

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



**DETERMINACIÓN DEL SISTEMA DE SECRECIÓN DE LA
GLICOPROTEÍNA APA DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EN
STREPTOMYCES: MODIFICACIÓN DEL PÉPTIDO SEÑAL Y SU
EXPRESIÓN EN CEPAS SILVESTRES Y MUTANTES NULAS TAT Y
PMT.**

TESIS

PRESENTA:

ITALO GÜINNO LORANDI CAMACHO

PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO. 2022



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.

Agradecimientos

Una fracción del universo se esconde detrás del merito del árbol. La realidad se trasmuta cada que un fruto maduro se cierne en sus ramas.

A todos quienes han sido una parte importante en mi vida, y a través del apoyo emocional, económico o académico, favorecieron el ambiente optimo para el desarrollo de mi tesis. Además, han sido quienes soportaron escucharme hablar de mi tema de tesis en más de una ocasión.

A mi padre y a mi madre quienes forjaron el camino por el cual he podido llegar a este punto de mi vida. Sin duda alguna, su presencia y ayuda, en todo sentido, han sido fundamentales para la realización de este trabajo.

A mi madre, Cecilia Camacho, con su cariño y disponibilidad perpetua, ha sido escucha y participe de los pormenores de este proceso, sin mencionar las horas de desvelo y las incontables peripecias que le he hecho pasar. Su confianza e impulso me han fortalecido para seguir mis metas.

A mi padre, Oscar Lorandi, con su preocupación constate y el soporte que me ha dado, ha sido punto partida de mi trayectoria académica y sigue presente en los proyectos en el porvenir.

A mi hermano, Paolo Lorandi, quien con su carisma y sentido práctico, ha sido cómplice de diversos planes y me ha ayudado a salir de más de un problema.

A mi abuelo, Carlos Camacho, y a mi tía, Carla Camacho, quienes han estado siempre al pendiente de mis progresos y con disposición para ayudarme en diversas situaciones. Y por la convivencia en la mesa con café y galletas que me ha hecho sentir parte de su hogar.

A mi tía, Ana Aranda y a mis hermanos, Oscar y Laura Lorandi, por su disposición para apoyarme.

A Apani Morales, quien no solo fue un espacio seguro y cálido, sino que estuvo de primera mano escuchándome y bridándome su valiosa opinión.

A los amigos y compañeros que han estado presentes en mi camino: José Alfredo, Andrea, Miguel, Elizabeth, Lizbeth, Michell, Diego, Scarleth, Alberto, Paola, Daniela y Fernanda.

A la Mtra. Guadalupe Alonso Viveros por sus enseñanzas durante mi preparación para mi examen de ingreso.

Al Dr. Oscar Flores Herrera por su simpatía, por haber abierto las puertas en su laboratorio y haberme guiado en mi primer acercamiento a la investigación científica.

A la M. en Ciencias Gabriela González Cerón por su apoyo técnico, enseñanzas, supervisión, sugerencias y comentarios brindados para la realización de este trabajo.

Al programa “Producción de Biomoléculas de Interés Biomédico en Microorganismos”, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por el apoyo financiero para la realización de este trabajo.

A la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular por el servicio de secuenciación, en particular a la T.A. Guadalupe Codiz.

Al Dr. Luis Servín González por el tiempo invertido en enseñarme las distintas técnicas empleadas en este proyecto, por cada una de las explicaciones respecto a los fundamentos experimentales y teóricos relacionados con el tema de estudio y en general sido guía en todo este proceso académico.

Índice

Resumen	4
Marco teórico	6
1. Glicosilación	6
1. 1. O-Glicosilación	7
1. 2. O-Manosilación.....	7
1. 3. O-Manosilación como vía conservada entre actinomicetos y eucariontes.....	9
2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
2.1 <i>M. tuberculosis</i> y O-glicosilación	10
2. 2. Importancia médica de <i>M. tuberculosis</i> : Tuberculosis	12
3. <i>Streptomyces</i>	13
3. 1. <i>Streptomyces</i> y O-manosilación.....	13
3. 2. Mecanismo de O-Manosilación en estreptomicetos	15
3. 3. <i>Streptomyces</i> como modelo experimental para la expresión de proteínas heterólogas	16
3. 4. <i>S. lividans</i> y <i>S. coelicolor</i>	18
4. APA.....	19
4. 1. O-manosilación de APA	21
4. 2. Expresión de APA en <i>Streptomyces</i>	22
5. Secreción de proteínas en bacterias.....	23
5. 1. Péptido señal	24
5. 2. Particularidades de los péptidos señal Sec y Tat.....	26
5. 3. Vía Sec	28
5. 4. Vía Tat.....	31
5. 5. Particularidades de la secreción en <i>Streptomyces</i>	33
Antecedentes	36
Justificación	39
Objetivos	41
Generales.....	41
Particulares.....	41
Hipótesis	42
Material y Métodos	43
Medios de cultivo.....	43
Buffers.....	44

Soluciones de desteñido	45
Cepas y plásmidos	46
Servidores de predicción de péptido señal	48
Construcciones génicas	49
Mutagénesis dirigida en el gen Rv1860	49
Clonación de los genes modificados en un vector de expresión multicopia de <i>Streptomyces</i>	51
Obtención de cepas transformates de <i>Streptomyces</i>	52
Prueba de infección por fago KC519	53
Expresión y purificación de proteínas de sobrenadante	53
Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), tinción con azul de Coomassie	54
Western blot: Detección con anticuerpos y con ConA	55
Purificación de APA por columna de afinidad a Níquel	56
Resultados	57
Predicción de la vía de secreción utilizada por la proteína APA	57
Mutagénesis dirigida	59
Transformación en <i>E. coli</i> IBEC58	63
Clonación en vector de expresión multicopia de <i>Streptomyces</i>	64
Transformación en <i>S. lividans</i> Δ sli3509 y <i>S. coelicolor</i> M145 y IB78	65
Cultivo y extracción de proteínas del sobrenadante	67
Detección de APA por Western blot	68
Glicosilación de APA	71
Discusión	73
Conclusiones	79
Perspectivas	80
Anexos	81
Referencias	89

Resumen

En el presente trabajo se diseñaron variantes de la glicoproteína secretada APA de *Mycobacterium tuberculosis*, con mutaciones puntuales en el péptido señal, con el objetivo de dirigir de manera exclusiva su secreción ya sea al sistema Tat (APA^{TAT}) o al sistema Sec (APA^{SEC}) y determinar cuál de estas variantes muestra un comportamiento parecido al de la proteína APA silvestre, la cual posee dos argininas en el péptido señal, pero carece de un motivo Tat bien conservado. Se expresaron las proteínas APA, APA^{TAT} y APA^{SEC} en las cepas silvestres *Streptomyces lividans* 1326 y *Streptomyces coelicolor* M145, así como las cepas mutantes *S. lividans* Δ pmt y *S. coelicolor* Δ tatAC. A partir de la detección por anticuerpos anti-APA en sobrenadantes de cultivo, se demostró que la glicoproteína APA de *M. tuberculosis* es reconocida y secretada a través del sistema de secreción Tat, en *Streptomyces* a pesar de no tener un motivo perfectamente conservado para la secreción por este sistema. La mutante APA^{TAT} mostró el mismo comportamiento que la proteína silvestre, ya que ambas se secretaron y glicosilaron en forma eficiente en la cepa silvestre de *S. coelicolor*, pero no en la cepa mutante Δ tatAC. Por otro lado, la variante APA^{SEC}, a diferencia de éstas, fue secretada por la vía Sec tanto en la cepa silvestre como en la mutante Δ tatAC. La secreción de la variante APA^{SEC} fue menos eficiente que la de la proteína silvestre o la variante APA^{TAT}. Lo anterior mostró que en *Streptomyces*, la conservación de las dos argininas en el péptido señal es crucial para su secreción por vía Tat. Mediante el uso de concanavalina A para la detección de glicosilación en las proteínas, se evidenció que APA es glicosilada ya sea que su secreción sea mediada por el sistema Sec o por el sistema Tat, siendo esta la primera evidencia de glicosilación de una proteína secretada por el sistema Tat en *Streptomyces*.

Marco teórico

1. Glicosilación

La glicosilación de proteínas se define como la modificación postraduccional de una proteína mediante la unión covalente de un carbohidrato (Spiro, 1973). La glicosilación es un proceso ubicuo pues se han identificado glicoproteínas, unidas a diversos carbohidratos, en todos los dominios de la vida. Se considera que la glicosilación es la modificación de polipéptidos más abundante en la naturaleza, siendo que, por ejemplo, se estima que al menos dos tercios de todas las proteínas eucariotas están glicosiladas (Spiro, 2002; Dell *et al.*, 2011).

En procariontes, las glicoproteínas cumplen diversas funciones, dependiendo del tipo de proteína y el azúcar conjugado que contienen. Entre éstas destacan la adhesión celular, la protección contra la proteólisis, el incremento en la solubilidad y la patogenicidad de la bacteria (Szymanski & Wren, 2005). Las glicoproteínas suelen tener unidas una gran variedad de oligosacáridos, que varían en complejidad y tamaño, y que pueden llegar a representar la etiqueta personalizada de cada glicoproteína y la que le confiere funciones específicas (Lommel & Strahl, 2009; Keenan, 2016).

La glicosilación ocurre mediante la unión de carbohidratos a cadenas polipeptídica a través de tres distintos mecanismos. En el caso de la *N*-glicosilación la unión es a través de los grupos amido de residuos de asparagina. En el caso de la *C*-manosilación la unión se establece mediante de enlaces C-C en residuos de triptófano. Por otro lado, la *O*-glicosilación ocurre a través de enlaces glicosídicos a los grupos hidroxilo de residuos de serina (Ser) o treonina (Thr) (Keenan, 2016). Las vías de *N*-glicosilación se han caracterizado en todos los dominios de la vida e involucran la síntesis de oligosacáridos ligados a lípidos de membrana y su transferencia en bloque (Dell *et al.* 2011) a la proteína. Por el contrario, la vía de *O*-glicosilación de proteínas es procesiva, lo que implica la adición secuencial de monosacáridos a los péptidos aceptores (Keenan, 2016).

1. 1. O-Glicosilación

La *O*-glicosilación se presenta cuando el oligosacárido se une covalentemente a través del grupo hidroxilo de un residuo de serina o de treonina a la proteína. En este tipo de glicosilación no se ha encontrado un motivo consenso de glicosilación y lo más cercano es un acercamiento a posibles sitios de glicosilación, usualmente secuencias ricas en glicina, prolina y valina (Córdova, 2009; Smith, *et al.*, 2014). Estudios previos han encontrado algunos sitios de glicosilación óptimos; por ejemplo, se cree que un residuo de prolina ubicado en la posición -1 o +3 en relación con el residuo de Thr/Ser aumenta la posibilidad de *O*-glicosilación (Herrmann, *et al.*, 2000).

Esta modificación ha sido ampliamente estudiada desde su descubrimiento en la arquea *Halobacterium halobium* y se ha caracterizado tanto en eucariontes como en procariontes; (Lechner & Wieland, 1989). Algunos de los grupos de bacterias mejor estudiados, en cuanto a sus mecanismos de glicosilación o la descripción de las glicoproteínas que producen son: *Campylobacter*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Bacteroides*, *Mycobacterium* y *Streptomyces* (Lommel & Strahl, 2009; Nothaft & Szymanski, 2010).

1. 2. O-Manosilación

La *O*-manosilación es un tipo de *O*-glicosilación, descubierta en levaduras, en 1968, por Sentandreu y Northcote, con importantes implicaciones en las bacterias y eucariontes. Se caracteriza por la unión de manosa u oligomanosas a los residuos de serina o treonina de una proteína. La *O*-manosilación iniciada por la proteína *O*-manosiltransferasas (Pmt) es una vía conservada entre algunas bacterias y eucariontes; en bacterias ha sido descrita en *Corynebacterium* spp., *Streptomyces* spp. y particularmente, en micobacterias (Lommel & Strahl, 2009).

En levaduras y otros hongos, la *O*-manosilación, tiene un papel esencial en la formación/mantenimiento de una pared celular estable. En los mamíferos, las proteínas *O*-manosiladas tienen diferentes e importantes implicaciones en las células cerebrales. Mientras que en los procariontes las proteínas *O*-manosiladas contribuyen a la virulencia de las

micobacterias patógenas y podrían cumplir otras funciones importantes aún no identificadas (Lommel & Strahl, 2009; Espitia *et al.*, 2010).

El proceso de *O*-manosilación de las proteínas bacterianas, al igual que en las eucariontas, involucra dos pasos principales: la unión de la manosa a un acarreador lipídico membranar, y la transferencia de la manosa de este acarreador a los polipéptidos aceptores. El primer paso de este proceso está mediado en eucariontes por la dolicol-P-manosa sintasa (Dpm) que cataliza la transferencia de GDP-manosa al dolicol-fosfato y por la proteína poliprenil-P-manosa sintasa (Ppm) que cataliza la transferencia de GDP-manosa al poliprenol-fosfato en procariontes. El segundo paso está mediado por la manosil transferasa (Pmt) que cataliza la transferencia de manosa desde dolicol-P-manosa o poliprenol-P-manosa a los residuos Ser/Thr de la proteína diana (Fig. 1). Sin embargo, a diferencia de las células eucariontes que cuentan con organelos membranosos especializados, como el retículo endoplásmico, en los procariontes el proceso de manosilación se realiza en la membrana celular (Lommel y Strahl 2009; Dell *et al.*, 2011; Hang *et al.*, 2022).

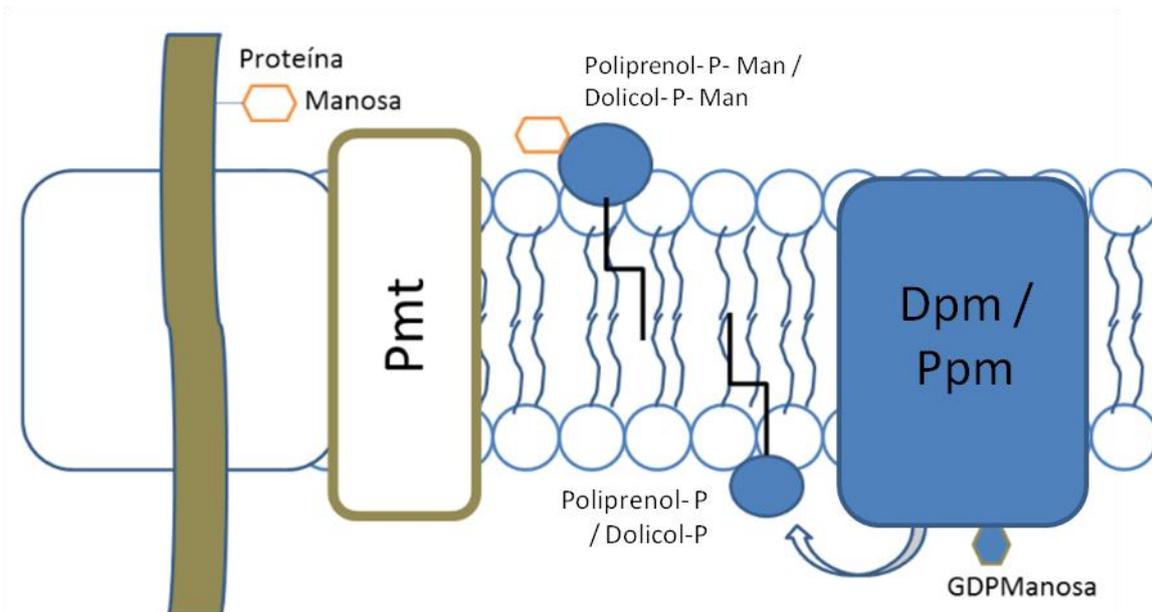


Figura 1. Mecanismo general de *O*-manosilación (modificado de Aguilar, 2015). El proceso de manosilación comienza con la unión de la GDP-manosa a un acarreador lipídico, por acción de la proteína poliprenil-P-manosa (Ppm), en procariontes, o la dolicol-P-manosa sintasa (Dpm), en eucariontes. El acarreador lipídico expone la GDP-manosa del lado extracelular y la manosil transferasa (Pmt) cataliza la unión de la manosa a los residuos Ser/Thr de la proteína diana.

1. 3. O-Manosilación como vía conservada entre actinomicetos y eucariontes.

Los actinomicetos o actinobacterias son un grupo de bacterias Gram positivas, es decir, bacterias que se han agrupado taxonómicamente por tener solamente una membrana interna y poseer una pared celular más gruesa con respecto a las bacterias Gram negativas. Los actinomicetos se caracterizan por tener un alto contenido de guanina y citosina en su ADN. Representan un taxón sumamente diverso al que pertenecen las bacterias del suelo más comunes que juegan un papel importante en la descomposición de materia orgánica, así como algunas bacterias asociadas o patógenas en plantas y animales; tales como miembros de los géneros *Mycobacterium*, *Corynebacterium* y *Streptomyces* (Lechevalier, *et al.*, 1967; Espitia *et al.*, 2010).

La presencia de proteínas manosiladas en los actinomicetos se describió por primera vez en *Mycobacterium tuberculosis* (Espitia y Mancilla, 1989; Robos *et al.*, 1996). Desde entonces se ha reportado la manosilación de proteínas en distintos organismos como, por ejemplo, *Streptomyces coelicolor*, *Corynebacterium glutamicum* (Wehmeier *et al.* 2009; Mahne *et al.* 2006). La vía biosintética de polipéptidos manosilados se caracterizó inicialmente en *Mycobacterium smegmatis* mediante la incubación de una fracción de membrana con GDP-[14C]-manosa y péptidos sintéticos derivados de la proteína APA, el ensayo condujo a la síntesis de poliprenol monofosfato [14C]-manosa y luego a [14C]-manosa-péptido (Cooper *et al.*, 2002).

En los actinomicetos (micobacterias, estreptomicetos y corinebacterias) se demostró la función de la Ppm para la síntesis de poliprenol monofosfato manosa (Ppm); esta función es semejante a la de la Dol-P-Man sintasa (Dpm1) de *S. cerevisiae*, con la cual se demostró que presenta una homología significativa. (Baulard *et al.* 2003; Cooper *et al.* 2002; Gibson *et al.* 2003; Gurcha *et al.* 2002; Wehmeier *et al.* 2009). Por otro lado, VanderVen *et al.* (2005), a través de un enfoque bioinformático identificaron la primera proteína O-manosiltransferasa (Pmt) en un actinomiceto (*M. tuberculosis*); dicha proteína muestra una homología moderada con respecto a las Pmt de *S. cerevisiae*. Asimismo, se han caracterizado proteínas Pmt que inician la biosíntesis de O-manosil glucanos en *C. glutamicum* y en *S. coelicolor* (Mahne *et*

al. 2006; Wehmeier *et al.* 2009). Cabe mencionar que además de la homología observada entre las Pmt actinobacterianas y las Pmt de levaduras, los perfiles de hidropatía también son sustancialmente similares (Mahne *et al.* 2006; VanderVen *et al.* 2005). Además, se ha observado que un motivo Asp-Glu presente en un dominio catalítico es crucial para la actividad de manosiltransferasa tanto para manosiltransferasas (Pmt) de levadura como para micobacterias (Lommel & Strahl, 2009).

Dada la similitud observada entre los procesos de manosilación se considera que la O-manosilación es una vía biosintética conservada entre procarionte y eucariontes. En particular los estudios hechos en actinomicetos nos revelan un mecanismo general de O-manosilación en este grupo de bacterias (Nothaft & Szymanski, 2010; Lommel & Strahl, 2009).

2. *Mycobacterium tuberculosis*

2.1 *M. tuberculosis* y O-glicosilación

M. tuberculosis (Mtb) es un bacilo recto y alargado, descubierto en 1882 por Robert Koch, quien lo designó como el agente causal de la tuberculosis, (Koch, 1884). Es una bacteria Gram positiva con alto contenido en G+C en su genoma y que pertenece al grupo de los actinomicetos o actinobacterias, a la familia Mycobacteriaceae y al género *Mycobacterium*. Da nombre al “complejo *M. tuberculosis*”, el cual es un grupo que engloba micobacterias de crecimiento lento que presentan >95% de homología en su DNA y que provocan tuberculosis en humanos y otros mamíferos (Dorransoro & Torroba, 2007).

Mtb se caracteriza por ser un microorganismo intracelular obligado, de crecimiento lento, aerobio, inmóvil, latente, con envoltura celular compleja, que se replica dentro de los fagosomas de los macrófagos (Wheeler & Ratledge, 1994; Ramírez, *et al.* 2002). Es resistente a ácidos, alcoholes, álcalis, desinfectantes y a la desecación; además, es naturalmente resistente a muchos antibióticos gracias a su envoltura celular, rica en lípidos, altamente hidrofóbica que actúa como una barrera permeable; (Cole *et al.*, 1998). Su pared celular es compleja y posee un alto contenido de lípidos (40%), proteínas y polisacáridos; es rica en ácido micólico, el cual se encuentra unido covalentemente con glicolípidos (Ramírez, *et al.* 2002). La pared de este microorganismo inicia las reacciones inflamatorias del huésped y actúa en la patogénesis de la enfermedad (Bradley & Mckluskey, 1997). El grosor y

propiedades de su pared impiden que penetren los colorantes habituales de anilina, por lo que no se pueden ver en la tinción de Gram y hace que para poder visualizarlas sean necesarios colorantes como los arilmetanos (Dorronsoro & Torroba, 2007).

M. tuberculosis, utiliza diversas estrategias para sobrevivir en los tejidos del huésped y para evadir a su sistema inmune. La adhesión de *M. tuberculosis* a los macrófagos alveolares y a las células epiteliales es un paso determinante en la infección, que permite la posterior invasión y colonización de las células huésped y es mediada por un grupo de moléculas secretadas asociadas a la superficie celular denominadas adhesinas. En consecuencia, las adhesinas micobacterianas se han considerado objetivos atractivos para el desarrollo de nuevos agentes antimicobacterianos (Soto & Hultgren, 1999; Gao, *et al.* 2019). Por ejemplo, la proteína APA, cuya unión a fibronectina es crucial para la patogénesis; pues el bloqueo la interacción entre estas proteínas reduce significativamente la unión bacteriana y su proliferación en las células huésped (Schorey, *et al.*, 1995).

Los primeros informes de proteínas manosiladas en micobacterias se describieron al identificar la unión de proteínas del sobrenadante con la lectina de unión a manosa concanavalina A (Con A) (Espitia & Mancilla 1989). Dobos *et al.* (1995) mostraron la primera evidencia directa de residuos glicosilados en una proteína micobacteriana al demostrar que la proteína 45/47 kDa de *M. tuberculosis* (APA) se modificó con hexosas. Posteriormente, caracterizaron la presencia de manosas localizadas en algunas treoninas cercanas a los extremos amino y carboxilo de la misma proteína (Dobos, *et al.*, 1996).

Se ha demostrado que la O-manosilación en micobacterias, así como en otros actinomicetos, se lleva a cabo mediante manosiltransferasas homólogas a las Pmt reportadas en levaduras. En este ámbito, destaca el trabajo de VanderVen *et al* (2005), quienes demostraron que una proteína de membrana de *M. tuberculosis* (Rv1002c) homóloga a las proteínas manosiltransferasas eucariontas, cataliza el paso inicial de la O-manosilación de proteínas en las micobacterias. Por otro lado, se ha caracterizado la ruta biosintética de la manosa y la GDP-manosa en las micobacterias y se ha observado que se sintetizan mediante la misma ruta, de fosfomanosa isomerasa, fosfomanomutasa y GDP-manosa pirofosforilasa, que en las levaduras (Espitia *et al.*, 2010).

La *O*-manosilación, es el tipo de modificaciones post-traduccionales más común en las proteínas secretadas por *M. tuberculosis*. Se han estudiado una gran cantidad de proteínas secretadas por Mtb por incluyendo: Rv1860 (APA), Rv0934 (PstS-1), Rv3763 (LpqH), Rv1887, Rv1096, Rv2164c, Rv0175, Rv1887, Rv2744c (Deng, *et al.*, 2020; Smith, *et al.*, 2014). Además, se ha sugerido que las propiedades protectoras de la vacuna antituberculosa BCG están relacionadas con el patrón de *O*-manosilación en sus glicoproteínas (Bando-Campos, *et al.*, 2019).

Cabe mencionar que la gran mayoría de las proteínas secretadas por *M. tuberculosis*, con modificaciones post-transcripcionales y estudiadas por su potencial antigénico, son lipoglicoproteínas; es decir, proteínas que al ser secretadas se anclan a la membrana celular por medio de la acilación de alguno de sus residuos (Tucci, *et al.* 2020).

2. 2. Importancia médica de *M. tuberculosis*: Tuberculosis

M. tuberculosis es el agente bacteriano que causa tuberculosis (TB), una enfermedad que se transmite por vía respiratoria. A nivel global, la tuberculosis es la decimotercera causa de morbilidad y es la enfermedad infecciosa más mortífera por detrás del COVID-19, superando al VIH/SIDA. Se estima que una cuarta parte de la población mundial está infectada por Mtb (OMS, 2021).

En los últimos años, la epidemia de TB se ha visto impulsada aún más por la aparición de cepas multirresistentes a los medicamentos (TB-MDR y TB-XDR) y la disminución de las opciones de tratamiento que tienen décadas de antigüedad (Koul, *et al.*, 2011), siendo estos los principales factores que obstaculizan el control epidemiológico de la enfermedad.

Durante los últimos 100 años se ha aplicado como vacuna una micobacteria viva atenuada conocida como bacilo de Calmette-Guérin (BCG), derivada del agente causante de la tuberculosis bovina, *Mycobacterium bovis* (Calmette, *et al.*, 1927). Sin embargo, la incidencia actual de tuberculosis demuestra que el BCG no protege lo suficiente contra la tuberculosis pulmonar. La eficacia protectora de la BCG es en promedio del 50%, pero varía sustancialmente según la ubicación geográfica, el rango de edad y es menor en aquellos con exposición previa a micobacterias (Nieuwenhuizen & Kaufmann, 2018). Por otro lado, el tratamiento con antibióticos requiere de 6 a 9 meses y además el surgimiento constante de

cepas multirresistentes y extremadamente resistentes a los medicamentos ha prolongado los tratamientos farmacológicos provocando efectos secundarios considerables en los pacientes (Jacobson, *et al.* 2010).

La búsqueda de alternativas que permitan controlar la incidencia de tuberculosis sobre la población es una prioridad. Por lo que es necesario estimular la producción de antígenos recombinantes de Mtb para evaluar su efecto *in vivo* e *in vitro*. Así mismo, es prioritario el desarrollo de herramientas para el diagnóstico temprano de la tuberculosis y el diseño efectivo de nuevas vacunas (Bando-Campos., *et al.*, 2019).

3. *Streptomyces*

3. 1. *Streptomyces* y O-manosilación

Los estreptomicetos son un grupo de bacterias cosmopolitas, Gram positivas con alto contenido de G+C en su genoma, que pertenecen a los actinomicetos (al igual que las micobacterias) (Flårdh & Buttner, 2009). El género representativo de este grupo de bacterias es el género *Streptomyces*, que pertenece a la familia Streptomycetaceae. Este género está bien delimitado por características fisiológicas, morfológicas y moleculares (Korn-Wendisch & Kutzner, 1992; Kieser, *et al.*, 2000).

Las bacterias del género *Streptomyces* son aerobias estrictas, catalasa-positivas, quimio-organotróficas, no ácido-resistentes, sensibles a la lisozima y con un alto contenido de G+C >70% (Hidrin *et al.* 2001; Hasani *et al.*, 2014). Son organismos mayormente saprofitos, aunque se sabe que ocupan una amplia gama de nichos. Están formados por una red filamentosa de micelio que eventualmente se diferencia en micelio aéreo que a su vez se diferencia en cadenas de esporas (Korn-Wendisch & Kutzner, 1992). Adicionalmente la diferenciación a esporas es sumamente útil como estrategia de supervivencia y de dispersión a través del suelo. Se piensa que un alto número de estreptomicetos del suelo se encuentran en estado latente en forma de esporas (Sigle, *et al.*, 2015).

Lo más característico de los *Streptomyces* es la capacidad de producir gran variedad de metabolitos secundarios, consistente en una multitud de productos naturales que incluyen enzimas, inmunosupresores, insecticidas, agentes antitumorales y alrededor de dos tercios de

los antibióticos clínicamente útiles (Hopwood 1999; Hasani *et al.*, 2014). La producción de metabolitos secundarios se inicia con el agotamiento de los nutrientes y, a menudo, coincide con la diferenciación morfológica (Keenan, 2016).

Los estreptomicetos poseen un ciclo de vida complejo en comparación con otras bacterias. Comienza en condiciones favorables de temperatura, nutrientes y humedad, cuando una spora unigenómica en estado latente germina y forma un tubo germinal. Los tubos germinales crecen por elongación de la punta y las células no sufren fisión binaria. A través de la extensión y la ramificación, los tubos germinales dan lugar a una red de filamentos que crecen dentro y a través de la superficie del sustrato. El crecimiento vegetativo da como resultado la formación de micelio, es decir, una red de hifas adheridas al sustrato (Flärdh y Buttner 2009; Chater, *et al.*, 2010; Hasani *et al.*, 2014). Las hifas son a menudo multigenómicas (multinucleoides) ya que la septación ocurre solo ocasionalmente. A medida que la colonia continúa creciendo, el micelio en el centro de la colonia comienza a diferenciarse y genera hifas dirigidas hacia la parte superior formando micelio aéreo. Cuando los nutrientes se agotan, se diferencian los extremos superiores de las hifas aéreas y se produce la esporulación (Mc Gregor, 1954; Kieser, *et al.*, 2000; Hasani *et al.*, 2014).

En *Streptomyces* spp. los primeros reportes de glicosilación estuvieron basados en la caracterización de glicoproteínas nativas y heterólogas expresadas en *S. lividans* (Kluepfel, *et al.* 1990). Posteriormente, se reportaron glicoproteínas *O*-manosiladas; como la β 1,4-glucanasa Cex en *S. lividans* (Ong *et al.* 1994) y la proteína de unión a fosfato PstS de *S. coelicolor* (Wehmeier *et al.* 2009).

Cowlishaw & Smith, (2001) reportaron una proteín-manosil transferasa (Sco3154), de *S. coelicolor*, homóloga a la Pmt de Mtb, cuya delección impide la manosilación del receptor membranal del fago phi C31 y abate la infección. De igual forma se demostró la presencia de un homólogo de la Ppm de Mtb, en *S. coelicolor*, siendo que la mutación nula de Ppm1 suprime la transferencia de manosa a las proteínas aceptoras y evita la infección del fago phi C31 (Cowlishaw & Smith, 2002). Posteriormente, Wehmeier *et al.* (2009) proporcionaron evidencia de que las proteínas Pmt y Ppm1, reportadas en *S. coelicolor*, son ambas necesarias para la *O*-manosilación de proteínas en este organismo, en una vía semejante a la de los eucariontes. Mientras que Lara, *et al.* (2004) reportaron que la glicoproteína APA, de *M.*

tuberculosis, puede ser reconocida y glicosilada cuando se expresa de manera heteróloga en *Streptomyces*.

3. 2. Mecanismo de O-Manosilación en estreptomicetos

En *Streptomyces* la O-Manosilación comienza con la biosíntesis de GDP-manosa, Para este primer paso se requiere la actividad de la fosfomanosa isomerasa (PMI), la fosfomanomutasa (PMM) y la GDP-manosa pirofosforilasas (GMPP). La manosa, unida a GDP, necesita ser activada por moléculas de poliprenol fosfato, que son lípidos transportadores de manosa localizados en la membrana citoplásmica. La enzima poliprenol fosfato manosa sintasa (Ppm) cataliza la unión covalente de la manosa con el poliprenol-fosfato, del lado intracelular de la membrana. Se cree que Ppm1 está asociada a la membrana por un dominio hidrofóbico Posteriormente, el poliprenol-fosfato-manosa se voltea hacia el lado extracelular de la membrana mediante un mecanismo desconocido denominado “flipping”, exponiendo así a la manosa hacia el exterior de la membrana citoplásmica. Finalmente, la manosil transferasa de proteínas (Pmt) cataliza la transferencia de manosa del poliprenol-fosfato-manosa a residuos específicos de Ser/Thr en proteínas diana, en el lado extracelular de la membrana (Varghese 2008; Lommel & Strahl, 2009; Espitia *et al.*, 2010; Keenan, 2016) (Fig. 2).

Según lo descrito en *M. tuberculosis*, se tiene evidencia de que la O-glicosilación está acoplada a la translocación de proteínas a través de la vía Sec, y se cree que el plegamiento de proteínas ocurre después de la glicosilación (Vandervan, *et al.* 2005). Sin embargo, en *Streptomyces*, Keenan (2016), al identificar glicoproteínas translocadas a través de la vía Tat propone que la glicosilación de proteínas plegadas es posible de manera previa a su secreción (Fig. 2). Esto se ve apoyado por la verificación experimental de la glicoproteína SCO4934 como sustrato Tat en *S. coelicolor* (Thompson *et al.*, 2010).

Todos los residuos glicosilados en los actinomicetos están ubicados cerca de los extremos amino o carboxilo de las proteínas diana; hasta el momento no se ha identificado una secuencia consenso. Los estudios de glicosilación *in vivo* sugieren que Pmt no glicosila los residuos de Ser o Thr de manera no específica, sino que tiene una preferencia al glicosilar ciertos residuos (Wehmeier *et al.*, 2009). En particular, se especula que un ambiente local rico en prolina es suficiente en actinomicetos para la glicosilación de Ser o Thr por Pmt (Espitia *et al.*, 2010).

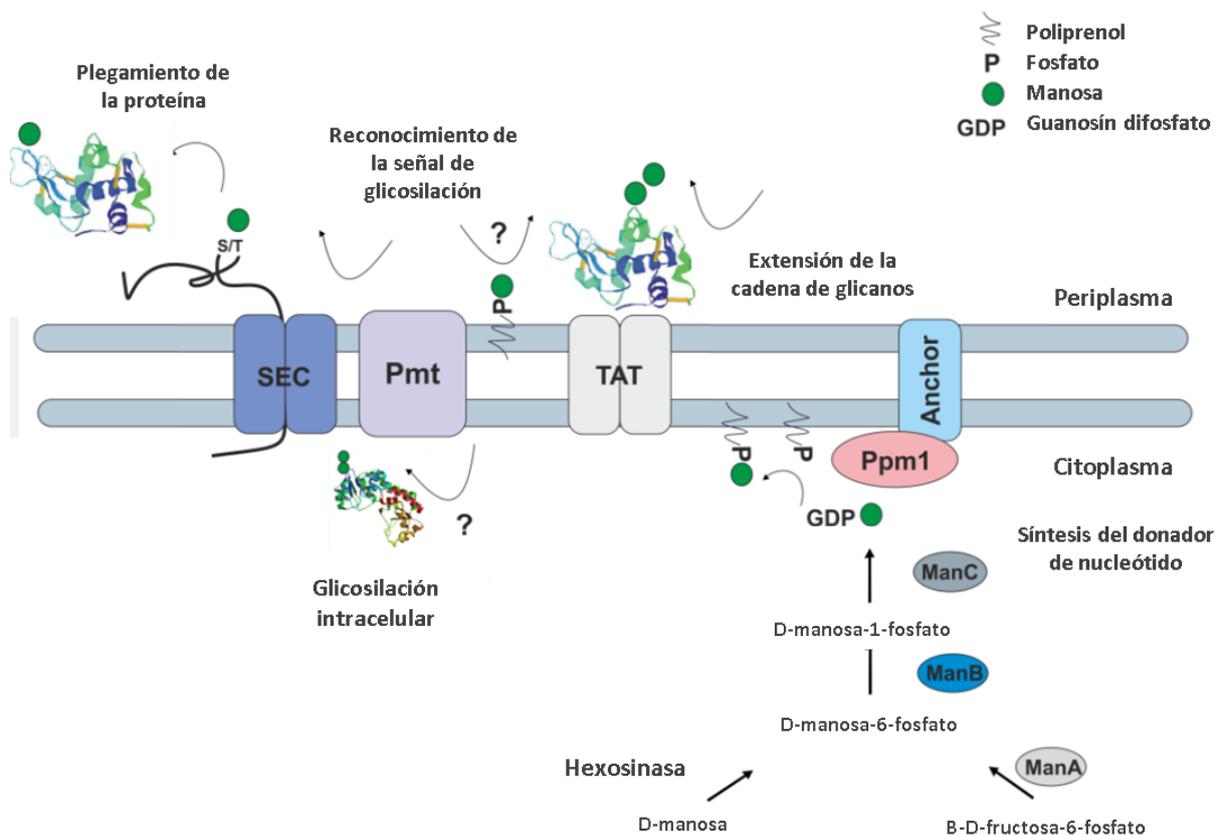


Figura 2. Mecanismo de *O*-manosilación en *Streptomyces* (Modificado de Keenan, 2016).

3. 3. *Streptomyces* como modelo experimental para la expresión de proteínas heterólogas

Los estreptomicetos han sido ampliamente estudiados como modelo experimental. En medio sólido crecen en la superficie, formando micelio vegetativo, aéreo y finalmente las hifas de la superficie esporulan (Fig 3a). Las colonias presentan aspecto ceroso, de aspecto polvoroso, de color blanco grisáceo, común en la mayoría de los *Streptomyces* (Hidrin *et al.* 2001). En medio líquido crecen en forma de agregados hifales, denominados “*pellets*” (Fig 3b). Estos *pellets* están compuestos de hifas densamente entrelazadas y generalmente tienen forma esférica. (Hobbs, *et al.*, 1989). El crecimiento de *Streptomyces* en medios líquidos es muy importante para la producción de metabolitos secundarios, proteínas extracelulares y para diversas manipulaciones genéticas como transformación de protoplastos, conjugación y aislamiento de ADN genómico/plásmido (Shepherd, *et al.*, 2010). Los cultivos muestran su crecimiento entre dos a diez días, a temperatura óptima de 30 a 37 °C (Hidrin *et al.* 2001).

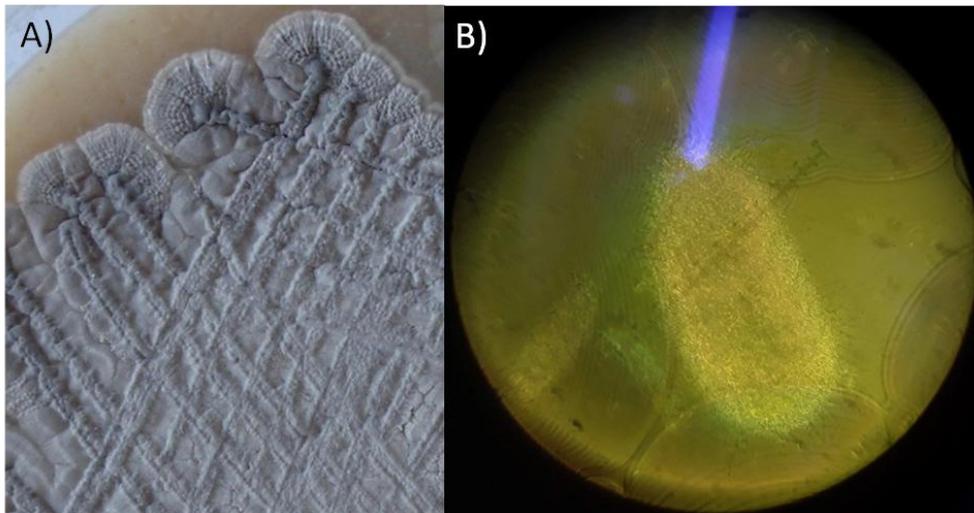


Figura 3. Cultivo de de *Streptomyces*. A) *S. lividans* esporulado en medio sólido. B) Agregado hifal, “*pellet*”, de *S. lividans*, producido durante el crecimiento en medio líquido.

Durante más de dos décadas se ha estudiado y se ha hecho uso de *Streptomyces* como huésped para la expresión de proteínas heterólogas (Anné *et al.*, 2014). Desde entonces se han desarrollado diversas herramientas moleculares y genéticas para mejorar la producción en este huésped e inclusive ha sido ampliamente usado para la expresión de proteínas recombinantes eucariotes (Brawner, 1994; Hong, *et al.*, 2003; Schaerlaekens, *et al.*, 2001; Morosoli, *et al.*, 1997; Hwang, *et al.*, 2021).

El género presenta ventajas prácticas en comparación con otros organismos modelos procariontes como *E. coli* y *Bacillus subtilis*, sobre todo en cuestiones de su expresión funcional de enzimas biosintéticas, disponibilidad de sustrato, baja citotoxicidad, sistemas de secreción y presencia de genes accesorios (Anné, *et al.*, 2012; Binda, *et al.*, 2013; Aguilar, 2015). Además, el crecimiento de varias especies de *Streptomyces* es robusto y escalable, ya que se han utilizado de forma intensiva para la producción industrial de metabolitos secundarios (Berini *et al.*, 2020).

Por otro lado, actualmente existen numerosos sistemas de vectores de integración sitio-específica conjugativos para la manipulación genética de los estreptomicetos. También está disponible la técnica de CRISPR/Cas como instrumento para la edición de genes en actinomicetos incluido *S. lividans* (Anné *et al.*, 2018). Particularmente la existencia de vectores de expresión de proteínas inducibles en *S. lividans* facilita la caracterización inmunológica y bioquímica de glicoproteínas (Lara, *et al.*, 2004).

3. 4. *S. lividans* y *S. coelicolor*

S. lividans es el hospedero de *Streptomyces* utilizado con mayor frecuencia para la producción de proteínas recombinantes. Se caracteriza por secretar altos niveles de proteínas bioactivas al medio, tanto procariontes como eucariontes. Carece de un sistema de modificación/restricción, a diferencia de *S. coelicolor* y *S. avermitilis* lo que permite una introducción eficiente del ADN recombinante, particularmente presenta una alta eficiencia de conjugación (Anne *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2004). Además, la actividad proteolítica extracelular es limitada, permitiendo un alto rendimiento de la proteína (Anne *et al.*, 2014).

Se ha demostrado la eficiencia de *S. lividans* para expresar, glicosilar y plegar de manera correcta sus propias proteínas, así como proteínas heterólogas (Ong, *et al.*, 1994; Lara, *et al.*, 2004; Aguilar, 2015; Hwang *et al.*, 2021). La capacidad de glicosilar productos génicos clonados mejora la utilidad de *Streptomyces* como huésped para la producción de glicoproteínas heterólogas, y facilita su uso como modelo para el estudio de los procesos de glicosilación en bacterias (Lara, *et al.*, 2004).

Con respecto a *S. coelicolor*, este es un organismo modelo del género *Streptomyces* y fue el primer estreptomiceto cuyo genoma se secuenció (Bentley *et al.* 2002). *S. coelicolor* tiene un solo cromosoma lineal de ~ 8667 kb que contiene 7825 genes predichos (Keenan, 2016). Se cree que más de 20 “clusters” de genes contienen los genes necesarios para la biosíntesis de sus metabolitos secundarios. Entre estos se encuentran los grupos bien caracterizados de antibióticos pigmentados, actinorrodina (ACT) y undecilprodigiosinas (RED) (Liu *et al.* 2013b). Además, se está recopilando información detallada sobre el metabolismo de *S. coelicolor* (Hodgson, 2000). Hay una gran cantidad de herramientas genéticas disponibles para este organismo, incluidos distintos vectores de replicación, integración y expresión (Rattleff, 2013; Hwang *et al.*, 2021).

Cabe mencionar que ambas cepas están estrechamente relacionadas genéticamente. Jayapal, *et al.*, (2007) usaron arreglos de expresión provenientes de *S. coelicolor* A3 (2) para *S. lividans*. La comparación de sus genomas reveló que *S. lividans* y *S. coelicolor* difieren principalmente en elementos genéticos adquiridos lateralmente (Jayapal, *et al.*, 2007; Lewis, *et al.*, 2010).

4. APA

La glicoproteína APA es un antígeno inmunodominante rico en alanina y prolina (*Alanine and Proline-rich Antigen*) de Mtb, también llamado antígeno de 45/47 kDa, ModD, o MPT-32. Se ha reportado como una adhesina que interactúa con receptores de lectina (Kumar, *et al.* 2003). Se encontró en el sobrenadante de *M. tuberculosis* y *M. bovis* y se observó que al someterse a electroforesis en gel SDS-PAGE migra como dos bandas de 45 y 47 KDa (Laqueyrie, *et al.* 1995). Horn *et al.* (1999) sugirieron que la doble banda de APA en gel es resultado de una escisión proteolítica en el extremo C-terminal entre los residuos P275 y T276.

La proteína APA consta de 325 aminoácidos. Los primeros 39 residuos, del extremo N-terminal corresponden al péptido señal (Fig. 4). APA es modificada por la unión de manosas y a diferencia de la mayoría de las glicoproteínas secretadas por *M. tuberculosis*, APA no es una lipoproteína (Dobos, *et al.*, 1996). Se han reportado cuatro posiciones donde se lleva a cabo la O-manosilación: T49, T57, T66 y T316 (Dobos, *et al.* 1996; Lara, *et al.* 2004). Por otro lado, se ha cristalizado la proteína (Fig. 4) y se describió su estructura como una gran hoja β antiparalela de siete hebras que está flanqueada por tres hélices α (Gao, *et al.* 2019).

APA ha sido identificada en varias especies de micobacterias como son *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. vaccae*, *M. bovis*, *M. kansasii*, *M. smegmatis*, *M. marinum* y *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Coddeville, *et al.*, 2012; Gao, *et al.* 2019). Se considera que APA es producida por todos los miembros del complejo *M. tuberculosis*, incluida la cepa vacunal, *M. bovis* bacillus Calmette Guerin (BCG) (Nakudamar, *et al.* 2013).

Se ha demostrado que APA media la unión e internalización de estas bacterias a su huésped ya que interactúa con receptores de lectina que influyen directamente en la invasión y proliferación de las micobacterias (Lara, *et al.* 2004; Liu, *et al.*, 2013a). Así mismo, se ha demostrado que APA de Mtb participa en varias otras actividades, como la proliferación de células T CD4+ y CD8+, la inducción de la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado y la obtención de protección contra Mtb en cobayos, también podría tener un papel en la selectividad del huésped (Ragas, *et al.* 2007; Kumar, *et al.* 2003; Gao, *et al.* 2019).

En relación a la aspiración de obtener nuevos tratamientos que permitan controlar la tuberculosis en la población, se ha propuesto a la proteína APA como una potencial vacuna de interés biomédico (Kumar, *et al.* 2003; Aguilar, 2015). Esto es, en primer lugar, por su papel como antígeno inmunodominante que desencadena la respuesta inmune, tanto *in vitro* o como *in vivo*. En segundo lugar, por la particularidad de que a diferencia de la mayoría de las glicoproteínas secretadas por *M. tuberculosis*, APA se secreta al medio extracelular sin anclarse a la membrana, lo cual facilita su purificación. Por último, cabe destacar que es APA una de las glicoproteínas mejor caracterizadas de este organismo (Wang, *et. al.*, 2018).

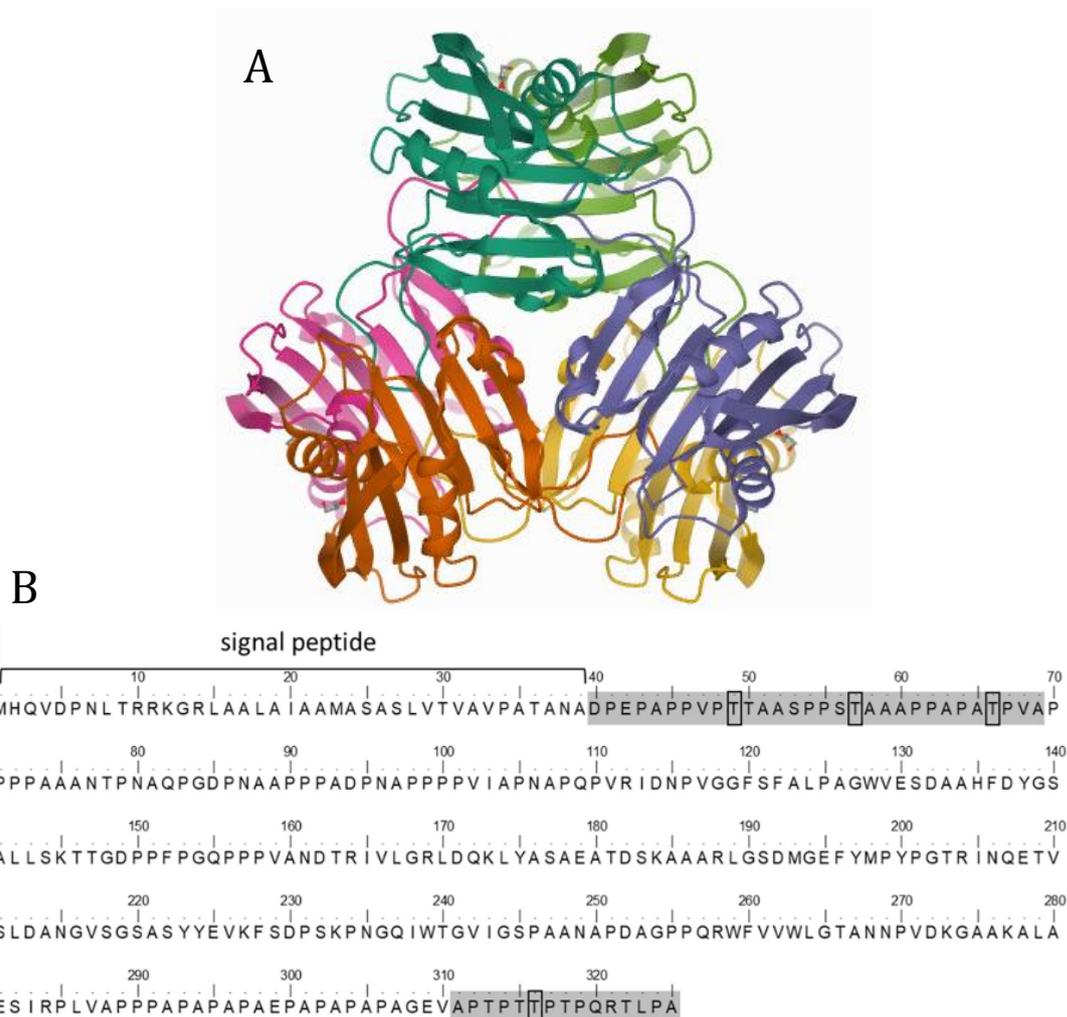


Figura 4. Estructura y secuencia de Apa. A) Estructura terciaria de la proteína de unión a fibronectina Apa de *M. tuberculosis*. Unidad biológica generada por el software PISA (Tomado de Gao, *et. al.* 2019). B) Diagrama esquemático que muestra la secuencia completa de Apa. Cuatro de los residuos Thr O-glicosilados (T49, T57, T66 y T316) se muestran encasillados. Péptido señal (residuo 1–39). Residuos circundantes a los sitios de glicosilación sombreados en gris (Modificado de Kuo, *et. al.* 2019).

4. 1. O-manosilación de APA

Dada la variedad de funciones en las que APA se encuentra involucrada y la especificidad de los receptores de lectina hacia los ligandos, se puede especular que las diferencias específicas en el estado de manosilación de APA puede influir en sus funciones biológicas (Coddeville, *et al.*, 2012). Es por esto que la descripción del perfil de glicosilación de APA es esencial para comprender su papel en el mecanismo de patogénesis de Mtb y en su uso como vacuna o blanco para el diagnóstico para la tuberculosis.

De hecho, se ha evidenciado que la glicosilación de APA es imprescindible para la activación de la respuesta inmune *in vitro* como *in vivo*. La proteína APA purificada induce una potente respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado y estimulaba las células T sensibilizadas. Por el contrario, la proteína recombinante no glicosilada expresada en *E. coli* no induce una hipersensibilidad de tipo retardado ni una respuesta de las células T (Horn *et al.* 1999; Romain *et al.* 1999).

La investigación de Dobos (1996) demostró la glicosilación de cuatro residuos de Thr en dominios ricos en Pro cerca de los extremos N y C (T49, T57, T66 y T316), con una sola unidad de α -D-manosa, manobiosa o manotriosa. En todos los casos, la glicosilación corresponde a O-manosilaciones a través de enlaces glucosídicos α -1,2. En estudios posteriores, se han confirmado que la glicosilación de APA consta únicamente de unión covalente con manosa (Mehaffy, *et al.*, 2019; Tucci *et al.*, 2020).

Estudios proteómicos de las glicoproteínas de *M. tuberculosis* han reportado detectar diversas isoformas de la proteína APA del mismo sobrenadante. Las variaciones incluyen formas no manosiladas o parcialmente manosiladas de APA, o manosiladas en las posiciones Th313, Th315 y Th 1318. Además, se detectaron variaciones en el número de residuos de manosa asociados, sin embargo, esto podría deberse a las técnicas utilizadas (Smith *et al.*, 2014; Tucci *et al.*, 2020).

Estudios de la APA de *M. bovis* MPB83 muestran que, a diferencia de su homólogo en *M. tuberculosis* que presenta α -1,2-mano-oligosacáridos, la APA de MPB83 presenta α -1,3-mano-oligosacáridos (Ragas, *et al.* 2007). Por otro lado, se ha reportado gran variabilidad respecto al paton de glicosilación entre los homólogos APA de *Mycobacterium marinum* y *M.*

tuberculosis o al ser expresada de manera heteróloga en *Pichia pastori* (Coddeville, et.al. 2012; Wang, S 2018).

4. 2. Expresión de APA en *Streptomyces*

Si bien es evidente el potencial de APA como vacuna, su producción se ve obstaculizada por la dificultad para obtener grandes cantidades de esta proteína. Se sabe que su expresión recombinante en *E. coli* (Horn, et al., 1999) carece de las modificaciones post-transcripcionales de la proteína silvestre; por lo que han buscado bacterias huésped con capacidad de modificar las proteínas extrañas, como lo son las bacterias del género *Streptomyces* (Gamboa-Suasnavarty et al. 2011; Vallecillo, et al., 2017).

APA se ha expresado de forma heteróloga en diversos huéspedes, como *E. coli*, *Rhodococcus erythropolis* (con un rendimiento de 20 mg/L), *P. pastori* (con un rendimiento de 46 mg/L) y *S. lividans* (con un rendimiento de 80 mg/L) (Horn, et al., 1999; Vallecillo, et al., 2017; Wang, S 2018; Vallin et al., 2006). Se ha estudiado la función antigénica y el uso terapéutico de la proteína APA expresada heterológamente (Kumar P., et al. 2003).

En diversos trabajos se ha expresado a la proteína APA de manera heteróloga, en *S. lividans* y *S. coelicolor*. Lara et al. (2004) mostraron que la proteína APA puede expresarse de forma recombinante y ser secretada por la maquinaria de *Streptomyces*; a su vez demostraron que tanto el dominio N-terminal como el C-terminal de la APA recombinante están glicosilados con manosas en las mismas posiciones de aminoácidos que la proteína nativa. Además, en ese mismo trabajo, se evidenciaron la reacción de anticuerpos de pacientes humanos con tuberculosis contra los residuos de carbohidratos de la glicoproteína recombinante.

Po otro lado, Vallin et al., (2006) realizaron ensayos *in vivo* con la proteína APA purificada de *S. lividans* TK24/pRGAPA1 en donde la proteína recombinante mostró un efecto antigénico en ratón. Córdova-Dávalos, et al. (2014) demostraron, a través de la evaluación de la glicosilación de la APA recombinante, que la lipoproteína N-acil transferasa (Lnt1) es prescindible para O-manosilación por *S. coelicolor*. Mientras que otros estudios se han dedicado a caracterizar las condiciones de cultivo óptimas para escalar la producción de APA en *Streptomyces* (Gamboa-Suasnavart et al. 2011; Marín-Palacio, et al., 2014; Gamboa-Suasnavart et al., 2019).

5. Secreción de proteínas en bacterias

La secreción de proteínas es un mecanismo fundamental en la interacción entre la célula y su entorno. Las proteínas exportadas pueden anclarse en la membrana citoplásmica o externa, retenerse en el espacio periplásmico o liberarse en el medio (Ivankov, *et al.*, 2013). El transporte de proteínas es común en todos los dominios de la vida (Tsirigotaki *et al.*, 2017). Alrededor del 20-30% de las proteínas sintetizadas por las bacterias tienen un destino extracelular. Estas atraviesan la membrana citoplásmica utilizando sistemas de transporte especializados, que involucran poros/canales, ATP y/o fuerza protón motriz (PMF) y péptidos señal para dirigir la exportación de proteínas. Los dos sistemas principales de exportación de proteínas son: la vía secretora general (Sec) y la vía de las argininas gemelas (Tat) (Fig. 5).

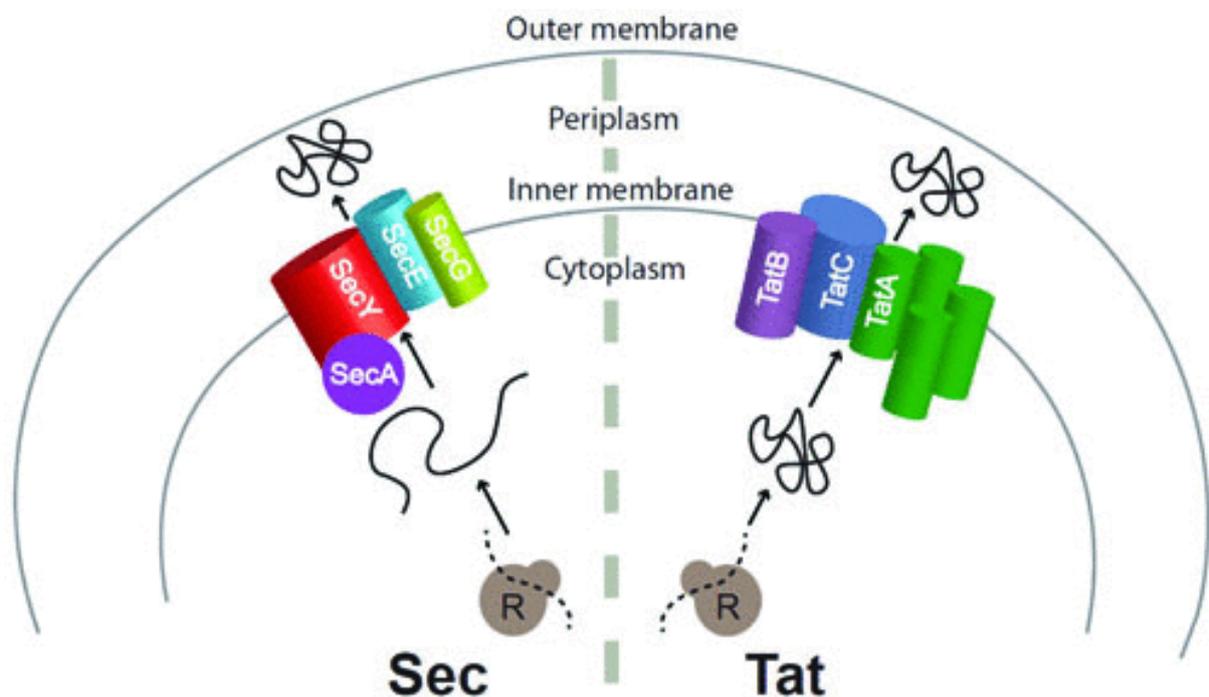


Figura 5. Las dos principales vías de translocación de proteínas, Sec y Tat. El proceso comienza con la síntesis proteica por los ribosomas (R). Con la ayuda de chaperonas, el péptido señal N-terminal dirige la cadena polipeptídica naciente a la translocasa correcta, Sec o Tat, respectivamente. La proteína Sec desplegada se transfiere a SecA, la cual facilita su paso a través del canal SecYEG. En el periplasma, la proteína desplegada asume su estado terciario completamente plegado. La proteína translocada por Tat está completamente plegada dentro del citoplasma, donde también puede adquirir un cofactor. Una vez dirigidos a TatBC, los protómeros de TatA se reclutan para trasladar la proteína a través de la membrana citoplasmática (Tomado de Frain *et al.*, 2019a)

En bacterias, la translocación de proteínas a través de la membrana citoplásmica hacia el periplasma o el espacio extracelular está mayoritariamente mediada por la interacción de los péptidos señal N-terminal con la maquinaria de secreción correspondiente (Ivankov, *et al.*, 2013). Sin embargo, existe un sistema de secreción adicional, altamente especializado e inusual que transloca proteínas que no poseen péptido señal: el sistema ESX-Tipo-VII; el cual fue caracterizado en *Mycobacterium* y otras bacterias gram positivas; como es el de las Actinobacterias, incluyendo *Streptomyces* (Fyans 2003; Tsolis *et al.*, 2018).

5. 1. Péptido señal

El péptido señal es una cadena aminoacídica, con una longitud de 15 a 30 aminoácidos, presente en el extremo N-terminal de las proteínas que son secretadas y es la señal que dirige a las preproteínas hacia la maquinaria de secreción correspondiente. Los péptidos señales son muy diversos en cuanto a su secuencia de aminoácidos y longitud, ya que estos varían dependiendo de la proteína, del sistema de secreción al que estarán dirigidos y del organismo (Low, *et. al.*, 2013). Al secretarse la proteína, la secuencia señal es escindida por una peptidasa señal específica (SPasa) (Blobel & Dobberstein, 1975).

Generalmente, los péptidos señal no muestran similitudes en su secuencia primaria, sin embargo, la estructura general de los péptidos señal se conserva a lo largo de la evolución y consta de tres regiones (Fig. 6). La región N: segmento amino terminal cargado positivamente, de 1 a 8 residuos de longitud. La región H: un núcleo hidrofóbico central de 7 a 15 residuos (usualmente leucinas), que puede adoptar una conformación de α -hélice que interacciona con la proteína SecA del sistema de secreción Sec. Y la región C: un dominio carboxilo terminal de 3 a 7 residuos, usualmente con carga polar, que incluye el motivo para el reconocimiento y la escisión mediada por la SPasa (Hiller, *et al.* 2004; Käll, *et al.* 2004; Paetzel, 2019).

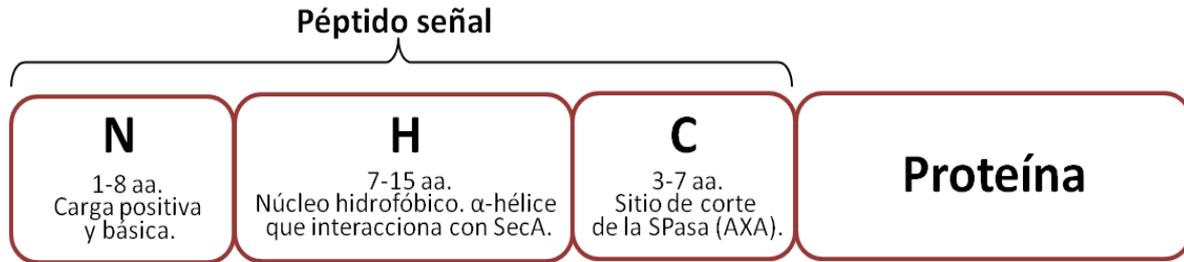


Figura 6. Estructura general de un péptido señal (Modificado de Aguilar, 2015).

Las posiciones -1 y -3 con respecto al sitio de escisión de la SPasa están ocupadas por aminoácidos polares no voluminosos (usualmente A) y son reconocidos por el sitio de unión de la peptidasa señal de tipo I, siendo el motivo consenso de corte A-X-A, donde X puede ser cualquier aminoácido. Algunas proteínas contienen un motivo que será señal para su maduración como lipoproteínas: L[AS][GA]C en la posición -3 a +1. La cisteína en la posición +1 se modifica con lípidos después de la translocación, después de lo cual se produce la escisión de la secuencia señal por una peptidasa señal de lipoproteína tipo II. El dominio maduro modificado permanece asociado a la superficie de la membrana a través del anclaje de lípidos (Natale *et al.*, 2008; Hutchings, *et al.* 2009).

El péptido señal es uno de los elementos más importantes que afectan las diferentes etapas del proceso de secreción y el rendimiento de la proteína. La variación de los residuos determina la capacidad del péptido señal para dirigir la secreción de la proteína, y su rendimiento. La sustitución o modificación de los péptidos señal de las proteínas ha sido aprovechada con fines biotecnológicos tanto en la expresión de proteínas nativas como en la expresión heteróloga en distintos modelos biológicos. Además, se ha tratado de identificar un péptido señal ideal para la secreción general de proteínas (Low, *et al.*, 2013; Aguilar 2015).

Cabe mencionar que se ha buscado optimizar la secreción de proteínas heterólogas a partir de la variación y modificación de péptidos señal (Freuld *et al.*, 2018). Para buscar el péptido señal más eficiente se han realizado diferentes tipos de experimentos, por ejemplo: el remplazo de aminoácidos o la sustitución completa del péptido señal silvestre (Hamed *et al.*, 2018).

5. 2. Particularidades de los péptidos señal Sec y Tat

Los péptidos señal de los sustratos Sec generalmente no muestran similitudes en sus secuencias a excepción de los motivos de escisión de SPasa, toda su estructura es reconocida por los componentes del sistema Sec. Tanto las regiones H como N son elementos estructurales críticos reconocidos por SRP y SecA. La afinidad de unión de SRP aumenta con la hidrofobicidad de la región H, mientras que la interacción con SecA aumenta con el número de cargas positivas en la región N (Cunningham, & Wickner 1989; Lee & Bernstein, 2001; Peterson *et al.*, 2003).

No obstante, poseen otras características en común dependiendo de si la secreción es co- o post-traducciona. En la secreción de tipo co-traducciona las proteínas precursoras poseen un péptido señal altamente hidrofóbico que permite ser reconocido por la partícula de reconocimiento de señal (SRP). En el modo post-traducciona, las proteínas precursoras poseen péptidos señal menos hidrofóbicos, la evidencia muestra que el péptido señal interactúa con los dominios de la preproteína y favorece que motivos en esta queden expuestos para su reconocimiento (Crane & Randall, 2017; Freuld, *et al.*, 2018).

Las proteínas que son dirigidas hacia la vía Tat contienen un motivo conservado en su péptido señal caracterizado por la presencia de dos argininas consecutivas. Dicho motivo fue descrito inicialmente para *E. coli* como (S/T)-R-R-x-F-L-K, donde x es cualquier aminoácido (Berks *et al.* 1996), se ha encontrado que las argininas consecutivas casi siempre son invariantes, mientras que los otros aminoácidos del resto del motivo ocurren con una frecuencia mayor al 50%, y el aminoácido en la posición x suele ser en la mayoría de los casos polar. Dependiendo del autor hay variantes de dicho motivo como S/TR-R-x- ϕ - ϕ , donde ϕ es un residuo hidrofóbico (Lee *et al.*, 2006), no obstante, en la actualidad se sigue haciendo referencia al motivo original (Frain *et al.*, 2019b; Freuld, 2018; Palmer y Berks, 2012). Además, se han encontrado proteínas cuyo péptido señal posee las dos argininas consecutivas, mas no son secretadas vía Tat (Pantelis *et al.*, 2012) mientras que se han reportado algunos casos en donde sustituciones de alguna de las argininas permiten la secreción por Tat (Buchanans *et al.*, 2002; DeLisa *et al.*, 2002; Ize *et al.*, 2002). Dos ejemplos de sustratos Tat naturales que carecen del motivo de las dos argininas consecutivas son: la prepropenicilina amidasa de *E. coli* (que contiene un motivo R-N-R) y la tetratoato reductasa de *Salmonella enterica* (K-R) (Lee *et al.*, 2006).

Cabe destacar que la región H de los péptidos señal Tat es, por lo general, menos hidrófoba que la de los péptidos señal del sistema Sec debido a la presencia de más residuos de glicina y treonina. Asimismo, el péptido señal de los sustratos Tat tiende a ser más largo que su contraparte Sec, principalmente debido a una región N extendida (Cristóbal *et al.*, 1999; Kipping *et al.*, 2003). Adicionalmente, el dominio C de los péptidos señal de Tat puede incluir residuos básicos en el extremo N del motivo A-x-A, que contribuyen a evitar ser reconocidos por la maquinaria del sistema Sec (Frain *et al.*, 2019b). Se ha propuesto que la presencia de cargas positiva en la región C sirve para evitar el desvío de la preproteína hacia el translocón Sec. Sin embargo, muchas secuencias de señales Tat carecen de esta carga (Lee, *et al.*, 2009).

En la figura 7 se muestran las diferencias entre los péptidos señal de los sustratos Sec y de los sustratos Tat.

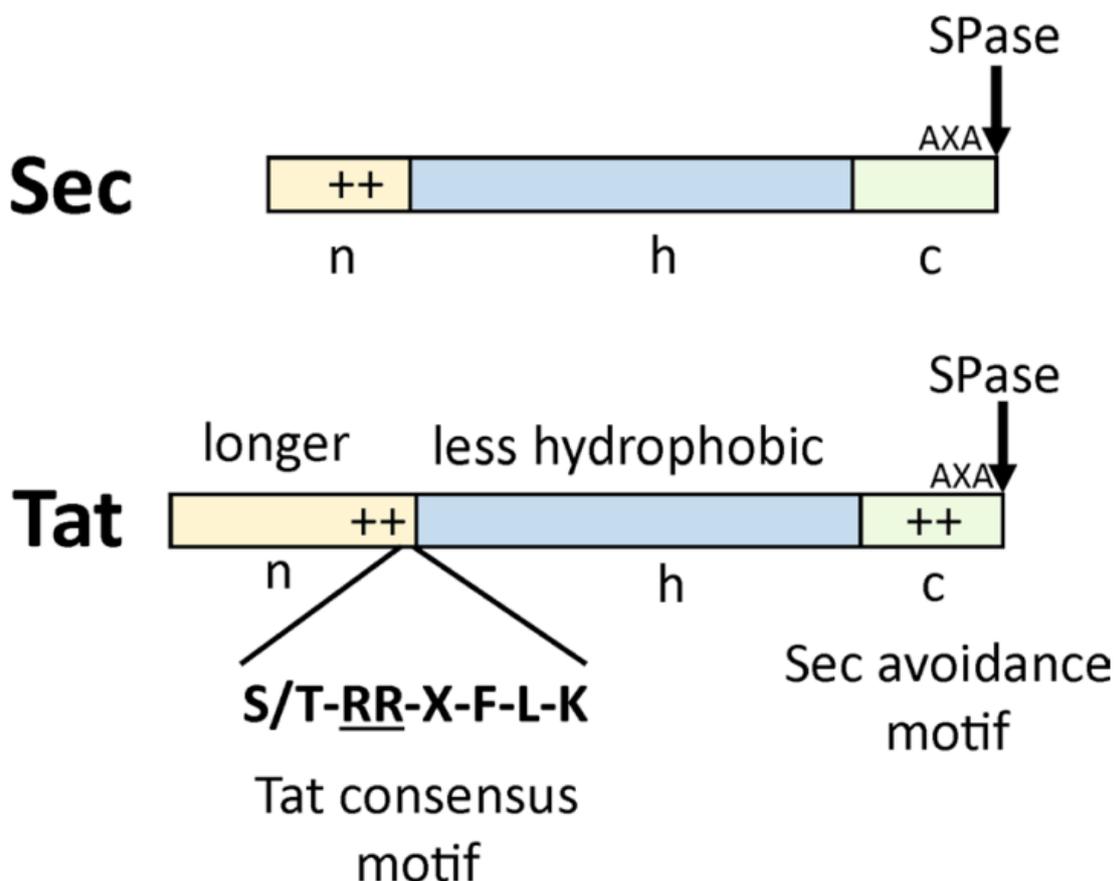


Figura 7. Características generales de los péptidos señal Sec y Tat. Los péptidos señal poseen una estructura tripartita general similar que consta de una región N cargada positivamente, una región H hidrofóbica y una región C polar que contiene el motivo A-X-A para la SPasa (el sitio de corte del péptido señal es indicado por una flecha).

5. 3. Vía Sec

La vía secretora general (Sec) es el principal sistema para la integración o la translocación de proteínas a través de la membrana plasmática. Se caracteriza por exportar proteínas, de manera co-traduccional o post-traduccional, mientras que estas están en un estado no plegado. Esta vía es esencial, ubicua y universal en todos los dominios de la vida. (Natale *et al.*, 2008; Tsirigotaki *et al.*, 2017). En *E. coli*, alrededor del 96% de las proteínas que son exportadas son dirigidas por la vía Sec (Orfanoudaki *et al.*, 2014).

La translocación por vía Sec es a través de un translocón descrito como SecYEG en bacterias. SecYE β en arqueas y Sec61 $\alpha\beta\gamma$ en el retículo endoplásmico de eucariontes (Ghaisani & Driessen, 2019). Además, intervienen las proteínas SecA, SecB, SecD, SecDF, YajC, YidC y en el caso de la secreción co-traduccional interviene FtsY y la ribonucleoproteína SRP (Anné *et al.*, 2014).

Existen dos tipos de secreción dependiente de Sec (Fig. 8). La principal diferencia radica en que en uno la síntesis de la proteína por el ribosoma se acopla con su paso a través de la membrana (mecanismo co-traduccional). Mientras que de la otra manera la secreción es independiente de la traducción (mecanismo post-traduccional). La secreción de proteínas en bacterias ocurre predominantemente como un evento de translocación postraduccional (Paetzel, 2019).

Por un lado, en el mecanismo cotraduccional, el proceso comienza con el reconocimiento de un péptido señal altamente hidrofóbico de una proteína emergente, por la SRP. Una vez que la SRP se une a la cadena que emerge del ribosoma, la dirige hacia el complejo receptor FtsY ubicado en la membrana. Tras la unión de GTP al heterodímero SRP: FtsY, la cadena emergente se libera de la SRP y se transfiere al canal SecYEG, donde la elongación de la cadena polipeptídica se acopla directamente al paso a través del canal SecYEG y a la inserción en la membrana de la proteína naciente (Low, *et al.*, 2013; Tsirigotaki, *et al.*, 2016). En eucariontes, este mecanismo es usado tanto para la exportación como para la inserción en la membrana, mientras que, en las bacterias, es usado principalmente para la inserción de proteínas en la membrana (Müller *et al.*, 2001).

Por el otro lado, se encuentra el mecanismo postraduccional. Durante la translocación postraduccional, las preproteínas con péptido señal Sec (menos hidrofóbico en comparación al mecanismo anterior) son reconocidas por chaperonas acopladas al ribosoma, como el factor desencadenante o la forma soluble de SecA. Alternativamente, las preproteínas abandonan el ribosoma y pueden unirse a chaperonas citoplasmáticas que tienen actividad "holdasa", como SecB, que mantienen las preproteínas en un estado desplegado y soluble. Cabe resaltar que ni el factor desencadenante ni la proteína SecB son esenciales para la exportación vía Sec. Además, en ausencia de chaperonas, las preproteínas pueden permanecer desplegadas y con capacidad de translocación *in vitro*, debido a las propiedades en sus péptidos señal y de sus dominios maduros que retrasan el plegamiento. Ya sea que sean dirigidas por una chaperona o por difusión en el citoplasma, las preproteínas llegan al complejo SecYEG-SecA (Crane & Randall, 2017; Ghaisani & Driessen, 2019; Tsirigotaki *et al.*, 2016). SecA es una ATPasa, que facilita el paso de las proteínas de manera escalonada a través del canal. SecYEG es un complejo heterotrimérico estable, compuesto por SecY, SecE y SecG, que funciona como canal para la translocación a través de la membrana. El complejo SecDF, ya sea solo o formando el complejo SecDF-YajC, interacciona con SecYEG y aumenta la eficiencia de la translocación al acoplar PMF al proceso (Driessen *et al.*, 2008; Schiebel *et al.*, 1991; Tsirigotaki *et al.*, 2016).

Los diferentes modelos y/o su combinación podrían explicar el rol de SecA y el mecanismo de translocación de la cadena. En un modelo de pistón, SecA actúa como un motor procesivo que impulsa la cadena a través del canal. Otra posibilidad es que SecA actúe como un regulador alostérico, donde ciclos de hidrólisis de ATP en SecA controlen los cambios de conformación de SecYEG, esto facilitaría el mecanismo donde un polipéptido acoplado pueda experimentar una difusión pasiva a través del canal. Otra alternativa es que Sec actúe como un freno, evitando que la cadena se deslice hacia atrás mientras el movimiento hacia adelante es impulsado por PMF o por difusión. Una vez que es translocada la mayor parte del dominio maduro, SecA pierde los sitios de contacto y se disocia de SecYEG (Allen *et al.*, 2016; Economou & Wickner, 1994; Ghaisani & Driessen, 2019; Tsirigotaki *et al.*, 2016). Finalmente, cuando la proteína es translocada completamente, o al menos 80%, la peptidasa señal (SPasa I para proteínas secretoras y SPasa II para lipoproteínas) cortan el péptido señal y se libera el dominio maduro para su plegamiento fuera de la membrana (Auclair *et al.*, 2016).

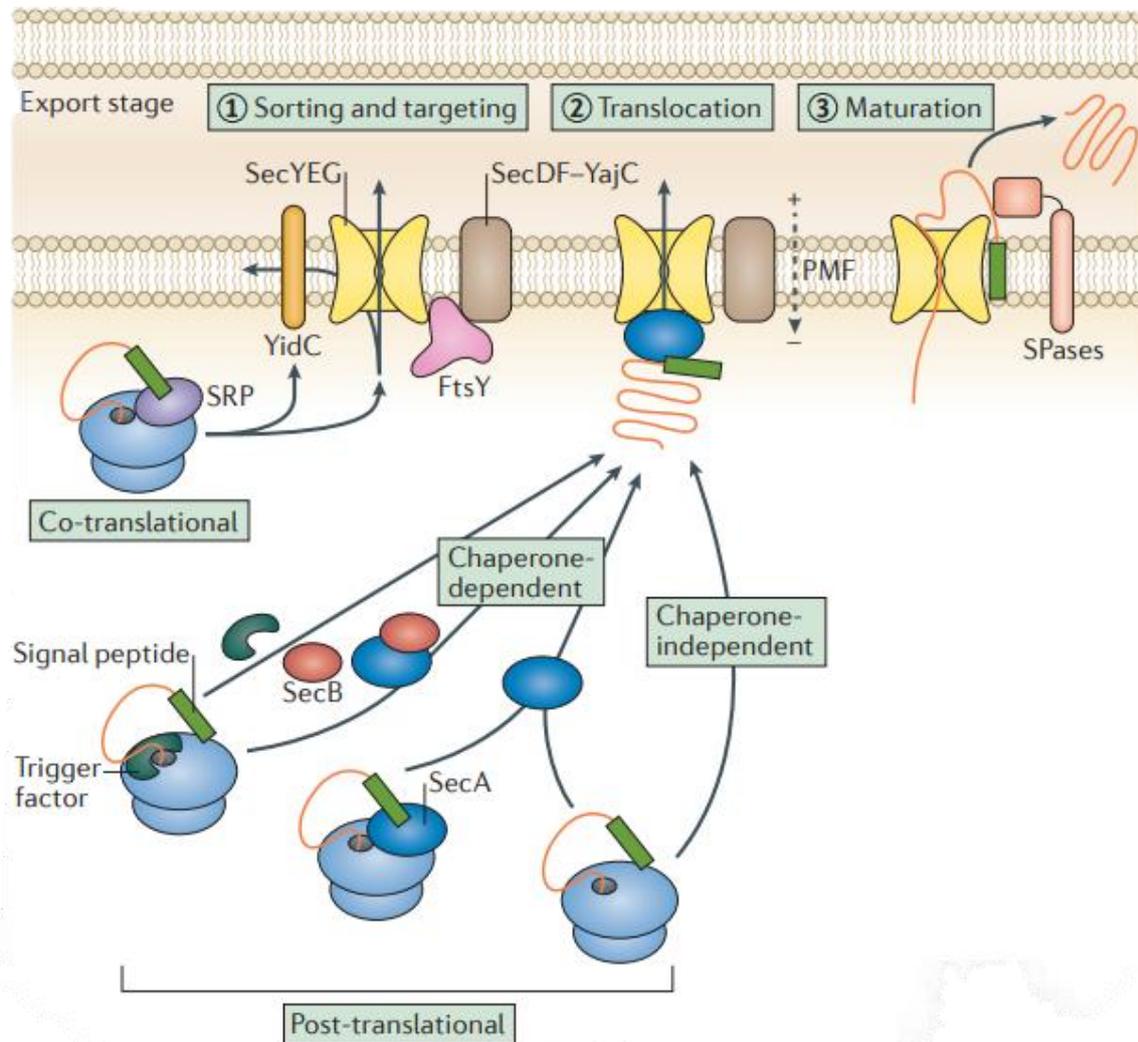


Figura 8. Sistema de secreción Sec. Reconocimiento y orientación (paso 1): Los ribosomas sintetizan las preproteínas (naranja) que contienen un péptido señal (verde) y sin plegarse son dirigidas al canal SecYEG (amarillo). De manera cotraduccional las preproteínas son dirigidas por la SRP (púrpura) y su receptor de membrana FtsY (rosa). Mientras que, por la manera postraduccional son dirigidas por SecA (azul). Las preproteínas pueden dirigirse a la translocasa SecYEG-SecA de manera independiente. No obstante, usualmente las chaperonas facilitan su orientación y evitan el plegamiento. Estas incluyen, al factor desencadenante (verde oscuro), SecA en su forma soluble en el citoplasma o la chaperona SecB (rojo). Translocación (paso 2): las preproteínas son translocadas a través de SecYEG hacia el periplasma, este proceso es impulsado por la hidrólisis de ATP por SecA y la fuerza protón motriz. Los componentes auxiliares SecDF – YajC6 (marrón) y YidC11 (naranja claro) mejoran la eficiencia de la translocación. Maduración y liberación (paso 3): las peptidasas señal (rosa pálido) escinden los péptidos señal y las proteínas se liberan en el periplasma para finalizar su maduración (Modificado de Tsirigotaki, 2016).

5. 4. Vía Tat

El sistema de secreción Tat (*twin-arginine translocation*) posibilita la secreción, a través de la membrana celular, de proteínas plegadas y permite ciertas modificaciones post-traduccionales, así como la adición intracelular de cofactores previo a su secreción (Bogsch *et al.*, 1998).

Esta es una vía ampliamente distribuida, presente en bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Rickettsia prowazekii* (Bogsch *et al.*, 1998; Dilks, *et al.*, 2003; Palmer *et al.* 2010). También se encuentra en bacterias Gram-positivas tales como *Streptomyces lividans*, *Bacillus subtilis* y *Mycobacterium tuberculosis* (Dilks *et al.*, 2003; McDonough *et al.*, 2005; Schaerlaekens *et al.*, 2001). Se ha descrito también en arqueas como *Haloferax volcanii*, *Halobacterium salinarum* y *Sulfolobus solfataricus* (Dilks *et al.*, 2003,). Cabe mencionar que además de encontrarse en procariontes y arqueas el sistema Tat se presenta en cloroplastos y tilacoides de plantas (Keller *et al.*, 2012).

A pesar de que la vía Tat usualmente transporta menos sustratos en comparación a la vía Sec, es importante hacer hincapié en el rol fundamental que puede ejercer en procesos celulares tales como: el metabolismo respiratorio y fotosintético, la adquisición de hierro y fósforo, la división celular, la motilidad celular, el "quorum sensing", el metabolismo de organofosfatos, la resistencia a metales pesados y péptidos antimicrobianos, fijación simbiótica de nitrógeno y la virulencia en distintos patógenos animales y vegetales (Palmer & Berks, 2012).

La vía de secreción Tat fue descrita inicialmente en *E. coli* y se encontró que el proceso de unión a los sustratos y su posterior translocación a través de la membrana es efectuado por la acción de las proteínas TatA, TatB, TatC y TatE, siendo TatE producto de una duplicación del gen que codifica para TatA. (Bogsch *et al.* 1998; Santini *et al.* 1998; Sargent *et al.* 1998). Los sistemas Tat funcionan mínimamente con proteínas similares a TatA y TatC, aunque esto varía entre organismos (Blaundek *et al.* 2005; Goosens *et al.*, 2014). En *S. lividans*, solo se expresan TatA, TatB y TatC (Schaerlaekens *et al.*, 2001).

Al sistema Tat se le relacionó directamente con sustratos unidos cofactores metálicos antes de la translocación, desde su descubrimiento en *E. coli* (Berks *et al.* 1996; Bogsch *et al.* 1998). Al permitir la translocación de oxidorreductasas que contienen cofactores, el sistema Tat es necesario para la secreción de proteínas involucradas en una multitud de vías redoxs (Natale

et al., 2008). Sin embargo, el ensamblaje de cofactores no es la única razón para el transporte dependiente de Tat, puesto que se han encontrado diversos sustratos Tat que carecen de cofactores. Particularmente se conocen un conjunto de sustratos Tat de procariotas como *Rhodobacter*, *Streptomyces* o archaeas halofílicas que incluyen una alta proporción de proteínas libres de cofactores (Molik *et al.*, 2001; Widdick, *et al.*, 2006; Natale *et al.*, 2008).

Se desconocen las razones específicas por las cuales los sustratos Tat que no requieren plegamiento en el citoplasma sean dirigidos a esta vía. Las dos principales hipótesis proponen lo siguiente: que estas proteínas pueden plegarse demasiado rápido dentro del citoplasma para ser compatibles con la vía Sec o que ciertas proteínas tienen que plegarse antes de la exportación porque no pueden alcanzar su estado biológicamente activo fuera de la célula. Por ejemplo, la proteína verde fluorescente (GFP) se puede translocar a través de las vías Sec y Tat, pero solo es fluorescente en el periplasma cuando se exporta por la vía Tat (Lee, *et al.*, 2006).

La translocación de proteínas por vía Tat (Fig. 9), comienza desde la síntesis de una proteína con un péptido señal Tat. Para su reconocimiento dicha proteína debe encontrarse plegada y usualmente es modificada (adición de un cofactor) o se oligomeriza previamente (Rodrigue *et al.*, 1999; Palmer *et al.*, 2012). En los tilacoides se ha encontrado que el reconocimiento de proteínas plegadas no es tan estricto y permite la secreción de algunas proteínas que aún no adquieren su estructura final (Hynds *et al.*, 1999). El péptido señal del sustrato es reconocido por TatC, proteína transmembrana que se encuentra formando un complejo con TatB. En respuesta a la unión con el sustrato, TatBC interacciona con TatA, mientras que TatB es el intermediario para el paso del péptido entre TatC y TatA (Frain *et al.*, 2019a). Para iniciar la translocación se desencadena la activación del motivo dependiente de fuerza protón motriz de TatA y esta se oligomeriza para formar una translocasa activa (Berks *et al.*, 2012). El mecanismo de translocación es aún discutido. Por un lado, se encuentra el modelo que teoriza la formación de un poro/canal para el paso de la proteína. Mientras que, por el otro lado, hay datos que favorecen a un modelo de desestabilización membranal (Brüser & Sanders, 2003; Frain *et al.*, 2019a; Gohlke *et al.*, 2005). Ya que la proteína fue exportada, el péptido señal es removido por acción de una peptidasa señal para que la proteína madure completamente. Una vez finalizada la exportación, TatA es desensamblado del complejo TatBC (Alcock *et al.*, 2013, Goosens *et al.*, 2014).

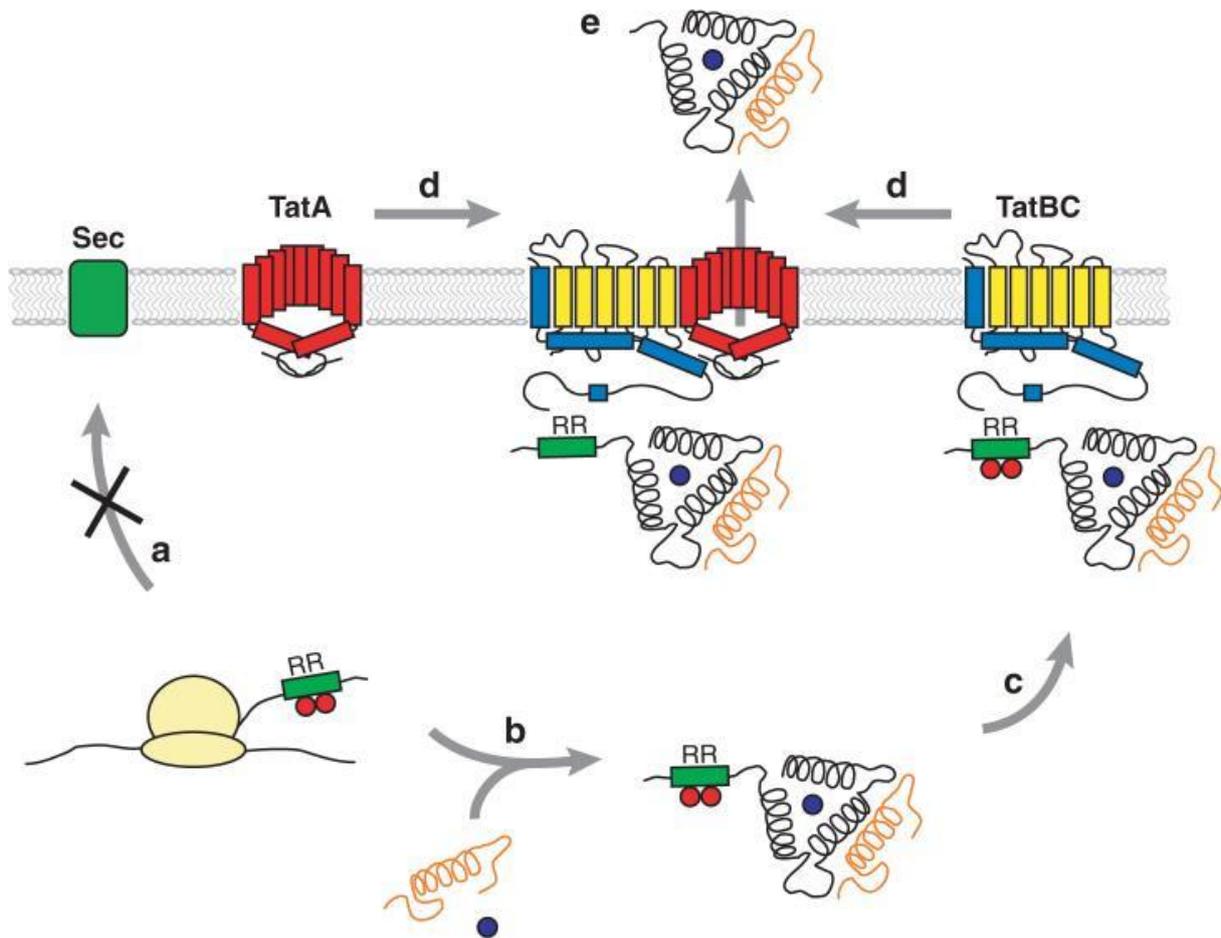


Figura 9. Sistema de secreción de proteínas Tat. En la membrana citoplásmica, TatA está representada en rojo, TatB en azul y TatC en amarillo. (a) Al emerger del ribosoma, la preproteína debe evitar dirigirse a otras vías como Sec. Esto ocurre debido a las características del péptido señal, como lo es el motivo que contiene las dos argininas (RR), la proteína madura y/o la unión de chaperonas específicas de Tat (círculos rojos). (b) Después del plegado, se añaden los cofactores y/o subunidades adicionales. (c) Posteriormente la proteína es reconocida por el complejo receptor TatBC. (d) La fuerza protón-motriz impulsa la formación de una translocasa activa formada por el reclutamiento de los protómeros de TatA para trasladar la proteína a través de la membrana citoplásmica. (e) Tras la eliminación del péptido señal, por acción de una peptidasa señal, la proteína madura se libera en el lado periplásmico de la membrana (Tomado de Lee *et al.*, 2006).

5. 5. Particularidades de la secreción en *Streptomyces*

La principal vía para secreción de proteínas en los estreptomicetos es la vía secretora general, Sec (Anné *et al.*, 2014). En *S. lividans* se predice que alrededor de 8% de su proteoma corresponde a proteínas secretadas por Sec, mientras que dentro de su secretoma representa $\approx 78\%$ (Tsolis *et al.*, 2018). En *S. lividans* se han identificado en el genoma los componentes

de la maquinaria de secreción Sec: SecF y SecD y YidC. También se han identificado involucradas con el mecanismo cotraduccional: SRP y FtsY. Además, se ha demostrado experimentalmente la secreción co-traduccional como la post-traduccional (Cruz-Morales *et al.*, 2013; Palacin *et al.*, 2003; Anné *et al.*, 2014).

La longitud promedio de un péptido señal de proteínas dependientes de Sec en los estreptomicetos es mayor que en otras bacterias Gram positivas, siendo de 32-35 aminoácidos. Los aminoácidos adicionales en las especies de *Streptomyces* se encuentran en la región N-terminal del péptido señal y, a menudo, tienen carga positiva (Gilbert *et al.*, 1995; Nielsen, *et al.*, 1997; Anné *et al.*, 2014).

En los estreptomicetos el sistema de secreción Tat tiene gran relevancia al ser una vía que exporta un amplio rango de proteínas, mucho mayor que en otras bacterias como *E. coli*. Tsolis *et al.* (2018) proponen que 157 proteínas son sustratos para la secreción por el sistema Tat predican en *S. lividans*. Además, mencionan que 32 de las proteínas predichas fueron previamente descritas experimentalmente como sustratos Tat en otras cepas de *Streptomyces*. Esto representaría alrededor del 21% del secretoma de *S. lividans* (Hwang *et al.*, 2021).

El primer sustrato Tat que se determinó experimentalmente fue la tirosinasa MelC2 de *Streptomyces antibioticus* en *S. lividans*, cabe destacar que el péptido señal de esta tirosinasa no es predicho como un sustrato Tat (Leu, *et al.*, 1992; Schaerlaekens *et al.*, 2001). Los análisis bioinformáticos del genoma de *Streptomyces coelicolor* con una versión modificada del programa TATFIND 1.2 revelaron 230 sustratos del sistema Tat putativos, siendo *S. coelicolor* el organismo que presenta la mayor cantidad de proteínas que podrían ser secretadas por este sistema. Cabe resaltar que la mayoría de las proteínas secretadas por Tat en *S. coelicolor* no son modificadas por cofactores (Schaerlaekens *et al.*, 2004).

En *S. coelicolor* se demostró experimentalmente que al menos 27 de las proteínas exportadas al exterior de la membrana celular son inequívocamente sustratos del sistema Tat. Además, estudios *in silico* en conjunto con ensayos experimentales en geles 2D y Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT) proyectaron 43 proteínas que son secretadas como sustratos Tat (Widdick *et al.*, 2006).

Se han identificado los componentes estructurales del sistema de secreción de TAT en *S. coelicolor*, particularmente, se identificaron dos copias funcionales de TatA y una de TatB y TatC (Schaerlaekens *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2016). Estudios en *S. coelicolor* de fusión a proteínas fluorescentes mostraron que los componentes de Tat son muy dinámicos y que con frecuencia se asocian con las puntas del micelio vegetativo. Esto sugiere que uno de los principales sitios de secreción de proteínas por la vía de Tat está en o cerca de la punta de las hifas (Anné *et al.*, 2014; Willemse *et al.*, 2012).

Para la secreción de proteínas heterólogas, en *Streptomyces*, la vía Sec es la ruta de exportación más explotada y la más importante en cuestión a su rendimiento. Varias proteínas se producen en cantidades industrialmente viables. Además, se reconoce que el rendimiento es generalmente superior respecto al de Tat (Hamed *et al.*, 2018; Hwang *et al.*, 2021). Ejemplo de esto es el rendimiento al producir estreptoquinasa de *Streptococcus equisimilis* en *S. lividans*, el cual fue 30 veces mayor cuando se utilizó la vía Sec (Kim *et al.*, 2010).

El uso de la vía Tat para la producción heteróloga de proteínas, puede ser ventajoso sobre la ruta Sec, ya que el plegamiento citoplasmático es crucial para la actividad de algunas proteínas. No obstante, cabe resaltar que, la eficiencia de secreción puede depender en gran medida de la estructura de la proteína (Weiner *et al.*, 1998; Feilmeier *et al.*, 2000; Tomás *et al.*, 2001; Fisher *et al.*, 2008). El rendimiento en la producción de proteínas secretadas por Tat es, en general, sustancialmente menor respecto a Sec; esto debido principalmente a que las proteínas, al sobreexpresarse, pueden quedarse atrapadas en el citoplasma (DeLisa *et al.*, 2004). Los estudios de Barrett *et al.*, 2003 y Gullon *et al.*, 2015 muestran que el sistema de exportación de Tat se satura fácilmente cuando las proteínas son sobre expresadas.

Por otro lado, si bien los péptidos señal nativos son generalmente funcionales para la secreción de proteínas heterólogas en los estreptomicetos; se ha observado que la optimización de los péptidos señal mejora la producción y secreción de proteínas en términos tanto de la proporción de secreción como del rendimiento del producto (Snajder *et al.*, 2019). Por ejemplo, se aumentó la producción de Xyle, la catecol 2,3-dioxigenasa, de *Pseudomonas putida* en *S. rimosus*, al utilizar el péptido señal de lipasa de *S. rimosus*; o la producción optimizada del factor de necrosis tumoral α de ratón (mTNF- α) en *S. venezuelae* a partir de la variación de carga en el péptido señal de α -amilasa (Carrillo *et al.*, 2018; Lammertyn *et al.*, 1998).

Antecedentes

La tuberculosis es una enfermedad respiratoria, provocada por la bacteria *M. tuberculosis*, que en la actualidad se posiciona como la segunda enfermedad infecciosa que más muertes causa a nivel mundial. Las medidas sanitarias actuales no son suficientemente eficaces para el control de la enfermedad en la población, mientras que la creciente aparición de cepas multiresistentes dificulta el tratamiento con antibióticos. Por lo tanto, la búsqueda de alternativas para su control es una prioridad; particularmente se ha propuesto la elaboración de una nueva vacuna con proteínas recombinantes. En este ámbito se han evaluado diversas proteínas de *M. tuberculosis* que tienen un efecto inmunogénico importante durante la infección, destacando la proteína APA.

APA (Alanine and proline-rich antigen), es una glicoproteína nativa de *M. tuberculosis*, que se secreta al medio. Se ha reportado como una adhesina que interactúa con receptores de lectina (Kumar, *et al.* 2003). Se ha demostrado el efecto inmunogénico dominante de APA *in vivo* en animales inmunizados, su interacción con células T humanas y se ha desarrollado una vacuna de DNA contra la tuberculosis en cobayos (Horn, *et al.* 1999; Romain, *et al.* 1999; Kumar, *et al.* 2003). Particularmente se ha observado que la manosilación de APA es indispensable para la respuesta inmune mediada por células T y que variaciones en el patrón de manosilación tiene un efecto sobre su eficiencia como antígeno (Horn, *et al.* 1999; Mehaffy *et al.*, 2019).

Sin embargo, debido a los obstáculos que presenta purificar APA nativa de las micobacterias, y a la necesidad de la elaboración de una vacuna recombinante contra la tuberculosis, se ha optado por la producción heteróloga en un hospedero eficiente en la secreción de proteínas heterólogas; como lo son las bacterias del género *Streptomyces* (Morosoli R, *et al.* 1997; Anné, *et al.*, 2012).

Las bacterias del género *Streptomyces* han sido un buen hospedero para la producción heteróloga de proteínas. Inclusive se ha demostrado que funcionan como una alternativa

viable en la producción de proteínas modificadas. Los estreptomicetos destacan frente a otros modelos procariontes al presentar diversas ventajas prácticas como la eficiencia de secreción antes mencionada, el plegamiento correcto de las proteínas, la solubilidad de las proteínas y maquinaria para modificaciones postraduccionales (Lara, *et al.*, 2004; Anné, *et al.*, 2012).

Respecto a la expresión heteróloga de APA en *Streptomyces* cabe mencionar el trabajo de Lara *et al.*, (2004) donde se expresó el gen Rv1860 (APA) de *M. tuberculosis* en *S. lividans* y se observó que la proteína fue eficientemente exportada al medio, se glicosiló e indujo la respuesta de anticuerpos en suero humano de pacientes con tuberculosis, demostrando que *S. lividans* es un modelo útil para la expresión y estudio de esta proteína. Desde entonces, este modelo biológico, ha sido ampliamente usado para evaluar distintos métodos para la optimización de la producción de APA o para estudiar los mecanismos moleculares de glicosilación de las bacterias (Vallin *et al.*, 2006; Gamboa-Suasnavart 2011; Córdova-Dávalos, *et al.* 2014; Marín-Palacio, *et al.*, 2014; Gamboa-Suasnavart *et al.*, 2019).

Por otro lado, no solo es importante el estudio de la proteína APA, sino también el de su péptido señal. Para superar el reto que implica purificar la mayoría las glicoproteínas de *M. tuberculosis*, que son lipoproteínas ancladas a la membrana, se ha propuesto sustituir su péptido señal por el de proteínas que se liberen al medio. Ejemplo de esto es que a las lipoproteínas MPT83 y LpqH de *M. tuberculosis* se les sustituyó su péptido señal original por el de la lipasa extracelular de *Streptomyces exfoliatus* para facilitar su purificación (Torres-Rodríguez, 2012; Arista, 2013).

En este contexto destaca el potencial del péptido señal de APA como herramienta para la secreción de lipoproteínas; pues como se ha mencionado APA se distingue por ser de las pocas glicoproteínas, nativas de *M. tuberculosis*, secretadas al medio. De hecho, Aguilar, (2015) sustituyó el péptido señal de las lipoproteínas de LpqH y MPT83 por el de APA: ambas proteínas fueron directamente secretadas al sobrenadante, demostrando que el péptido señal de la proteína APA es suficiente para que LpqH y MPT83 sean exportadaa al medio y se glicosilen.

Se ha hecho hincapié en que APA, al ser una proteína que se secreta al medio, posee un péptido señal y debe ser reconocida por alguno de los principales sistemas de exportación de proteínas: la vía secretora general (Sec), donde las proteínas se translocan a través del canal

SecYEG en su estructura primaria para posteriormente plegarse en el exterior de la célula, o la vía Tat, que transloca proteínas plegadas hacia el citoplasma (Frain *et al.*., 2019a). Si bien, la conformación de APA y su péptido señal ha sido ampliamente caracterizada (Kuo, *et. al.* 2019). La identidad de esta proteína como un sustrato de tipo Sec o de tipo Tat es aún incierta.

Se ha determinado experimentalmente que, en *E. coli*, APA es un sustrato del sistema de secreción Tat (Marrichi *et al.*, 2008). En contraparte, de acuerdo a Kapopoulou A., *et al.*, 2011, la predicción del péptido señal de APA corresponde a un sustrato Sec. Además, se ha propuesto que la glicosilación en *M. tuberculosis* se encuentra ligada a la maquinaria de secreción Sec (VanderVen *et al.*, 2005); no obstante, hay evidencia de que en *Streptomyces* la glicosilación no está necesariamente ligada a la maquinaria Sec (Keenan, 2016). Al analizar el péptido señal de APA con el programa de predicción PRED-TAT (2010), este aparentemente corresponde a un péptido Tat; mientras que el programa TatP (2005) lo reconoció como un sustrato Sec (Aguilar, 2015). Particularmente en el género *Streptomyces* los ensayos empíricos tampoco han sido concluyentes (Aguilar E. 2015).

Justificación

Puesto que la efectividad de los tratamientos actuales para el control de la tuberculosis en la población es insuficiente, es prioritario el estudio de moléculas con potencial como herramientas terapéuticas; como lo es la del antígeno inmunodominante APA de *M. tuberculosis*.

Se ha demostrado la capacidad de APA para inducir una respuesta inmunogénica en humanos, tanto para la proteína obtenida de su hospedero silvestre, así como al ser expresada de manera heteróloga en *Streptomyces*. En especial es de importancia el uso de hospederos como *S. lividans* o *S. coelicolor* por las ventajas metodológicas de su cultivo y eficiencia en la secreción de proteínas heterólogas, pues esto facilitaría los estudios para la caracterización molecular y bioquímica de APA y posible uso como vacuna.

Por otro lado, se ha propuesto el péptido señal de APA como una herramienta para secretar diversas glicolipoproteínas de *M. tuberculosis* de interés terapéutico. Esto se debe a que la purificación de estas glicolipoproteínas, al ser lipoproteínas se anclan a la membrana, representa un gran obstáculo metodológico. APA, en contraparte, se distingue por ser una glicoproteína que se secreta directamente al medio; por lo tanto, la sustitución del péptido señal nativo, de una glicolipoproteína, por el de APA puede permitir su secreción, su glicosilación y optimizar su purificación. Se ha comprobado la eficacia de este procedimiento en la secreción y glicosilación de las proteínas recombinantes MPT83 y LpqH en *S. lividans*.

El papel de APA como antígeno inmunodominante o como herramienta para la purificación de lipoproteínas es de gran importancia. Sin embargo, hay incertidumbre respecto a cuál es el sistema de secreción que reconoce y transloca a esta proteína en *Streptomyces*, puesto que los ensayos experimentales no han sido concluyentes (Aguilar E. 2015).

El saber cuál es el sistema de secreción por el cual es reconocida y secretada APA no solo implica cambios en cuanto al proceso y la maquinaria celular que se involucra en la secreción de esta proteína, sino que además puede implicar diferencias en el rendimiento de las proteínas recombinantes y la capacidad de llevar a la proteína recombinante a la maquinaria

de glicosilación, siendo que este puede ser diferente según la naturaleza de plegamiento de la proteína.

La naturaleza ambivalente del péptido señal de APA podría posibilitar su reconocimiento por ambos sistemas de secreción, hecho que no ha sido puesto a prueba. De ser el caso, también podría ponerse a prueba si posee un péptido señal que muestre un claro motivo Sec o Tat, respectivamente, modifica el comportamiento de su secreción.

Objetivos

Generales

- Determinar si la glicoproteína APA silvestre es reconocida y secretada a través del sistema Sec, el sistema Tat, o por ambos, en *Streptomyces*.
- Modificar el péptido señal de la proteína APA para dirigir su secreción exclusivamente hacia el sistema Sec o hacia el sistema Tat y evaluar si los cambios realizados alteran la capacidad de secreción y/o la glicosilación de la proteína madura, en cepas silvestres y mutantes $\Delta tatAC$ y Δpmt , de *Streptomyces*.

Particulares

- Diseñar mutantes del péptido señal de la proteína APA silvestre, con base a programas de predicción, de tal manera que sean, por un lado, un sustrato Sec típico, y, por otro lado, uno Tat.
- Modificar, mediante mutagénesis dirigida, el péptido señal de la proteína APA.
- Expresar de manera heteróloga la proteína APA con el péptido señal silvestre, así como con los péptidos señales mutantes, en la cepa silvestre de *Streptomyces*, en una mutante carente de sistema Tat ($\Delta tatAC$) y en una mutante afectada en la capacidad de glicosilación (Δpmt).
- Determinar si cambios puntuales en el péptido señal de la proteína APA pueden redirigir la secreción de la proteína, alterar la cantidad de proteína secretada y su glicosilación, en *Streptomyces*.

Hipótesis

En caso de que la proteína APA sea un sustrato del sistema de secreción Tat, esta será incapaz de secretarse en la cepa IB78 ($\Delta tatAC$) de *S. coelicolor*; mientras que, si es reconocida por el sistema Sec, su secreción no se verá afectada en esta cepa.

Por otro lado, el modificar el péptido señal de esta proteína en sitios específicos será suficiente para dirigir su secreción hacia un sistema de secreción distinto al sistema de secreción que reconoce al motivo silvestre.

La glicosilación de APA será dependiente del sistema de secreción por el cual sea translocada, por lo que se podrán detectar diferencias entre las variantes cuya secreción este dirigida hacia Sec o hacia Tat, respectivamente.

Material y Métodos

Medios de cultivo

- LB:

Bactotripton	1.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl	1.0 g

*Aforar a 100 ml con agua Mili-Q.

- YT2X:

Bactotripton	1.6 g
Extracto de levadura	1.0 g
NaCl	0.5 g

*Aforar a 100 ml con agua Mili-Q.

- R2:

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

*Aforar a 80 ml con agua Mili-Q.

- R2YE:

R2	80 ml
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 ml
Trazas R5*	0.2 ml
CuSO ₄	0.2 ml
NaOH (1 N)	0.2 ml
Extracto de levadura (10%)	5.0 ml

* Trazas R5:

ZnCl ₂	4.0 mg
FeCl ₃ -6H ₂ O	20.0 mg
CuCl ₂ -2H ₂ O	1.0 mg
MnCl ₂ -4H ₂ O	1.0 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ -10H ₂ O	1.0 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ -4H ₂ O	1.0 mg
Agua Mili-Q	100 ml

- YEME:

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

*Aforar a 100 ml con agua Mili-Q.

- MS:

Manitol	2.0g
Harina de soya	2.0g
Agar	0.2g

*Aforar a 100 ml con agua Mili-Q.

- DNA:

<i>Difco Nutrient Broth Powder</i>	0.4g
Agar	1.0g

*Aforar a 100 ml con agua Mili-Q.

Buffers

- TE 10 mM, pH=8

Tris	10 mM
EDTA	0.1 mM

- TE 25 mM, pH=8

Tris	25mM
EDTA	0.25 mM

- Buffer P:

Sacarosa	51.5 g
MgCl ₂ -6H ₂ O	1.01 g
KS ₂ O ₄	0.125 g

Aforar a 400 ml con agua Mili-Q.

- Buffer de transferencia:

Tris base	3.0 g
Glicina	14.0 g
Metanol	200 ml

*Aforar a 1 L con agua Mili-Q.

- Buffer TBS:

Tris base	6.05 g
NaCl	8.76g

Aforar a 1 L con agua Mili-Q y ajustar el pH=7.5.

Soluciones de desteñido

- Solución de desteñido I:

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

- Solución de desteñido II:

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

Cepas y plásmidos

En el presente trabajo se usaron diferentes cepas de la bacteria *Escherichia coli* para la manipulación del DNA plasmídico. Por otra parte, se usaron distintas cepas de *Streptomyces*, principalmente para la expresión de proteínas. A continuación, se enlistan las cepas utilizadas:

Tabla 1. Cepas

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5 α	Derivada de la cepa DH1. <i>deoR</i> $\Delta(lacZYAargF)U169$ $\phi 80dlacZ\Delta M15$ <i>recA1</i> <i>endA1</i> .	Grant, <i>et al.</i> , 1990.
IBEC58	Derivada de la cepa BW25113. Δdam Δdcm Δhsd . Esta cepa no metila el DNA.	González-Cerón <i>et al.</i> , 2009.
<i>S. lividans</i>		
1326	Cepa silvestre	Kieser <i>et al.</i> , 2000
Δpmt	Cepa derivada de 1326 con una mutación nula en el gen que codifica la manosil transferasa de proteínas ($\Delta sli3509$) Incapaz de glicosilar proteínas.	Arista, I, 2013
<i>S. coelicolor</i>		
M145	Cepa silvestre	John Innes Centre
IB78	Cepa derivada de M145 con una mutación nula que elimina los genes del sistema Tat ($\Delta tatAC$)	Aguilar, 2015

Asimismo, se usaron diferentes plásmidos para la clonación, secuenciación y expresión de las proteínas relevantes de este estudio. A continuación, se presentan los plásmidos empleados en este trabajo:

Tabla 2. Plásmidos

Plásmido	Descripción	Referencia
pBlueScript II SK	Vector de clonación multicopia para <i>E. coli</i> . Sitio de clonación múltiple. Resistencia a la ampicilina (Ap).	Short, <i>et al.</i> , 1988
pBlueScript II SK+ APA6H	Plásmido derivado del pBlueScript II SK que contiene al gen Rv1860 con una etiqueta de seis histidinas en el C-terminal.	Este trabajo
pBlueScript II SK+ APA6H ^{SEC}	Plásmido derivado del pBlueScript II SK que contiene al gen Rv1860 con una modificación en el péptido señal para secretar APA por la vía Sec y con una etiqueta de seis histidinas en el C-terminal.	Este trabajo
pBlueScript II SK+ APA6H ^{TAT}	Plásmido derivado del pBlueScript II SK que contiene al gen Rv1860 con una modificación en el péptido señal para secretar APA por la vía Tat y con una etiqueta de seis histidinas en el C-terminal.	Este trabajo
pIJ6021	Vector de expresión multicopia para <i>Streptomyces</i> spp. Promotor P _{tipA} inducible con tioestreptona. Resistencia a la kanamicina	Takano, <i>et al.</i> , 1995
pIJ6021+ APA6H	Plásmido pIJ6021 con el gen Rv1860 modificado para expresar APA y contiene una etiqueta de histidinas.	Aguilar, 2015
pIJ6021+ APA6H ^{TAT}	Plásmido derivado del pIJ6021 que contiene al gen Rv1860 con una modificación en el péptido señal para secretar APA por la vía Tat y con etiqueta de seis histidinas en el C-terminal.	Este trabajo
pIJ6021+ APA6H ^{SEC}	Plásmido derivado del pIJ6021 que contiene al gen Rv1860 con una modificación en el péptido señal para secretar APA por la vía Sec y con etiqueta de seis histidinas en el C-terminal.	Este trabajo

Servidores de predicción de péptido señal

Para el análisis bioinformático para predecir el tipo de péptido señal de APA o las variantes diseñadas en este estudio, se hizo uso de tres servidores web públicos.

TatP1.0 (Bendtsen *et al.*, 2005; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>):

El servidor de predicción TatP1.0 usa un método que es capaz de discriminar péptidos señal Tat de proteínas citoplasmáticas que llevan un motivo similar, así como de péptidos señal Sec, con alta precisión. El método permite el filtrado de secuencias de entrada basadas en expresiones regulares de sintaxis de Perl, mientras que la discriminación por hidrofobicidad de los péptidos de señal Tat y Sec se lleva a cabo mediante una red neuronal artificial (Bendtsen *et al.*, 2005).

PRED-TAT (Pantelis *et al.*, 2012; <http://www.compgen.org/tools/PRED-TAT/>):

El servidor PRED-TAT permite predecir y discriminar entre los péptidos señal Sec de los péptidos señal Tat y predecir sus sitios de escisión. El método de predicción se basa en modelos ocultos de Markov y posee una arquitectura modular. El HMM, como método de *machine learning*, es capaz de detectar las preferencias generales de los péptidos señal Tat que discriminan a partir de péptidos señal Sec, como la región n más larga, el motivo RR y la región h menos hidrófoba (Pantelis *et al.*, 2012).

SignalP - 5.0. (Almagro *et al.*, 2019; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>):

El servidor SignalP 5.0 predice la presencia de péptidos señal y la ubicación de sus sitios de escisión en proteínas de Archaea, Bacteria y Eukarya. Su método se basa en una red neuronal recurrente y convolucional profunda que incluye un campo aleatorio condicional. En Bacteria y Archaea, SignalP 5.0 puede discriminar entre tres tipos de péptidos señal: 1) Sec/SPI: péptidos señal secretados transportados por el translocón Sec y escindidos por la péptidasa señal I. 2) Sec/SPII: péptidos señal de lipoproteínas transportados por el translocón Sec y escindidos por péptidasa señal II. 3) Tat/SPI: péptidos señal Tat transportados por el translocón Tat y escindidos por la péptidasa señal I (Almagro *et al.*, 2019).

Construcciones génicas

Para este estudio se realizaron 2 construcciones originales a partir del gen Rv1860 de *M. tuberculosis*, unido a una etiqueta de seis histidinas:

1.- APA6H^{SEC}: MHQVDPNLTRPKGRLAALAIAMASASLVTVAVPATANA

En esta construcción se sustituyó en la región que codifica para el péptido señal de la proteína APA la arginina de la posición 11 por una prolina.

2.- APA6H^{TAT}: MHQVDPNLTRRKFLLAALAIAMASASLVTVAVPATANA

En esta construcción se sustituyó en la región que codifica para el péptido señal de la proteína APA la glicina de la posición 13 por una fenilalanina y la arginina de la posición 14 por una leucina.

Estas sustituciones de aminoácidos en el péptido señal se realizaron como se describe a continuación.

Mutagénesis dirigida en el gen Rv1860

Primeramente, fue necesario obtener un plásmido para *E. coli* que contuviese al gen Rv1860 silvestre de *M. tuberculosis*. El gen se obtuvo a partir del plásmido pIJ6021+ APA6H (Aguilar, 2015), el cual se cortó con las enzimas de restricción NdeI y HindIII para separar el gen del vector y posteriormente se purificó el gen en un gel de agarosa LMP al 0.8% (ver anexos). Una vez purificado el fragmento de DNA, se ligó al vector pBlueScript II SK; así se obtuvo el plásmido pBlueScript II SK+ APA6H.

Se usó este plásmido para transformar *E. coli* DH5 α que se plaqueó en medio LB con apramicina. A partir de las colonias aisladas se realizaron Midipreps para purificar el DNA plasmídico.

Para la modificación del péptido señal de APA se optó por realizar el protocolo de mutagénesis dirigida QuikChange (Agilent Technologies, Inc. 2015). Se usó el plásmido

pBlueScript II SK+ APA6H (metilado) como molde y se diseñaron oligonucleótidos que introdujeron los cambios puntuales deseados en el péptido señal de APA y funcionaron como cebadores para la reacción de la polimerasa. A continuación, se enlistan los oligonucleótidos usados.

Tabla 3. Descripción de los oligonucleótidos empleados.

Oligonucleótido	Descripción	Secuencia (5' → 3')
SECFOR	Oligonucleótido usado para introducir la mutación R11P, en la secuencia correspondiente del péptido señal de APA, mediante mutagénesis dirigida por QuikChange y de esta manera promover su secreción por el sistema Sec.	GGACCCCAAC TTGACACGGC CCAAGGGACG ATTGGCGGC
SECREV	Oligonucleótido complementario a SECFOR, se usó para introducir la mutación R11P, en la secuencia correspondiente al péptido señal de APA, mediante mutagénesis dirigida por QuikChange y de esta manera promover su secreción por el sistema Sec.	GCCGCCAATC GTCCCTTGGG CCGTGTCAAG TTGGGGTCC
TATFOR	Oligonucleótido usado para introducir las mutaciones G13F y R14L, en la secuencia correspondiente al péptido señal de APA, mediante mutagénesis dirigida por QuikChange y de esta manera promover su secreción por el sistema Tat.	ACTTGACACG TCGCAAGTTC CTGTTGGCGG CACTGGCTAT CGC
TATREV	Oligonucleótido complementario a TATFOR, se usó para introducir las mutaciones G13F y R14L, en la secuencia correspondiente al péptido señal de APA, mediante mutagénesis dirigida por QuikChange y de esta manera promover su secreción por el sistema Tat.	ACTTGACACG TCGCAAGTTC CTGTTGGCGG CACTGGCTAT CGC

Se realizaron dos reacciones de QuikChange; la primera para obtener la construcción pBlueScript II SK + APA^{TAT} y la segunda para obtener pBlueScript II SK + APA^{SEC}. En paralelo se pusieron otras dos sin la enzima polimerasa Pfu Ultra como control negativo. Al finalizar los ciclos de extensión e incorporación de las mutaciones al gen., se incubaron las reacciones con la enzima DpnI para degradar el molde que posee las mutaciones.

Posteriormente se sometió el DNA obtenido a electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, para corroborar si la reacción había sido exitosa. Las reacciones exitosas se usaron para transformar por electroporación a *E. coli* DH5. Se purificó el plásmido de varias colonias

aisladas por medio de Minipreps (Anexo 5.). Para corroborar la presencia de la construcción en las colonias transformantes, se digirió el plásmido obtenido con las enzimas de restricción NdeI y se observó el patrón de restricción. Los plásmidos que mostraron un patrón correcto se mandaron a secuenciar en la unidad de secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (Anexo 2).

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

Dado que *Streptomyces* posee un sistema muy específico de restricción de DNA metilado, fue preciso utilizar la cepa de *E. coli* IBEC58. La cepa IBEC58 fue transformada por electroporación con los siguientes plásmidos:

- pBlueScript II SK + APA^{TAT}
- pBlueScript II SK + APA^{SEC}

Se plaquearon las transformantes en medio LB y se les adicionó el antibiótico correspondiente. Se tomaron colonias aisladas hicieron minipreparaciones para purificar los plásmidos no metilados. Se comprobó por restricción que el plásmido estuviera correcto. Se cultivaron de 100 ml de las colonias que habían tenido un patrón de restricción correcto y por medio de midipreparación se purificó el plásmido.

Se digirieron los plásmidos purificados con la enzima de restricción NdeI y se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.0% para comprobar que el plásmido estuviera linearizado. A esta misma digestión se le adicionó la endonucleasa EcoRI con la que se separó el gen completo del vector. Las muestras de DNA digerido se sometieron a electroforesis en gel de agarosa LMP 0.8% para purificar las bandas con los genes que contenían los extremos cohesivos.

A su vez se digirió el vector de expresión multicopia pIJ6021 con las mismas enzimas, NdeI y EcoRI; de tal manera que se linearizó y se obtuvieron extremos cohesivos correspondientes a los de los genes modificados.

Al final se llevó a cabo la ligación entre el vector linearizado y los fragmentos purificados. Obteniendo los siguientes plásmidos:

- pIJ6021+ APA^{TAT}
- pIJ6021+ APA^{SEC}

Los dos plásmidos anteriores, así como el plásmido pIJ6021+ APA6H (Aguilar, 2015), fueron introducidos, mediante transformación de protoplastos, a la cepa *S. lividans* 1326 (Anexo.5). Los protoplastos se plaquearon en medio R2 y se incubaron durante dieciséis horas, posteriormente se les adicionó kanamicina a las cajas y las transformantes se dejaron esporular por una semana.

Se tomaron colonias transformantes aisladas y se plaquearon en medio MS adicionado con extracto de levadura 0.1% y se incubaron hasta que esporularan. Las esporas se cosecharon adicionando agua y raspando la superficie de la paca y se filtraron haciéndolas pasar a travez de un filtro para esporas de algodón esteril, para eliminar el micelio. Posteriormente se crecieron en medio líquido LB + sacarosa 25%. Con los cultivos anteriores se realizaron minipreparaciones para obtener los plásmidos (Anexo 5.). EL plasmido purificado se cortó con la enzima de restricción KpnI para corroborar si las colonias presentaban el patrón de restricción correspondiente. El plásmido purificado que mostró un patrón de purificación correcto se mandó a secuenciar en la unidad de secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (Anexo 3).

Obtención de cepas transformates de *Streptomyces*

Una vez corroborada la secuencia de los plásmidos, estos se usaron para transformar, por medio de protoplastos, a *S. lividans* 1326, *S. lividans* Δpmt ($\Delta sli3509$), *S. coelicolor* M145 y a *S. coelicolor* IB78 ($\Delta tatAC$) (Anexo 5.). Las esporas de las cepas sin trasformar se cultivaron en medio YEME + sacarosa 25% para las cepas silvestres y YEME + sacarosa 12% para las sepas mutantes. Se tomaron colonias transformantes aisladas, se machacaron, se resuspendieron en agua y se plaquearon en cajas de Petri con medio MS suplementado con extracto de levadura 0.1% (extracto de levadura 0.1% y elementos traza 0.04% para cepa IB78). Los tapetes bacterianos confluentes resultantes de la retransformación se incubaron a

30°C hasta que esporularon. Se cosecharon las esporas, se filtraron y se concentraron por centrifugación a 3500 rpm por 10 min, se lavaron con agua y se resuspendieron en glicerol al 20% para ser almacenadas a -20°C.

Se obtuvieron un total de 12 cepas distintas: tres cepas derivadas de cada una de las cepas antes mencionadas. Las transformadas con el plásmido pIJ6021+APA6H, con pIJ6021+APA^{TAT} y con pIJ6021+APA^{SEC}, respectivamente.

Prueba de infección por fago KC519

Se prepararon cajas de Petri con medio DNA suplementado con glucosa 0.5%. Ca(NO₃)₂ 10 mM y MgSO₄ 10mM. En estas cajas se plaquearon esporas de *S. lividans* 1326, *S. lividans* Δpmt, *S. lividans* Δpmt + APA6H, *S. lividans* Δpmt + APA^{TAT} y *S. lividans* Δpmt + APA^{SEC}. A continuación, se adicionaron en dos regiones distintas de cada caja de Petri 10 μl de dos lisados diferentes de fago KC519. Las cajas se incubaron durante una noche a 30 °C.

Expresión y purificación de proteínas de sobrenadante

Se midió la absorbancia de las esporas almacenadas y se calculó la cantidad suficiente de esporas para obtener en 30 ml una densidad óptica de 0.1 al momento de la inoculación. A continuación se inocularon en medio LB + sacarosa 25% (sacarosa 12% para las cepas IB78 y ΔPmt) en matraces provistos de un resorte de acero inoxidable en el fondo (para evitar la agregación de los pellets de micelio) con 30 ml de medio LB + sacarosa 25% con 50 μg/ml de kanamicina. Los cultivos se mantuvieron en agitación constante a una temperatura de 30°C. Se indujo la expresión de APA a las 14 horas por medio de la adición de tioestreptón (5 μg/ml). Los cultivos se incubaron por 24 horas a partir de la inducción.

A las 36 horas se colocaron los matraces en hielo. Se filtraron los cultivos utilizando primeramente papel filtro, en segundo lugar, un filtro Whatman de 0.125 mm y por último un filtro Millipore de 0.045 μm; colectando el sobrenadante en un matraz Kitasato conectado a una línea de vacío. De esta forma se obtuvo un sobrenadante libre de fragmentos pequeños de micelio.

Las proteínas del sobrenadante se precipitaron por medio de metanol/cloroformo. Al sobrenadante (3ml) se le adicionaron 4 volúmenes de metanol, 1 volumen de cloroformo y 3 volúmenes de agua. Una vez precipitadas las proteínas se centrifugaron a 13000 rpm por 10 min formando dos fases. A continuación, se retiró la fase superior, se añadieron 3 volúmenes más de metanol y se centrifugó 13000 rpm por 8 minutos para retirar por completo la fase acuosa. Se recolectó la fase sólida en un tubo *Eppendorf* y se dejó evaporar por 15 minutos, a temperatura ambiente, para eliminar todo el metanol, posteriormente se resuspendió en 200 μ l de buffer de carga 2x (2-betamercaptoetanol 10%, Tris-HCl [pH 6.8] 0.125 M, SDS 4%, glicerol 20%). Las muestras fueron hervidas por 5 min y almacenadas a -20°C.

En el caso de las cepas IB78, el cultivo se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C para conservar el micelio, este posterior a la centrifugación se lavó cuatro veces con 100 mL de Tris-Cl 20mM [pH 8.0] y se almacenó a -70°C por 24 horas. El micelio congelado se resuspendió en buffer de lisis (MgCl₂ 1 M, DTT 4mM, media pastilla inhibidora de proteasas [cOmplete de Roche], 0.5 μ l de RNAsa y Tris 20 mM). Posteriormente se lisó por medio de sonicación. El lisado se centrifugó a 10,000 rpm durante una hora a 4°C. Se conservó el sobrenadante (extracto total). El extracto total se separó 150 μ l por tubo y se le añadió 50 μ l de buffer de carga 2x. Finalmente las muestras se hirvieron por 5 minutos y se almacenaron a -20 °C.

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), tinción con azul de Coomassie

Las muestras obtenidas del sobrenadante o del extracto total se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Los geles se hicieron a una concentración de poliacrilamida del 10% y se corrieron a 100 mV. Se usó el marcador de peso BioRad® de 10-250kDa. Los geles se utilizaron para teñirse, o para transferir las proteínas a membranas de PVDF.

Para visualizar las proteínas en los geles se realizó una tinción con azul brillante de Coomassie R-250. Se incubaron los geles en solución de tinción coomassie, en agitación, durante una noche. Posteriormente se destiñó durante 1 hora en solución de desteñido I y a continuación una hora más en solución de desteñido II.

Western blot: Detección con anticuerpos y con ConA

El primer paso para efectuar los ensayos de Western blot fue transferir las proteínas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Esto se efectuó en una en una cámara húmeda de BIO RAD por 16 horas a 12 mA en buffer de Tris-Glicina (14 g de glicina, 3 g de Tris, 200 ml de metanol y 800 ml de agua, pH 8) en agitación constante. Terminada la transferencia se lavó la membrana en el mismo buffer Tris-Glicina. Para eliminar toda la humedad de la membrana se sumergió en metanol absoluto, se dejó evaporar el metanol y se almacenaron las membranas.

Para los ensayos de Western-blot con anticuerpos, las membranas se bloquearon durante 3 horas con TBS 1x-Tween 20 al 0.05% con leche sin grasa 5.0% a temperatura ambiente. Posteriormente fueron agregados los anticuerpos primarios, Anti-His o 6A3 (ambos de ratón), en dilución 1:1000 en TBS 1x-Tween 20 al 0.05% con leche sin grasa 5.0% por 16 hrs en agitación constante a 4°C. A continuación, se realizaron 4 lavados, el primero de 5 minutos con agua desionizada y los restantes de 10 minutos con TBS-Tween20. Posteriormente se agregó el anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón unido a peróxidasa, a una dilución de 1:1000 en el mismo buffer de TBS-Tween 20 con leche sin grasa, se incubó durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. La membrana fue lavada con TBS-Tween 20 tres veces y fue revelada con el kit de quimioluminiscencia ROCHE.

Por el otro lado, para los ensayos de Western blot en los que la detección se realizó con la lectina ConA, la cual es una molecula que se une de manra especifica a los carbohidratos, las membranas se bloquearon por 1 hora con TBS 1X con albumina fracción V al 1.0%. A continuación, se incubaron por 16 horas con ConA (Sigma) a una dilución de 1:1000 en TBS con 1mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂ y 1 mM de MnCl₂, en agitación a temperatura ambiente. Cumplido el tiempo, se realizaron tres lavados de 10 minutos en agitación con TBS 1X a temperatura ambiente.

Tanto para la detección por anticuerpos como por ConA, se reveló por quimioluminiscencia haciendo uso del kit de quimioluminiscencia ROCHE.

Purificación de APA por columna de afinidad a Níquel

Para la purificación de la proteína APA se inocularon esporas de *S. lividans* 1326 + APA6H en 50 ml de medio LB + 25% de sacarosa, de tal manera que se alcanzara una DO₄₅₀ de 0.1. Las condiciones cultivo, inducción y filtrado se realizó de la forma descrita previamente (ver Expresión y purificación de proteínas de sobrenadante).

El sobrenadante obtenido se aforó a 100 ml con agua desionizada. Posteriormente se disolvió sulfato de amonio lentamente hasta alcanzar el 80% de saturación y se mantuvo en agitación constante por una hora a 4°C. En seguida se centrifugó por una hora a 14,000 rpm y 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las proteínas precipitadas en un volumen mínimo de agua desionizada. Las proteínas disueltas se filtraron a travez de un filtro Millipore de 0.45 µm. La muestra se desaló utilizando una columna HiTrap Desalting (GE Healthcare) conectada a un equipo de FPLC (Äkta Pure Prime) utilizando el mismo buffer que se utiliza para unir a la columna de Ni (NaH₂PO₄ 50 mM NaCl 300 mM Imidazol 20 mM [pH 8]).

Una vez que se desaló la muestra, esta se pasó a través de una columna HisTrap de 1 ml (GE Healthcare) previamente equilibrada con buffer de lavado (NaH₂PO₄ 50 mM NaCl 300 mM Imidazol 20 mM [pH 8]). Después de lavar con 20 volúmenes de buffer la muestra se eluyó con un gradiente lineal de imidazol de 20 ml hasta alcanzar una concentración de 250 mM colectando fracciones de 1 ml. Se detectó un pico en la absorbancia correspondiente a las fracciones 10 a 12 las cuales se colectaron. Finalmente, se adicionó buffer de carga a las fracciones colectadas y se almacenaron a -20°C.

Resultados

Predicción de la vía de secreción utilizada por la proteína APA

A pesar de que experimentalmente se ha demostrado que en *E. coli* el péptido señal de la proteína APA es sustrato de la vía de secreción Tat, un análisis bioinformático del mismo muestra que carece de un motivo conservado para las proteínas secretadas por este sistema (Anexo 1).

De hecho, al hacer uso del servidor SignalP 5.0 (Almagro *et al.*, 2019) para analizar el péptido señal de APA la predicción mostró un porcentaje de similitud (Likelihood), de 57.66% para Sec y 40.32% para Tat. Por otro lado, el servidor TatP 1.0 (Bendtsen *et al.*, 2005) reconoció en la secuencia de APA un posible péptido señal para Tat pero no encontró un motivo Tat. Además, el servidor PRED-TAT (Pantelis *et al.*, 2012) predijo, con un valor de fiabilidad de 0.436, que APA posee un péptido señal Tat. Los resultados de los análisis de predicción computacional, así como los experimentos *in vivo* en *Streptomyces* (Aguilar, 2015), fueron en ambos casos ambiguos respecto al tipo de péptido señal de APA.

Usando como referencia las características típicas de los motivos Sec y Tat, se diseñaron variantes del péptido señal de APA que presentasen cambios puntuales. Las variantes se analizaron con el programa SignalP 5.0 y PRED-TAT. Todos los péptidos señal diseñados se compararon los resultados arrojados por los programas y se seleccionaron aquellos que mostraron una mayor puntuación ya sea para Sec o para Tat.

Como potencial péptido señal Tat se seleccionó APA G13F, R14L, en el cual se sustituyó la glicina de la posición 13 por fenilalanina y la arginina de la posición 14 por leucina, presentó un puntaje de certeza en SignalP 5.0 de 93.38% para Tat y 5.52% para Sec, mientras que en PRED TAT se predijo que es un péptido señal del tipo Tat con un valor de fiabilidad del 0.997. En ambos análisis APA G13F, R14L mostró los puntajes más altos como potencial péptido señal Tat.

Se seleccionó como potencial péptido señal Sec APA R11P, en el cual se sustituyó la prolina de la posición 11 por arginina, y presentó un puntaje de certeza en SignalP 5.0 de 84.68% para Sec y un puntaje de 13.97% para Tat, mientras que en PRED TAT se predijo que es un

péptido señal del tipo Sec con un valor de fiabilidad del 0.992. En ambos análisis APA P11R mostró los puntajes más altos como potencial péptido señal Sec. Como control se analizaron los péptidos señal de la agarasa extracelular DagA, que es un sustrato Tat típico y los de las lipasas de *S. coelicolor* y *S. exfoliatus*, que son sustratos Sec típicos. (Tabla 3; Tabla 4).

Tabla 4. Predicción del tipo de péptido señal obtenido del servidor SignalP 5.0, para las distintas versiones del péptido señal de la proteína APA, la agarasa y las lipasas de *S. coelicolor* y *S. exfoliatus*.

PÉPTIDO SEÑAL	Puntaje de certeza		SECUENCIA
	Péptido señal Sec (Sec/SPI)	Péptido señal Tat (Tat/SPI)	
APA WT	57.66%	40.32%	MHQVDPNLTRRKGRLLAALAIAMASASLTVAVPATANA
APA G13F	37.42%	59.92%	MHQVDPNLTRRKFRLLAALAIAMASASLTVAVPATANA
APA R14L	21.76%	75.59%	MHQVDPNLTRRKGLLAALAIAMASASLTVAVPATANA
APA G13F, R14L	5.52%	93.38%	MHQVDPNLTRRKFLLAALAIAMASASLTVAVPATANA
APA R11G	82.02%	16.73%	MHQVDPNLTRGKGRLLAALAIAMASASLTVAVPATANA
APA T9A	64.88%	33.69%	MHQVDPNLARRKGRLLAALAIAMASASLTVAVPATANA
APA T9P	72.06%	26.27%	MHQVDPNLPRRKGRLLAALAIAMASASLTVAVPATANA
APA R11P	84.68%	13.97%	MHQVDPNLTRPKGRLLAALAIAMASASLTVAVPATANA
APA A35T	56.29%	41.40%	MHQVDPNLTRRKGRLLAALAIAMASASLTVAVPPTANA
APA A35G	54.70%	42.67%	MHQVDPNLTRRKGRLLAALAIAMASASLTVAVPGTANA
APA A35R	45.77%	51.86%	MHQVDPNLTRRKGRLLAALAIAMASASLTVAVPRTANA
AGARASA (<i>M. tuberculosis</i>)	2.03%	97.91%	MVNRRDLIKWSAVALGAGAG
LIPASA (<i>S. coelicolor</i>)	56.08%	43.61%	MQQNPHTHAAPGAARPVLRGVRRLAAVTAAVA
LIPASA (<i>S. exfoliatus</i>)	46.39%	52.96%	MPQHLLPARRQAARPSRPTLTGLLAAAATA

Tabla 5. Predicción del tipo de péptido señal obtenido del servidor PRED-TAT para las distintas versiones del péptido señal de la proteína APA.

PÉPTIDO SEÑAL	Sec	Tat	Valor de fiabilidad	SECUENCIA
APA WT		X	0.436	MHQVDPNLTRRKGRLAALAIAAMASASLTVAVPATANA
APA G13F		X	0.989	MHQVDPNLTRRKFRLAALAIAAMASASLTVAVPATANA
APA R14L		X	0.98	MHQVDPNLTRRKGLLAALAIAAMASASLTVAVPATANA
APA G13F, R14L		X	0.997	MHQVDPNLTRRKFLLAALAIAAMASASLTVAVPATANA
APA R11G	X		0.989	MHQVDPNLTRGKGRLAALAIAAMASASLTVAVPATANA
APA T9A	X		0.967	MHQVDPNLARRKGRLAALAIAAMASASLTVAVPATANA
APA T9P	X		0.0989	MHQVDPNLPRRKGRLAALAIAAMASASLTVAVPATANA
APA R11P	X		0.992	MHQVDPNLTRPKGRLAALAIAAMASASLTVAVPATANA
APA A35T		X	0.434	MHQVDPNLTRRKGRLAALAIAAMASASLTVAVPPTANA
APA A35G		X	0.435	MHQVDPNLTRRKGRLAALAIAAMASASLTVAVPGTANA
APA A35R		X	0.439	MHQVDPNLTRRKGRLAALAIAAMASASLTVAVPRTANA

Mutagénesis dirigida

Con el fin de probar las variantes seleccionadas, que teóricamente serían versiones de APA exclusivamente reconocidas y secretadas por la vía Sec o para la vía Tat, se optó por usar el protocolo de mutagénesis dirigida QuikChange (Agilent Technologies, Inc. 2015).

Para obtener la variante Sec (APA6H^{SEC}) con la mutación que ocasiona el cambio R11P en el péptido señal, se diseñaron los oligonucleótidos complementarios SECFOR, y SECREV para amplificar el vector pBlueScript II SK con el gen de APA con una etiqueta de seis histidinas en el extremo carboxilo clonado. Este plásmido se deriva de la ligación del vector pBlueScript II SK y el gen APA+6H obtenido del plásmido PIJ6021+APA6H (Aguilar,

2015). Las mutaciones fueron introducidas en los oligonucleótidos SECFOR y su complementario SECREV que poseen dos nucleótidos distintos al gen original (Tabla 3).

En el caso de la variante Tat (APA6H^{TAT}), para introducir las mutaciones que ocasionan los cambios G13F R14L, se diseñaron los oligonucleótidos TATFOR, y su complementario TATREV para amplificar el vector pBlueScript II SK con el gen de APA (Rv1860) clonado. Las mutaciones fueron introducidas en los oligonucleótidos TATFOR y su complementario TATREV que poseen cinco nucleótidos distintos al gen original (Tabla 3).

Los productos de las reacciones de QuikChange se incubaron con la enzima DpnI, que reconoce y degrada el DNA metilado, con el fin de degradar el DNA añadido como molde para la síntesis. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.0% en la que se corrieron los productos digeridos de las reacciones QuikChange, así como el de las reacciones control a las que no se le añadió la polimerasa Pfu Ultra (Fig10).

En el gel de agarosa es posible observar las bandas correspondientes a pBlueScript II SK + APA6H^{TAT} y a pBlueScript II SK + APA6H^{SEC}. Ambas bandas son del tamaño esperado, es decir del tamaño de pBlueScript II SK +APA6H (3945 pb), lo cual confirma que la amplificación fue exitosa. Por el otro lado, en los carriles donde se cargo el producto de la reacción sin la polimerasa, no se observa ninguna banda lo cual nos indica que el material genético molde fue digerido por la enzima DpnI y que las bandas que se observan son el resultado de la actividad de la polimerasa.

Las construcciones obtenidas a partir de el procedimiento de mutagénesis dirigida son:

- pBlueScript II SK + APA^{TAT}
- pBlueScript II SK + APA^{SEC}

Se usaron estas construcciones para transformar por electroporación *E. coli* DH5 α (Anexo 5.). Se purificó el plásmido de varias colonias transformantes aisladas. Para corroborar la presencia de las construcciones en las colonias transformantes, se digirieron los plásmidos obtenidos con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI (Figura 11). De la digestión se esperaron dos bandas, una que correspondiese al vector pBluescript II KS y otra

correspondiente al gen Rv1860 de 2943 pb y 1002 pb, respectivamente. El patrón de digestión mostró que únicamente una de las colonias de Tat perdió el gen de interés, mientras que el gen de una de las colonias de Sec presentó un tamaño anómalo.

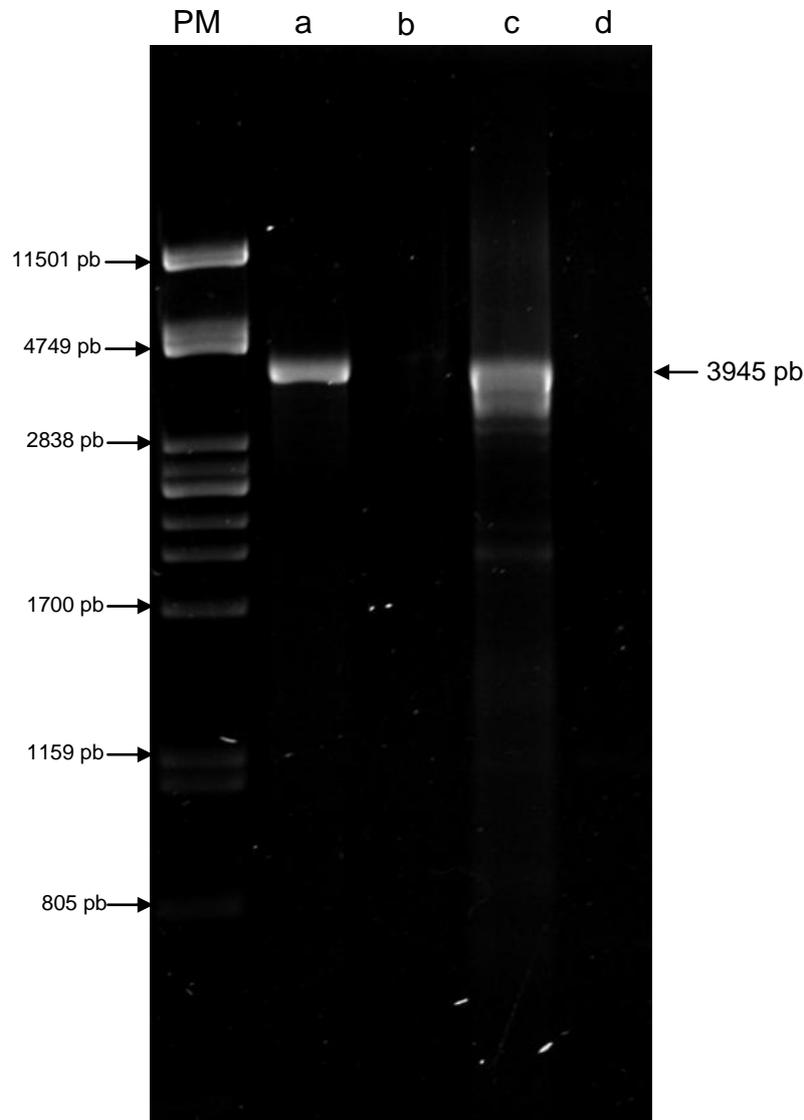


Figura 10. Modificación y amplificación del gen Rv1860 por QuikChange. PM) Marcador de peso molecular. a) pBluescript II KS + Rv1860-SEC. Producto de la reacción QuikChange a partir del pBluescript II KS + Rv1860 y los oligonucleótidos SECFOR y SECREV b) reacción control, producto de una reacción idéntica, pero sin incluir la DNA polimerasa Pfu Ultra. c) pBluescript II KS + Rv1860-TAT. Producto de la reacción QuikChange a partir del pBluescript II KS + Rv1860 y los oligobulcleótidos TATFOR y TATREV. Los productos de la reacción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 1.0%. Se cargó la quinta parte de la reacción total.

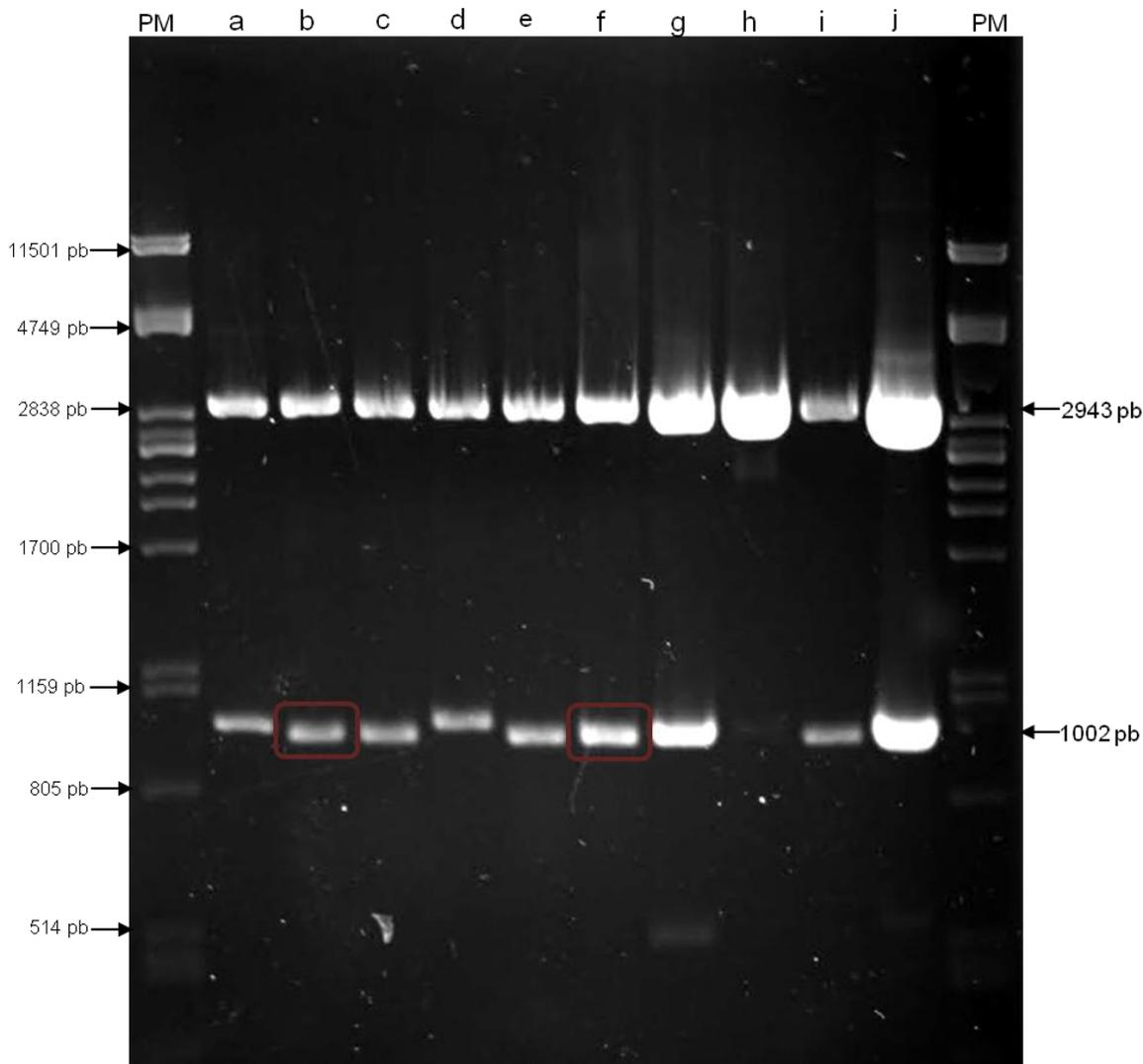


Figura 11. Minipreparaciones de DNA plasmídico de *E.coli* DH5 α . PM) Marcador de peso molecular. a) pBluescript II KS + Rv1860 purificado de *E.coli* DH5 α (metilado). b-e) pBluescript II KS + Rv1860- SEC f-i) pBluescript II KS + Rv1860- TAT j) pBluescript II KS + Rv1860 purificado de *E.coli* IBEC58 (no metilado). Se usó el DNA obtenido de la Miniprep SEC 1 (b) y de la Miniprep TAT 1 (f). Los plásmidos obtenidos se digirieron con BamHI y EcoRI para obtener dos fragmentos, uno de 2943 correspondiente al vector pBluescript II KS y otro del 1002 correspondiente al gen Rv1860.

Hasta este punto se tenía la certeza de que la reacción de Quick change fue exitosa y que los plasmidos obtenidos se logrador introducir a *E. coli*. Para comprobar que estos plasmidos tuviesen la secuencia mutante esperada se eligieron dos de las preparaciones purificadas para para posteriormente enviarse a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Los resultados corroboraron las secuencias esperadas para ambos plásmidos. En la figura 12 se indica la diferencia entre la secuencia del gen Rv1860 nativo y las variantes APA^{TAT} y APA^{SEC}, obtenidas en este trabajo.

- APA silvestre

```

1   ATGCATCAGGTGGACCCCAACTTGACACGTCGCAAGGGACGATTGGCGGCACTGGCTATC
1   M H Q V D P N L T R R K G R L A A L A I
61  GCGGCGATGGCCAGCGCCAGCCTGGTGACCGTTGCGGTGCCCGCGACCGCCAACGCCGAT
21  A A M A S A S L V T V A V P A T A N A D

```

- APA^{SEC}

```

1   ATGCATCAGGTGGACCCCAACTTGACACGGCCCAAGGGACGATTGGCGGCACTGGCTATC
1   M H Q V D P N L T R P K G R L A A L A I
61  GCGGCGATGGCCAGCGCCAGCCTGGTGACCGTTGCGGTGCCCGCGACCGCCAACGCCGAT
21  A A M A S A S L V T V A V P A T A N A D

```

- APA^{TAT}

```

1   ATGCATCAGGTGGACCCCAACTTGACACGTCGCAAGTTCCTGTTGGCGGCACTGGCTATC
1   M H Q V D P N L T R R K F L L A A L A I
61  GCGGCGATGGCCAGCGCCAGCCTGGTGACCGTTGCGGTGCCCGCGACCGCCAACGCCGAT
21  A A M A S A S L V T V A V P A T A N A D

```

Figura 12. Diferencias en la secuencia genética y de aminoácidos, del péptido señal de APA, APA^{SEC} y APA^{TAT}. Se encuentra resaltada en amarillo la secuencia correspondiente a los oligonucleótidos diseñados. Las sustituciones de nucleótidos y los cambios de aminoácidos para APA^{SEC} están señalados en rojo. Las sustituciones de nucleótidos y los cambios de aminoácidos para APA^{TAT} están señalados en morado.

Transformación en *E. coli* IBEC58

Dado que *S. coelicolor* posee un sistema de restricción que reconoce la metilación en el DNA y lo degrada, fue necesario el uso de la cepa de *E. coli* IBEC58 (Ver cepas y plásmidos), que tiene mutados sus sistemas de metilación de DNA, para obtener plásmidos no metilados. A partir de los plásmidos purificados de *E. coli* IBEC58, que se secuenciaron, se transformó por electroporación a *E. coli* IBEC58.

De las colonias aisladas se realizaron midipreps. Se purificaron los plásmidos no metilados. pBluescript II KS + APA^{TAT} y pBluescript II KS + APA^{SEC}.

Clonación en vector de expresión multicopia de *Streptomyces*

Con el fin de expresar la proteína APA en *Streptomyces* se eligió el vector de expresión multicopia pIJ6021 (Ver tabla de cepas)). El vector pIJ6021 se corto con las enzimas de restricción NdeI y EcoRI de tal manera que se linerizará el vector.

Por otro lado, para purificar el fragmento de DNA correspondiente a las versiones mutantes del gen Rv1860 se cortaron con las enzimas NdeI y EcoRI los plásmidos Bluescript II KS + APA^{TAT} y pBluescript II KS + APA^{SEC}(sin metilar).

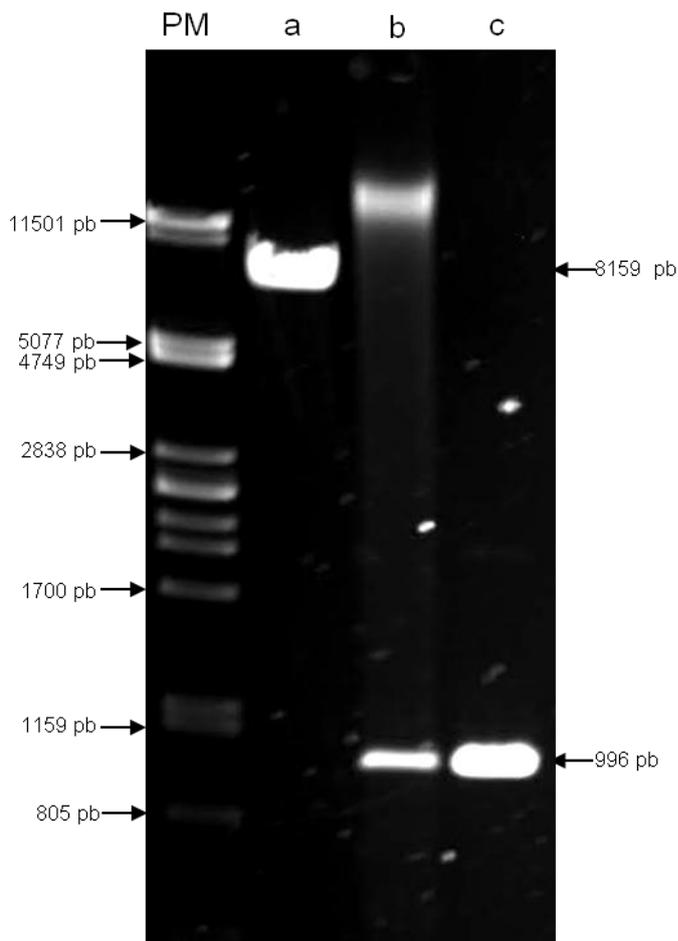


Figura 13. Digestión del pIJ6021 e insertos para ligación. PM) Marcador de peso molecular. a) pIJ6021 lineal b) APA^{TAT} c) APA^{SEC}. Los plásmidos obtenidos se digirieron con NdeI y EcoRI y fueron sotetidos a electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión 0.8%.

Para corroborar el tamaño de los fragmentos digeridos, así como para la purificación del vector linearizado, las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa LMP

0.8% (Fig.13). Se puede observar que el vector pIJ6021 tuvo el tamaño esperado 8159 pb. Los fragmentos correspondientes a APA^{SEC} y APA^{TAT} presentaron el peso correcto, 996 pb. En el carril dond  se corrió APA^{TAT}, se puede observar material genético que no fue digerido, sin embargo, debido a la diferencia de tamaños entre la banda que se purificó 996pb, y el material no digerido >1500pb, no fue un inconveniente para proceder con la purificación de la banda.

Una vez que se purificó el vector linearizado y los dos fragmentos de DNA que contienen los genes mutantes (Fig 13), se ligaron, obteniendo los siguientes plásmidos:

- pIJ6021+ APA^{TAT}
- pIJ6021+ APA^{SEC}

Ambos plásmidos, fueron introducidos en la cepa *S. lividans* 1326 por transformación de protoplastos (Anexo 5.). Para regenerar micelio, los protoplastos se sembraron en medio R2YE, el cual fue adicionado a las 12 horas con kanamicina y se dejaron crecer hasta que las colonias transformantes esporularan. Posteriormente se cosecharon.

Se purificó plásmido proveniente de las cepas transformantes mediante minipreps. El plasmido purificado se cortó con la enzima de restricción KpnI, la cual tiene dos sitios de corte, uno en el vector y otro dentro del gen. Se observaron los dos fragmentos resultantes esperados, de 656 pb y 2018 pb (Fig.14). Los plasmidos se enviaron a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular para su secuenciación y corroborar que las secuencias mutantes correspondieran con las esperadas.

Transformación en *S. lividans* Δ sli3509 y *S. coelicolor* M145 y IB78

Una vez confirmadas las secuencias de los plásmidos, se introdujeron mediante protoplastos a las siguientes cepas: *S. coelicolor* M145 (cepa silvestre), *S. coelicolor* IB78 (Δ tatAC) y *S. lividans* Δ pmt. La cepa *S. lividans* Δ sli3509 (Δ pmt) tiene una mutación nula en el gen que codifica la Pmt, y por lo tanto es incapaz de glicosilar proteínas, lo cual permitió tener un control negativo de la glicosilación de proteínas.

Por otra parte, la cepa *S. coelicolor* IB78, tiene deletados genes esenciales para el sistema Tat (*tatA* y *tatC*) y por lo tanto es fundamental para saber si la proteína es secretada por este sistema o en su defecto es secretada vía Sec.

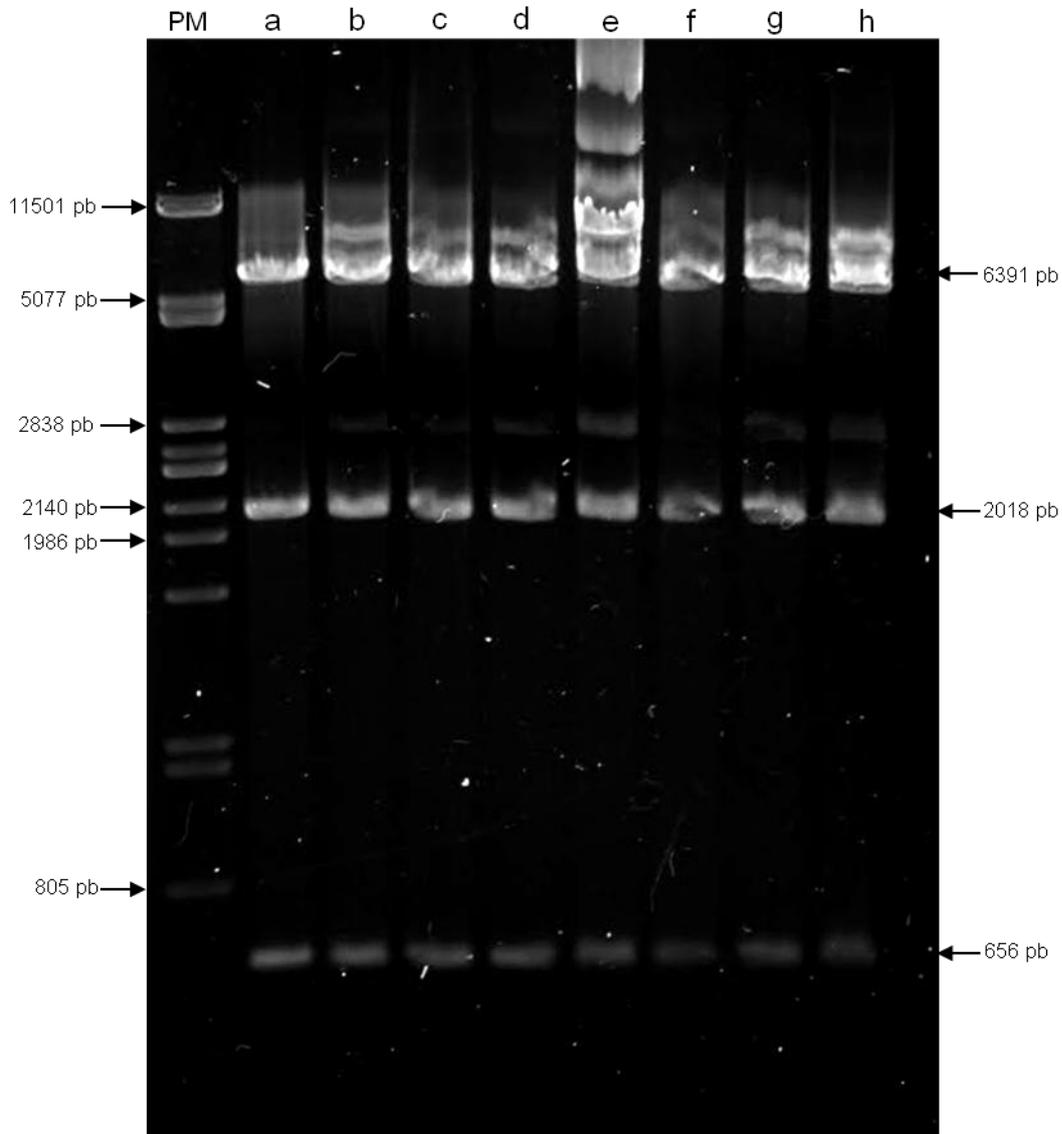


Figura 14. Minipreparaciones de DNA plasmídico de *S. lividans* 1326 mutantes. PM) Marcador de peso molecular. a-d) pIJ6021 +Rv1860-6H SEC. e-h) pIJ6021 +RV1860-6H TAT. Los plásmidos obtenidos se digirieron con KpnI para obtener dos fragmentos: uno de 2018 pb y otro de 656 pb.

Se obtuvieron las siguientes 12 cepas:

- *S. lividans* 1326 + APA^{6H}
- *S. lividans* 1326 + APA^{TAT}
- *S. lividans* 1326 + APA^{SEC}
- *S. coelicolor* M145 + APA^{6H}
- *S. coelicolor* M145 + APA^{TAT}
- *S. coelicolor* M145 + APA^{SEC}
- *S. lividans* Δpmt + APA^{6H}
- *S. lividans* Δpmt + APA^{TAT}
- *S. lividans* Δpmt + APA^{SEC}
- *S. coelicolor* IB78 + APA^{6H}
- *S. coelicolor* IB78 + APA^{TAT}
- *S. coelicolor* IB78 + APA^{SEC}

Se cosecharon esporas de cada una de las cepas y se conservaron en glicerol a -20°C.

Para corroborar que la cepa *S. lividans* Δpmt , que sería utilizada como control negativo, fuera efectivamente incapaz de glicosilar proteínas, se realizó una prueba de infección por el fago KC519, derivado del bacteriófago phiC31, el cual requiere de un receptor glicosilado para infectar. Se plaquearon esporas concentradas de *S. lividans* 1326, *S. lividans* Δpmt , *S. lividans* Δpmt + APA^{6H}, *S. lividans* Δpmt +APA^{TAT} y *S. lividans* Δpmt + APA^{SEC} de manera que crecieran en forma confluyente, y se les adicionaron dos gotas de fago, cada una proveniente de un lisado diferente de KC519. Después de un día de incubación solamente se observó la formación de placas de lisis en la cepa silvestre, pero no se formó ninguna placa de lisis en la cepa mutante por parte del fago; a diferencia de la cepa silvestre donde es evidente la formación de placas por la infección (Anexo 4).

Cultivo y extracción de proteínas del sobrenadante

Se inocularon esporas de cada una de las cepas de *Streptomyces*, de manera independiente, en 30 ml de medio LB en matraces con resorte, durante 14 hrs, a 30°C en agitación constante. Posteriormente, se indujo la expresión de APA con tioestreptón y se mantuvieron las condiciones de incubación. A las 36 hrs, a partir de la inoculación del cultivo, se procesó el sobrenadante de cada uno de los cultivos. Para el caso de los cultivos de la cepa IB78 también se procesó el micelio para obtener un extracto total. Se precipitaron las proteínas con metanol/clorofomo y posteriormente fueron resuspendidas en buffer de carga. Las proteínas se hirvieron durante 5 minutos y se conservaron a -20°C.

Para visualizar el contenido proteico del sobrenadante de los cultivos, se sometieron las muestras a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 10% y se tiñeron con azul de Coomassie (Fig. 15a; Fig. 16a). En estos geles se detecta la presencia de diversas proteínas y se observan bandas del tamaño esperado para APA. Se ajustó la cantidad de muestra que se cargó en cada carril a partir de la comparación visual de las muestras teñidas en los geles.

Detección de APA por Western blot

Para determinar si la proteína APA estaba siendo secretada, se realizaron experimentos de Western Blot de todas las muestras. Inicialmente se usó un anticuerpo comercial anti-histidinas (Anti-His) con la finalidad de detectar a la proteína APA a través de esta etiqueta colocada en todos los casos en el extremo carboxilo-terminal. En forma inesperada no se logró detectar la etiqueta de histidinas en todas las cepas. Se detectó la proteína APA a través de esta etiqueta en los sobrenadantes de la cepa *S. lividans* 1326, con una abundancia evidente en la cepa 1326 +APA^{TAT}. a comparación de *S. lividans* 1326 + APA^{SEC} y APA 6H en donde se detecta de forma muy reducida. En el caso de la cepa de *S. coelicolor* M145 solo se detectó en M145 + APA6H y M145 + APA^{TAT}, con varios productos de degradación visibles, mientras que en la cepa IB78, que no puede secretar proteínas por Tat, únicamente se detectó en IB78 + APA^{SEC}, donde son nuevamente notorias las formas degradadas de la proteína (Fig. 15b; Fig. 16b).

De estos resultados llama la atención que no se detectara la proteína en los sobrenadantes de la cepa *S. lividans* Δpmt ni de M145 + APA^{SEC}; puesto que no hay razones para pensar que APA no se hubiese expresado o secretado al medio, al no tener ninguna de las cepas mutaciones que afecten la secreción de proteínas. Lo anterior, aunado a la presencia de formas degradadas de la proteína APA, nos hizo pensar que la etiqueta de histidinas estaba siendo escindida por alguna proteasa presente en el sobrenadante. Debido a ello la detección usando Anti-His no nos permitiría llegar a conclusiones válidas respecto a la presencia de APA en el sobrenadante de los cultivos. En consecuencia, se optó por usar el anticuerpo monoclonal 6A3, el cual se une directamente a un epítipo dentro de APA y permite su detección aún en cepas de *S. coelicolor* carentes de las enzimas de glicosilación (Córdova-Dávalos *et al.* 2014).

Al realizar los ensayos de Western blot usando el anticuerpo 6A3 se detectó que APA estaba presente en el sobrenadante de todos los cultivos a excepción de IB78 + APA^{TAT} (Fig. 15c; Fig. 16c). Es decir que, como se esperaba, tanto en las cepas silvestres como en la mutante Δpmt , la proteína APA fue expresada y secretada al medio, mientras que la secreción se vio alterada en la cepa IB78. En esta cepa que no puede secretar proteínas por la vía Tat, la señal de APA^{6H} es claramente menor a la observada en las cepas silvestres, las mutantes Δpmt o a la de la cepa IB78 + APA^{SEC}, donde la señal es mucho más intensa. Al igual que lo observado al realizar los ensayos con el anticuerpo Anti-His, se observaron formas degradadas de la proteína en la mayoría de los sobrenadantes.

Era de particular interés realizar estos experimentos en sobrenadantes de la cepa mutante IB78 ($\Delta tatAC$). Se observó que en esta cepa la secreción de APA con el péptido señal silvestre se vio abatida, al igual que la secreción de APA con péptido señal TAT. Por el contrario, la secreción de la variante de APA con el péptido señal SEC no se vio afectada en esta cepa.

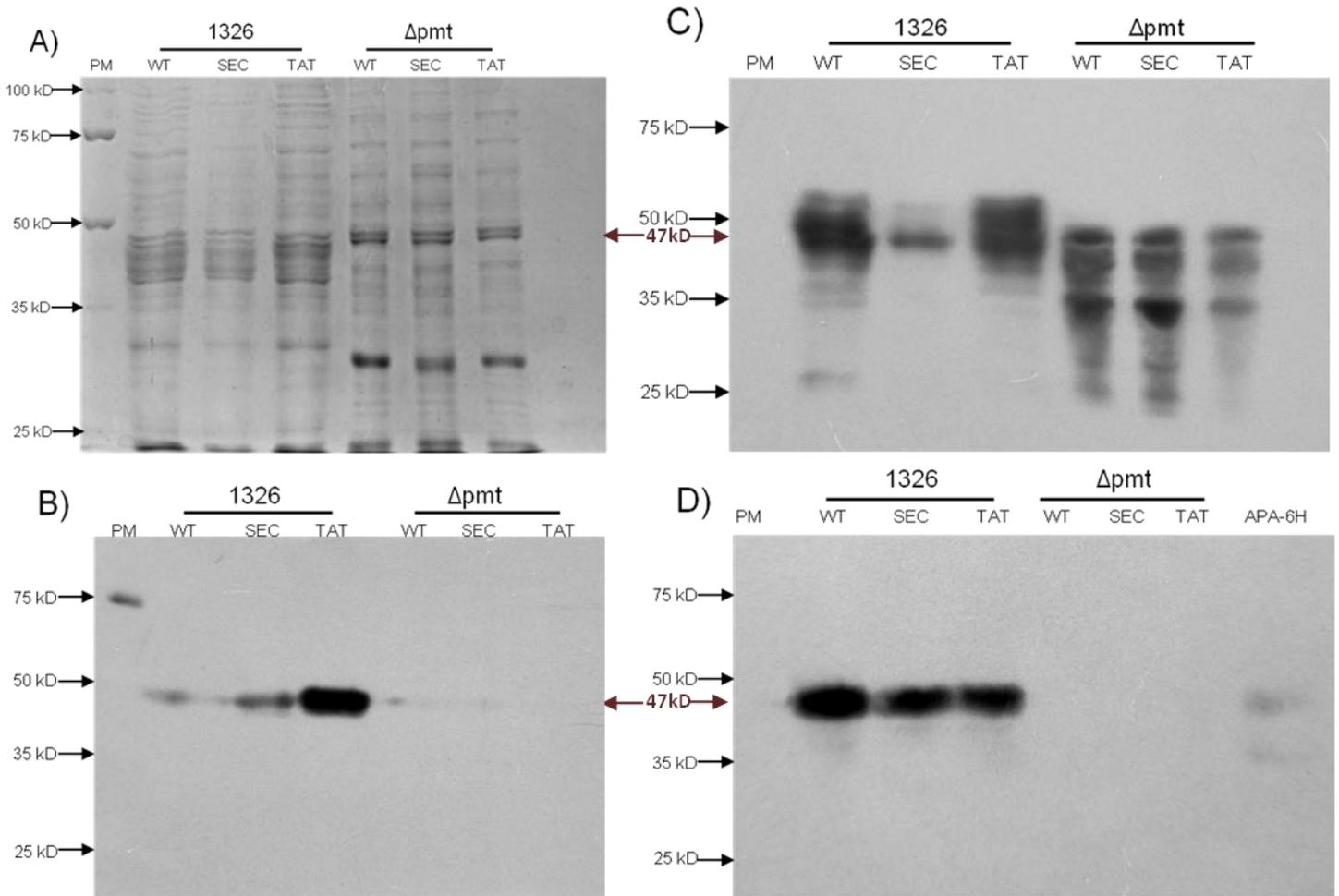


Fig. 15. Expresión y secreción de APA-6H (WT), APA^{SEC} y APA^{TAT}, en las cepas de *S. lividans* 1326 y Δpmt . A) Electroforesis en gel desnaturizante-SDS poliacrilamida (10%) de proteínas extraídas del sobrenadante. Tinción con azul de coomassie. B) Western Blot con anticuerpo Anti-His C) Western Blot con anticuerpo 6A3 (Anti-APA). D) Detección de las proteínas glicosiladas con concanavalina A (ConA). APA6-H= proteína APA purificada mediante FPLC. Se indujo la expresión de APA-6H en medio líquido con tioestreptón a las 14 hrs y las proteínas se precipitaron a las 36 hrs.

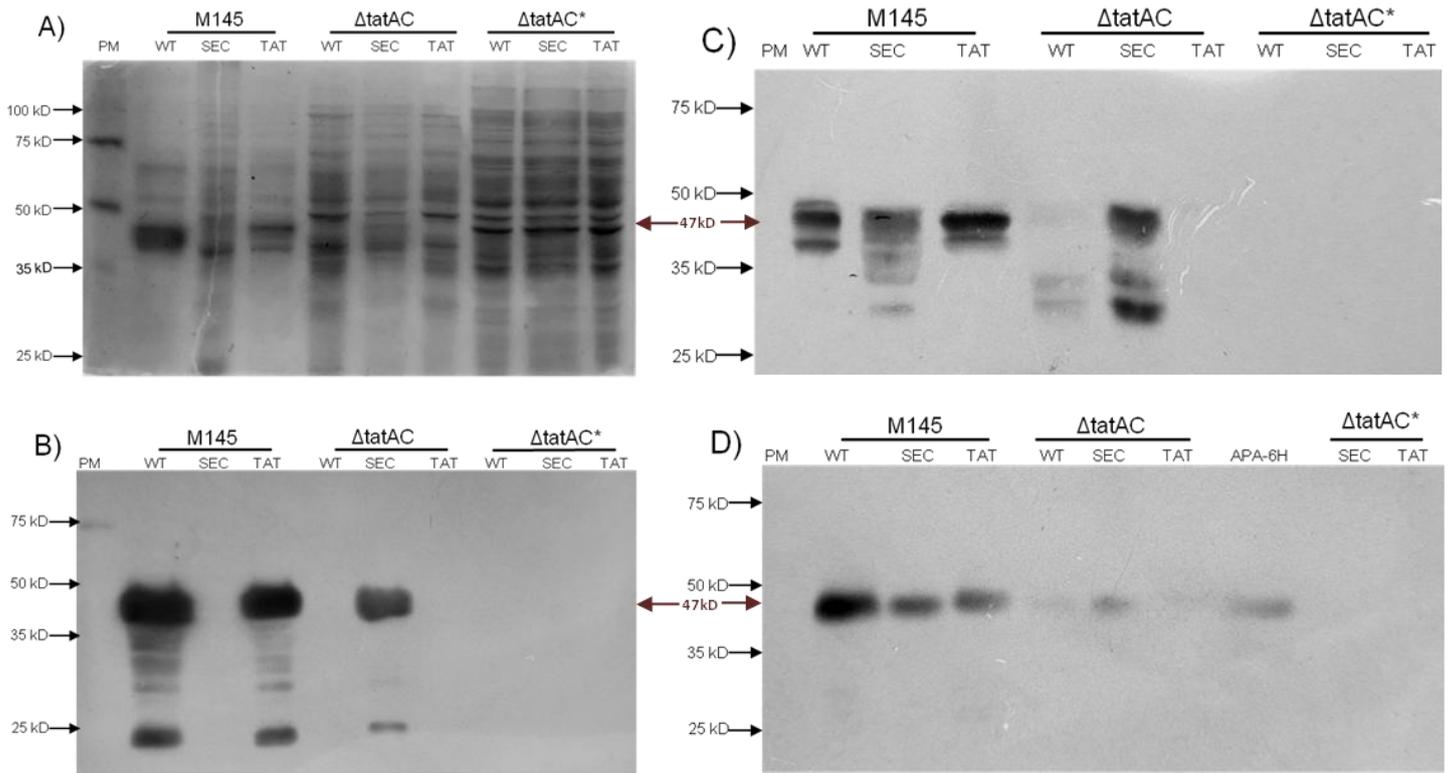


Fig. 16. Expresión y secreción de APA-6H (WT), APA^{SEC} y APA^{TAT}, en las cepas de *S. coelicolor* M145 e IB78 (Δ tatAC). A) Electroforesis en gel desnaturalizante-SDS poliacrilamida (10%) de proteínas extraídas del sobrenadante. Tinción con azul de coomassie. B) Western Blot con anticuerpo Anti-His C) Western Blot con anticuerpo 6A3 (Anti-APA). D) Detección de las proteínas glicosiladas con concanavalina A (ConA). APA6-H= proteína APA purificada mediante FPLC. *Proteínas obtenidas del extracto total del cultivo de la cepa IB78. Se indujo la expresión de APA-6H en medio líquido con tioestreptón a las 14 hrs y las proteínas se precipitaron a las 36 hrs.

Glicosilación de APA

Como se observó en las pruebas de detección con el anticuerpo 6A3, la proteína APA de las construcciones APA^{SEC} y APA^{TAT} fue secretada de forma distinta. Dado que estudios previos han demostrado la importancia de la glicosilación de esta proteína para que active la respuesta inmune, era de particular interés determinar si las diferencias en la forma de secreción alteraban la capacidad de la maquinaria molecular de los estreptomicetos para glicosilar esta proteína.

Para ello se hizo uso de concanavalina A (ConA), una lectina que se enlaza de manera específica a los carbohidratos, unida a peroxidasa para detectar la glicosilación de las proteínas del sobrenadante.

Antes de realizar los ensayos de Western Blot con ConA, se purificó la proteína APA a partir de la cepa *S. lividans* 1326 + APA6H, para tener un control positivo y evitar confundir la señal de otras proteínas glicosiladas por las cepas con la de la proteína APA. La purificación se realizó mediante FPLC empleando una columna de afinidad a Ni (Fig. 17).

La proteína purificada se corrió junto con las muestras para realizar los ensayos de detección con ConA. Estos ensayos mostraron que las tres construcciones, APA6H, APA^{TAT} y APA^{SEC}, expresan una proteína que es glicosilada por la maquinaria de glicosilación de *Streptomyces* (Fig. 15d; Fig. 16d); pues se observó la glicosilación de APA en las cepas silvestres *S. lividans* 1326 y *S. coelicolor* M145. Cabe mencionar que en la cepa IB78, donde la proteína APA es secretada por la vía Sec, la glicosilación se detecta de manera reducida. En cambio, como se esperaba, no se detectó a la proteína APA glicosilada en la cepa *S. lividans* Δ *pmt*, lo cual nos sirvió como control negativo.

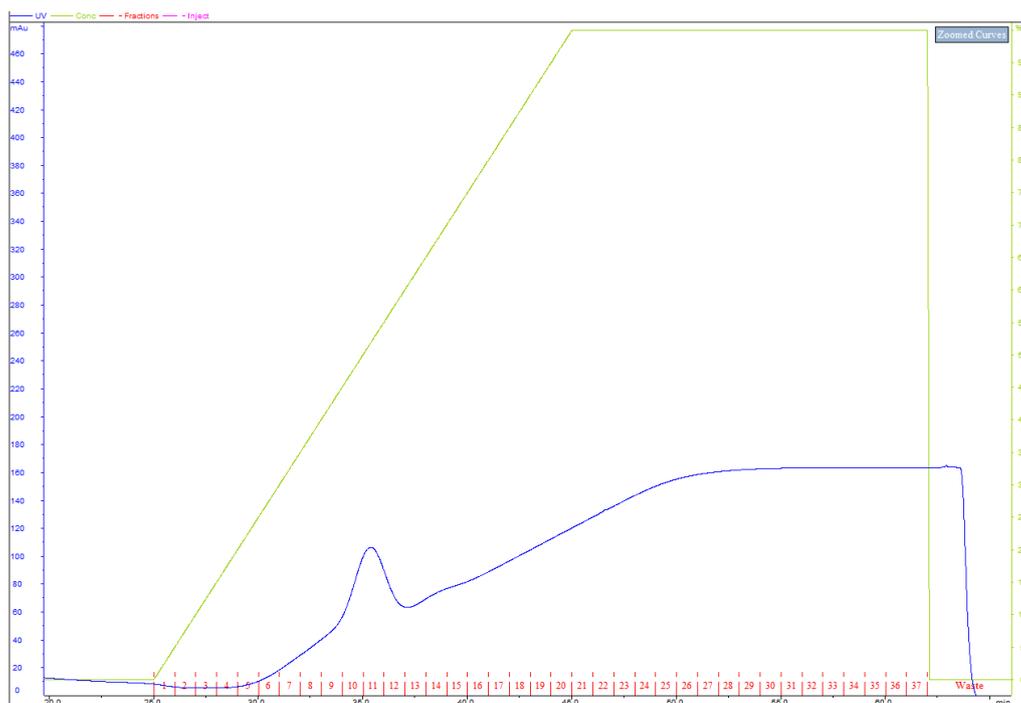


Fig. 17. Purificación de proteína APA6H. Curva de absorbancia a 280 nm durante la elución de la proteína APA mediante una columna de afinidad de Ni-NTA). Gradiente de concentración de imidazol (100% corresponde a una concentración de 250 mM) (verde). El pico en la absorbancia (fracciones 10 -12) corresponde a la elución de la proteína APA.

Discusión

La proteína APA es un antígeno inmunodominante que presenta características que la distinguen frente a la mayoría de glicoproteínas de *M. tuberculosis*, siendo el principal factor el hecho de secretarse directamente al medio, en lugar de permanecer anclada a la membrana como la mayoría de las glicoproteínas de este organismo, que son glicolipoproteínas. Asimismo, el péptido señal de APA posee características que dificultan la identificación bioinformática respecto al tipo de secreción por el cual se transloca. Cabe resaltar que aun cuando el péptido señal de APA presenta las dos argininas consecutivas características de los sustratos Tat, el resto del motivo no está conservado; aunado a esto se han encontrado proteínas cuyo péptido señal posee las dos argininas consecutivas, mas no son secretadas vía Tat (Pantelis *et al.*, 2012). Adicionalmente se ha descrito que la proteína APA expresada en *E. coli* es secretada por el sistema Tat, mientras que se asume que en general las proteínas glicosiladas de micobacterias son secretadas por el sistema Sec.

En este trabajo se usaron los servidores SignalP 5.0, PRED-TAT y TatP 1.0, para analizar el péptido señal de APA. La predicción en el caso de SignalP 5.0 y PRED-TAT fue ambigua; ya que en ambos casos la identidad como un péptido señal Sec fue menor al 60%. Por otra parte, el servidor TatP 1.0 reconoció al péptido señal de APA como un posible sustrato para la secreción Tat, sin embargo indicó la ausencia de un motivo Tat consenso. Estos resultados concuerdan con los reportado previamente en donde de igual forma, la predicción no ha arrojado resultados concluyentes (Kapopoulou A., *et al.*, 2011; Aguilar, 2015). Por otro lado, los programas fueron capaces de indicar con exactitud el sitio de corte del péptido señal respecto a lo reportado en la literatura. Esto nos indica que aun cuando los programas de predicción son de gran utilidad, también es notable que en algunos casos se ven limitados, particularmente en casos de proteínas con características atípicas respecto al de la mayoría de otras proteínas secretadas por el organismo en cuestión.

Debido a la ambigüedad de la secuencia del péptido señal de APA, decidimos diseñar variantes de éste en donde se favorecieran las características consenso de los sustratos de tipo Sec o Tat. Estas dos variantes del péptido señal podrían servir para realizar una comparación respecto al comportamiento de la proteína APA silvestre, y así determinar cuál es el sistema a través del cual es secretada.

Para el caso de Sec, se sustituyó una de las argininas del motivo por un aminoácido apolar, prolina (R11P). Cabe mencionar que a pesar de que hay ejemplos de sustratos Tat naturales que carecen de las dos argininas consecutivas, estos son del tipo R-N-R, es decir con un aminoácido en medio de las dos argininas; o del tipo R-K donde la segunda arginina es remplazada por lisina, un aminoácido con carga positiva al igual que la arginina (Lee *et al.*, 2006). Es por esto que se supuso que la sustitución de la arginina por un aminoácido apolar como la prolina podría abatir la identidad de este péptido señal como un sustrato Tat. Al analizar este péptido señal modificado (Sec), el puntaje de Tat fue abatido y los servidores proporcionaron puntajes altos para Sec: puntaje de certeza en SignalP 5.0 de 84.68% para Sec y puntaje de fiabilidad en PRED-TAT de 0.992 para Sec.

Para favorecer el reconocimiento del péptido señal por el sistema Tat, se realizaron las siguientes sustituciones: G13F, R14L. Estos cambios se efectuaron para restablecer el motivo consenso de TAT típico, (S/T)-R-R-x-F-L-K (Berks *et al.* 1996), con el menor número de cambios posibles. De forma análoga, el análisis del péptido señal modificado (Tat), proporcionó valores más elevados para Tat: puntaje de certeza en SignalP 5.0 de 93.38% para Tat y puntaje de fiabilidad en PRED-TAT de 0.997 para Tat.

Este trabajo se planteó como objetivo la demostración experimental del tipo de secreción por el que es secretada la proteína APA nativa, por lo que fue fundamental la expresión en una cepa incapaz de secretar por el sistema de secreción Tat, como el es la cepa mutante *S. coelicolor* IB78. Mientras que para valorar la glicosilación de las versiones mutantes, por lo cual, se detectó la presencia de las proteínas en el sobrenadante utilizando anticuerpos y también ConA.

Para facilitar la detección de la proteína inicialmente se planteó la incorporación de una etiqueta de seis histidinas en el extremo carboxilo y así poder detectar la proteína con un anticuerpo anti histidinas (Anti-His) o para permitir su purificación mediante una columna de afinidad a níquel.

Sin embargo, los experimentos de detección mediante Anti-His no dieron los resultados esperados, puesto que únicamente se detectó la etiqueta correctamente en las tres variantes (APA^{6H}, APA^{TAT} y APA^{SEC}) cuando eran expresadas en la cepa silvestre de *S. lividans* 1326,

y no así en la cepa *S. lividans* Δpmt . En el caso de la cepa IB78 de *S. coelicolor* no se detectaron las variantes APA6H y APA^{TAT} en el sobrenadante, mientras que sí se detectaron en la cepa silvestre M145, lo que podría ser tomado como evidencia de que la proteína APA silvestre es secretada a través del sistema Tat. Sin embargo, la falta de detección de la variante APA^{SEC} en la cepa silvestre M145 no permitió llegar a esta conclusión. La presencia de formas degradadas de la proteína, y el hecho de que en la cepa Δpmt no se detectara la etiqueta en ningún caso parecía ser consistente más bien con la idea de que la etiqueta de 6H estuviera siendo removida por proteólisis, evitando así la detección de las proteínas. Estas observaciones son consistentes con el hecho de que las proteínas glicosiladas parecen ser más resistentes a proteólisis (Szymanski & Wren, 2005) y que *S. coelicolor* es más proteolítico que *S. lividans* (Anné *et al.*, 2014), así como con la observación de Horn *et al.* (1999) de que en *M. tuberculosis* existe en ocasiones un corte proteolítico del extremo C-terminal entre los residuos P275 y T276 de APA.

Por lo anterior se decidió realizar la detección de las proteínas mediante el uso del anticuerpo monoclonal (6A3) que detecta un epítipo propio de la proteína APA. Mediante el uso de este anticuerpo fue posible detectar todas las variantes de la proteína en todas las cepas. La presencia de bandas en ambas cepas silvestres como en la mutante Δpmt nos permitió confirmar que las tres variantes del péptido señal producen proteínas capaces de expresarse y secretarse. Respecto a la determinación del tipo de secreción en cada una de las variantes fue necesario observar los resultados en la cepa IB78, en los cuales se observó el mismo comportamiento que al detectar con Anti-His. Es decir, no se detectó la presencia ni de la proteína silvestre ni de la variante APA^{TAT}, mientras que APA^{SEC} sí se secretó al sobrenadante. De esto podemos inferir que tanto APA6H (silvestre) como APA^{TAT} son secretadas por el sistema Tat, mientras que APA^{SEC} es secretada por el sistema Sec. Lo anterior no solamente confirma el diseño correcto de las variantes APA^{TAT} y APA^{SEC} para diferenciar la secreción a través de ambos sistemas, sino la observación de que la proteína APA silvestre es secretada en *Streptomyces*, al igual que en *E. coli* (Marrichi *et al.*, 2008), por el sistema Tat. Por lo tanto, esta información sumada a la similitud que existe entre los sistemas de secreción de los actinomicetos (Keenan, 2016), es altamente probable que en *M. tuberculosis* también sea secretada por dicho sistema, aunque esto no ha sido determinado experimentalmente.

Una observación interesante es que se detectó una señal débil de APA6H en el sobrenadante de la cepa que no tiene el sistema Tat habilitado (IB78). La intensidad de la señal es apenas apreciable (Fig 6. D), esto contrasta con lo detectado para APA6H en la cepa silvestre o respecto a la variante APA^{SEC} en la mutante IB78, donde la señal es evidente. Esta observación podría deberse a la utilización de un vector de expresión multicopia (pIJ6021), que da lugar a una sobreproducción de las proteínas. Es probable que en estas condiciones de sobreexpresión el péptido señal de APA silvestre pudiera ser reconocido por la vía Sec y ser secretado con baja eficiencia, en la cepa IB78. Este fenómeno también fue observado por Aguilar (2015), quien lo reportó como una secreción anómala.

APA^{TAT}, que posee un motivo Tat más conservado respecto a la proteína nativa, no fue secretada por un sistema que no fuese Tat, aún en condiciones de sobreexpresión. Esta observación refuerza el hecho de que el motivo consenso Tat, en APA^{TAT}, está más conservado respecto al péptido señal silvestre. Se almacenó el extracto celular de la cepa IB78, pensando que podría detectarse la presencia de la proteína que se expresó más no fue secretada y se acumuló en el citoplasma. Sin embargo, la proteína no se observó, lo cual puede deberse a que la proteína intracelular fue degradada rápidamente. La ausencia de APA en el extracto celular también fue reportada por Aguilar (2015).

Por otro lado, dada la importancia de la manosilación de APA para su papel antigénico (Horn C., *et al.* 1999; Mehaffy, C. e. al., 2019) se decidió determinar el estado de la glicosilación de las variantes de la proteína APA expresadas en las diferentes cepas mediante la detección con la lectina ConA. Estos ensayos mostraron que las tres variantes fueron glicosiladas, pues fueron detectadas por la lectina en los sobrenadantes de las cepas silvestres, pero no en los sobrenadantes de la cepa Δpmt , la cual es incapaz de glicosilar proteínas. Cabe mencionar que en la cepa IB78 se corroboró lo observado en los ensayos con Anti-His y 6A3.

Los resultados obtenidos con ConA son importantes, puesto que demuestran que la proteína APA secretada a través del sistema Tat es reconocida por la Pmt y glicosilada. Esto implica que la enzima Pmt es probablemente capaz de interactuar con el translocón Tat para la glicosilación de proteínas secretadas en forma posttraduccional, además de interactuar con el translocón Sec para la glicosilación de proteínas en forma cotraduccional, como se describió inicialmente (Vanderven *et al.*, 2005).

En resumen, los experimentos realizados en este trabajo demuestran que la proteína APA de *M. tuberculosis*, al expresarse en *Streptomyces*, es secretada a través del sistema de secreción Tat, lo que concuerda con lo reportado para *E. coli* (Marrichi, 2008) y con las observaciones de Aguilar (2015). Además, las mutantes del péptido señal APA^{TAT} y APA^{SEC} favorecieron la secreción por los sistemas Tat y Sec, respectivamente. Se demostró que tanto la proteína con el péptido señal silvestre como las mutantes fueron glicosiladas. Es decir, que la glicosilación de la proteína APA es independiente del sistema secretor. Esto concuerda con lo reportado por Aguilar (2015), quien demostró la glicosilación de una mutante de APA cuyo péptido señal fue remplazado por el de un sustrato Sec. Por otro lado, confirma que en *Streptomyces* no es necesaria la secreción por el sistema Sec para que la glicosilación pueda llevarse a cabo, como también especuló Kenan, 2016.

En la figura 18 se presenta un modelo de la secreción y glicosilación de APA de *M. tuberculosis*, así como las mutantes APA^{TAT} y APA^{SEC} diseñadas en este trabajo, en *Streptomyces*. APA WT y APA^{TAT} poseen péptido señal que son reconocidos por el sistema de secreción Tat, por lo que el plegamiento de la proteína es efectuado de manera intracelular, para posteriormente ser translocada por el poro formado por unidades de TatA. Por el otro el péptido señal de APA^{SEC} es reconocido por el sistema Sec, por lo que la proteína en su estructura primaria se direcciona hacia el canal SecYEG para su translocación y posteriormente su plegamiento. En ambos casos, la glicosilación de APA es mediada por la enzima Pmt.

Dada la evidencia presentada en este trabajo podríamos especular que así como los dominios maduros de las proteínas que se secretan tienen sus propias señales para su dirigir su translocación (Chatzi & Sardis, 2017) y pueden presentar propiedades de plegamiento variables que afectan su orientación (Tsirigotaki *et al.*, 2018), la proteína APA puede tener una señal interna que dirija a la proteína directamente a la maquinaria de glicosilación, además de la señal presente en su péptido señal como observó Aguilar (2015). Otra posible explicación sería ampliar el modelo de VanderVen *et al.* (2005) y realizar estudios que demuestren una relación entre la maquinaria de glicosilación y las proteínas de los sistemas de secreción Sec y Tat.

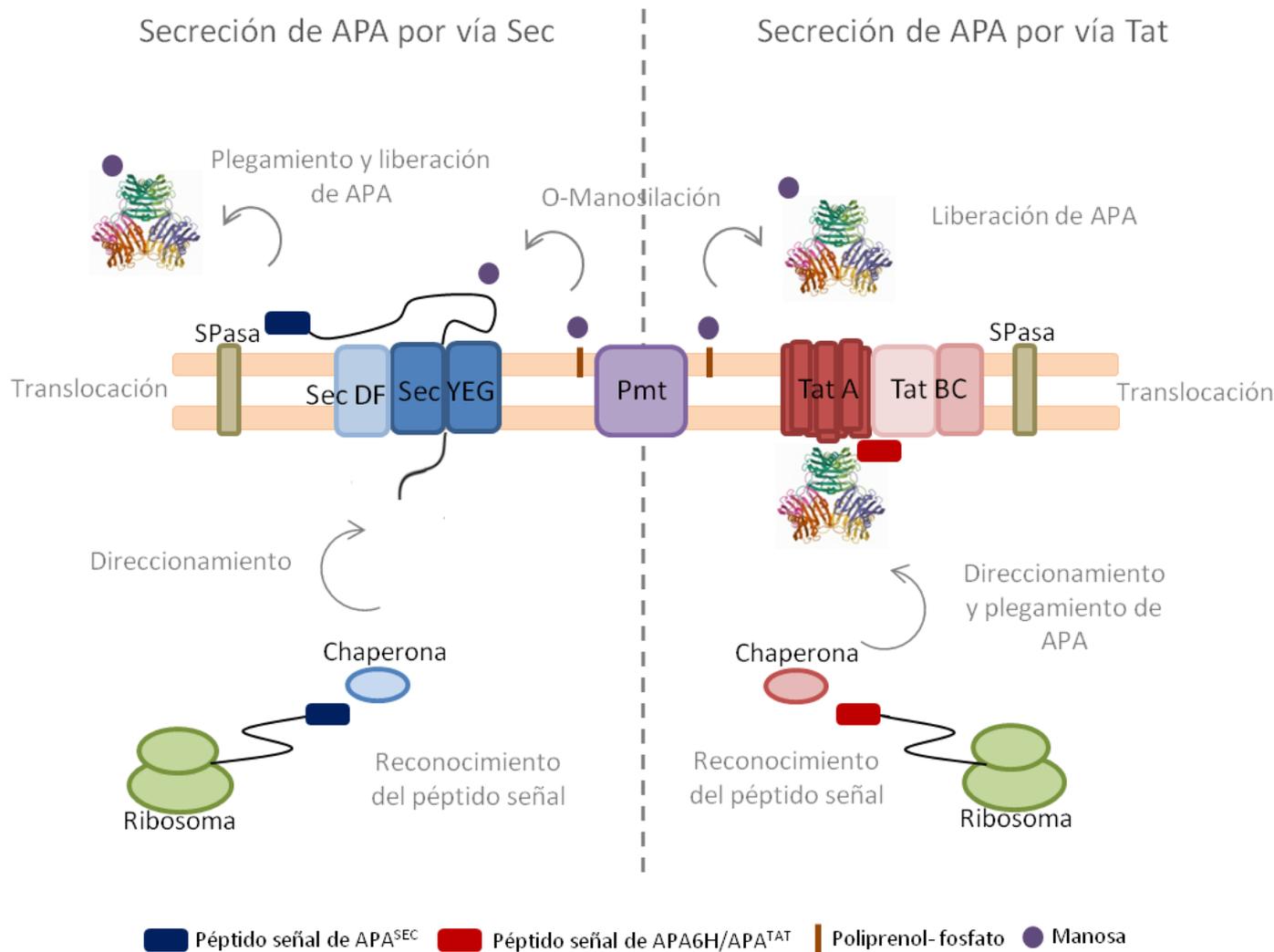


Figura 18. Modelo de la secreción de APA por vía Tat o por vía Sec, en *Streptomyces*.

Conclusiones

Se comprobó que, en *Streptomyces*, el péptido señal de la proteína APA silvestre es reconocido por el sistema de secreción Tat. Lo cual implica que su péptido señal puede ser usado para dirigir la secreción de otras proteínas hacia este sistema.

Se crearon dos mutantes de la proteína APA con cambios en el péptido señal. La primera, APA^{TAT}, fue secretada de la misma forma que la proteína silvestre, por el sistema Tat. La segunda, APA^{SEC}, cambió la vía de secreción de APA, pues esta proteína mutante fue secretada por el sistema Sec.

Por otro lado, los ensayos con ConA permitieron concluir que en *Streptomyces* la glicosilación no está exclusivamente ligada a la secreción vía Sec, ya que APA fue glicosilada independientemente de su secreción por la vía Sec o por la vía Tat. Esto nos haría especular si los componentes celulares que glicosilan las proteínas en *Streptomyces* se encuentran asociados no solo a las proteínas de la maquinaria sino también a la maquinaria del sistema Tat; o si estos componentes se reclutan debido a alguna señal en el motivo de secreción o en el interior de la proteína.

Perspectivas

Si bien en este trabajo se demostró que la glicosilación de APA se realiza independientemente de la maquinaria de secreción que la hubiese reconocido, aún sería necesario estudiar si hay cambios en cuanto a las posiciones de glicosilación y de la misma forma evaluar si en ambos casos la proteína induce una respuesta inmune in vivo. Para ello sería necesario realizar un análisis de espectrometría de masas de APA^{SEC} y APA^{TAT} y compararlas con la APA silvestre para develar si el patrón de glicosilación cambia o por el contrario es independiente del tipo de secreción.

Sería pertinente, corroborar que el sitio de corte de la peptidasa es el esperado y concuerda en el caso de APA^{TAT} con el sitio de corte de APA silvestre.

Se trabajó con el vector de expresión multicopia pIJ6021, por lo cual la proteína se sobreexpresó en todos los ensayos realizados. Es por eso que sería relevante verificar si la expresión de esta proteína con un vector integrativo muestra el mismo comportamiento y de esta manera corroborar si el péptido señal de APA es secretado por un sistema adicional al Tat cuando su expresión sea basal.

En caso de que el patrón de glicosilación sea diferente entre la proteína secretada por Sec o por Tat, sería favorable realizar pruebas serológicas (ELISA) con las mutantes de APA, en muestras de animales o pacientes que padezcan tuberculosis, para evaluar su capacidad de ser reconocidas y desencadenar una respuesta del sistema inmune; y si esta respuesta es equiparable o mayor a la reportada por la proteína nativa.

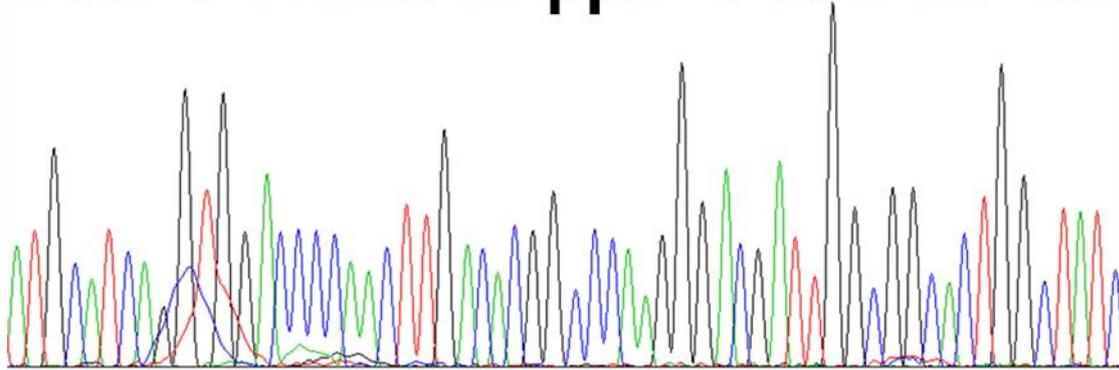
En caso de que APA, ya sea secretada por Tat o por Sec, induzca la respuesta inmune, sería beneficioso realizar experimentos que evalúen el rendimiento de secreción de esta proteína, para determinar cuál versión de la proteína aumentar la cantidad de APA que se pueda expresar, secretar y purificar mediante su expresión heteróloga en *Streptomyces* y poder producir esta proteína en mayores cantidades.

APA WT

ATGCATCAGGTGGACCCCAACTTGACACGTCGCAAGGGACGATTGGCGGCACTGGCTATC

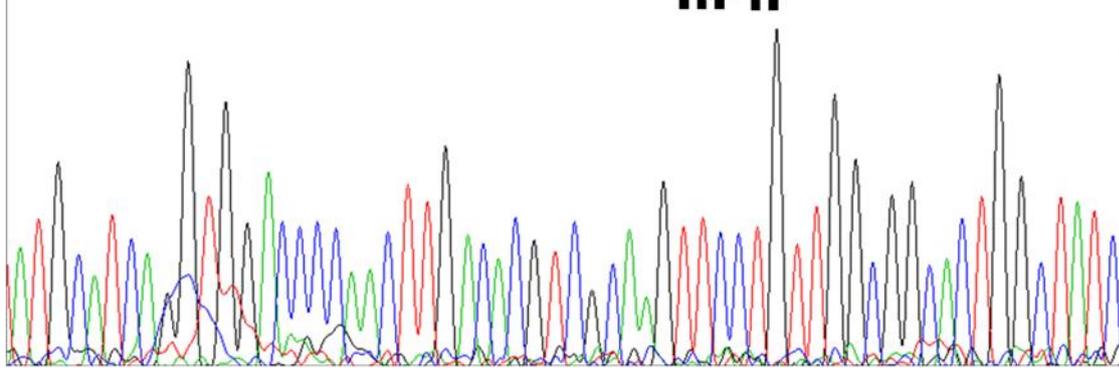
APA^{SEC}

70 80 90 100 110 120
ATGCATCAGGTGGACCCCAACTTGACACGGCCCAAGGGACGATTGGCGGCACTGGCTATC



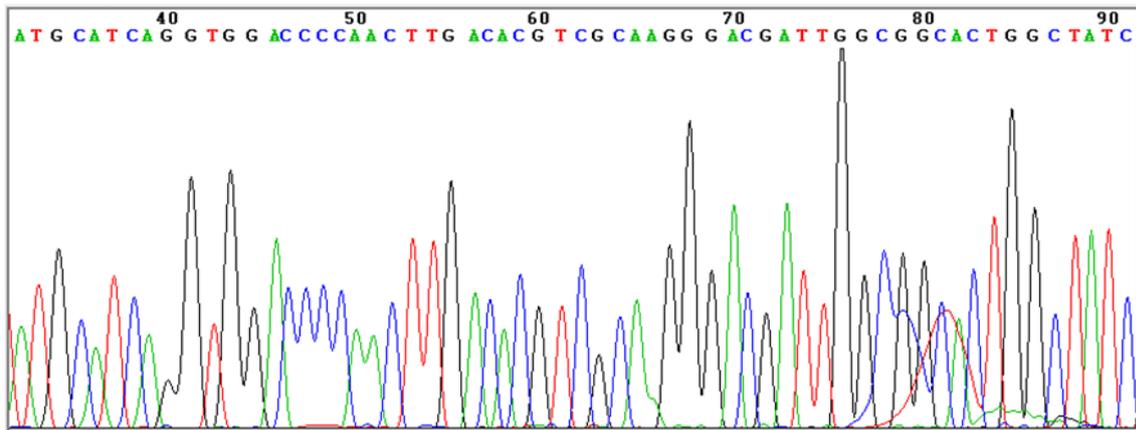
APA^{TAT}

70 80 90 100 110 120
ATGCATCAGGTGGACCCCAACTTGACACGTCGCAAGTTTCCTGTTGGCGGCACTGGCTATC

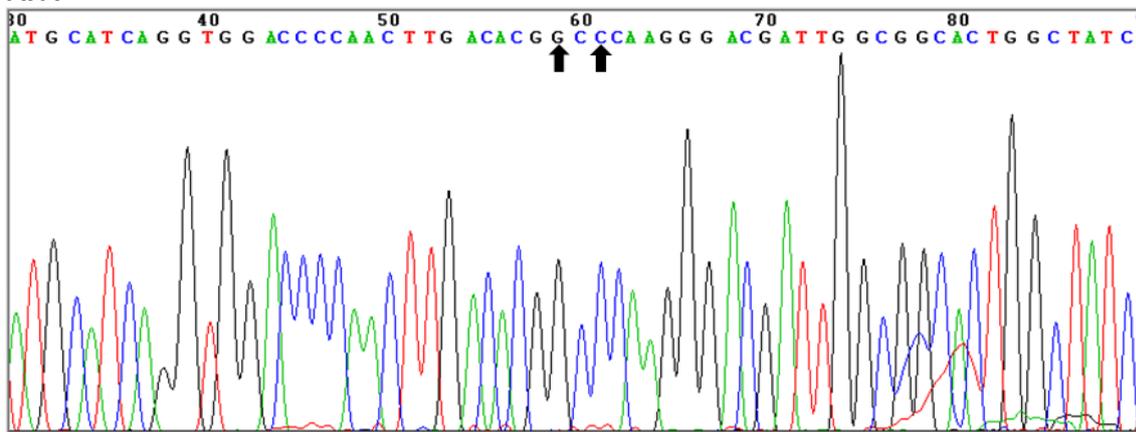


Anexo 2. Resultados de la secuenciación de APA purificada en *E. coli*

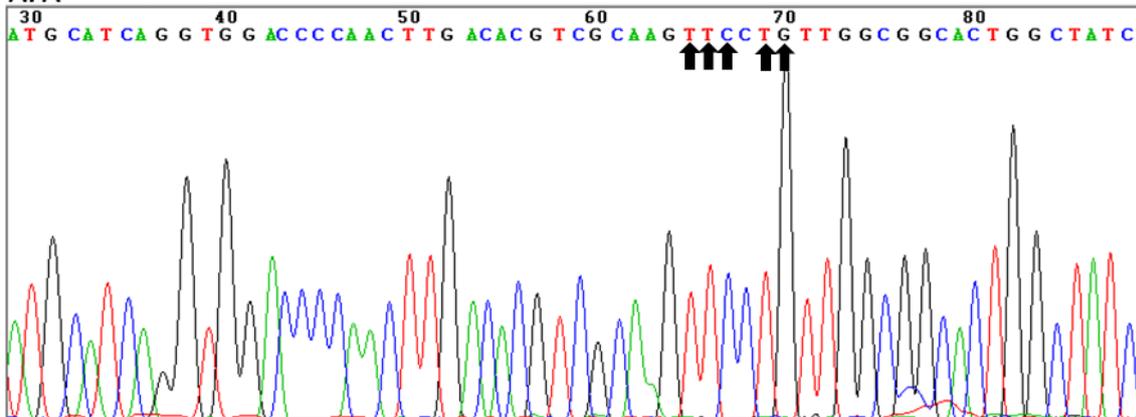
APA WT



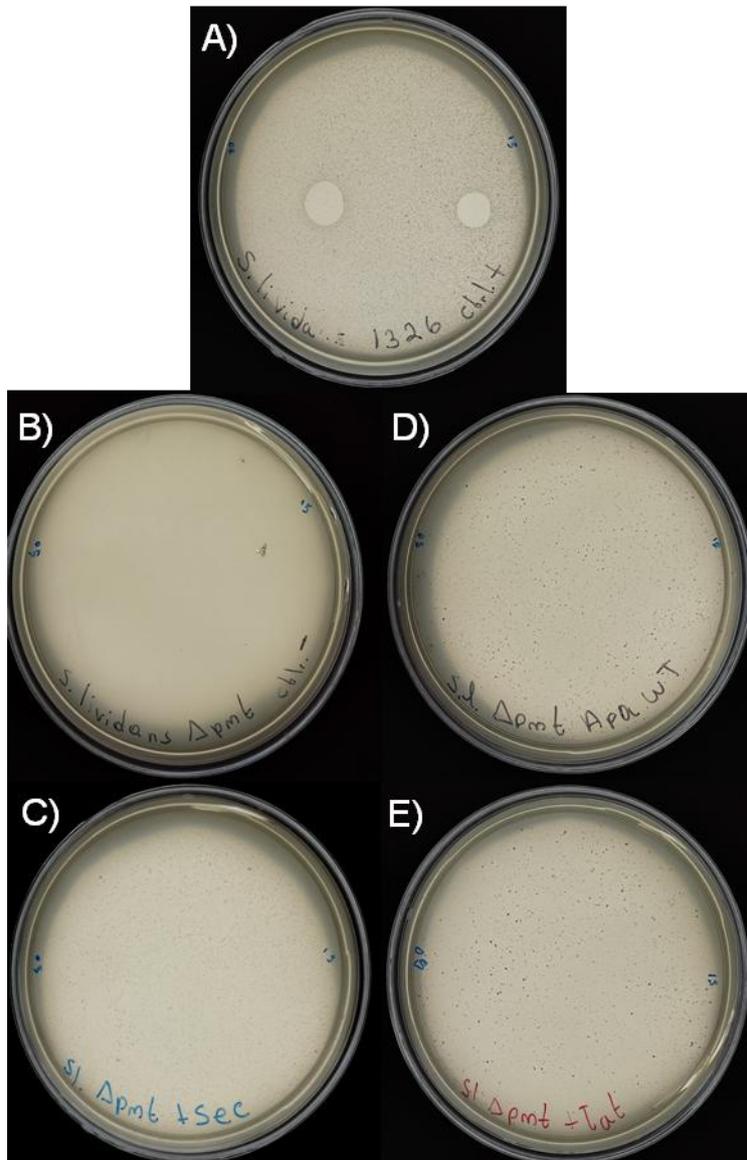
APA^{SEC}



APA^{TAT}



Anexo 3. Resultados de la secuenciación de APA purificada en *Streptomyces*



Anexo 4. Ensayo de infección por el fago KC519 A) *S.lividans* 1326 B) *S.lividans* Δpmt C) *S.lividans* Δpmt + APA-6H D) *S.lividans* Δpmt + APA^{SEC} E) *S.lividans* Δpmt + APA^{TAT}. Las esporas se cultivaron en medio DNA (*Difco*TM Nutrient Agar).

Anexo 5. Protocolos

Minipreps de DNA plasmídico para *E. coli* (Para midipres se escala el proceso aumentando el volumen 50 veces).

- 1.- Tomar con un palillo una colonia aislada de *E. coli* e inocular 0.4 ml de medio YT2X en un tubo de ensayo. Incubar durante 2 horas a 37°C con agitación constante.
- 2.- Inocular 20 mL de medio YT2X en un matr az con 0.1 mL del un precultivo e incubar durante toda la noche a 37°C con agitación constante.
- 3.- Centrifugar a 6,000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- 5.- Resuspender el paquete de c elulas en 200 ul de TE 25mM.
- 6.- Añadir 400  ul 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.
- 7.- Añadir 300  ul de acetato de potasio 3 M, pH=4.8, mezclar por inversión hasta que se pierda la viscosidad y se vea un precipitado blanco. Incubar 15 minutos en hielo.
- 8.- Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos y pasar la fase acuosa a un tubo nuevo.
- 9.- Añadir al tubo 400  ul de fenol/cloroformo, agitar 30 segundos en v rtex y centrifugar 2 minutos a 14,000 rpm en la microcentrífuga.
- 10.- Pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir un volumen de isopropanol. Dejar precipitando 5 minutos a temperatura ambiente.
- 11.- Centrifugar 10 minutos 14,000 rpm en la microcentrífuga. Retirar todo el sobrenadante, dando un pulso en la microcentrífuga para eliminar el sobrenadante restante.
- 12.- Resuspender el pellet en 50 ul de TE 10mM
- 13.- Añadir 150 ul de acetato de sodio 4M, pH=6. Mezclar bien e incubar una hora a -20°C.
- 14.- Centrifugar 10 minutos a 14,000 rpm en la microcentrífuga. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio y añadir 200 ul de isopropanol, mezclar muy bien y precipitar 10 minutos en hielo.
- 15.- Centrifugar 10 minutos a 14,000 rpm en la microcentrífuga. Eliminar todo el sobrenadante. 16.- Resuspender en 45 ul de TE, mezclar bien, dar un pulso en la microfuga y añadir 5 ul de acetato de sodio 3M pH=6 y 125 ul de etanol frío. Precipitar 10 minutos en hielo.
- 17.- Centrifugar 10 minutos a 14,000 rpm en la microcentrífuga. Eliminar todo el sobrenadante. 18.- Secar el botón y resuspenderlo en 20-25 ul de TE 10mM.

Minipreps de DNA plasmídico para *Streptomyces*

- 1.- Tomar con un palillo una colonia aislada de *E. coli* e inocular 0.4 ml de medio YT2X en un tubo de ensayo. Incubar durante 2 horas a 37°C con agitación constante.
- 2.- Inocular 20 mL de medio YT2X en un matr az con 0.1 mL del un precultivo e incubar durante toda la noche a 37°C con agitación constante.
- 3.- Centrifugar a 6,000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- 4.- Resuspender el paquete de c elulas en 200 ul de TE 25mM.
- 5.- Resuspender el el micelio en 200 ul de TE 25mM adicionado con lisozima (2 mg/ml).
- 6.- Incubar con la lisozima aproximadamente 1 hora a 37°C, o hasta que el micelio este visiblemente lisado (trasl ucido y viscoso).
- 7.- Añadir 400  ul de una solución fresca de NaOH 0.2 N, SDS 1%. Mezclar de manera invertida en v rtex durante varios segundos, hasta que no se vea rastro de micelio Incubar 10 minutos en hielo.
- 8.- Seguir el procedimiento como se indica, a partir del paso “7.” del protocolo para minipreps de DNA plasmídico para *E. coli* (ver arriba).

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

- 1.- Someter muestras a electroforesis en un gel de agarosa LMP, a a concentración adecuada para el tamaño del fragmento a purificar.
- 2.- Teñir con Bromuro de etidio 1  g/ml por 10 min. Iluminar el gel con luz UV de onda larga y cortar las bandas deseadas.
- 3.- Fundir la rebanada de agarosa que contiene el DNA en un tubo Eppendorf a 65°C durante 10 minutos.
- 4.- Añadir 1/10 del volumen de NaCl 5M, mezclar y dejar otros 5 min a 65°C.
- 5.- Saturar fenol con NaCl de la siguiente forma (mezclar 100 ul de NaCl 5M, 400 ul de agua y 500 ul de fenol). Centrifugar 1 min a 13000 rpm, luego retirar la fase acuosa y mantener a 37°C.
- 6.- Mantener la agarosa fundida a 37°C, posteriormente añadir al tubo 2/3 de volumen del fenol saturado e inmediatamente agitar en v rtex durante 30 segundos. Centrifugar 5 min en la microcentrífuga a 14,000 rpm y transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
- 7.- Añadir al fenol 45 él de TE 10 ml o agua y 5 ul de NaCl 5M y agitar en v rtex, centrifugar por 2 min y mezclar la fase acuosa con la anterior.

8.- Agregar 1 vol. de fenol/cloroformo a la fase acuosa, agitar 15 s. en vórtex y centrifugar por 2 min.

8.- Transferir la fase acuosa a un tubo limpio. Agregar 1 vol. de cloroformo a la fase acuosa, agitar 15 s. en vórtex y centrifugar por 2 min.

9.- Transferir a un tubo limpio la fase acuosa y añadir 1 vol. de isopropanol. Para aumentar la cantidad de DNA recuperado añadir 10 µg de glicógeno. Mantener a -20°C al menos dos horas. 10.- Centrifugar todo el DNA durante 10 min. a 14,000 rpm en la microcentrífuga, asegurándose de eliminar todo el alcohol con una micropipeta.

11.- Secar el pellet y resuspenderlo en un volumen adecuado de TE 10 mM.

Transformación de *E. coli* por electroporación

1.- Inocular 20 mL de medio YT2X con 0.1 ml de un precultivo de células de *E. coli*, incubar a 37°C con agitación constante hasta llegar a una densidad óptica de 0.6 a 600 nm (aproximadamente de 3hrs).

2.- Centrifugar a 5,000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

3.- Decantar el sobrenadante, resuspender el pellet en 20 ml de agua esteril (provocando choque osmótico) y centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

4.- Repetir 2 veces el paso anterior.

5.- Eliminar el sobrenadante, dejando aproximadamente 150µl para resuspender suavemente el botón.

6.- Tomar 50µl del botón resuspendido y agregar 1µl de DNA plasmídico (5µl si es una ligación), mezclar, colocarlo en una celda de electroporación Bio-Rad® y mantenerlo en hielo.

7.- Dar un pulso de 1.6kV en el electroporador.

8.- Pasar las células a 1 ml de medio YT2X e incubar a 37°C por una hora.

9.- Transferir a un tubo Eppendorf y centrifugar a 6,000 rpm durante 10 minutos. Resuspender el pellet en medio YT2X y realizar las diluciones correspondientes.

10.- Inocular 0.1 ml de cada dilución en cajas con medio LB adicionado con el antibiótico correspondiente e incubar a 37°C durante toda la noche.

11.- Tomar una colonia aislada con ayuda de un palillo y resuspenderla en 3 ml de medio YT2X. Posteriormente reinocular en un cultivo de 100 mL de medio YT2X adicionado con el antibiótico correspondiente e incubar a 37°C durante 12h en agitación constante.

Transformación de *Streptomyces* por fusión de protoplastos

- 1.- Suplementar 25 ml de medio YEME con 125 μ l de MgCl₂ 1 M y 1.25 ml de glicina al 10%.
* Disolver el equivalente al 25% sacarosa en el para el caso de las cepas silvestres. Disolver el equivalente al 12% sacarosa en el para el caso de las cepas mutantes.
- 3.- Pasar el cultivo a un tubo de centrífuga y enjuagar el matraz con 10ml de sacarosa al 10.3%, agregándolo también al tubo. Mezclar y centrifugar a 3,500 rpm, 10 minutos a temperatura ambiente.
- 4.- Resuspender el botón en 20 ml de sacarosa 10.3% y centrifugar a 3,500 rpm durante 10 min a 27°C. Repetir 2 veces y almacenar el botón de micelio a -20°C.
- 5.- Pesar 7.5mg de lisozima y agregar 5 mL de Buffer P, disolver y filtrar a través de un filtro Millipore de 0.45 μ m de poro.
- 6.-Descongelar el micelio y agregar la solución de lisozima en. Mezclar suavemente e incubar a 30°C durante 1 hora aproximadamente, mezclar por inversion cada 15 min. Tomar muestras del micelio cada 15 min para observar al microscopio y asegurarse que los protoplastos estén bien formados.
- 7.- Filtrar los protoplastos a través de un filtro para esporas de algodón estéril. Añadir al filtro 5 ml de Buffer P para lavar. Pasar el filtrado a un tubo con rosca y centrifugar a 3,500 rpm, por 10 min a 27°C.
- 8.- Eliminar el sobrenadante y resuspender suavemente el botón en el remanente de Buffer P.
- 9.-Agregar 3 μ l de plásmido purificado (dependiendo de la concentración de plásmido). Inmediatamente agregar 0.6 ml de polietilenglicol (PEG1450) al 25% en Buffer P con ayuda de una pipeta Pasteur y mezclar subiendo y bajando los protoplastos de la pipeta dos o tres veces. Agregar 5 ml de Buffer P y centrifugar a 3,500 rpm durante 10 min.
- 10.- Eliminar el sobrenadante y resuspender en 0.3 ml de Buffer P.
- 11.- Hacer diluciones y poner en cajas de medio R2YE, 100 μ l 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.
- 12.-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.

Referencias

- Aguilar E. 2015. Utilización del péptido señal de la glicoproteína apa de *Mycobacterium tuberculosis* para la secreción y glicosilación de lipoproteínas en *Streptomyces*. Universidad Nacional Autónoma de México
- Alcock F, Baker MAB, Greene NP, Palmer T, Wallace MI, Berks BC. 2013. Live cell imaging shows reversible assembly of the TatA component of the twin-arginine protein transport system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110: E3650– E3659.
- Allen WJ, Corey RA, Oatley P, Sessions RB, Baldwin SA, Radford SE, Tuma R, Collinson I. 2016. Two-way communication between SecY and SecE suggests a Brownian ratchet mechanism for protein translocation. *eLife* 5: e15598.
- Arista I. 2012. Clonación, expresión y glicosilación de la lipoproteína antigénica MPT83 (Rv2873) de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*. Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Almagro A., Konstantinos D., Tsigos, Sønderby C., Nordahl T., Winther, Søren Brunak, Heijne and Nielsen. 2019. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks *Nature Biotechnology*, 37, 420-423.
- Anné J, Maldonado B, Van Impe J, Van Mellaert L, Bernaerts K. 2012. Recombinant protein production and *streptomycetes*. *J Biotechnol.* .
- Anné J., Vrancken K., Mellaert L., Impe J., Bernaerts K.. 2014. Protein secretion biotechnology in Gram-positive bacteria with special emphasis on *Streptomyces lividans*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Volume 1843, Issue 8, Pages 1750-1761
- Berks, B. C. 1996. A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol. Microbiol.* 22:393–404.
- Auclair, S. M., Bhanu, M. K. & Kendall, D. A. 2012. Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins. *Protein Sci.* 21, 13–25.
- Bando-Campos, G., Juárez-López, D., Román-González, S. A., Castillo-Rodal, A. I., Olvera, C., López-Vidal, Y., Arreguín-Espinosa, R., Espitia, C., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. 2019. Recombinant O-mannosylated protein production (PstS-1) from *Mycobacterium tuberculosis* in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) as a tool to study tuberculosis infection. *Microbial cell factories*, 18(1), 11.
- Bendtsen J., Nielsen H., Widdick D., Palmer T. and Brunak S. 2005. Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC bioinformatics* 6: 167.
- Berini, F., Marinelli, F., and Binda, E. 2020. *Streptomycetes*: Attractive Hosts for Recombinant Protein Production. *Front. Microbiol.* 11, 1958.
- Berks BC, Palmer T., Sargent F. 2005. Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway *Curr. Opin. Microbiol.* 8 , pp. 174-181.
- Berks BC, Lea SM, Stansfeld PJ. 2014. Structural biology of Tat protein transport. *Curr Opin Struct Biol* 27: 32– 37.

- Bentley S., Chater K., Cerdano-Tarraga A., Challis G. , Thomson N., James K., Harris D., Quail M., Kieser H., Harper D. 2002. 'Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2)', *Nature*, 417: 141-47.
- Blaudeck N., Kreutzenbeck P., Muller M., Sprenger G., Freudl R. 2005. Isolation and characterization of bifunctional *Escherichia coli* TatA mutant proteins that allow efficient Tat-dependent protein translocation in the absence of TatB. *J. Biol. Chem.*;280:3426–32.
- Blobel G., Dobberstein B. 1975. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* 67:835–851.
- Bogsch E., Sargent F., Stanley N., Berks B., Robinson C., Palmer T.. 1998. An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273: 18003–18006.
- Bradley J., Mckluskey J. 1997. “Tuberculosis”. En: Bradley J, Mckluskey J. *Clinical immunology*. Oxford. Hong Kong. 189.
- Brüser T, Sanders C. 2003. An alternative model of the twin arginine translocation system. *Microbiol Res* 158: 7– 17.
- Buchanan G, Sargent F, Berks BC, Palmer T. 2002. A genetic screen for suppressors of *Escherichia coli* Tat signal peptide mutations establishes a critical role for the second arginine within the twin-arginine motif. *Arch Microbiol* 177:107–112.
- Calmette A, Guérin C, Boquet A, Nègre L. 1927. La vaccination préventive contre la tuberculose par le “BCG”. Paris: Masson; 1927 p.
- Carrillo R., Magdevska V., Kranjc L., Fujs Š., Müller R., Petković H. 2018. Production of Extracellular Heterologous Proteins in *Streptomyces Rimosus*, Producer of the Antibiotic Oxytetracycline. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 2607–2620.
- Chater K, Biró S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. 2010. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Rev* 34. 171–198.
- Coddeville B., Wu S.-W., Fabre E., Brassart C., Rombouts Y., Burguière A., Guérardel Y. 2012. Identification of the *Mycobacterium marinum* Apa antigen O-mannosylation sites reveals important glycosylation variability with the *M. tuberculosis* Apa homologue. *Journal of Proteomics*, 75(18), 5695–5705.
- Cole S, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV.1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 93: 538 – 544.
- Cooper H., Gurcha S., Nigou J., Brennan P., Belisle J., Besra G., Young D. 2002. Characterization of mycobacterial protein glycosyltransferase activity using synthetic peptide acceptors in a cell-free assay *Glycobiology*, 12.pp. 427-434
- Córdova D. LE. 2009. Glicosilación de proteínas en bacterias patógenas. *El Residente*. Vol. IV Número 3-2009: 105-110.
- Córdova-Dávalos L., Espitia C, González-Cerón G, Arreguín-Espinosa R, Soberón-Chávez G, Servín-González L. 2014. Lipoprotein N-acyl transferase (Lnt1) is dispensable for protein O-mannosylation by *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiol Lett.* 350(1):72-82.

- Cowlshaw, D., Smith, M. 2001. Glycosylation of a *Streptomyces coelicolor* A3(2) cell envelope protein is required for infection by bacteriophage ϕ C31. *Mol Microbiol* 41: 601– 610.
- Cowlshaw, D., Smith, C. 2002. A gene encoding a homologue of dolichol phosphate- β -d mannose synthase is required for infection of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by phage ϕ C31. *J Bacteriol* 184: 6081– 6083.
- Crane J., Randall L. 2017. The Sec System: Protein Export in *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*. 2017 November; 7(2).
- Cristobal S, de Gier J, Nielsen H, von Heijne G. 1999. Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *EMBO J*; 18:2982–90.
- Cruz-Morales P., E. Vijgenboom, F. Iruegas-Bocardo, G. Girard, L.A. Yáñez-Guerra, H.E. Ramos-Aboites, J.L. Pernodet, J. Anné, G.P. van Wezel, F. Barona-Gómez. 2013. The genome sequence of *Streptomyces lividans* 66 reveals a novel tRNA-dependent peptide biosynthetic system within a metal-related genomic island. *Gen. Biol. Evol.*, 5, pp. 1165-1175
- Cunningham K., Wickner W. 1989. Specific recognition of the leader region of precursor proteins is required for the activation of translocation ATPase of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86 , pp. 8630-8634.
- DeLisa M., Samuelson P., Palmer T., Georgiou G. 2002. Genetic analysis of the twin arginine translocator secretion pathway in bacteria. *J Biol Chem* 277:29825–29831.
- Dell A., A. Galadari, F. Sastre, and P. Hitchen. 2011. 'Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes', *International journal of microbiology*.
- Dilks K., Rose R., Hartmann E., Pohlschroder, M. 2003. Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey. *J. Bacteriol.* 185, 1478–1483.
- Dilks, K., Gimenez, M., Pohlschroder M. 2005. Genetic and biochemical analysis of the twin-arginine translocation pathway in halophilic archaea. *J. Bacteriol.* 187, 8104–8113.
- Dobos K., Khoo K., Swiderek K., Brennan P., Belisle J. 1996. Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* *J. Bacteriol.*, 178 pp. 2498-2506.
- Dorronsoro I., Torroba L. 2007. *Microbiology of tuberculosis*. *An. Sist. Sanit. Navar*; 30 (Supl. 2): 67-84.
- Driessen A., Nouwen N, *Annu Rev Biochem.* 2008. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. 77():643-67.
- Economou, A., Wickner, W. 1994. SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* 78, 835–843.
- Espitia, C., R. Mancilla. 1989. 'Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens', *Clinical and experimental immunology*, 77: 378.
- Espitia, C., Servín-González, L., Mancilla, R. 2010. New insights into protein O-mannosylation in actinomycetes. *Molecular BioSystems*, 6(5), 775.

- Feilmeier, B., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H., Phillips, G. J. 2000. Green Fluorescent Protein Functions as a Reporter for Protein Localization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182, 4068–4076. doi:10.1128/jb.182.14.4068- 4076.2000.
- Fisher, A. C., Kim, J.-Y., Perez-Rodriguez, R., Tullman-Ercek, D., Fish, W. R., Henderson, L. A., *et al.* 2008. Exploration of Twin-Arginine Translocation for Expression and Purification of Correctly Folded Proteins in *Escherichia coli*. *Microb. Biotechnol.* 1, 403–415.
- Flärdh, K., Buttner, M. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Review*, 7, 36-49.
- Frain K., Maarten V., Robinson C. 2019a. The Twin-Arginine Pathway for Protein Secretion. En Sandkvist1 M., Eric Cascales E., Peter J. Protein secretion in bacteria American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Frain, K., Robinson, C. van Dijn, J.M. 2019b. Transport of Folded Proteins by the Tat System. *Protein J* 38, 377–388
- Freudl. 2018. Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. *Microb Cell Fact* 17:52.
- Fyans J., Bignell D, Loria R, Toth I, Palmer T. 2013. The ESX/type VII secretion system modulates development, but not virulence, of the plant pathogen *Streptomyces scabies*. *Mol Plant Pathol.* 14:119–30.
- Gao, J., Liu, W., Chen, C.C., Guo, R.T. 2019. Crystal structure of apo form fibronectin-binding protein Apa from *Mycobacterium tuberculosis*. PDB. 10.2210/pdb5zx9/pdb.
- Gamboa-Suasnavart R., Valdez-Cruz N., Cordova-Dávalos L. *et al.* 2011. The O-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 KDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flasks. *Microb Cell Fact* 10, 110
- Gamboa-Suasnavart, R., Marín-Palacio, L., López-Griego, L., Córdova-Aguilar, M., Valdez-Cruz, N., & Trujillo-Roldán, M. 2019. Volumetric power input as a reliable parameter for scale-up from shake flask to stirred-tank bioreactor: production of a recombinant glycoprotein by *Streptomyces lividans*. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 18(3), 1085-1099.
- Ghaisani A. & Driessen A. 2019. SecA-Mediated Protein Translocation through the SecYEG Channel. En Sandkvist1 M., Eric Cascales E., Peter J. Protein secretion in bacteria American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Gilbert M., Morosoli R., Shareck F., Kluepfel D. 1995. Production and secretion of proteins by streptomycetes *Crit. Rev. Biotechnol.*, 15, pp. 13-39
- González-Cerón G., Miranda-Olivares O., Servín-González L. 2009. Characterization of the methyl-specific restriction system of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and of the role played by laterally acquired nucleases. *FEMS Microbiology Letters*, 301: 35-43.
- Grant J., Jessee F., Bloom D., Hanahan. 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 87 (12) 4645-4649.

- Gohlke U., Pullan L., McDevitt C., Porcelli I, Leeuw E., Palmer T., Saibil H., Berks BC. 2005. The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 : 10482–10486.
- Goosens V., Carmine G. Monteferrante, Maarten J. 2014. The Tat system of Gram-positive bacteria, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Volume 1843, Issue 8, 1698-1706.
- Gullon, S., Marin, S., Mellado, R. 2015. Overproduction of a Model Sec-Independent Secretory Protein Elicits Different Cellular Responses in *Streptomyces lividans*. *PLoS One* 10, e0133645. [journal.pone.0133645](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133645).
- Gurcha S., Baulard, Kremer, Loch, Moody, Muhlecker, Costello, Crick, Brennan, Besra. 2002. 'Ppm1, a novel polyprenolmonophosphomannose synthase from *Mycobacterium tuberculosis*', *Biochem J*, 365:441-50.
- Hamed B., Anné J., Karamanou S., Economou A. 2018. *Streptomyces* protein secretion and its application in biotechnology. *FEMS Microbiology Letters*.
- Hang J., Wang J., Lu M., Xue Y., Qiao J., Tao L. 2022. Protein O-mannosylation across kingdoms and related diseases: From glycobiology to glycopathology, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 148, 112685.
- Hasani A., Kariminik A., Issazadeh K. 2014. *Streptomyces*: Characteristics and Their Antimicrobial Activities. *Int J Adv Biol Biom Res*. 2(1):63-75
- Herrmann J., Delahay R., Gallagher A., Robertson B., Young D. 2000. Analysis of post-translational modification of mycobacterial proteins using a cassette expression system. *FEBS Lett* 473 358-362.
- Hidrin N., Goodfellow M., Boiron P., Moreno M., Serrano J. 2001. Los estreptomicetes: Actualización y revisión didáctica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 21(1), 36-38.
- Hobbs G., Frazer M., Gardner J. *et al.* 1989. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 31, 272–277.
- Hodgson D., 2000. Primary metabolism and its control in streptomyces: a most unusual group of bacteria. *Adv Microb Physiol*, Årgang 42, pp. 47-238.
- Hopwood D. 2007. *Streptomyces* in nature and medicine: the antibiotic makers Oxford University Press.
- Horn C., Namane, Pescher, Riviere, Romain, Puzo, Barzu, Marchal. 1999. Decreased capacity of recombinant 45/47-kDa molecules (Apa) of *Mycobacterium tuberculosis* to stimulate T lymphocyte responses related to changes in their mannosylation pattern. *J. Biol. Chem.*274:32023-32030.
- Hwang S., Lee Y., Kim J., Kim G., Kim H., Kim W., Cho S., Palsson B., Cho B. 2021. *Streptomyces* as Microbial Chassis for Heterologous Protein Expression. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9:804295
- Hynds P., Robinson D., Robinson C. 1998. The Sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malfolded proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem* 273: 34868– 34874.

- Ivankov, Dmitry, Samuel, Michael, Stefano, Pavel, Dmitrij. 2013. How many signal peptides are there in bacteria? *Environmental microbiology*. 15. 983-90. 10.1111/1462-2920.12105.
- Ize B., Gerard F., Zhang M., Chanal A., Voulhoux R, *et al.* 2002. In vivo dissection of the Tat translocation pathway in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol*;317:327–35.
- Jacobson KR, Tierney DB, Jeon CY, Mitnick CD, Murray MB. 2010. Treatment outcomes among patients with extensively drug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*.
- Keller R., Keyzer J., Arnold J.M. Driessen, Palmer T. 2012. Co-operation between different targeting pathways during integration of a membrane protein. *J Cell Biol*; 199 (2): 303–315.
- Keenan T. 2016. Protein O-glycosylation in *Streptomyces*. University of York.
- Kieser T., Bibb M., Buttner M., Chater K., Hopwood D. 2000. General Introduction to Actinomycete Biology. In: *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Crowes, Norwich, England,. 1-21.
- Kim M., Choeng Y., Chi W., Kang D., Hong, S. 2010. Heterologous Production of Streptokinase as a Secretory Form in *Streptomyces lividans* and Nonsecretory Form in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20,132–137.
- Kipping M., Lilie H., Lindenstrauß U. *et al.* 2003. Structural studies on a twin-arginine signal sequence. *FEBS Lett* 550:18–22.
- Kluepfel, Vats-Mehta, Aumont, Shareck, Morosoli. 1990. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66, *Biochem J*, 267: 45-50.
- Korn-Wendisch F., Kutzner H. 1992. The family Streptomycetaceae In: 'The prokaryotes (2 edEdn),(Eds A Balows, HG Truper, M Dworkin, W Harder and KH Schleifer), Springer-Verlag: New York,. 2, 923-995.
- Koul A., Arnoult E., Lounis N., Guillemont J., Andries K. 2011. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*, 469.
- Kuo C.-J., Gao J., Huang J.-W., Ko T.-P., Zhai C., Ma L. Chen C.-C. 2019. Functional and structural investigations of fibronectin-binding protein Apa from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*.
- Lammertyn E., Desmyter S., Schacht S., Van Mellaert L., Anne J. 1998. Influence of Charge Variation in the *Streptomyces Venezuelae* Alpha-Amylase Signal Peptide on Heterologous Protein Production by *Streptomyces Lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 424–430.
- Lara M., Servín-González L., Singh M., Moreno C., Cohen I., Nimtz M., Espitia C. 2004. Expression, secretion, and glycosylation of the 45- and 47-kDa glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans*. *Appl Environ Microbiol.* 70(2):679-85.
- Lee, P., Tullman-Ercek D., Georgiou G. 2006. The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annual review of microbiology*, 60, 373–395.

- Leu WM, Chen LY, Liaw LL, Lee YH. 1992. Secretion of the *Streptomyces* tyrosinase is mediated through its trans-activator protein, MelC1. *J Biol Chem.*267:20108–13.
- Liu CF, Tonini L, Malaga W, Beau M, Stella A, Bouyssié D, Jackson MC, Nigou J, Puzo G, Guilhot C, Burlet-Schiltz O, Rivière M. 2013a. Bacterial protein-*O*-mannosylating enzyme is crucial for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(16):6560-5.
- Liu, G., K. Chater, G. Chandra, G. Niu, and H. Tan. 2013b. 'Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77: 112-43.
- Lommel, Strahl. 2009. 'Protein *O*-mannosylation: conserved from bacteria to humans', *Glycobiology*, 19: 816-28.
- Low K., Mahadi N., Illias R. 2013. Optimisation of signal peptide for recombinant protein secretion in bacterial hosts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9), 3811–3826.
- Marín-Palacio L., Gamboa-Suasnavart R., Valdez-Cruz N., Servín-González L., Córdova-Aguilar M., Soto E., Trujillo-Roldán M. 2014. The role of volumetric power input in the growth, morphology, and production of a recombinant glycoprotein by *Streptomyces lividans* in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal*, 90, 224–233.
- Martinez A., Kolvek S., Yip C., Hopke J., Brown K., Macneil I., *et al.* 2004. Genetically Modified Bacterial Strains and Novel Bacterial Artificial Chromosome Shuttle Vectors for Constructing Environmental Libraries and Detecting Heterologous Natural Products in Multiple Expression Hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2452–2463.
- Mc Gregor J. 1954. Nuclear division and the life cycle in a *Streptomyces* sp. *J. gen. Microbiol* 11, 52-56.
- MacLeod A., Gilkes N., Escote-Carlson L., Warren R., Kilburn D., Miller R. 1992. *Streptomyces lividans* glycosylates an exoglucanase (Cex) from *Cellulomonas fimi*. *Gene*121:143-147.
- Mehaffy C., Belisle J., Dobos K. 2019. Mycobacteria and their sweet proteins: An overview of protein glycosylation and lipoglycosylation in *M. tuberculosis*. *Tuberculosis.*; 115:1–13
- Molik S., Karnauchov I., C. Weidlich C. Herrmann R. Klösgen R. 2001. The Rieske Fe/S protein of the cytochrome b6/f complex in chloroplasts: missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts? *J. Biol. Chem.*, 276, pp. 42761-42766.
- Müller M., Koch H., Beck K., Schäfer U. 2001. Protein traffic in bacteria: multiple routes from the ribosome to and across the membrane. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66:107–157.
- Natale P., Brüser T., Driessen A. 2008. Secand Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1778:1735–1756.

- Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S., Heijne G. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10:1–6.
- Nieuwenhuizen, N. E., & Kaufmann, S. 2018. Next-Generation Vaccines Based on Bacille Calmette-Guérin. *Frontiers in immunology*, 9, 121.
- Nothaft, H., Szymanski, C. 2010. Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. *Nat Rev Microbiol* 8, 765–778.
- Ong, Kilburn, Miller, Warren. 1994. '*Streptomyces lividans* glycosylates the linker region of a beta-1, 4-glycanase from *Cellulomonas fimi*', *J Bacteriol*, 176: 999-1008.
- Orfanoudaki G, Economou A. 2014. Proteome-wide subcellular topologies of *E. coli* polypeptides database (STEPdb). *Mol Cell Proteomics* 13, 3674–3687.
- Paetzel M. 2019. Bacterial Signal Peptidases. En Springer Nature Switzerland AG A. Kuhn (ed.), *Bacterial Cell Walls and Membranes, Subcellular. Biochemistry* 92,
- Palacin A., R. de la Fuente, I. Valle, L.A. Rivas, R.P. Mellado. 2003. *Streptomyces lividans* contains a minimal functional signal recognition particle that is involved in protein secretion. *Microbiol.-UK*, 149, pp. 2435-2442
- Palmer T., Sargent F., Berks B. 2010. The Tat protein export pathway. In *Escherichia coli* and *Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. (eds Böck, A. *et al.*) chapter 4.3.2.
- Palmer T., Berks B. 2012. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat Rev Microbiol* 10, 483–496.
- Pantelis G. Bagos, Elisanthi P. Nikolaou, Theodore D. Liakopoulos and Konstantinos D. Tsirigos. 2010. Combined prediction of Tat and Sec signal peptides with Hidden Markov Models. *Bioinformatics*.
- Peterson J., Woolhead C., Bernstein D. 2003. Basic amino acids in a distinct subset of signal peptides promote interaction with the signal recognition particle *J. Biol. Chem.*, 278, pp. 46155-46162.
- Ragas A., Roussel L., Puzo G., Riviere M. 2007. The *Mycobacterium tuberculosis* cell-surface glycoprotein apa as a potential adhesin to colonize target cells via the innate immune system pulmonary C-type lectin surfactant protein A. *J. Biol. Chem.*, 282, pp. 5133-5142
- Ramírez N., Cocotle B., Méndez A., Arenas J. 2002. *Mycobacterium tuberculosis*: Su pared celular y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kDa. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana/Vol. 2 núm. 2*.
- Rattleff S. 2013. Heterologous protein production in *Streptomyces lividans*. Technical University of Denm.
- Rodrigue A., Chanal A., Beck K., Müller M., Wu L. 1999. Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial Tat pathway. *J Biol Chem* 274: 13223– 13228.
- Romain F., C. Horn, P. Pescher, A. Namane, M. Riviere, G. Puzo, O. Barzu, and G. Marchal. 1999. Deglycosylation of the 45/47 kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* decreases its capacity to elicit in vivo or in vitro cellular immune responses. *Infect. Immun.*67:5567-5572.

- Santini C., B. Ize, A. Chanal, M. Muller, G. Giordano, and L. F. Wu. 1998. A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 17:101–112.36.
- Sargent F., E. G. Bogsch, N. R. Stanley, M. Wexler, C. Robinson, B. C. Berks, and T. Palmer. 1998. Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J.* 17:3640–3650.
- Schaerlaekens K, Schierova M, Lammertyn E, Geukens N, Anne J, VanMellaert L. 2001. Twin-Arginine Translocation Pathway in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* 183:6727–6732.
- Schaerlaekens K., Mellaert L., Lammertyn E., Geukens N. and Anne J. 2004. The importance of the Tat-dependent protein secretion pathway in *Streptomyces* as revealed by phenotypic changes in tat deletion mutants and genome analysis. *Microbiology*, 150, 21–31
- Schiebel E., Driessen J., Hartl U., Wickner W. 1991. $\Delta\mu\text{H}^+$ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell* 64, 927–939.
- Sentandreu R, Northcote DH. 1968. The structure of a glycopeptide isolated from the yeast cell wall. *Biochem J.* 109(3):419-32.
- Shepherd M., Kharel M., Bosserman M., Rohr J. 2010. Laboratory maintenance of *Streptomyces* species. *Curr Protoc Microbiol*; Chapter 10: Unit 10E.1.
- Short M., Fernandez M., Sorge A. Huse D. 1988. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res* 16(15):7583-600.
- Sigle S., Ladwig N., Wohlleben W., Muth G. 2015. Synthesis of the spore envelope in the developmental life cycle of *Streptomyces coelicolor*. *Int J Med Microbiol.* 305(2):183-9
- Smith G., Sweredoski M., Hess S. 2014. O-linked glycosylation sites profiling in *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins. *J Proteomics.* Jan 31; 97:296–306.
- Snajder M., Carrillo A., Magdevska V., Bahun M., Kranjc L., Pas M., *et al.* 2019. Extracellular Production of the Engineered Thermostable Protease Pernisine from *Aeropyrum Pernix* K1 in *Streptomyces Rimosus*. *Microb. Cel Fact* 18, 196.
- Soto G., Hultgren S. 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly *J. Bacteriol.*, 181, pp. 1059-1071.
- Spiro R. 1973. 'Glycoproteins', *Advances in protein chemistry*, 27: 349-467.
- Spiro R. 2002. 'Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds', *Glycobiology*, 12: 43R-56R.
- Szymanski C., Wren B. 2005. Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. *Nature*; 3: 225-237.
- Takano E., White J., Thompson C., Bibb M. 1995. Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp., *Gene*, Volume 166, Issue 1, Pages 133-137.
- Thomas J., Daniel R., Errington J., Robinson C. 2001. Export of Active green Fluorescent Protein to the Periplasm by the Twin-Arginine Translocase (Tat) Pathway in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 39, 47–53.

- Thompson, Widdick, Hicks, Chandra, Sutcliffe, Palmer, Hutchings. 2010. Investigating lipoprotein biogenesis and function in the model Gram-positive bacterium *Streptomyces coelicolor*, *Mol Microbiol*, 77: 943-57.
- Torres-Rodriguez. 2012. Clonación y expresión de la glicoproteína de 19kDa de *Mycobacterium tuberculosis* (Gen Rv3763) en *Streptomyces lividans*. Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Tsirigotaki A., De Geyter J., Šoštarić N., Economou A., Karamanou S. 2017. Protein export through the bacterial Sec pathway. *Nat Rev Microbiol* 15 : 21– 36.
- Tsolis C., Tsare E., Orfanoudaki G., Busche T., Kanaki K., Ramakrishnan R., *et al.* 2018. Comprehensive Subcellular Topologies of Polypeptides in *Streptomyces*. *Microb. Cel Fact* 17, 43.
- Tucci P., Portela M., Chetto C., González-Sapienza G., Marín M. 2020. Integrative proteomic and glycoproteomic profiling of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate. *PLOS ONE*, 15(3), e0221837.
- VanderVen B, Harder J, Crick D, Belisle J. 2005. Export-mediated assembly of mycobacterial glycoproteins parallels eukaryotic pathways, *Science*, vol. 309 (pg. 941-943).
- Vallecillo A., Parada C., Morales P., Espitia C. 2017. *Rhodococcus erythropolis* as a host for expression, secretion and glycosylation of *Mycobacterium tuberculosis* proteins. *Microbial Cell Factories*, 16(1).
- Vallin C., Ramos A., Pimienta E., Rodríguez C., Hernández T., Hernández I., Anné J. 2006. *Streptomyces* as host for recombinant production of *Mycobacterium tuberculosis* proteins. *Tuberculosis*, 86(3-4), 198–202.
- Wang S., Wang Y., Wang P., Chen M., Kong Y. 2018. High-level expression and glycosylation of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* Ala-Pro-rich antigen in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 150, 67–71.
- Wehmeier S, Varghese AS, Gurucha SS, Tissot B, Panico M, Hitchen P, Morris H, Besra G, Dell A, Smith M. 2009. Glycosylation of the phosphate binding protein, PstS, in *Streptomyces coelicolor* by a pathway that resembles protein O-mannosylation in eukaryotes, *Mol Microbiol*, vol. 71 (pg. 421-433).
- Wheeler P., Ratledge C. 1994. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control* (ed. Bloom, B. R.) 353–385 (Am. Soc. Microbiol., Washington DC).
- Widdick D., Dilks K., Chandra G., Bottrill A., Naldrett M., Pohlschröder M., Palmer T. 2006. The twin-arginine translocation pathway is a major route of protein export in *Streptomyces coelicolor* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103, pp. 17927-17932
- Willemse J., Ruban-Osmialowska B., Widdick D., Celler K., Hutchings M., Wezel G., Palmer T. 2012. Dynamic localization of Tat protein transport machinery components in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.*, 194, pp. 6272-6281
- Zhou Z, Sun N, Wu S, Li YQ, Wang Y. 2016. Genomic data mining reveals a rich repertoire of transport proteins in *Streptomyces*. *BMC Genomics*.17:510.