyo receptor se encuentra glicosilado.

Purificación de proteínas glicosiladas mediante cromatografía de afinidad a Concanavalina A

Precipitación de proteínas con sulfato de amonio

La precipitación de proteínas con sulfato de amonio puede realizarse de dos formas: el compuesto sólido puede añadirse directamente a la muestra o bien, puede prepararse una solución de sulfato de amonio saturado al 100% y posteriormente llevar la muestra a la concentración final deseada utilizando la solución.

Debido a que los volúmenes de muestra utilizados en este trabajo son altos, se decidió agregar el sulfato de amonio sólido directamente a la muestra. Para ello se realizó la precipitación de proteínas agregando a 15 ml de sobrenadante concentraciones distintas de sulfato de amonio: 20, 40, 60 y 80 % en agitación constante a 4 °C durante 12 h. Pasado el tiempo, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 1 h y el “pellet” se resuspendió en 1 ml de agua, se eliminó el sobrenadante final.

Las muestras precipitadas se dializaron con 1 litro de agua durante 24 h a 4°C en membranas con un corte de 6 a 8 kDa, se cambió el agua cada 8 h. Posteriormente, el agua se sustituyó por una solución amortiguadora “buffer” de acetatos (acetato de sodio-ácido acético 0.2 M, pH=5) durante 24 h. Pasado el tiempo, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min, se eliminó el pellet y se conservó el sobrenadante a 4°C.

Purificación de proteínas por columna de afinidad a Concanavalina A

Las proteínas se precipitaron con sulfato de amonio al 80% y se dializaron contra agua, “buffer” de acetatos y “buffer” de equilibrio (en Mm: acetato de sodio 1, cloruro de manganeso 1, cloruro de magnesio 1, cloruro de calcio 1, cloruro de sodio 1, azida de sodio 0.01%, pH=6) durante 24 h cada uno a 4°C. Para la purificación por columna de afinidad, se empacó 1 ml de resina de agarosa unida a concanavalina A (Con A Sepharose™ 4B GE Healthcare) y se lavó con 5 ml de

buffer de equilibrio, posteriormente se pasaron los 5 ml de muestra en tres ocasiones por la columna a 4 °C durante 12 h. Después, la columna se lavó con 10 ml de buffer de equilibrio, tomando fracciones de 1 ml y se cuantificó la absorbancia en un espectrofotómetro a 280 nm hasta validar la nula presencia de proteínas. Para eluir las proteínas pegadas a la columna se utilizó el azúcar competidor α -D-metilmanósido, a una concentración 1 mM en “buffer” de equilibrio. Se tomaron 10 fracciones de 1 ml y se cuantificó la proteína a 280 nm.

Para el almacenamiento de la columna, se pasaron 20 ml de agua por la resina y posteriormente 5 ml de etanol al 20%, se guardó a 4 °C con al menos 1 ml de etanol sobre la base de la cama.

Purificación de proteínas con una etiqueta de 6 histidinas

Para obtener una mayor concentración de ambas lipoproteínas, se inocularon cultivos de 1 litro de medio LB + azúcar 25 % con esporas de *S. lividans* que contenían los plásmidos pBIA4H6 y pBD3.1H6. Los cultivos se indujeron con tiostreptón a las 16 h y se incubaron a 30 °C hasta completar 40 h. Se separó el micelio del sobrenadante del cultivo mediante centrifugación para el aislamiento de la fracción membranal mediante fraccionamiento celular el cual se realizó por ultra centrifugación siguiendo el método mostrado en “The QIAexpressionist™ 2003. El sobrenadante se almacenó a -20 °C para su posterior uso.

Purificación de proteínas Mpt83 y LpqH membranales mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA

Para la solubilización de las lipoproteínas ancladas a la membrana de la bacteria fue necesario el uso de un detergente. La fracción membranal fue resuspendida en 5 ml de Tris 20 mM pH=8 con 4% LDAO (lauril-dimetilamina-N-óxido), manteniéndose en agitación a temperatura ambiente durante 1 h. El material insoluble fue removido mediante centrifugación a 13,500 rpm por 20 min.

Se añadieron 2 ml de resina de agarosa Ni-NTA en una columna de 10 ml hasta que se ésta se compactara por gravedad. Para equilibrar la columna se pasaron 20 ml de Tris 20 mM pH=8 con 2 % de LDAO (Buffer A). Una vez equilibrada, se pasó por la columna dos veces el extracto de proteína membranal solubilizado previamente, dejándola reposar durante 12 h. La columna se lavó con 20 ml de "Buffer" A + 10 mM de imidazol y posteriormente con 20 ml de Tris 20 mM pH=8 sin LDAO ("Buffer" B) + 20 mM de imidazol. La proteína se eluyó con Buffer B + 250 mM de imidazol y se colectó en 10 fracciones de 1.5 ml cada una. Posteriormente las fracciones de la elución se cuantificaron por el método de Bradford para determinar la cantidad de proteína en cada una de ellas.

Purificación de proteínas Mpt83 y LpqH del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA

Se precipitaron 800 ml de sobrenadante con 80 % de sulfato de amonio en agitación a 4 °C durante 12 h. Las proteínas se obtuvieron mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 1 h y se resuspendieron en un volumen pequeño de "Buffer" de Tris 20 mM pH=8 ("Buffer" B). Las muestras se dializaron extensivamente en membranas con un corte de 3.5 kDa, con 4 pases de 1 L de "Buffer" B a 4 °C durante 24 h máximo, se recuperaron y se almacenaron a 20 °C.

Para la purificación de las muestras por columna, se cargaron 3 ml de resina en una columna. La resina se equilibró con 20 ml de "Buffer" B y posteriormente se cargó la muestra de proteínas previamente dializada, dejándola reposar durante 12 h. Se realizaron dos lavados de 20 ml con "Buffer" B + 10mM de imidazol y "Buffer B" + 20 mM de imidazol, respectivamente. Las proteínas se eluyeron con "Buffer" B + 250 mM de imidazol y se colectaron en 10 fracciones de 1.5 ml.

Análisis de proteínas por electroforesis y "Western-Blot"

Las muestras de proteínas precipitadas con sulfato de amonio y purificadas mediante columna de afinidad se concentraron por el método de precipitación de

proteínas con TCA (ácido tricloro-acético) (Jacobs *et al.*, 2001) y se resuspendieron en “buffer” de carga para proteínas 2X (0.125 M Tris-HCl pH=6.8, SDS 4 %, glicerol 20 %, 2-mercaptoetanol 10 %). Se corrieron 10 µg de muestra en geles de poliacrilamida al 14 y 16 % durante 2 h a 120 mV y se analizaron mediante la tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

Las membranas de PVDF utilizadas para los ensayos de expresión por inmuno-blot se bloquearon con TBS-Tween + leche descremada 5 %, se incubaron con el anticuerpo primario policlonal específico de cada proteína en una dilución 1:1000 y posteriormente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo a 4 °C. Las membranas para ensayos de detección de manosas con concanavalina A se bloquearon con albúmina 1 % (BSA) y posteriormente se incubaron con concanavalina A 1 µg/ml a temperatura ambiente. La detección se realizó utilizando un estuche de quimioluminiscencia ROCHE.

Preparación de las muestras de proteínas para su análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

Las muestras purificadas de las proteínas se concentraron mediante evaporación del solvente al vacío utilizando un concentrador Savant SpeedVac®. Los espectros de masas de las proteínas purificadas se obtuvieron mediante un equipo MALDI-TOF para determinar la masa total de las proteínas purificadas y sus respectivas modificaciones aminoacídicas.

La solución de cristalización se preparó mezclando una solución saturada de la matriz (THAP: 2,4,6 trihydroxy acetophenone y HABA: 2-(4 hydroxybenzeneazo) benzoic acid) con ácido trifluoroacético (TCA) 0.1% y acetonitrilo (ACN) 1:2 en agua ultrapura Milli Q. Se tomó 1 µl de la proteína concentrada y se mezcló con 1 µl de la solución de cristalización.

Se colocó 1 µl de esta mezcla en la placa para MALDI-TOF y se dejó cristalizar durante 5 min. Posteriormente la placa se introdujo en el espectrómetro de masas MALDI-TOF Bruker modelo Microflex para obtener los espectros.

Preparación de las muestras de proteínas para el análisis de la reactividad de sueros mediante ensayos de ELISA

Para el análisis de reactividad de diferentes sueros frente a los antígenos Mpt83 y LpqH expresados y purificados de *S. lividans* se ocuparon 91 sueros de los cuales 46 correspondían a personas infectadas con tuberculosis que no presentaban la enfermedad, 15 a pacientes con tuberculosis confirmada y 30 a personas sanas. Por otro lado, para observar si la glicosilación era necesaria para el reconocimiento de anticuerpos presentes en los sueros de personas, se escogieron 15 sueros al azar de entre los 91 sueros utilizados anteriormente y se hicieron los ensayos de ELISA utilizando los antígenos Mpt83 y LpqH provenientes de la cepa mutante *S. lividans* · *pmt*. Los sueros en ambos ensayos se ocuparon en diluciones 1:300 y 1:500 respectivamente.

Las muestras de proteínas purificadas se utilizaron a una concentración de 5 µg/ml en "Buffer" de carbonatos (carbonato de sodio 15 mM, bicarbonato de Sodio 35 mM). Se tomaron 100 µl de muestra de proteína (por pozo) y se colocaron en placas para ELISA de 96 pozos, posteriormente se dejaron incubar durante una noche a 37 °C y a continuación se lavaron 3 veces con 250 µl de PBS + Tween 20 al 0.005 %. Se añadieron 100 µl de una solución de PBS + Tween 20 al 0.05 % + BSA 2 % a cada pozo para bloquear contactos inespecíficos proteína-anticuerpo y se dejó en agitación durante 2 h. Transcurrido el tiempo se añadieron 100 µl de cada uno de los sueros por duplicado y en ambas diluciones, se dejaron en agitación durante una hora para añadir posteriormente el anticuerpo secundario anti-IgG de humano unido a peroxidasa.

Para observar los resultados, se añadieron 100 µl de solución reveladora (citrato de sodio 0.1 M, ácido cítrico 0.1 M, 0.1 mg/ml de ortofenildiaminobenzidina, 4 µl de H₂O₂) a cada pozo en oscuridad durante 15 min, la reacción se detuvo con ácido clorhídrico 2 N y se obtuvieron lecturas de absorbancia a 450 nm.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la expresión de las lipoproteínas LpqH y Mpt83 en *S. lividans* 1326, se realizaron previamente en el laboratorio construcciones en las que se insertaron los genes completos de ambas lipoproteínas en el vector multicopia de alta expresión pIJ6021, en el que los genes son transcritos a partir del promotor fuerte PtipA, generando los plásmidos pBIA4 para la expresión de la proteína Mpt83 y pBD3.1 para la expresión de la proteína LpqH (Arista, 2012; Torres, 2012).

Adicionalmente se generaron nuevas construcciones en las cuales se añadió por medio de PCR una secuencia codificante de 6 histidinas (6xHis) en el extremo C-terminal de las lipoproteínas con la finalidad de no perjudicar la expresión del péptido señal nativo ubicado en el extremo N-terminal y de esta manera facilitar la purificación de las proteínas mediante una columna de afinidad a níquel (Ni-NTA). Se generaron los plásmidos pBIA4H6 que contiene el gen completo de la proteína Mpt83 y pBD3.1H6 con el gen completo de la proteína LpqH, ambos con la etiqueta 6xHis en las secuencias génicas. Adicionalmente, se realizó una construcción en la que se eliminó la secuencia que codifica el péptido señal nativo de la proteína LpqH y se reemplazó por una secuencia que codifica a los 48 aminoácidos pertenecientes al péptido señal de la lipasa extracelular LipA de *Streptomyces exfoliatus* (Pérez *et al.*, 1993). Además, se añadió a la construcción la etiqueta 6xHis en el extremo C-terminal obteniendo el plásmido pBIA7H6 que insertado en *S. lividans* promueve la secreción de la proteína LpqH al espacio extracelular. De esta forma, se obtuvieron dos tipos de construcciones, aquellas con los genes nativos más la etiqueta 6xHis clonados en el vector pIJ6021 y la construcción con el gen de la proteína (nombrada LpqH F) fusionada con el péptido señal de la lipasa LipA clonado en pIJ6021.

Para la expresión de proteínas se utilizaron los plásmidos pBIA4 y pBD3.1 que fueron introducidos en la cepa *S. lividans* 1326 mediante transformación de protoplastos. Se hicieron cultivos de *S. lividans* con los diferentes; posteriormente las proteínas fueron colectadas tanto del sobrenadante como de la fracción membranal de la bacteria obtenida mediante fraccionamiento celular, ya que se

había observado previamente que una porción de las proteínas ancladas a la membrana de la bacteria eran rasuradas y recuperadas en el medio de cultivo bacteriano. Las proteínas de ambas fracciones aparentemente conservan la glicosilación ya que reaccionan de manera positiva en ensayos de “Western Blot” con anticuerpos y ensayos con la lectina Concanavalina A llevados a cabo anteriormente en el laboratorio (Arista, 2012; Torres, 2012).

Por lo anterior, en los ensayos realizados posteriormente se utilizaron a las proteínas Mpt83 y LpqH ubicadas en la membrana de la bacteria, así como aquellas proteínas que fueron rasuradas y recuperadas en el sobrenadante del cultivo bacteriano.

Precipitación de la proteína MPT83 en sobrenadante a diferentes concentraciones de sulfato de amonio

Para determinar la concentración de sulfato de amonio necesario para que la proteína MPT83 ubicada en el sobrenadante (peso molecular aproximado de 17-18 kDa) se precipite, se realizaron pruebas con 15 ml de sobrenadante, llevando al 20, 40, 60 y 80 % de saturación a 4°C.

En la figura 5 se observa la presencia de una banda enriquecida en el carril con el 80 % de saturación de sulfato de amonio que corresponde a la proteína Mpt83 trunca, con un peso molecular aproximado de 17-18 kDa. Se observa además, que a concentraciones más bajas de sulfato de amonio la proteína de interés no se precipita a diferencia de otras proteínas que se observan enriquecidas, por lo que dicha variación favorece la eliminación de gran cantidad de proteínas en las muestras de sobrenadante, lo que permite una purificación proteica más eficiente. Debido a esto, los sobrenadantes posteriormente utilizados fueron precipitados con el 80% de saturación de sulfato de amonio a 4°C.

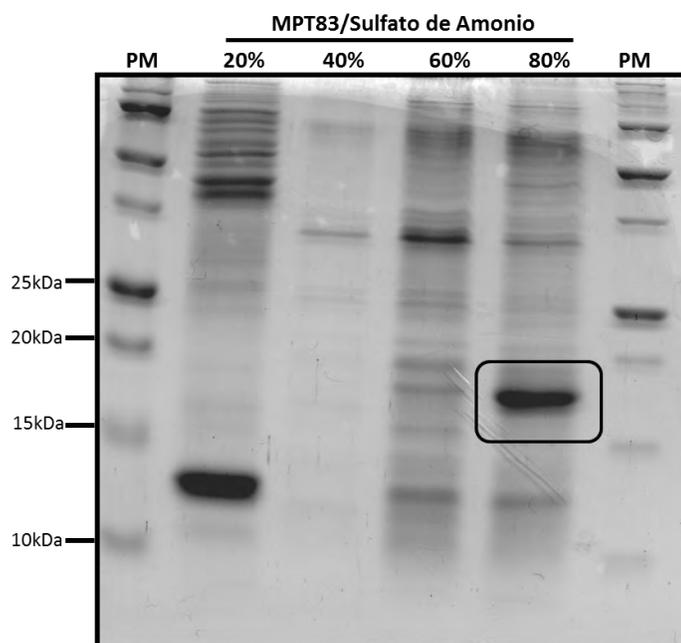


Figura 5. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de las proteínas obtenidas mediante precipitación con diferentes concentraciones de sulfato de amonio. Se observa que la proteína Mpt83 de sobrenadante (en recuadro) se precipita a una concentración de 80% de sulfato de amonio.

Ensayos de purificación por columna de afinidad con Concanavalina A

Después de precipitar y dializar exhaustivamente las muestras de las proteínas MPT83 y LpqH que se recuperaron al 80% de saturación de sulfato de amonio, se purificaron mediante una columna de Concanavalina A acoplada a sefarosa. Para recuperar las proteínas unidas a ConA de la resina se utilizó el azúcar competidor α -metil-manopiranosido a una concentración de 0.05 M. En la figura 6 se encuentran las fracciones correspondientes al lavado y a la elución de ambas proteínas.

Debido a que en experimentos previos se había observado que ambas proteínas conservaban la glicosilación aún después de ser rasuradas de la membrana, se esperaba recolectarlas en las fracciones de elución de la columna de ConA. Sin embargo, como puede observarse en la figura 6.a, la banda que corresponde al peso molecular esperado de 17-18 kDa para la proteína Mpt83 se obtuvo en las fracciones de lavado y no en las fracciones de elución donde se

esperaban. Lo mismo ocurrió con la proteína LpqH (Figura 6.b) que se observa con un peso molecular esperado de 12-14 kDa. Estos resultados indican que ambas proteínas no se retuvieron en la resina. En ambos geles (Figura 6) se observa el enriquecimiento de bandas que pertenecen a otras proteínas con un peso molecular mayor de 25 kDa, que se recuperaron en las fracciones de elución y no en las de lavado, indicando que la unión de la resina acoplada a ConA con proteínas manosiladas se realizó de manera eficiente. El hecho de que las proteínas Mpt83 y LpqH rasuradas de la membrana no se unieron fuertemente a la resina puede indicar que su afinidad por la resina es muy baja, o bien que la glicosilación se perdió durante el proceso de diálisis o purificación, ya que se trata de proteínas incompletas o truncas.

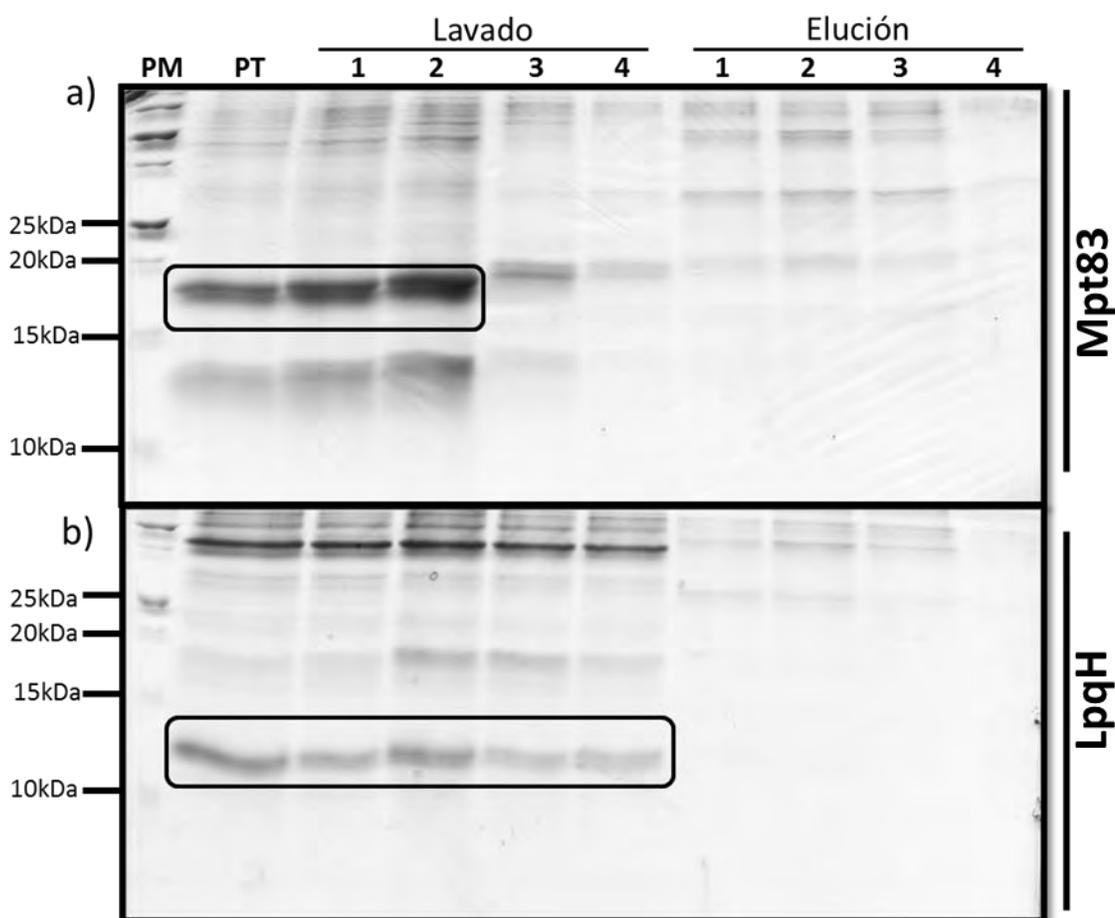


Figura 6. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de las proteínas del sobrenadante purificadas por columna de afinidad a ConA, a) Mpt83 y b) LpqH. Los carriles indicados con número corresponden a la fracción de 1 ml de lavado o elución. Se observa que ambas proteínas se obtuvieron en las fracciones de lavado y no en la elución.

Ensayos de Western Blot con anticuerpos y Concanavalina A de la proteína MPT83 membranal

Para asegurar que la proteína fue expresada correctamente por *S. lividans*, se realizaron ensayos de “Western blot” tanto con anticuerpos como con ConA antes de precipitar las muestras de sobrenadante con sulfato de amonio. En la figura 7, se observa que la proteína MPT83 se encontró a 17-18 kDa en el sobrenadante del cultivo, mientras que en el control con el vector vacío pIJ6021 no se observó la presencia de la proteína, indicando que ésta se expresó correctamente y sobre todo de forma glicosilada, ya que en el Western Blot con ConA, apareció una banda en el carril que corresponde a la proteína con el peso molecular esperado.

Los resultados anteriores muestran claramente que la proteína MPT83 recuperada del sobrenadante de los cultivos no se unió a la columna de afinidad a ConA, a pesar de encontrarse glicosilada antes del paso por la misma (Figura 7). Debido a que es probable que las manosas presentes en las proteínas MPT83 y LPQH rasuradas de la membrana se perdieron durante alguno de los pasos de precipitación y dializado, se procedió a realizar los mismos experimentos usando a las proteínas obtenidas de la membrana celular de la bacteria, para evitar de esta manera los pasos de precipitación requeridos en proteínas secretables.

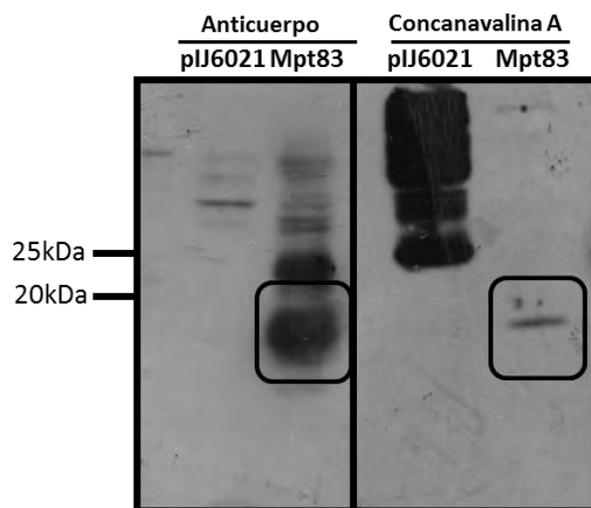


Figura 7. Western Blot con anticuerpos anti Mpt83 y con concanavalina A de muestras de la proteína Mpt83 antes de ser precipitada con sulfato de amonio. Se cargaron 10 µg de proteína en cada carril. Se observa que una banda de 17-18kDa, perteneciente a la proteína es reconocida tanto por los anticuerpos como por la ConA.

Purificación mediante cromatografía de afinidad a concanavalina A de las proteínas MPT83 y LpqH provenientes de la membrana celular de *S. lividans* 1326

La proteína MPT83 de membrana fue obtenida mediante fraccionamiento celular, sin embargo, debido a que las muestras contienen una alta cantidad de lípidos de membrana fue necesario solubilizarlas con el detergente Tritón X-100 al 0.5% para realizar posteriormente una cromatografía de afinidad a Con A y purificarla. Para la cromatografía de afinidad en columna, el sobrenadante de las muestras de membrana centrifugadas y tratadas con Tritón X-100 se pasó por la columna de afinidad que contenía 2 ml de resina ConA-sefarosa previamente empacada. Las muestras se incubaron con la resina durante una noche a 4 °C para maximizar la unión de las proteínas. Para el análisis de las muestras se realizó una electroforesis con proteína total, membrana solubilizada, fracciones de la elución y del lavado, finalmente la ubicación de las proteínas se detectó mediante una tinción con azul de Coomassie y un “Western-Blot” con anticuerpos anti-MPT83.

Se dejó pasar la muestra y se realizó un lavado con 20 ml de “buffer” de equilibrio tomando fracciones de 1 ml y cuantificando a una longitud de onda de 280 nm hasta que la absorbancia estuviera prácticamente en cero, lo que nos sugeriría un estado de equilibrio de la interacción de las proteínas retenidas con su ligando en la columna y promover una mejor purificación de las proteínas que se encontraban unidas a la resina. Posteriormente las proteínas se eluyeron hasta dejar de obtener lectura a 280 nm, tomándose fracciones de 1 ml.

Para los ensayos de “Western Blot” se utilizaron las fracciones 2, 3 y 4 que contenían las muestras de las proteínas de membrana Mpt83 y LpqH purificadas y que tuvieron una mayor lectura de absorbancia a 280 nm. En un primer ensayo de SDS-PAGE y mediante la tinción con azul de Coomassie para visualizar la totalidad de proteínas en las diferentes muestras, no se observó alguna banda con el peso molecular de la proteína Mpt83 (Figura 8.a). Sin embargo, en un “Western Blot” en el que se usaron anticuerpos contra MPT83 se pudo observar claramente una banda con un peso molecular de 25kDa en todas las muestras: proteína total,

lavado y fracciones de elución que corresponde con la proteína MPT83 (Figura 8.c). Para confirmar si dicha banda era reconocida con ConA se realizó un segundo “Western Blot” en el que se cargaron muestras de las mismas fracciones y se incubaron con ConA. Los resultados se muestran en la figura 8.b en donde se observa el reconocimiento por parte de la ConA de la banda de 25 kDa en todos los carriles excepto en la fracción de lavado, con una intensidad de señal que se incrementó en las fracciones que corresponden a la elución de la proteína.

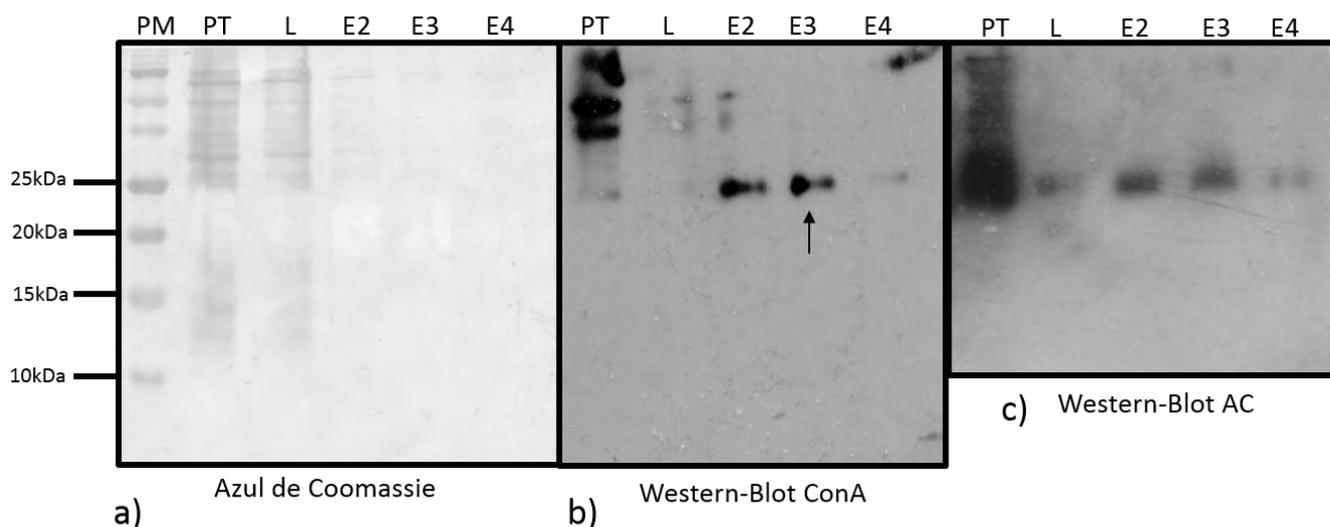


Figura 8. SDS-PAGE y “Western Blot” de la proteína Mpt83 purificada por columna de afinidad a ConA. Tinción con azul de Coomassie (a), Western Blot con ConA (b) y anticuerpos anti_MPT83 (c) de la proteína MPT83 solubilizada con 0.5% de Triton X-100 y purificada mediante cromatografía de afinidad en columna ConA-sefarosa. Las fracciones analizadas corresponden a la proteína total (PT), lavado con buffer de equilibrio (L) y fracciones de la elución de la columna de afinidad a ConA (E2, E3 y E4). Se observa la presencia de la proteína MPT83 en las fracciones de elución a un peso molecular de 25 kDa indicada con una flecha y su ausencia en los lavados. Además, es de hacer notar la ausencia de la banda que corresponde a la proteína en la tinción con azul de Coomassie.

Resultados similares se obtuvieron con la proteína LpqH, la cual se observó en las fracciones de elución al ser identificada con anticuerpos dirigidos contra ésta. Como se observa en la figura 9, la fracción 8 que dio mayor lectura a 280 nm mostró claramente una banda a un peso molecular de 19 kDa aproximadamente, que corresponde con la proteína LpqH. Se puede observar que de manera similar a la proteína MPT83, la banda identificada con anticuerpos como LpqH no apareció en la tinción con azul de Coomassie.

Como se observó en los resultados anteriores, las proteínas LpqH y Mpt83 se unieron a la resina acoplada a ConA con poca afinidad, ya que la cantidad de proteína que se alcanzó a recuperar de los extractos totales durante la elución fue mínima. Se decidió usar esta resina debido a que experimentos previos de expresión, purificación y caracterización de la glicoproteína Apa de *M. tuberculosis* expresada en *S. lividans* (Lara *et al.*, 2004), así como experimentos para la obtención y caracterización del glicoproteoma de *M. tuberculosis* (González Zamorano *et al.*, 2008) habían demostrado la eficacia de la recuperación de proteínas glicosiladas al usar una resina de ConA acoplada a sefarosa. Una de las razones probables por las cuales las proteínas Mpt83 y LpqH mostraron una débil unión a la resina pudo ser la abundante presencia de lípidos en las muestras, ya que ambos antígenos son lipoproteínas que se encuentran ancladas a la membrana. Así, la recuperación debe realizarse a partir de dicha fracción celular, caso contrario a la proteína Apa y a las proteínas secretables de *M. tuberculosis* que al no ser lipoproteínas fueron purificadas a partir de extractos de proteínas solubles y de filtrados de cultivo. Por lo tanto, la presencia de gran cantidad de lípidos así como de proteínas que no lograron solubilizarse con el detergente pudo haber interferido con la purificación de Mpt83 y LpqH.

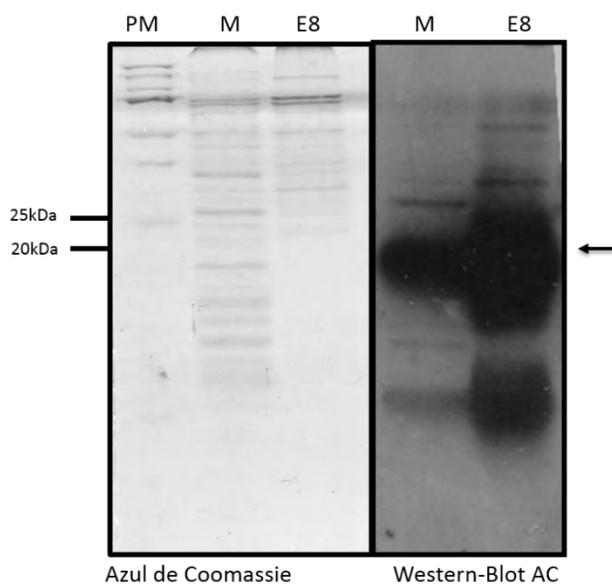


Figura 9. Tinción con azul de Coomassie y Western Blot con anticuerpos anti-LpqH de la proteína LpqH solubilizada con 1% de Tritón X-100 y purificada mediante cromatografía de afinidad en columna. Las muestras analizadas pertenecen a la proteína solubilizada de membrana (M) y a la fracción 8 de la elución (E8). La flecha indica la posición de la banda que corresponde a la proteína LpqH. Se cargaron 7µg de proteína por carril.

Adición de una etiqueta de 6 histidinas a las proteínas Mpt83 y LpqH para su purificación por columna de afinidad a níquel

Debido a que la cantidad de proteínas recuperadas durante la purificación mediante columna de afinidad a ConA era mínima y resultaba necesario obtener proteínas puras en mayores cantidades para los experimentos de espectrometría de masas y ELISA, se decidió purificar ambas proteínas mediante una columna de agarosa níquel Ni-NTA, utilizando los plásmidos pBD3.1H6 y pBIA4H6 que contienen una etiqueta de 6 histidinas en el extremo C-terminal. La etiqueta 6xHis fue añadida en dicho extremo debido a que en el extremo N-terminal ambas lipoproteínas tienen un péptido señal de anclaje que les permite ser secretadas a través de la membrana de la bacteria y que posteriormente es cortado por la peptidasa señal LspA (Hutchings *et al.*, 2008). Se ha observado que el péptido señal es muy importante para la acilación de la proteína y su posterior anclaje a la membrana debido a la presencia de un motivo ampliamente conservado denominado “lipobox”; adicionalmente estudios previos en el laboratorio con la glicoproteína Apa y con las proteínas antigénicas Mpt83 y LpqH mostraron que el péptido señal juega un papel muy importante para la glicosilación de las proteínas en *S. lividans*.

Las proteínas fueron obtenidas a partir de cultivos grandes (1 L de LB + azúcar 25%) de *S. lividans* que contenía los plásmidos antes mencionados, con la finalidad de obtener una cantidad de proteína mayor a la obtenida con los métodos de purificación descritos anteriormente. En primer lugar, resultaba necesario comprobar que las proteínas con la etiqueta de seis histidinas estuvieran siendo expresadas de forma adecuada por la bacteria, motivo por el cual se realizó una electroforesis en gel con muestras de proteínas obtenidas del sobrenadante previamente precipitadas con metanol-cloroformo y de extractos totales de membrana obtenida mediante fraccionamiento celular; además, se utilizó como control a las proteínas LpqH y Mpt83 purificadas a partir de extractos solubles de *E. coli* que también poseen la etiqueta 6xHis pero en el extremo N-terminal (Arista, 2012; Torres, 2012). Posteriormente se realizó un “Western Blot” con anticuerpos

monoclonales anti-6xHis provenientes de ratón para observar la presencia de las lipoproteínas en las fracciones celulares. A pesar de que tanto la proteína Mpt83 como LpqH son rasuradas de la membrana mediante peptidasas extracelulares de *S. lividans* (Bentley *et al.*, 2002) y liberadas al sobrenadante con una masa molecular menor a la original, la etiqueta de 6xHis sigue conservándose debido a su ubicación en el extremo C-terminal.

Como se puede observar en la figura 10, tanto en la membrana como en el sobrenadante se encuentran las proteínas Mpt83 y LpqH. En la fracción que corresponde a la membrana, Mpt83 se observó con una masa molecular mayor de 25 kDa ya que la presencia de manosas, lípidos y la etiqueta de 6 histidinas incrementaron la masa molecular de la proteína. Lo mismo ocurrió con la lipoproteína LpqH, que se apreció a una masa molecular de 19kDa.

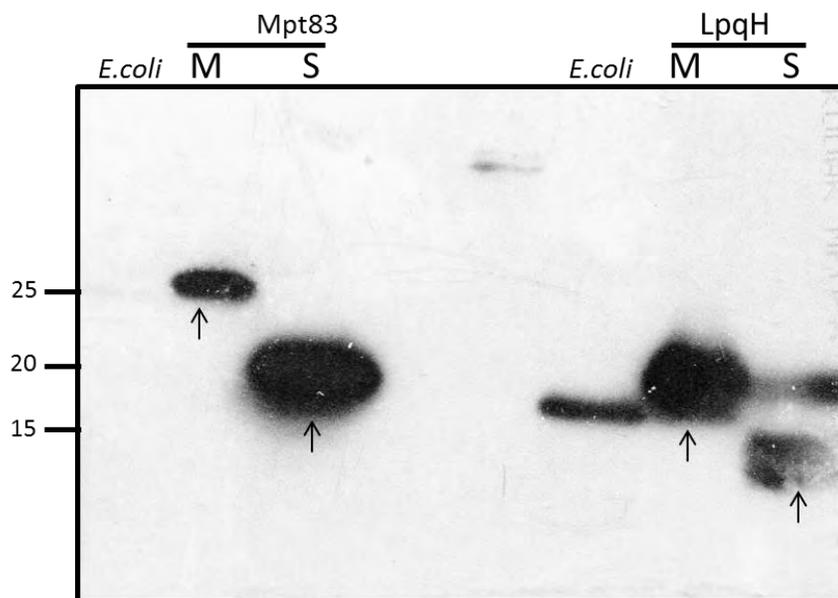


Figura 10. Western Blot con anticuerpos anti-6xHis de las proteínas Mpt83 y LpqH producidas en *S. lividans* y obtenidas a partir del sobrenadante del cultivo y del extracto total de membrana. La fracción membranal es señalada como M y el sobrenadante como S. Los carriles que corresponden a las proteínas control de *E. coli* contienen muestras de proteínas purificadas a partir de extractos solubles de la bacteria. Se cuantificaron 10 µg de proteína por carril.

Adicionalmente se observó que las proteínas ubicadas en la fracción del sobrenadante fueron reconocidas por los anticuerpos anti-6xHis con masas moleculares menores que las de las proteínas ancladas en la membrana, lo que indica la permanencia de la etiqueta 6xHis en el extremo C-terminal. Esto resulta importante ya que sugiere que estas proteínas, a pesar de ser liberadas incompletas al espacio extracelular pueden ser purificadas por una columna de afinidad.

Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad a Ni-NTA

Después de comprobar que las proteínas se expresaron correctamente con la etiqueta 6xHis en la fracción membranal y que además se encontraban en el sobrenadante, las muestras membranales se pasaron a través de una columna de afinidad a Ni-NTA, para obtener las proteínas Mpt83 y LpqH con la mayor pureza posible. Debido a que está comprobado que los detergentes aniónicos tales como SDS son incompatibles con la espectrometría de masas (Rosinke *et al.*, 1995), se utilizó el detergente de tipo zwitteriónico LDAO (N,N-Dimetildodecilamino N-óxido) para solubilizar a las lipoproteínas presentes en los extractos membranales. El detergente LDAO es ampliamente utilizado para solubilizar proteínas transmembranales que serán sometidas a espectrometría de masas y a cristalografía de rayos X (Cadene *et al.*, 2000; Rosenow *et al.*, 2002; Meetani *et al.*, 2005) razón por la cual se decidió usar este compuesto. Los extractos membranales se solubilizaron con LDAO al 4 % con la finalidad de eliminar todos los restos de lípidos que interfirieran con la purificación. Después de solubilizar las proteínas de la membrana, se colocó la muestra en la columna con 1 ml de resina de agarosa-Ni-NTA y se dejó reposando durante 12 h para incrementar la cantidad de proteína unida a la resina. Posteriormente se hicieron dos lavados con 10 y 20 mM de imidazol para eliminar aquellas proteínas que se pegaron de manera inespecífica a la resina. La elución se hizo a una concentración de 250 mM de imidazol para asegurar la recuperación de las proteínas Mpt83 y LpqH. Se

colectaron 10 fracciones de 1 ml y se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con Azul de Coomassie.

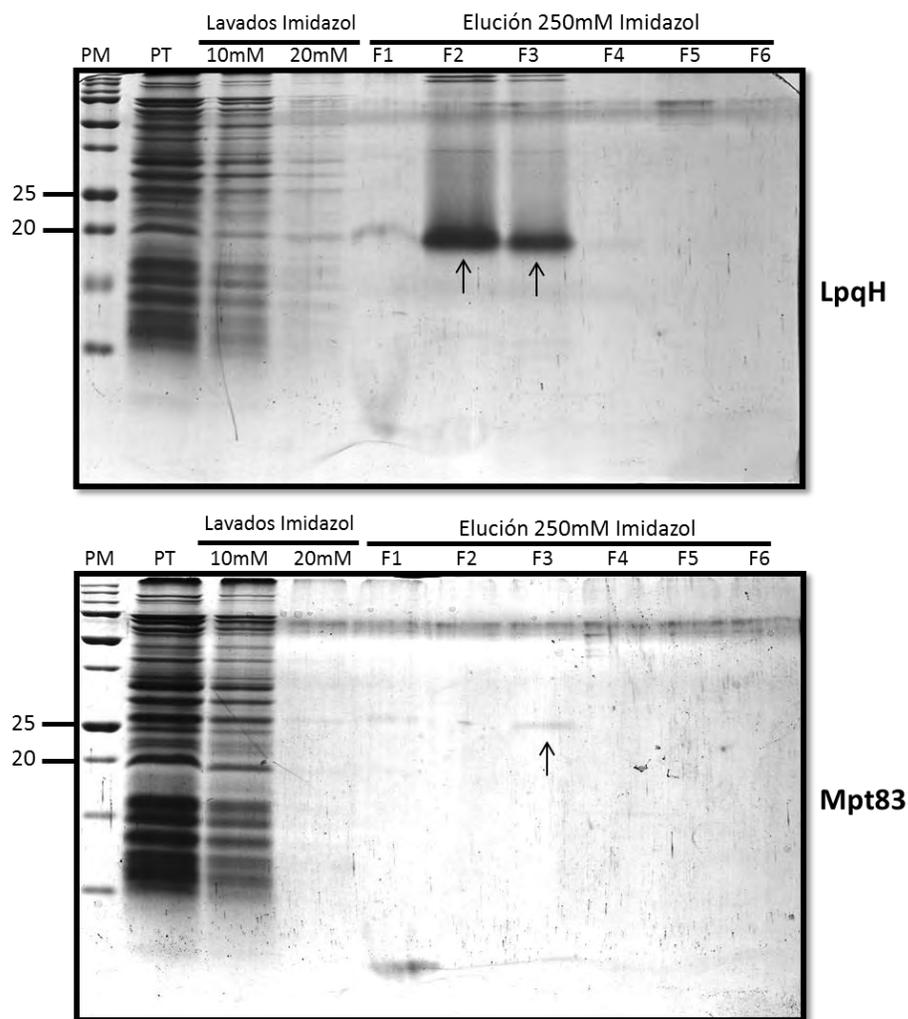


Figura 11. SDS-PAGE teñido con con Azul de Coomassie de las proteínas LpqH y Mpt83 purificadas mediante una columna de afinidad a Ni-NTA. Las flechas indican la presencia de las bandas que corresponden a las proteínas recuperadas en la elución. Puede observarse que la recuperación y enriquecimiento de proteínas ocurre en las primeras fracciones de la elución. Se observa además, que la purificación de ambas proteínas es muy eficiente, ya que apenas se logran ver proteínas contaminantes. Se cargaron 10 μ g de proteína en extracto total y 10 μ l de muestra en las fracciones de lavado y elución.

La proteína LpqH se recuperó con un gran enriquecimiento en las fracciones F2 y F3 de la elución, con la mínima presencia de otras proteínas que no lograron descartarse en los lavados a bajas concentraciones de imidazol

(Figura 11). Por otro lado, la proteína Mpt83 fue recuperada a una baja concentración en la elución, ya que únicamente en la fracción F3 se observó la presencia de una banda que corresponde con la masa molecular (25 kDa) de la proteína (Figura 11). A pesar de esto, la presencia de proteínas contaminantes en dicha elución fue prácticamente nula, lo cual indica que la purificación de las proteínas es eficiente. Resulta importante señalar que en las fracciones de proteína total y lavado no se logró apreciar con claridad la presencia de las proteínas Mpt83 y LpqH, observándose únicamente en las primeras fracciones de la elución, lo cual demuestra que la adición de una etiqueta 6xHis, y la posterior purificación mediante una columna de afinidad a Ni resultó en un aumento de la pureza y recuperación de las lipoproteínas Mpt83 y LpqH cuando se compara con la purificación mediante una columna de afinidad a ConA (Figura 8).

Para comprobar que las bandas observadas en la purificación pertenecieran a las proteínas Mpt83 y LpqH, se hicieron ensayos de “Western Blot” con anticuerpos policlonales específicos para cada una de las proteínas, además mediante ensayos de “Western Blot” con ConA se comprobó también se encontraran manosiladas.

Como se observa en la Figura 12, la proteína LpqH de 19 kDa presente en la fracción 3 de la elución es reconocida con gran afinidad por los anticuerpos anti-LpqH y por la ConA, a diferencia de la proteína expresada y purificada de extractos solubles de *E. coli* que es detectada por los anticuerpos anti-LpqH pero no por la ConA, hecho que concuerda con la ausencia de manosiación en esta proteína. Resultados similares se obtuvieron al realizar los ensayos de “Western Blot” con la proteína Mpt83, ya que la banda observada a 26 kDa en la fracción 3 de la elución es detectada por los anticuerpos anti-Mpt83 y por la ConA (Figura 13); sin embargo, la recuperación de Mpt83 a partir de los extractos membranales de la bacteria es mínima como puede observarse al comparar el enriquecimiento de ambas proteínas durante la elución. Estos resultados demuestran que las bandas observadas en la purificación que corresponden a las proteínas LpqH y Mpt83 se expresan completas, glicosiladas y ancladas a la membrana de la bacteria *S. lividans*.

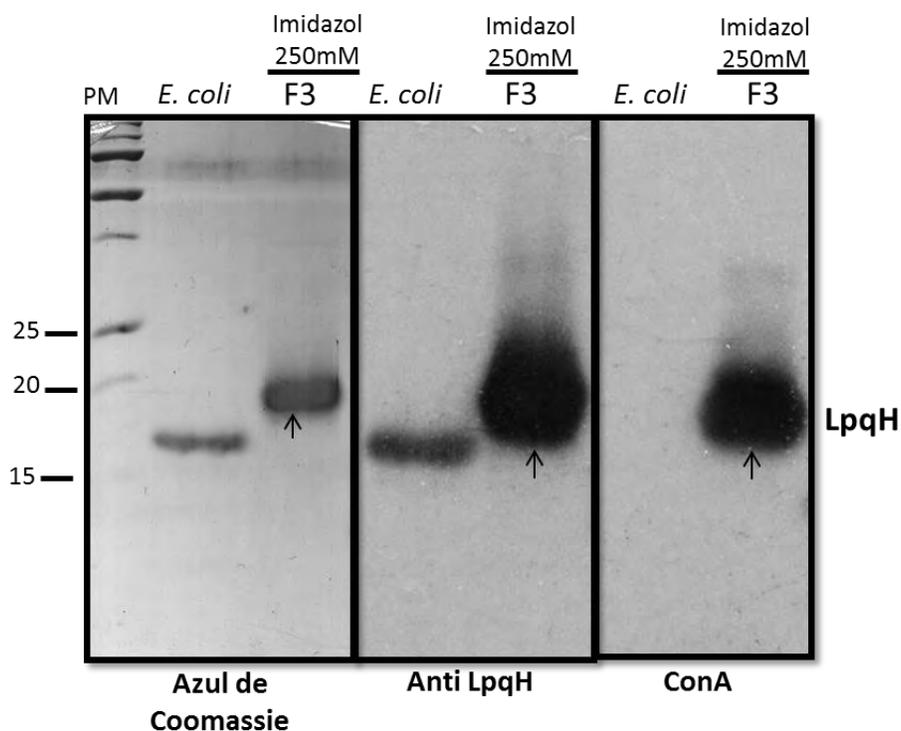


Figura 12. SDS-PAGE y Western Blot con anticuerpos anti-LpqH y ConA de la proteína LpqH proveniente de la fracción 3 de la elución con Buffer B [250 mM de imidazol]. Las flechas indican las bandas que corresponden a la proteína LpqH. Se puede observar que la proteína purificada de *E. coli* no es reconocida por la ConA a diferencia de la proteína LpqH que proviene de la membrana de *S. lividans*.

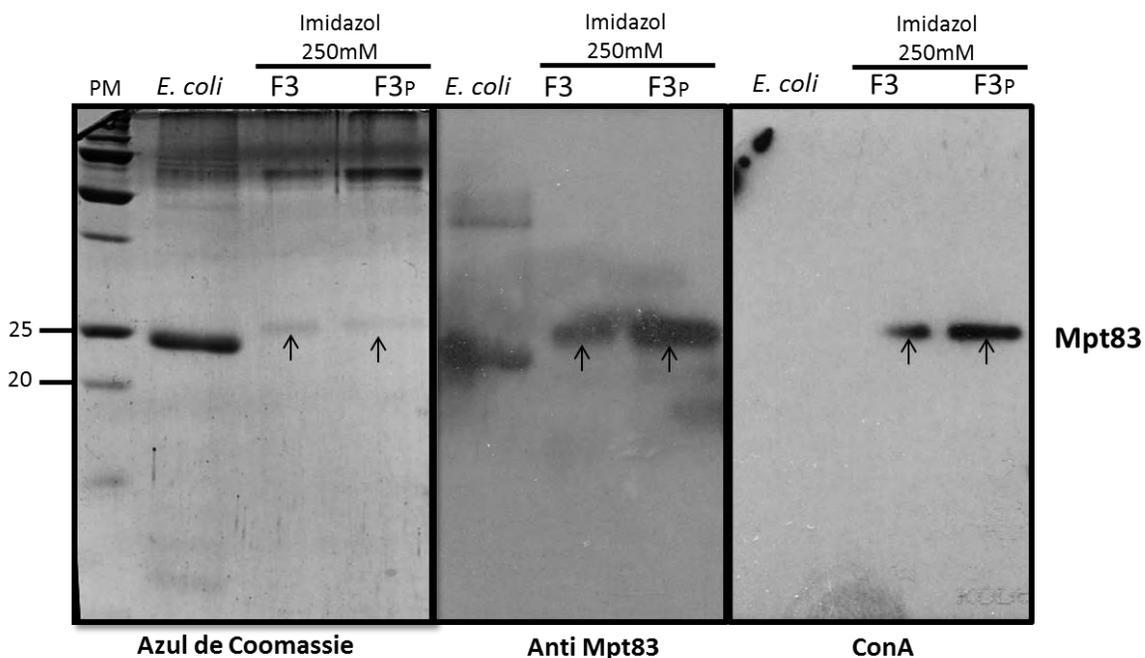


Figura 13. SDS-PAGE y Western Blot con anticuerpos anti-Mpt83 y ConA de la proteína Mpt83 proveniente de la fracción 3 de la elución con Buffer B [250 mM de imidazol]. Las flechas indican las bandas de un peso ligeramente mayor a 25kDa que corresponden a la proteína Mpt83. Se puede observar que la proteína purificada de *E. coli* no es reconocida por la ConA a diferencia de la proteína MPT83 que proviene de la membrana de *S. lividans*. El carril F3p corresponde a la proteína Mpt83 recuperada de la fracción 3 de la elución precipitada con metanol-cloroformo.

Purificación de las proteínas Mpt83 y LpqH provenientes de sobrenadantes de cultivo de *S. lividans*

Debido a que las proteínas rasuradas de la membrana y liberadas al sobrenadante conservan los sitios de glicosilación y la etiqueta 6xHis, se precipitaron con sulfato de amonio al 80 % las muestras de las proteínas provenientes de los sobrenadantes de cultivos de *S. lividans* con los diferentes plásmidos, después se dializaron y se purificaron las proteínas Mpt83 y LpqH mediante columnas de Ni-NTA. Debido a que las muestras se encontraban solubles no fue necesario utilizar un detergente para solubilizar los lípidos. Los pasos de lavado y elución se realizaron con las mismas concentraciones de imidazol que los ensayos anteriores.

La presencia de proteínas en las fracciones de la elución se analizó mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Se puede observar en la figura 14 que principalmente en las fracciones de elución 1 y 2 de Mpt83 se recuperó gran cantidad de proteína enriquecida a un peso molecular esperado de 17-18 kDa. De manera similar, la proteína LpqH se encontró enriquecida en las primeras dos fracciones de la elución, sin embargo, se observó un perfil proteico diferente al observado en Mpt83, ya que se pudo apreciar la presencia de dos bandas enriquecidas a un peso molecular de 13 kDa y 15 kDa aproximadamente. En experimentos previos se ha observado que ambas bandas corresponden a la proteína LpqH que fue rasurada de la membrana en diferentes sitios cercanos al extremo amino terminal por lo que se liberan al sobrenadante con masas moleculares más pequeñas (Torres, 2012). Estos resultados indican que tanto las proteínas completas provenientes de la membrana de la bacteria, así como aquellas que son liberadas al sobrenadante del cultivo expresadas de forma heteróloga por *S. lividans*, pueden ser purificadas de manera eficiente mediante la adición de una etiqueta 6xHis en el extremo C-terminal y su posterior recuperación mediante una columna de Ni-NTA.

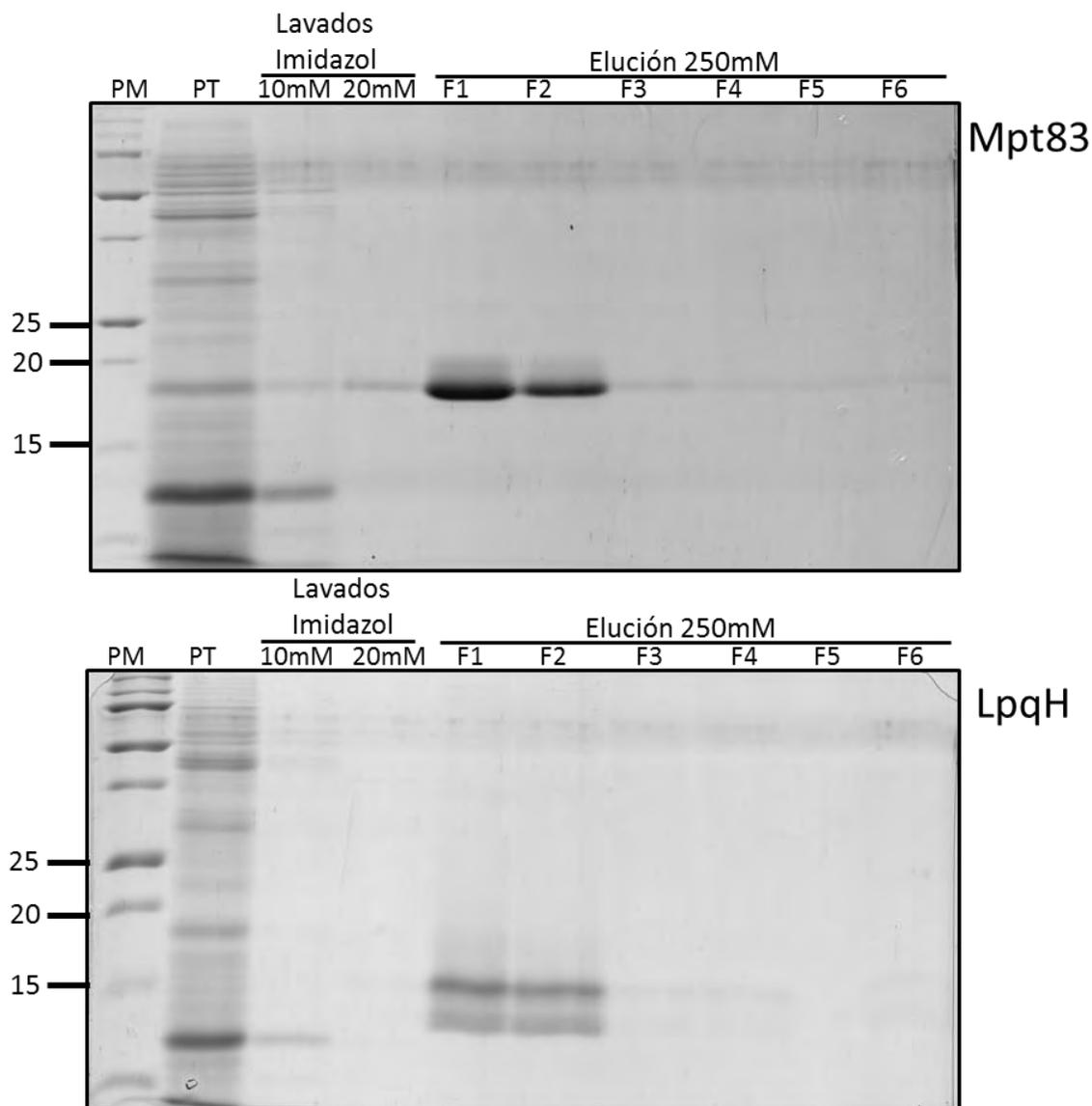


Figura 14. SDS-PAGE y tinción con Azul de Coomassie de las proteínas Mpt83 y LpqH provenientes de sobrenadante y purificadas mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA. En ambos casos, la recuperación de la proteína fue en las fracciones 1 (F1) y 2 (F2) de la elución.

Cabe destacar que la recuperación de la proteína purificada Mpt83 ubicada en la membrana de la bacteria es mínima cuando se compara con la recuperación de la proteína LpqH. Sin embargo, la presencia de la proteína Mpt83 es abundante en el sobrenadante del cultivo a diferencia de la proteína LpqH que puede observarse en menor cantidad en el sobrenadante (Figura 14). Estos resultados sugieren que LpqH se ancla a la membrana de la bacteria *S. lividans* al igual que la proteína Mpt83, sin embargo, ésta última podría ser rasurada de la membrana

en mayor proporción que LpqH, ya que a pesar de que la proteína Mpt83 se expresa con su péptido señal nativo (el cual promueve el anclaje de la lipoproteína a la membrana) la proteína podría ser rasurada por proteasas extracelulares presentes en el medio de cultivo. Debido a que el hábitat natural de las distintas especies de *Streptomyces* es el suelo, las bacterias que se encuentran en este grupo liberan gran cantidad de proteasas y enzimas hidrolíticas como mecanismo de obtención de nutrientes. Mediante el análisis de la secuencia del genoma de *Streptomyces coelicolor* (Bentley et al., 2002) se encontraron cientos de probables proteínas secretables en las que se incluyen hidrolasas, peptidasas, celulasas etc. Por lo tanto, la abundancia de la proteína Mpt83 en el sobrenadante del cultivo podría deberse a que el plegamiento de esta proteína al expresarse en *S. lividans* es más susceptible al corte por proteasas extracelulares producidas naturalmente por la bacteria a diferencia de la proteína LpqH, en donde el mayor porcentaje de la proteína producida permanece en la membrana de la bacteria.

Purificación de la proteína LpqH fusionada con el péptido señal de secreción de una lipasa extracelular de *S. exfoliatus*

Para determinar si el péptido señal nativo de las lipoproteínas es fundamental para promover la glicosilación de LpqH, este se intercambió por un péptido señal tipo Sec de secreción de una lipasa extracelular (LipA) de *Streptomyces exfoliatus*, el cual en lugar de dirigir a la proteína para su anclaje en la membrana extracelular, la dirige hacia el sistema de secreción Sec para el transporte hacia el exterior de la célula. Adicionalmente se añadió una etiqueta de 6 histidinas en el extremo C-terminal de la proteína unida al péptido señal de la lipasa mediante amplificación por PCR, esta construcción se nombró pIA7H6. Para la producción de la proteína recombinante, el plásmido pIA7H6 se transformó en *S. lividans* (WT) y contiene la secuencia que codifica a la proteína LpqH con el péptido señal de la lipasa unida a la etiqueta de 6 histidinas; esta proteína quimérica se nombró 'LpqH F' para diferenciarla de las proteínas anteriormente utilizadas. Debido a que contiene el péptido señal de la lipasa, la purificación de la

proteína LpqH F se realizó a partir del sobrenadante del medio de cultivo de *S. lividans*. La proteína se precipitó con sulfato de amonio, se dializó durante 24 h y se pasó a través de la columna de agarosa-Ni-NTA para su purificación.

Para observar si la presencia del péptido señal de lipoproteína, que es necesario para el anclaje a membrana era también necesario para la glicosilación, se corrieron geles en electroforesis con muestras de las proteínas LpqH y Mpt83 purificadas a partir de las diferentes fracciones celulares. En la Figura 15 se observan muestras de la proteína LpqH obtenida a partir de la fracción membranal de la bacteria, así como de las proteínas LpqH, LpqH F y Mpt83 trucas recuperadas del sobrenadante del cultivo de *S. lividans*. Además se observan las mismas muestras de proteínas pero expresadas y purificadas a partir de la cepa mutante *S. lividans* Δpmt , la cual es una mutante nula que carece del gen *pmt* que codifica la manosiltransferasa que une el primer residuo de manosa a cada sitio de glicosilación en las proteínas. Por lo tanto las proteínas purificadas de la mutante Δpmt son un buen control negativo de la ausencia total de manosilación.

Se cargaron 7 μ g de proteína en cada uno de los carriles y se verificó mediante tinción con Azul de Coomassie que la cantidad de proteína se mantuviera igual en todas las muestras (Figura 15.a). Puede observarse claramente que la proteína LpqH migra a una altura que corresponde aproximadamente a 19 kDa, mientras que la misma proteína purificada de la mutante *S. lividans* Δpmt se observa a 17.5 kDa debido a la ausencia de residuos de manosa unidos a la proteína. La proteína LpqH trunca recuperada del sobrenadante se observa como dos bandas a un peso molecular entre 13 a 14 kDa ya que ésta proteína es rasurada de la membrana por proteasas. En los carriles que corresponden a muestras de LpqH F se observa que la proteína se encuentra a una masa molecular de 13 kDa en la cepa WT y ligeramente más pequeña en la cepa *S. lividans* Δpmt . Finalmente los carriles que corresponden a la proteína Mpt83 rasurada de la membrana y recuperada del sobrenadante muestran a la proteína con un peso molecular de 19 kDa en la cepa silvestre y con un tamaño ligeramente menor en la cepa mutante. La diferencia entre las masas moleculares aparentes de las proteínas expresadas en la cepa WT y en la cepa

mutante *S. lividans* Δpmt se deben a que en esta última las proteínas no pueden ser manosiladas. En la Figura 15.b se observa un “Western Blot” con anticuerpos monoclonales anti- histidinas en donde se muestra el reconocimiento de los anticuerpos por las proteínas purificadas a partir de la membrana, lo cual indica que todas las bandas de proteínas presentes en la tinción con Azul de Coomassie corresponden a las proteínas purificadas mediante afinidad a Ni. Finalmente, en la Figura 15.c se observa un “Western Blot” con ConA para la identificación de proteínas manosiladas. Como era de esperarse las proteínas provenientes de la cepa silvestre, tanto de fracciones membranales como del sobrenadante, fueron reconocidas por la lectina, a diferencia de las proteínas expresadas en la mutante *S. lividans* Δpmt . Sin embargo, el reconocimiento de manosas por parte de la lectina ConA con las diferentes proteínas purificadas no se llevó a cabo con la misma intensidad, ya que la proteína LpqH proveniente de la fracción membranal, así como LpqH proveniente del sobrenadante muestran una mayor intensidad de señal en contraste con la proteína LpqH F, que a pesar de provenir de la cepa silvestre muestra un reconocimiento por parte de la lectina mucho menor. Finalmente, la proteína Mpt83 rasurada de la membrana y recuperada del sobrenadante es reconocida débilmente por la lectina en la cepa silvestre, con una intensidad muy baja similar a la proteína LpqH F, mientras que en la cepa *S. lividans* Δpmt no se observa reconocimiento alguno por parte de la lectina, como era de esperarse.

En 2005, Van der Venn y colaboradores observaron mediante la generación de proteínas quiméricas con la proteína secretable FbpC, consistente del péptido señal de FbpC y una secuencia de manosilación proveniente de la proteína Apa, que para la glicosilación de proteínas en *M. tuberculosis*, se requiere únicamente que las proteínas sean dirigidas y secretadas mediante el sistema de secreción Sec, ya que este proceso promueve una interacción física con la maquinaria de glicosilación. Sin embargo, la drástica disminución en la glicosilación de la proteína LpqH F observada en los ensayos de “Western Blot” con ConA (Figura 15.c), demuestran que a pesar de ser secretada mediante el sistema Sec, la glicosilación en esta proteína se lleva a cabo de manera muy deficiente. Estos resultados

sugieren que para la glicosilación de proteínas no es suficiente su secreción a través del sistema Sec, sino que resulta necesario que las lipoproteínas se encuentren ancladas o permanezcan inicialmente en la membrana de la bacteria, ya que la proteína LpqH recuperada de las fracciones membranales muestra un eficiente reconocimiento por parte de la ConA en los ensayos de “Western Blot” (Figura 15).

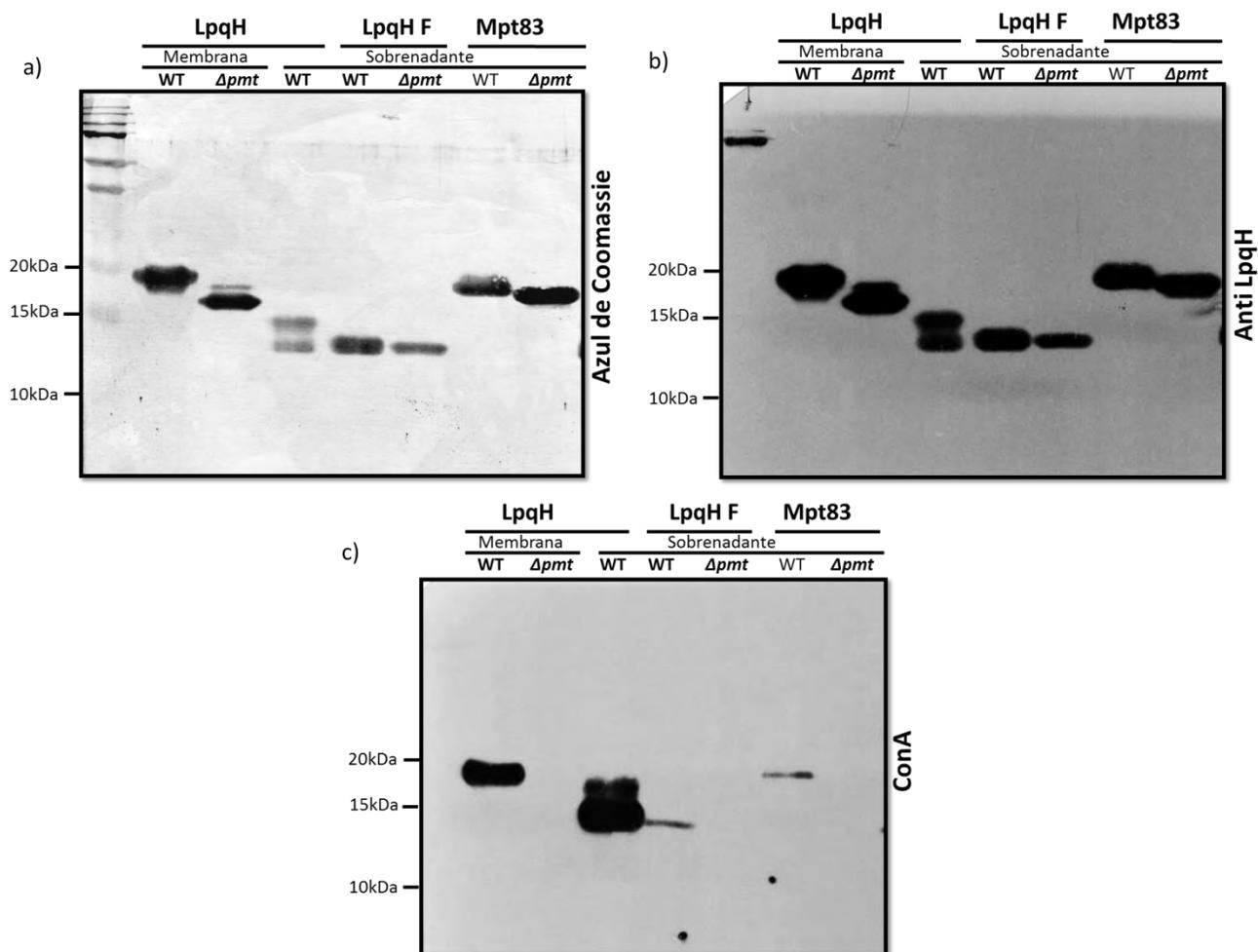


Figura 15. SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie (a) y Western Blot con anticuerpos Anti-His (b) y ConA (c) de muestras de las proteínas LpqH, LpqH F y Mpt83 tanto de la fracción membranal como del sobrenadante del cultivo de *S. lividans* y de la mutante *S. lividans* Δpmt . En los carriles marcados como WT la proteína se purificó a partir de la cepa de *S. lividans* 1326 silvestre y en los carriles marcados como Δpmt las proteínas fueron purificadas de la cepa mutante que no manosi las proteínas *S. lividans* Δpmt .

Una probable explicación de los resultados anteriores es que la maquinaria de secreción Sec y las enzimas Ppm y Pmt que componen la maquinaria de glicosilación de proteínas en actinobacterias se ubican en la membrana de la bacteria, por lo que la glicosilación de lipoproteínas se llevaría a cabo de manera eficiente únicamente si éstas se encuentran ancladas a la membrana, ya que este hecho permitiría un mayor tiempo de interacción entre la maquinaria de secreción mediada por Sec, la maquinaria de acilación y la maquinaria de glicosilación de proteínas. Ejemplos de interacción para el correcto funcionamiento de estas maquinarias se han observado en *M. smegmatis* en donde la enzima Ppm interactúa directamente con Lnt (enzima que cataliza la adición de un tercer residuo de acilo a las proteínas durante el proceso de lipogénesis) (Baulard *et al.*, 2002; Schumi *et al.*, 2009) y en la actinobacteria *Corynebacterium glutamicum*, donde la proteína Lnt podría mediar la interacción física entre la proteína Ppm y Pmt con la finalidad de conducir eficientemente la transferencia de manosa directamente desde el acarreador lipídico hacia la lipoproteína (Mohiman *et al.*, 2012). Sin embargo, recientemente se observó que en *S. coelicolor*, la presencia de la enzima Lnt1 no es indispensable para que se lleve a cabo la glicosilación de la proteína Apa (Córdova Dávalos *et al.*, 2014) considerando el hecho de que esta última no es una lipoproteína. Los resultados obtenidos en este trabajo, así como las evidencias encontradas en la literatura que confirman la interacción entre los sistemas de secreción, acilación y glicosilación, demuestran que la glicosilación es un proceso que requiere de la presencia de las lipoproteínas en la membrana de la bacteria, de la acción conjunta entre la maquinaria de acilación, glicosilación y el transporte Sec y que no es dependiente únicamente de su translocación mediada por este último.

Análisis de la proteína LpqH de membrana mediante espectrometría de masas MALDI TOF

Se realizó una espectrometría de masas MALDI TOF para determinar la masa exacta de la proteína LpqH encontrada en la membrana de *S. lividans*. La

masa molecular de LpqH con su péptido señal (compuesto por 21 aa y con una masa molecular de 1.9 kDa aproximadamente) en forma de prolipoproteína es reportada de 15.1 kDa (Ashbridge, 1989), por lo que la proteína madura tiene una masa molecular teórica de 13.2 kDa sin considerar modificaciones por lípidos o manosas. Sin embargo, debido a que se agregó una etiqueta de 6 histidinas al extremo C-terminal de la proteína, la masa molecular teórica de la proteína sin modificaciones postraduccionales producida en *S. lividans* es de 14.03 kDa.

Al realizar la espectrometría de masas MALDI TOF de la proteína LpqH membranal, usando una matriz de THAP se obtuvo un espectro en el cual se puede observar la presencia de un pico de gran intensidad con una masa de 16796 m/z, que corresponde a la proteína LpqH en su forma madura (Figura 16). La diferencia en la masa teórica de la proteína madura sin modificaciones comparada con la obtenida mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) se debe principalmente a las modificaciones postraduccionales de la proteína. En LpqH se encuentra modificada la cisteína del extremo amino-terminal, tanto por un diacil glicerol unido a la cadena lateral de la cisteína como por una tercera cadena de acilo unida al grupo amino, lo que permite su anclaje a la membrana de la bacteria. De acuerdo al servidor de predicción de proteínas glicosiladas NetOGlyc 4.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/) existen 13 sitios probables de glicosilación en la lipoproteína LpqH de los cuales las treoninas 14, 15, 19 y 20 tienen los puntajes más altos. En 2004, González Zamorano y colaboradores demostraron que la glicoproteína inmunodominante Apa de *M. tuberculosis* se encuentra glicosilada con 3 manosas en una treonina ubicada en el extremo C-terminal de la proteína, por lo tanto, puede esperarse que cada uno de los 4 sitios predichos de glicosilación podría tener hasta 3 manosas unidas, con lo cual habría una cantidad teórica de 12 residuos de manosa presentes en la proteína LpqH madura (1 hexosa= 162 m/z) con un incremento en la masa de la proteína de hasta 1944 m/z. Debido a que LpqH es una lipoproteína anclada a la membrana de la bacteria, la modificación por lípidos permanece incluso después de su purificación. Por lo anterior es de esperarse que la proteína esté modificada por lo menos con un diacilglicerol (m/z= 573; con un ácido graso C16:0 y un ácido

palmítico) y una cadena de ácido palmítico ($m/z=238$) unida directamente al extremo N de la cisteína de anclaje a membrana en caso de presentarse actividad de la enzima Lnt sobre la proteína. Si se suman las masas de todas las probables modificaciones postraduccionales y la masa teórica de la proteína madura, esta tendría una masa molecular esperada de 16787 m/z que es un valor extremadamente cercano al obtenido en la espectrometría de masas de 16796 m/z como se observa en la figura 16, por lo cual se puede confirmar que dicho pico corresponde con la proteína LpqH ubicada en la membrana y que al igual que en *M. tuberculosis* se encuentra modificada covalentemente por unidades de manosa. Sin embargo, para determinar con exactitud las distintas modificaciones presentes en la proteína y los sitios exactos de glicosilación es necesario generar péptidos mediante el corte con peptidasas como la tripsina y analizarse mediante MALDI-TOF.

La proteína Mpt83 no pudo observarse mediante espectrometría de Masas, ya que se fragmentaba en péptidos de diversos tamaños (sin uso de peptidasas) al iniciar el vuelo de las muestras en el equipo MALDI-TOF, lo que imposibilitó su identificación.

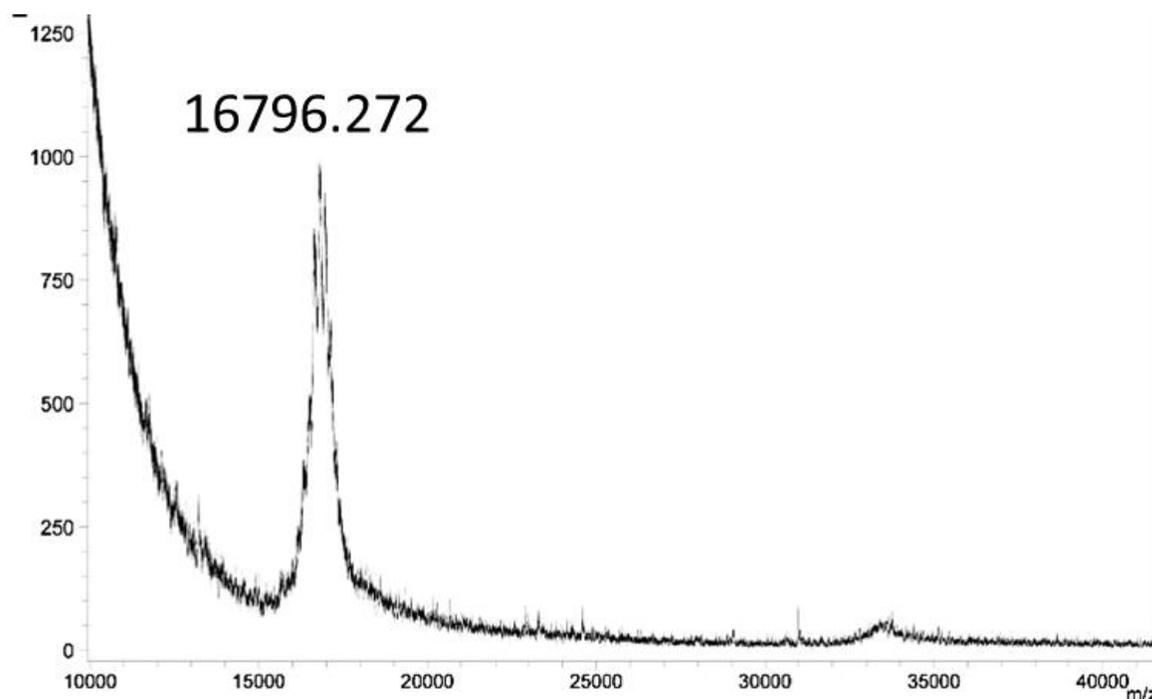


Figura 16. Espectro de masas de la proteína LpqH. Se puede observar que en el espectro con la matriz THAP aparece un pico de 16.796 m/z . La señal corresponde a la masa de la proteína LpqH.

Análisis de la reactividad de sueros de personas sanas, pacientes con tuberculosis e individuos infectados contra las lipoproteínas LpqH y Mpt83 purificadas de *S. lividans*.

Con el fin de determinar si las lipoproteínas glicosiladas LpqH y Mpt83 purificadas a partir de *S. lividans* eran reconocidas por sueros de pacientes y personas infectadas con tuberculosis, y el papel de la glicosilación en dicho reconocimiento, se ocuparon 91 sueros de personas para realizar análisis de ELISA; de estos sueros 46 correspondían a personas que habían tenido una reacción positiva a la prueba de la tuberculina, es decir, que estaban infectadas por *M. tuberculosis* pero que no presentaban la enfermedad, 15 correspondían a pacientes con tuberculosis y 30 a personas sanas que no presentaban supuesta infección por dicha bacteria. Se ocuparon dos diluciones por duplicado de cada uno de los sueros (1:300 y 1:500) para observar en cuál de ellas se observaba mayor reactividad.

Para analizar la reactividad de cada proteína contra los sueros se utilizó el anticuerpo secundario anti IgG de humano unido a peroxidasa, midiendo la intensidad de la reacción al añadir peróxido de hidrógeno y diaminobenzidina a una densidad óptica de 450 nm. Se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón Anti-His como control positivo de reconocimiento de las proteínas, ya que ambas contienen la etiqueta 6xHis. Como control negativo se midió la densidad óptica del anticuerpo secundario anti IgG de humano sin la presencia de las proteínas Mpt83 y LpqH.

Para comparar los resultados de manera general, se promediaron los valores de densidad óptica por cada grupo de sueros y sus duplicados, es decir, infectados, enfermos y sanos, y se sacaron los valores de desviación estándar. Los valores de densidad óptica dependientes de la dilución del suero se analizaron de forma independiente uno de otro para comparar qué concentración de suero resultaba más eficiente para observar la reactividad contra la proteína. Los promedios de densidad óptica pueden observarse en la Tabla 4.

Media total de absorbancia a 450 nm por grupo de sueros				
	Dilución	Infectados	Enfermos	Sanos
LpqH M	500	0.302	0.242	0.258
	300	0.366	0.293	0.32
LpqH S	500	0.176	0.174	0.185
	300	0.216	0.203	0.223
Mpt83 M	500	0.21	0.21	0.242
	300	0.261	0.253	0.301
Mpt83 S	500	0.131	0.126	0.133
	300	0.155	0.14	0.157

Tabla 4. Valores de absorbancia a 450 nm obtenidos en los ensayos de ELISA de cada una de las proteínas. M y S corresponden a la proteína purificada a partir de membrana y sobrenadante, respectivamente. Los valores mostrados corresponden a la media de cada grupo de sueros.

En la figura 17 se observan los resultados de las medias por cada grupo de sueros y su reactividad medida como densidad óptica. Se puede apreciar que no existen diferencias evidentes entre los 3 grupos de sueros, siendo únicamente el grupo de infectados los que presentan una media ligeramente mayor frente a las proteínas LpqH M (membranal) y Mpt83 S (obtenida del sobrenadante). Con todas las proteínas, el grupo de sueros de pacientes infectados por tuberculosis presenta una menor reactividad, mientras que el grupo de sanos e infectados presentan valores muy similares.

Inicialmente se realizó una prueba estadística de F para comparar si la varianza entre el grupo de sueros de personas infectadas con el suero de personas sanas era significativamente diferente. En todos los casos las varianzas fueron iguales para los dos grupos en ambas proteínas. Con este dato se realizó una prueba de T no pareada con varianzas iguales y de esta manera se comparó la reactividad de los sueros frente a ambas proteínas.

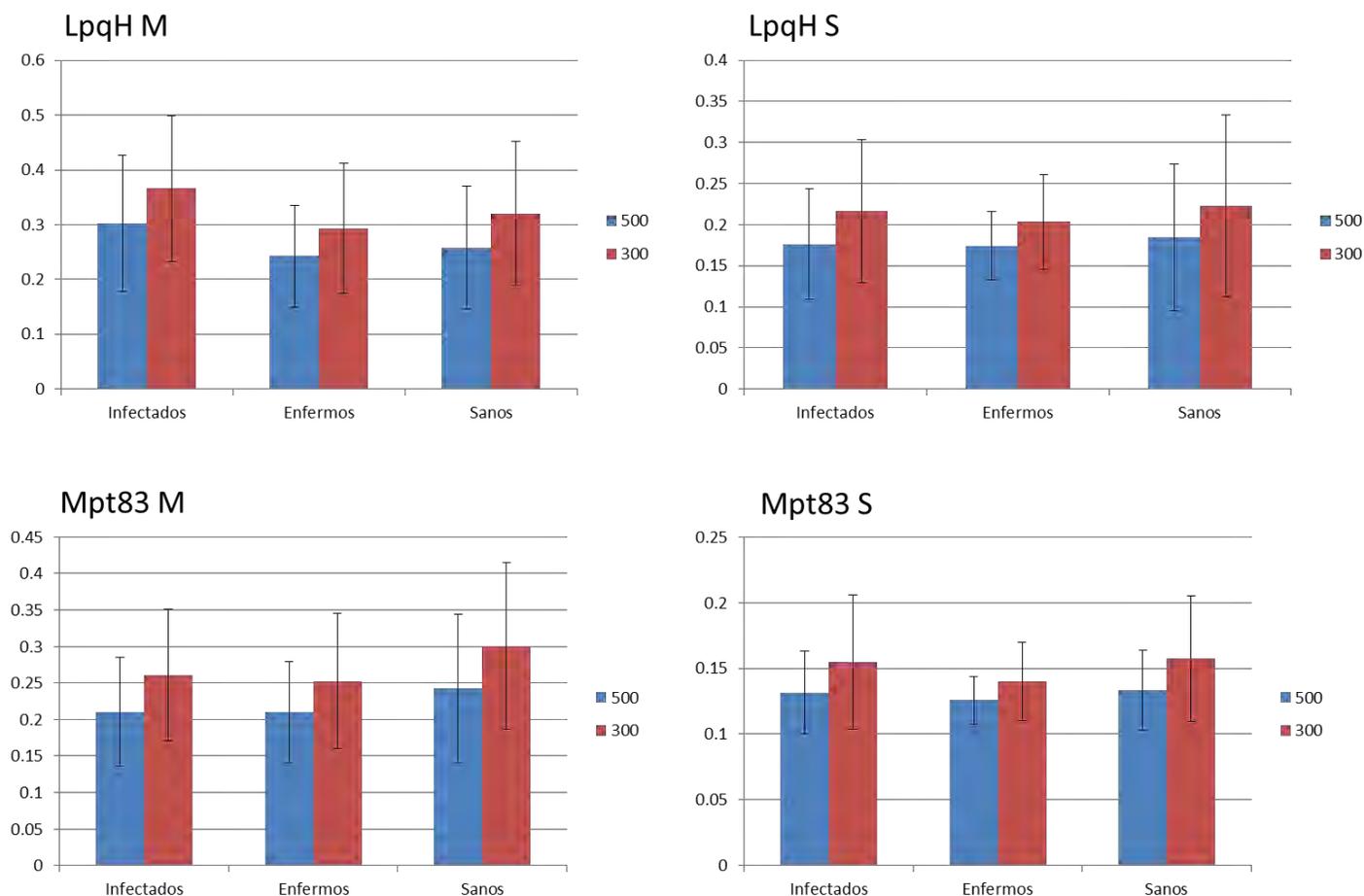


Figura 17. Comparación de las absorbancias a 450 nm de los ensayos de ELISA en donde se observa la reactividad de las proteínas Mpt83 y LpqH frente a los sueros de personas infectadas, enfermas y sanas. Se puede observar que no existen grandes diferencias entre las densidades ópticas de cada grupo, siendo la dilución 1:300 de los sueros las que mayor reactividad muestran frente a cada una de las proteínas.

Como puede observarse en la Tabla 5, los valores arrojados por la prueba son mayores a 0.05. Los mismos resultados se observan para las proteínas LpqH S y Mpt83 S provenientes de los sobrenadantes de cultivo de *S. lividans*.

Estos resultados indican que no existe diferencia significativa entre la reactividad de los sueros de pacientes infectados por *M. tuberculosis* y los sueros de personas sanas no infectadas frente a las proteínas expresadas y glicosiladas en *S. lividans*. La ausencia de diferencias entre la reactividad de los sueros de las personas sanas frente a los que provienen de personas infectadas o enfermas puede deberse a que en México obtener sueros de personas sanas sin

anticuerpos frente a micobacterias ambientales o de personas que no se hayan vacunado previamente con la vacuna BCG es relativamente difícil, ya que hasta el 2008 el porcentaje de cobertura de la BCG registró una media nacional de 99.8% (DGE, 2015). Otro factor a considerar es el grupo de personas de las que provienen los sueros, ya que se ha observado que el grupo de 15 a 59 años tiene la tasa de morbilidad más elevada así como la población indígena, población migrante, población privada de su libertad, habitantes de áreas rurales y/o marginadas que son los que se han observado más vulnerables frente a la tuberculosis (DGE, 2015).

A pesar de esto, se puede observar que la reactividad total de los sueros frente a los antígenos expresados en *S. lividans* sin diferenciar el grupo del cual provienen es muy alta, ya que la reactividad del control negativo se encuentra en una media de 0.1 y el control positivo con una media de 0.5 de absorbancia a 450 nm, mientras que la reactividad de los sueros frente a las proteínas se ubica entre 0.2 y 0.35 mayoritariamente.

Prueba T de Student			
	Dilución	Infectados vs Sanos(Valor de p)	Significativo < 0.05
LpqH M	500	0.0812	No
	300	0.0906	No
LpqH S	500	0.6572	No
	300	0.7651	No
Mpt83 M	500	0.1463	No
	300	0.0956	No
Mpt83 S	500	0.7835	No
	300	0.8305	No

Tabla 5. Prueba de T de Student para comparar si las diferencias en la reactividad de las proteínas frente a los grupos de sueros de personas infectadas contra personas sanas son estadísticamente significativas. Se puede observar que el resultado de la prueba arroja en todos los casos un valor de “p” mayor a 0.05.

Análisis de la reactividad de sueros de personas sanas, pacientes con tuberculosis e individuos infectados contra las proteínas LpqH y Mpt83 no glicosiladas

Ya que los sueros pertenecientes a los grupos de personas sanas, infectadas y enfermas de tuberculosis mostraron una gran reactividad frente a las proteínas glicosiladas expresadas en *S. lividans*, se procedió a realizar un ensayo de ELISA frente a la proteína LpqH (fracción membranal) así como frente a la proteína LpqH no glicosilada purificada a partir de la cepa mutante *S. lividans* Δpmt , para determinar si la glicosilación de los antígenos es necesaria para promover la reactividad frente a los sueros o si por el contrario, la presencia o ausencia de glicosilación en las proteínas expresadas por *S. lividans* no afecta al reconocimiento antigénico de los sueros.

Debido a que la reactividad de los 91 sueros ordenados por grupos frente a las proteínas glicosiladas no fue significativamente diferente entre cada uno de los grupos, se escogieron al azar 15 sueros de entre cada uno de los grupos (infectados, enfermos y sanos) utilizados en los ensayos de ELISA anteriores para analizar la reactividad total de los 45 sueros sin considerar su procedencia, frente a las proteínas Mpt83 y LpqH glicosiladas y no glicosiladas.

En la Figura 18.a se observa una gráfica de barras en donde se comparan los resultados obtenidos en los ensayos de ELISA usando los promedios de absorbancia a 450 nm que corresponden a la reactividad de los 45 sueros frente a las proteínas LpqH glicosilada (LpqH WT) y LpqH no glicosilada (LpqH Δpmt). Se puede notar claramente que la reactividad de los sueros frente a la proteína que se encuentra glicosilada es mayor que la reactividad frente a la proteína no glicosilada producida por la mutante *S. lividans* Δpmt .

Por otro lado, se graficaron los valores de absorbancia obtenidos de ambas proteínas frente a cada uno de los sueros. En la figura 18.b se puede observar que los sueros mostraron gran reactividad con la proteína LpqH membranal glicosilada producida por *S. lividans*, incluso algunos de ellos superando el valor de referencia 0.52 que es la reactividad mostrada por los anticuerpos anti-His frente a la proteína. Sin embargo, al analizar la reactividad de los mismos 45 sueros frente a

la proteína LpqH membranal no glicosilada (Figura 18.c) se puede notar que prácticamente no existe reactividad en ninguno de los casos cuando la proteína no presenta modificaciones por manosas, ya que la absorbancia obtenida en la mayoría de los sueros corresponde con el valor de referencia 0.1 del control negativo (anti-IgG de humano sin LpqH).

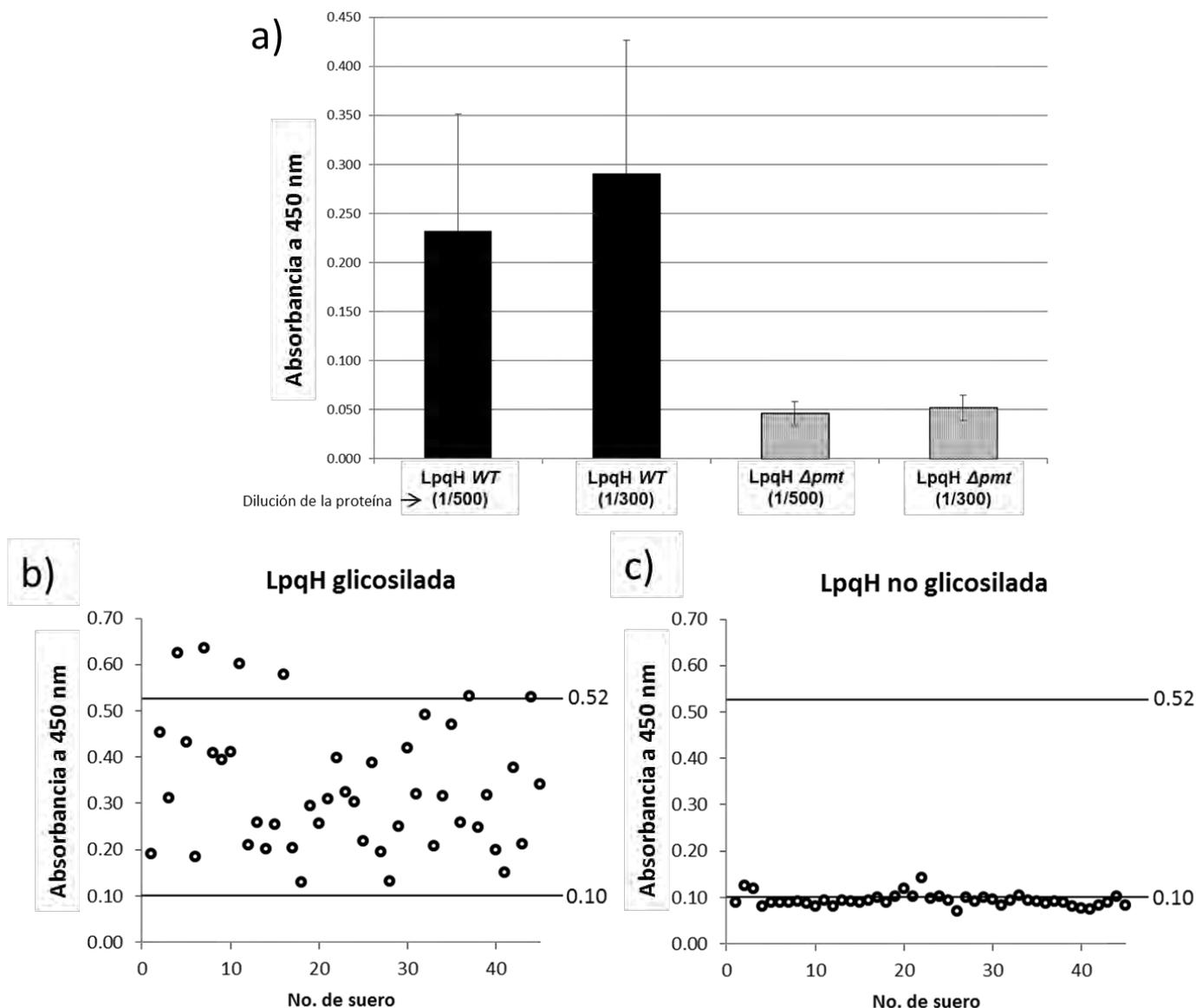


Figura 18. Reactividad de sueros frente a las proteínas LpqH WT y LpqH Δpmt . En a) se observa la diferencia entre la reactividad de los sueros frente a la proteína glicosilada en comparación con la proteína no glicosilada. En b) se encuentra la reactividad de los sueros frente a la proteína LpqH glicosilada (WT) y en (c) la proteína LpqH no glicosilada (Δpmt). La línea horizontal inferior dentro de las gráficas b) y c) indica el valor 0.1 de absorbancia a 450 nm como control negativo (sólo anti-IgG de Humano) en el cual no hay reactividad frente a la proteína.

Estos resultados se verificaron mediante la prueba estadística *t* para comprobar que las diferencias entre las reactividades de los sueros frente a los dos tipos de proteína fueran significativamente diferentes. En la tabla 6 se muestran los promedios de absorbancia a 450 nm de los sueros frente a las proteínas LpqH WT y LpqH Δpmt junto con el valor estadístico *p* que fue menor a 0.05, lo cual indica que las diferencias entre las reactividades de los sueros frente a las proteínas LpqH glicosilada y no glicosilada es estadísticamente diferente.

	Media D.O	t de Student (valor de p)
LpqH M	0.341	=>1.33x10⁻¹⁹
LpqH M Δpmt	0.083	
Anti-His	0.52	
Anti IgG Humano	0.1	

Tabla 6. Promedios de las reactividades de los sueros frente a la proteína LpqH M y LpqH M (Δpmt) así como el valor de p de la prueba T de Student entre ambas proteínas.

Estos resultados demuestran claramente que los antígenos de *M. tuberculosis* Mpt83 y LpqH producidos en *S. lividans* 1326 muestran una alta reactividad al suero de personas infectadas y enfermas por tuberculosis siempre y cuando éstos se encuentren glicosilados, hecho que confirma la estrecha similitud entre las maquinarias de glicosilación pertenecientes a ambas bacterias. La importancia de la glicosilación de antígenos en bacterias patógenas y la participación de glicoproteínas involucradas en respuestas inmunitarias innatas y adaptativas está ampliamente estudiado (Rudd *et al.*, 2012; Szymanski, 2005). La glicosilación de antígenos en *M. tuberculosis* se ha observado tiene un papel muy importante en el reconocimiento antigénico durante la infección de la bacteria al hospedero ya que la estructura de varios glicoconjugados (Gatfield *et al.*, 2003) así

como la modificación por manosas de antígenos secretables ampliamente estudiados de *M. tuberculosis* como la glicoproteína Apa (Ragas *et al.*, 2006), promueven un rápido reconocimiento y unión a receptores específicos de manosas (C-type lectins) lo que favorece el establecimiento de la respuesta inmunitaria inicial y una posterior infección. Por otro lado, se ha observado que la acilación y glicosilación de proteína LpqH (19 kDa) en *M. tuberculosis*, así como los niveles de expresión de la proteína son muy importantes para que LpqH mantenga un efecto modulador sobre la inducción de citocinas (IL-1 β), además de comprobarse que dichas modificaciones son necesarias para que la proteína permanezca anclada a la pared celular de la micobacteria (Wilkinson *et al.*, 2009). Adicionalmente estudios *in vivo* con ratones infectados por *M. tuberculosis* mostraron que Mpt83 es altamente inmunogénica durante la infección a pesar de no expresarse en grandes cantidades dentro de la bacteria como sí ocurre en *M. bovis* (Hewinson *et al.*, 1996).

Debido a esto, se debe resaltar la importancia de *S. lividans* para la producción de proteínas antigénicas de *M. tuberculosis*, que se encuentran glicosiladas y que muestran reactividad hacia los anticuerpos producidos por personas infectadas y enfermas de tuberculosis, con especial interés en su uso como hospedero para la producción de antígenos inmunodominantes como las proteínas LpqH y Mpt83 que podrían potencialmente ser utilizados para la generación de nuevas vacunas con mayor efectividad que las disponibles actualmente.

VII. CONCLUSIONES

- Las proteínas antigénicas Mpt83 y LpqH son producidas, secretadas y glicosiladas eficientemente por *S. lividans* al igual que en *M. tuberculosis* como lo demuestran los ensayos de Western Blot y MALDI-TOF realizados en este trabajo.
- La glicosilación no es dependiente únicamente de la translocación de las lipoproteínas mediante el Sistema Sec, ya que resulta necesario que las lipoproteínas LpqH y Mpt83 se encuentren ancladas inicialmente a la membrana celular para que las maquinarias de glicosilación, acilación y secreción funcionen correctamente.
- La proteína antigénica LpqH producida en *S. lividans* muestra gran reactividad frente a los sueros de personas infectadas con *M. tuberculosis* únicamente cuando estos se encuentran manosilados, por lo que se destaca su potencial uso en la generación de nuevas vacunas contra la enfermedad.

VIII. PERSPECTIVAS

- Generar péptidos de las proteínas LpqH y Mpt83 mediante el corte con tripsina y otras proteasas, con la finalidad de analizarlos mediante MALDI-TOF y determinar con exactitud la composición de manosas presentes en ambas proteínas.
- Inyectar a ratones con las proteínas LpqH y Mpt83 producidas por *S. lividans* para observar si brindan protección frente a una posterior infección con *M. tuberculosis*.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Anné J. y Lieve V.M., 1993, *Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production, FEMS Microbiology Letters, Vol. 114, p. 121 – 128.
- Arista, Isaí., 2012, *Clonación, expresión y glicosilación de la lipoproteína antigénica MPT83 (Rv2873) de Mycobacterium tuberculosis en Streptomyces lividans*, Tesis de Licenciatura, UNAM, México.
- Ashbridge Kevin R., Booth R., Watson J., and Lathigra R., 1989, *Nucleotide sequence of the 19 kDa antigen gene from Mycobacterium tuberculosis*, Nucleic Acid Research, Vol. 17, No. 3, p. 1249.
- Baulard Alain R., 2003, *In Vivo Interaction between the Polyprenol Phosphate Mannose Synthase Ppm1 and the Integral Membrane Protein Ppm2 from Mycobacterium smegmatis Revealed by a Bacterial Two-hybrid System*, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 278, p. 2242-2248.
- Beck D., Vasisht N., Baglieri J., Monteferrante C., van Dijn J., Robinson C. and Smith C., 2013, *Ultrastructural characterization of Bacillus subtilis TatA complexes suggest they are too small to form homooligomeric translocation pores*, Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1839(8), p. 1811-1819
- Bentley S, 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, Vol. 417, p. 141-147.
- Benz I. and Schmidt M.A., 2002, *Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria*, Molecular Microbiology, Vol. 45, No. 2, p. 267-276.

- **Cadene M. and Chait Brian.**, 2000, *A Robust, Detergent-Friendly Method for Mass Spectrometric Analysis of Integral Membrane*, Analytical Chemistry, Vol. 72, No. 22, p. 5655-5658.
- **Córdova-Dávalos LE, Espitia C, González-Cerón G, Arreguín-Espinosa R, Soberón-Chávez G and Servín-González L.**, 2013, *Lipoprotein N-acyl transferase (Lnt1) is dispensable for protein O-mannosylation by Streptomyces coelicolor*, FEMS Microbiology Letters, doi: 10.1111/1574-6968.12298, p. 1-11.
- **Daffé, M., Drapper P.**, 1998, *The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity*, Advances in Microbial Physiology, Vol. 39, p. 131-203.
- **Demain A.L. and Sanchez, S.**, 2011, *Fermentation improvement of processes yielding natural products for industry*, Bioactive Natural Products Opportunities and Challenges in Medicinal Chemistry, Chapter 13th. World Scientific Publishing Co., NJ. p. 601 - 629.
- **DGE**, 2012, *Perfil Epidemiológico de la Tuberculosis en México*, SINAVE, México. En línea: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/Monografias5_Tuberculosis_Mex_junio12.pdf
- **Díaz-Silvestre H., Espinosa Cueto P., Sánchez González A., Esparza Cerón M., Pereira Suárez A., Bernal Fernández G., Espitia C. y Mancilla R.**, 2005, *The 19 kDa antigen of Mycobacterium tuberculosis is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monotypic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria*, Microbial Pathogenesis, Vol. 39, p. 97-107.
- **Ernst J.D.**, 2012, *The immunological life cycle of tuberculosis*, Nature Reviews, Vol. 12, p. 581-591.
- **Espitia C., Servín González L. and Raúl Mancilla**, 2010, *New insights into protein O-mannosylation in actinomycetes*, Molecular BioSystems, Vol. 6, p. 775-781.
- **Fifis T., Costopoulos C., Corner L.A. and Wodd P.R.**, 1992, *Serological reactivity to Micobacteriumbovis protein antigens in cattle*, Veterinary Microbiology, Vol. 30, p. 343 – 354.

- **Gatfield J. and Pieters Jean**, 2003, *Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interaction: Entry and Survival of Mycobacteria in Macrophages*, Advances in Immunology, Vol. 81, p. 45-96.
- **González Zamorano M., Mendoza-Hernández G., Xolalpa W., Parada C., Vallecillo A.J., Bigi F. and Espitia C.**, 2008, *Mycobacterium tuberculosis Glycoproteomics Based on ConA-Lectin Affinity Capture of Mannosylated Proteins*, Journal of proteome research, Vol. 8, p. 721 – 733.
- **Harboe M., Nagai S., Wiker H.G., Sletten K. and Haga S.**, 1995, *Homology between the MPB70 and MPB83 Proteins of Mycobacterium bovis BCG*, Scandinavian Journal of Immunology, Vol. 42, p. 46 – 51.
- **Harboe M., Wiker H.G., Ulvund G., Lund Pedersen B., Andersen B., Hewinson R.G. and Sadamu Nagai**, 1998, *MPB70 and MPB83 as indicators of protein localization in mycobacterial cells*, Infection and Immunity, Vol.66, No.1, p. 289 – 296.
- **Herman J.L., Gaora P.O., Gallagher A., Thole J. and Young D.B.**, 1996, *Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19kDa antigen from Mycobacterium tuberculosis*, The EMBO Journal, Vol. 14, p. 3547-3554.
- **Hewinson R.G., Michel S.L., Rusell W.P., McAdam R.A. and Jacobs W.R.**,1996 *Molecular characterization of MPT83: a seroactive antigen of Mycobacterium tuberculosis with homology to MPT70*, Scandinavian Journal of Immunology, Vol. 43, p. 490 – 499.
- **Horn C., Namane A., Pescher P., Riviere M., Romain F., Puzo G., Barzu O., and Marchal G.**, 1999, *Decreased capacity of recombinant 45/47 kDa molecules (APA) of Mycobacterium tuberculosis to stimulate T lymphocyte responses related to changes in their mannosylation pattern*, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 274, p. 32023-32030.
- **Horton, H.R, Perry M.D., Moran L.A., Rawn J.D. and Scrimgeour K. Gray**, 2008, *Principios de bioquímica*, Prentice Hall, 4^a ed., USA, p. 274-278 y 241-243.

- **Huang J., Shi J., Molle V., Sohlberg B., Weaver D., Bibb M.J., Karoonuthaisiri N., Lih C.J., Kao C.M., Buttner M.J. and Cohen S.N., 2005, *Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor**, *Molecular Microbiology*, Vol. 58, No. 5, p. 1276 – 1287.**
- **Hutchings M., Palmer T., Harrington D. and Sutcliffe I., 2009, *Lipoprotein biogenesis in Gram-positive bacteria: knowing when to hold 'em, knowing when to fold 'em*, *Trends in Microbiology*, Vol. 17(1), p. 13 – 21.**
- **Juárez M.D., Torres A. and Clara Espitia, 2001, Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* región containing the mpt83 and mpt70 genes, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 203, No. 1, p. 95 – 102.**
- **Juliane K. Brülle, Thomas Grau, Andreas Tschumi, Yolanda Auchli, Reto Burri, Silke Polsfuss, Peter M. Keller, Peter Hunziker and Peter Sander, 2010, *Cloning, expression and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* lipoprotein LprF*, *BBRC*, Vol. 391, p. 679-684**
- **Kaufmann, S.H.E., 2011, *Fact and fiction in tuberculosis vaccine research: 10 years later*, *Lancet Infectious Diseases*, Vol. 11, p. 633-40.**
- **Kieser T., 2000, *Practical *Streptomyces* genetics*, Norwich, England: John Innes Foundation.**
- **Ligon LS., Hayden J and Braunstein M., 2012, *The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* protein export*, *Tuberculosis*, Vol. 92, No. 2, p. 121 – 132.**
- **Lommel M. y Strhal S., 2009, *Protein O-mannosylation: Conserved from bacteria to humans*, *Glycobiology*, Vol.19, No.8, p. 816-828.**
- **Meetani Mohammed A., and Voorhees Kent J., 2005, *MALDI Mass Spectrometry Analysis of High Molecular Weight Proteins form Whole Bacterial Cells: Pretreatment of samples with surfactants.*, *American Society for Mass Spectrometry*, Vol.16, p. 1422-1426.**
- **Michell SL, Whelan A.O., Wheeler P.R., Panico M., Easton R.L., Etienne A.T., Haslam S.M., Dell A, Morris H.R., Reason A.J., Herrmann J.L., Young D.B. and Hewinson R., 2003, *The MPB83 antigen from *Mycobacterium bovis****

contains O-linked mannose and $\alpha(1 \rightarrow 3)$ mannosidose moieties, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 278, p. 16423–16432.

- **Mohiman N., Argentiti M., Batt S., Cornu D., Masi M., Eggeling L., Besra G. and Bayan N., 2012, *The ppm operon is essential for acylation and Glycosylation of Lipoproteins in Corynebacterium glutamicum*, PLoS ONE, Vol. 7(9), p. 1-14.**
- **Nandakumar S, Kannanganat S, Dobos KM, Lucas M, Spencer JS, Fang S, McDonald MA, Pohl J, Birkness K, Chamcha V, Ramirez MV, Plikaytis BB, Posey JE, Amara RR and Sable SB., 2013, *O-mannosylation of the Mycobacterium tuberculosis adhesin Apa is crucial for T cell antigenicity during infection but is expendable for protection*, PLOS Pathogens, Vol. 9, No. 10, p. 1 – 16.**
- **OMS, 2011, *WHO report 2011: Global tuberculosis control*, p. 5-25.**
En línea: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf
- **Otshubo K. and Marth J.D., 2006, *Glycosylation in Cellular Mechanism of Health and disease*, Cell, Vol. 126, p. 855-867.**
- **Pérez C., Juárez K., García-Castells E., Soberón G. and Servín-González L., 1993, *Cloning, characterization, and expression in Streptomyces lividans 66 of an extracellular lipase-encoding gene from Streptomyces sp. M 11*, Gene, Vol. 123, p. 109 -114.**
- **Peter-Katalinić, 2005, *Methods in Enzymology: O-Glycosylation of Proteins*, Methods in Enzymology, Vol. 405, p. 139 – 171.**
- **Ragas A., et al., 2006, *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*, Journal of Biological Chemistry, Vol. 282, p. 5133-5142.**
- **Rezwan, M., Grau T., Tschumi A. and Peter Sander, 2007, *Lipoprotein synthesis in mycobacteria*, Microbiology, Vol. 153, p. 652-658.**
- **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 and Lea SM., 2012, *Structure of the TatC core of the twin-arginine protein transport system*, Nature, Vol. 492 (7428), p. 210 – 214.

- Rosenow M. A., Magee C., Williams J. and Allen J., 2002, *The influence of detergents on the solubility of membrane proteins*, Acta Crystallographica, Section D58, p. 2076-2081.

- Rosinke B., Strupat K., Hillenkamp F., Rosenbusch J., Dencher N., Kruger U., et al., 1995, *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) of membrane proteins and non-covalent complexes*, J. Mass Spectrom. Vol. 30, p. 1462–1468

- Rudd Pauline M., Elliot T., Cresswell P., Wilson I. and Dwek R., 2001, *Glycosylation and the Immune System*, Science, Vol. 291, p. 2370-2376.

- Saïd-Salim, B., Mostowy S., Kristof A.S. and Behr M.A., 2006, *Mutations in Mycobacterium tuberculosis Rv0444c, the gene encoding anti-SigK, explain high level expression of MPB70 and MPB83 in Mycobacterium bovis*, Molecular Microbiology, Vol. 62, No.5, p. 1251 – 1263.

- Sanchez and Demain, A.L., 2011, *Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical and biotechnological significance*, Organic Process Research & Development, Vol. 15, p. 224 – 230.

- Scherr N. and Nguyen L., 2009, *Mycobacterium versus Streptomyces – we are different, we are the same*. Current Opinion in Microbiology, Vol. 12, p. 699-707.

- Singh B., Gosh J., Islam N., Dasgupta S. and Kirsebom L., 2010, *Growth, cell division and sporulation in mycobacteria*. Antonie van Leeuwenhoek, 98, p. 165 – 177.

- Smith I., 2003, *Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence*, Clinical Microbiology Reviews, Vol. 16, No. 3, p. 463-496.

- Stewart G., Wilkinson K., Newton S., Sullivan S., Neyrolles O., Wain J., Patel J., Pool K-L., Young D. and Wilkinson R., 2005, *Effect of deletion or overexpression of the 19-kilodalton lipoprotein Rv3763 on the innate response to Mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immunity, Vol. 73, p. 6831-6837.

- Sulzenbacher G., Canaan S., Bordat Y., Neyrolles O., Stadthagen G., Roig-Zamboni V., Rauzier J., Maurin D., Laval F., Daffé M., Cambillau C., Gicquel B., Bourne Y and Mary Jackson, 2006, *LppX is a lipoprotein required for the translocation of phthioceroldimycocerosates to the surface of Mycobacterium tuberculosis*, The EMBO Journal, Vol. 25, No. 7, p. 1436 – 1444.
- Sutcliffe, I.C. and Harrington. D.J., 2004, *Lipoproteins of Mycobacterium tuberculosis: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components*, FEMS Microbiology Reviews, Vol. 28, p. 644-659.
- Szymanski Christine M. and Wren Brendan, *Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens*, Nature Reviews Microbiology, Vol. 3, p. 225-237.
- Terasaka K., Yamauchi R., Matsuo K., Yamazaki A., Nagai S. and Yamada T., 1989, *Complete nucleotide sequence of the immunogenic protein MPB70 from Mycobacterium bovis BCG*, FEMS Microbiology Letters, Vol. 49, No. 2-3, p. 273 – 276.
- The QIAExpressionst, 2003, Qiagen, 5a ed. En línea: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAexpressionist_EN.pdf
- Torres Rodríguez, María D., 2012, *Clonación y expresión de la glicoproteína de 19kDa de Mycobacterium tuberculosis en Streptomyces lividans*. Tesis de licenciatura, UNAM, México.
- Toumanen Elaine I., 1996, *Surprise? Bacteria Glycosylate Proteins Too*, The Journal of Clinical Investigation, Vol. 98, No. 12, p. 2659 -2660.
- Tschumi A., Nai C., Auchli Y., Hunziker P., Gehrig, Keller P., Grau T. and Peter Sansder, 2009, *Identification of Apolipoprotein N-Acyltransferase (Lnt) in Mycobacteria*, Journal of biological chemistry, Vol. 284, No. 40, p. 27146 – 27156.
- Upreti K., Kumar M. and Shankar V., 2003, *Bacterial glycoproteins: Functions, biosynthesis and applications*, Proteomics, Vol. 3, p. 363-379.
- VanderVen B., Harder J., Crick D. and Belisle J., 2005, *Export-Mediated Assembly of Mycobacterial Glycoproteins Parallels Eukaryotic Pathways*, Science, Vol. 309, No. 5736, p. 941-943.
- Widdick D., Dilks K., Chandra G., Bottrill A., Naldrett M., Pohlsschröder M. and Palmer T., 2006, *The Twin-arginine translocation pathway is*

a major route of protein export in Streptomyces coelicolor, PNAS, Vol. 103(47), p. 17927-17932.

- Widdick D., Hicks M., Thompson B., Tschumi A., Chandra G., Sutcliffe I., Brülle J., Sander P., Palmer T. and Hutchings M., 2011, *Dissecting the complete lipoprotein biogenesis pathway in Streptomyces scabies*, Molecular Microbiology, Vol. 80, No. 5, p. 1395 – 1412.

- Wiker H.G., 2009, *MPB70 and MPB83 – Major antigens of Mycobacterium bovis*, Scandinavian Journal of Immunology, Vol. 69, p. 492-499.

- Wilkinson K., Newton S., Stewart G., Martineau A., Patel J., Sullivan S., Herrman J., Neyrolles O., Young D. and Wilkinson R., 2009, *Genetic determination of the effect of post-translational modification on the innate immune response to the 19 kDa lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis*, BMC Microbiology, Vol. 9 (93), p. 1-10.

X. ANEXOS

Medios de Cultivo

LB + Sacarosa

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

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

R2

Solución base:

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

Aforar a 80ml con agua Milli-Q

Posterior a esterilización en autoclave:

KH ₂ PO ₄ (0.5%)	1.0 ml
CaCl ₂ -2H ₂ O(3.68%)	8.0 ml
L-Prolina	1.5 ml
Tris-Cl(3%, pH=7.2)	10.0 ml
Trazas R5*	0.2 ml
CuSO ₄	0.2ml
NaOH (1N)	0.2ml
Extracto de levadura (10%)	5.0 ml

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

YEME

Peptona	0.5 g
Extracto de Malta	0.3 g
Extracto de levadura	0.3 g
Glucosa	1.0 g
Sacarosa	34.0 g

Aforar a 100 ml con agua Milli-Q, pH=7, adicionar después de esterilización

en autoclave:

MgCl ₂ (1M)	0.5 ml
Glicina 10%	5.0 ml

YT2X

Bactotripton	1.6 g
Extracto de levadura	1.0 g
NaCl	0.5g

Aforar a 100 ml con agua Milli-Q, pH=7.2

MS

Manitol	2.0 g
Harina de soya	2.0 g
Agar	0.2 g

Aforar a 100 ml con agua

Agar suave para transformaciones

Tris-Cl (3%,pH=7.2)	10.0 ml
MgCl ₂	1.0 g
CaCl ₂ (5M)	0.4 ml
Sacarosa	10.3 g
Agar	0.65 g

Aforar a 100ml en agua Milli-Q

XI. PROTOCOLOS

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

1.- Correr el gel al 0.6% y teñir con Bromuro de etidio $1 \mu\text{g/ml}$. Iluminar el gel con luz UV de onda larga y cortar las bandas deseadas, procurando cortar la agarosa lo más cerca del DNA para reducir el volumen de la rebanada.

2.- Fundir la rebanada de agarosa que contiene el DNA en un tubo Eppendorf a $65-70^\circ\text{C}$, durante 10 min. Añadir $1/10$ del volumen de NaCl 5 M, mezclar y dejar otros 5 min a $65-70^\circ\text{C}$.

3.- Saturar un poco de fenol con NaCl de la siguiente forma: en un tubo Eppendorf mezclar $100 \mu\text{l}$ de NaCl 5 M, $400 \mu\text{l}$ de agua y $500 \mu\text{l}$ de fenol. Centrifugar 1 min, retirar la fase acuosa y mantener a 37°C .

4.- Mantener la agarosa fundida a 37°C , posteriormente añadir al tubo $2/3$ de volumen del fenol saturado e inmediatamente agitar en vórtex durante 30 s. Centrifugar 5 min en la microfuga y transferir la fase acuosa a un tubo limpio.

5.- Añadir al fenol $45 \mu\text{g}$ de TE o agua y $5 \mu\text{l}$ de NaCl 5 M y agitar en vórtex, centrifugar por 2 min y mezclar la fase acuosa con la anterior.

6.- Agregar 1 vol de fenol/cloroformo a la fase acuosa, agitar 15 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 $1 \mu\text{g}$ de glicógeno. Mantener a -20°C al menos dos h.

9.- Centrifugar todo el DNA durante 10 min a $14,000 \text{ rpm}$ en la microfuga, asegurándose de eliminar todo el alcohol con una micropipeta. Posteriormente secar el pellet y resuspenderlo en un volumen adecuado de TE.

MINIPREPARACIONES DE DNA PLASMÍDICO

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

2.- Para *E.coli* incubar 5 min en hielo. Para *Streptomyces* al menos de 1 a 3 h a 37°C o hasta que el micelio esté visiblemente lisado (debe ponerse traslúcido y viscoso).

3.- Añadir 400 µl de una solución fresca de NaOH 0.2 N, SDS 1%. Mezclar por inversión vigorosa los tubos, hasta que el contenido se vea transparente, homogéneo y muy viscoso. Cuesta más trabajo mezclar bien las preparaciones de *Streptomyces*, por lo tanto, los tubos deben mezclarse de manera invertida en vórtex durante varios segundos, hasta que no se vea rastro de micelio. Incubar 10 min en hielo.

4.- Añadir 300 µl de acetato de potasio 3 M, pH=4.8, mezclar bien por inversión hasta que se pierda la viscosidad y se vea un precipitado blanco. Incubar 15 min en hielo. En el caso de *Streptomyces*, centrifugar a 13'000 rpm durante 10 min 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 min en la microfuga.

6.- Pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir 600 µl de etanol absoluto frío. Dejar precipitando 5 min a temperatura ambiente.

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

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

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

10.- Centrifugar 10 min en la microfuga. Eliminar todo el sobrenadante. Resuspender en 45 µl de TE, mezclar bien, dar un pulso en la microfuga y añadir 5µl de acetato de sodio 3 M pH=6 y 125 µl de etanol frío. Precipitar 10 min en hielo.

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

TRANSFORMACIÓN DE *Streptomyces*

1.- Inocular 100 µl 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 40 h en un matraz con resorte.

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

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 7.5 mg de lisozima y agregar 5 ml de "Buffer" P, disolver y filtrar a través de un filtro Millipore de 0.45 µm de poro. Agregar al micelio la solución de lisozima en "buffer" P. Mezclar e incubar a 30°C durante 1 hora con agitación suave cada 15 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 0.6 ml de polietilenglicol (PEG1450) al 25% en buffer P con ayuda de una pipeta Pasteur

y mezclar subiéndolo y bajándolo 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 40 ml de buffer P: 100 µl de Trazas R5, 0.5 ml de fosfato monobásico (KH₂PO₄) al 0.5%, 5 ml de CaCl₂-2H₂O 0.25 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 previamente filtrado

TRANSFORMACIÓN DE *Escherichia coli* MEDIANTE ELECTROPORACIÓN

1.- Inocular 20 ml de medio SOB sin magnesio con 0.1 ml de un precultivo de toda la noche. Incubar a 37°C con agitación constante hasta llegar a una densidad óptica de 0.6 a 600 nm (aproximadamente de 2-3 h).

2.- Centrifugar a 6000 rpm durante 10 min a 4°C.

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

4.- Eliminar el sobrenadante, dejando aproximadamente 100 μ l para resuspender suavemente el pellet.

5.- Tomar 50 μ l del pellet resuspendido y agregar 1 μ l de DNA plasmídico (5 μ l si es una ligación), mezclar bien y colocarlo en una celdilla de electroporación mantenida en hielo. Dar un pulso en el electroporador de 1.8 kv.

5.- Pasar las células a 1ml de medio SOB sin magnesio e incubar a 37°C por una hora.

6.- Pasar a un tubo Eppendorf y centrifugar a 6000 rpm durante 10 min. Resuspender el pellet en medio SOB sin magnesio y hacer diluciones.

7.- Inocular 0.1 ml de cada dilución en cajas con medio LB + antibióticos e incubar a 37°C durante toda la noche.

8.- Tomar una colonia aislada y resuspenderla en 100 μ l de medio SOB. Poner un cultivo de 10 ml de medio SOB + antibióticos inoculando con las células resuspendidas e incubando a 37°C durante 8 h. Realizar minipreparaciones de plásmidos.

OBTENCIÓN DE PREPARACIONES DENSAS DE ESPORAS

1.- Inocular cajas de Petri con medio MS en forma confluyente e incubar hasta obtener esporulación. Agregar a cada caja 10 ml de agua estéril. Con ayuda de un asa bacteriológica raspar la superficie para separar las esporas del micelio.

2.- Recuperar los 10 ml de agua y pasarlos por un filtro de algodón para esporas.

3.- Agregar 5 ml de agua al filtro para recuperar la mayor cantidad de esporas.

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

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

6.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el paquete de esporas en 1 ml de glicerol al 20%. Colocar en viales pequeños y almacenar a -20°C.

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

Es necesario pregerminar las esporas antes de iniciar los cultivos

1.- Tomar 500 μ l de una preparación densa de esporas en glicerol al 20% y pasarlas a un tubo Eppendorf. Centrifugar a 6000 rpm durante 10 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 250-ml con 10 ml de medio YT2X. Incubar a 37°C durante 5-6 h.

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 min. Eliminar rápidamente el sobrenadante.

4.- Añadir 10 ml de agua, resuspender el pellet y centrifugar a 6000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.

5.- Resuspender el pellet en 10 ml de medio LB+sacarosa 25%. Pasar a un matraz de 500 ml con 100 ml del mismo medio con los antibióticos adecuados. Incubar a 30°C durante 16 h con agitación constante.

6.- Posterior a las 16 h inducir la expresión mediante la adición de 5 μ g/ml de thioestreptón. Incubar a 30°C hasta completar 36-40 h con agitación constante.

7.- Posteriormente, centrifugar todo el cultivo a 7500 rpm durante 10 min a 10°C. Guardar muestra de sobrenadante para el aislamiento de proteínas, y el micelio someterlo a fraccionamiento celular.

FRACCIONAMIENTO CELULAR

1.- Centrifugar el cultivo a 7500 rpm durante 10 min a 10°C. Lavar el pellet de micelio con 100 ml de Tris 20mM pH=8. Dar 4 lavados.

2.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en el poco líquido que quede. Congelar 30 min a -70°C y descongelar.

3.- Resuspender el pellet en 25 ml de "buffer" para sonicar. Sonicar las muestras con 30 pulsos de 20 s cada uno.

4.- Centrifugar el extracto a 7000 rpm durante una h a 4°C.

5.- Colectar el sobrenadante y pasarlo a un tubo para ultracentrifuga. Centrifugar a 33000 rpm durante 1 h a 4°C. Terminado el tiempo, colectar el sobrenadante para determinar las proteínas del citoplasma.

6.- Lavar el pellet con 50 mM de NaCl (1.1 ml de NaCl 5 M, 109 ml de Tris 20 mM pH=8) y volver a centrifugar a 33000 rpm durante 30 min 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.

SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS MEMBRANALES CON DETERGENTE (LDAO)

1.- Añadir 4 ml de solución de LDAO 4% a 1ml de extracto de membrana obtenido durante el fraccionamiento celular. Incubar a temperatura ambiente por 1 h.

2.- Centrifugar durante 30 min a 14500 rpm a 4°C. Recuperar el sobrenadante y desechar el pellet.

3.- Almacenar la muestra a 4°C hasta pasarse por la columna de Ni-NTA.

PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON METANOL/CLOROFORMO

1.- En hielo, colocar 1 ml de muestra de sobrenadante en un tubo con tapa de rosca. Agregar 4 ml de metanol, 1 ml de cloroformo y 3 ml de agua. Mezclar con vórtex después de cada adición. Centrifugar a 3500 rpm durante 10 min 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 min 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 min en la campana de extracción.

5.- Agregar al pellet 10 µl de "buffer" para proteínas 2X. Hervir por 5 min y almacenar a -20°C.

DETECCIÓN DE PROTEÍNAS CON ANTICUERPOS (INMUNO-BLOT)

1.- Después de secar la membrana de PVDF en la cual se transfirieron previamente las proteínas, remojarla con metanol y dejar secar nuevamente por 5 min.

2.- Bloquear la membrana con 10 ml de "Buffer" Tris-Salino (TBS –Tween 20 al 0.005%) + leche descremada 5% durante 12-16 h a temperatura ambiente y con agitación constante.

3.- En un tubo de ensayo con 10 ml de TBS –Tween 20 al 0.005% + leche 5%, agregar el anticuerpo primario a una dilución 1:100, correspondiendo a 100 µl en 10 ml de buffer.

4.- Pasado el tiempo, retirar el "buffer" de bloqueo e incubar la membrana con los 10 ml de anticuerpo diluido durante 12-16 h a 4°C y con agitación constante.

5.- Posteriormente tirar la solución del anticuerpo primario y dar un lavado a la membrana con 10 ml de agua Milli-Q a temperatura ambiente. Dar dos lavados más con TBS –Tween 20 al 0.005% de 5 min cada uno.

6.- Incubar la membrana con 5 ml de anticuerpo secundario (anti IgG de conejo) diluido 1:1000 en TBS-Tween 20 al 0.005% + leche 5% durante 2 h a temperatura ambiente.

7.- Realizar 3 lavados con 10 ml de TBS-Tween 20 al 0.005% durante 5 min. Posteriormente revelar membrana con tinción de 3,3'-Diaminobenzidina o con el kit de quimioluminiscencia de ROCHE.

DETECCIÓN DE PROTEÍNAS GLICOSILADAS CON CONCAVALINA A

1.- Después de secar la membrana de PVDF en la cual se transfirieron previamente las proteínas, remojarla con metanol y dejar secar nuevamente por 5 min.

2.- Bloquear la membrana con 10 ml de TBS 1X+BSA (albúmina) 1% durante una h a temperatura ambiente.

3.- Lavar la membrana con 5 ml de TBS durante 5 min.

4.- Incubar la membrana con 10 ml de Concanavalina A a una dilución de 1:1000 en TBS 1X, agregando 1 mM de CaCl_2 , 1 mM de MnCl_2 y 1 mM de MgCl_2 a la dilución. Incubar por 16 h en agitación constante a temperatura ambiente.

5.- Después de las 16 h, retirar la Concanavalina A y lavar con 5 ml de TBS 1X durante 5 min. Repetir 3 veces.

6.- Revelar con 3,3'-Diaminobenzidina o por quimioluminiscencia.