



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Caracterización de la proteína PE\_PGRS1  
de *Mycobacterium tuberculosis***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**B I O L O G A**

**P R E S E N T A**

**ANA LAURA SALGADO OROZCO**



DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

|  |   |
|--|---|
| <p>1. Datos del alumno</p> <p>Autor</p> <p>Apellido paterno</p> <p>Apellido materno</p> <p>Nombre(s)</p> <p>Teléfono</p> <p>Universidad</p> <p>Facultad o Escuela</p> <p>Carrera</p> <p>Número de cuenta</p> | <p>1. Datos del alumno</p> <p>Salgado</p> <p>Orozco</p> <p>Ana Laura</p> <p>55 13 23 27</p> <p>Universidad Nacional Autónoma de México</p> <p>Facultad de Ciencias</p> <p>Biología</p> <p>301788623</p> |
| <p>2. Datos del tutor</p> <p>Grado</p> <p>Nombre(s)</p> <p>Apellido paterno</p> <p>Apellido materno</p>  | <p>2. Datos del tutor</p> <p>Dra</p> <p>Clara Inés</p> <p>Espitia</p> <p>Pinzón</p>   |
| <p>3. Datos del sinodal 1</p> <p>Grado</p> <p>Nombre(s)</p> <p>Apellido paterno</p> <p>Apellido materno</p>  | <p>3. Datos del sinodal 1</p> <p>Dra</p> <p>Diana Elodia</p> <p>Aguilar</p> <p>León</p>   |
| <p>4. Datos del sinodal 2</p> <p>Grado</p> <p>Nombre(s)</p> <p>Apellido paterno</p> <p>Apellido materno</p>  | <p>4. Datos del sinodal 2</p> <p>M en I</p> <p>José Eduardo</p> <p>Rodríguez</p> <p>Bustamante</p>  |
| <p>5. Datos del sinodal 3</p> <p>Grado</p> <p>Nombre(s)</p> <p>Apellido paterno</p> <p>Apellido materno</p>  | <p>5. Datos del sinodal 3</p> <p>QFB</p> <p>María Dolores</p> <p>Ramírez</p> <p>Parales</p>   |
| <p>6. Datos del sinodal 4</p> <p>Grado</p> <p>Nombre(s)</p> <p>Apellido paterno</p> <p>Apellido materno</p>  | <p>6. Datos del sinodal 4</p> <p>Biol. Exp.</p> <p>María Simona</p> <p>Ustoa</p>  |
| <p>7. Datos del trabajo escrito.</p> <p>Título</p> <p>Número de páginas</p> <p>Año</p>   | <p>7. Datos del trabajo escrito</p> <p>Caracterización de la proteína PE_PGRS1 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i></p> <p>94 p</p> <p>2010</p>   |

*A mi madre, porque gracias a ti estoy cumpliendo una meta más en mi vida. No tengo palabras para expresar lo que representas para mí, sólo sé que Dios me ha regalado momentos hermosos a tu lado. Gracias por todo el amor, alegría y apoyo que me has dado desde niña, siempre impulsándome a ser mejor persona en todos los aspectos.*

El éxito consiste en obtener lo que se desea. La felicidad, en disfrutar lo que se obtiene.

*Ralph Waldo Emerson* (1803-1882) Poeta y pensador estadounidense.

*A la Dra. Clara Espitia, por haberme brindado la oportunidad de acercarme a la investigación científica y descubrir las satisfacciones invaluable que se reciben con cada día de trabajo. Gracias por haber confiado en mí y contribuir de manera excepcional en mi formación profesional y personal.*

*A Toño, por tu paciencia, dedicación, experiencia, consejos y risas que compartiste conmigo cada día, sé que existieron buenos y malos momentos, pero créeme que de eso aprendí mucho y ahora lo valoro mucho más. Gracias, este logro no hubiera sido posible sin tu ayuda.*

*A M. en C. Cristina Parada, por el apoyo técnico recibido durante la realización de este proyecto en el laboratorio.*

*A mis compañeros de laboratorio Anaíd, Cristi, Edén, Ingrid, Lucero, Sharlen, Wendy, Alberto, Mauricio, Pedro, Ramsés, por su apoyo, sus consejos y ayuda que me brindaron en todo este tiempo, son un grupo de trabajo excelente, me da mucho gusto formar parte de él.*

*A mis amigas de la facultad Dianíz, Paty y Pay bu, por haber compartido conmigo tantos momentos inolvidables durante la carrera y hasta el día de hoy, las quiero mucho amigas.*

*A mis amigas Jaz, Luz, Mariana y Pau, por su compañía, consejos y amistad incondicional a lo largo de estos años juntas, las quiero hermanitas.*

*A mi familia, porque a pesar de los problemas del pasado hemos aprendido a convivir en armonía y nos hemos apoyado mutuamente. En el lugar donde esté saben que los llevo en mi corazón.*

*A Juan Manuel, mi niño, por haber estado a mi lado en esta nueva etapa, gracias por tus cuidados, los hermosos detalles y los maravillosos momentos que hemos compartido. Te quiero mucho.*

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Lista de Figuras y Tablas .....</b>   | <b>vi</b>   |
| <b>Lista de Abreviaturas .....</b>   | <b>viii</b> |
| <b>Resumen .....</b>   | <b>xi</b>   |
| <br>   |             |
| <b>Capítulo 1 INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>1</b>    |
| 1.1 Historia de la tuberculosis humana.....  | 1           |
| 1.2 Epidemiología de la tuberculosis humana .....  | 2           |
| 1.3 Patogenia e inmunidad de la tuberculosis humana .....  | 4           |
| 1.4 Secuencia del genoma de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....  | 7           |
| 1.5 Localización de las proteínas PE_PGRS de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....                             | 9           |
| 1.6 Estructura de la envoltura celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....                                | 12          |
| 1.7 Secreción de proteínas en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....  | 14          |
| 1.8 Secreción de proteínas en <i>Staphylococcus aureus</i> .....   | 18          |
| <br>   |             |
| <b>Capítulo 2 ANTECEDENTES .....</b>   | <b>22</b>   |
| <br>   |             |
| <b>Capítulo 3 JUSTIFICACIÓN .....</b>  | <b>27</b>   |
| <br>   |             |
| <b>Capítulo 4 HIPÓTESIS .....</b>  | <b>28</b>   |
| <br>   |             |
| <b>Capítulo 5 OBJETIVOS .....</b>  | <b>29</b>   |
| 5.1 Objetivo General.....  | 29          |
| 5.2 Objetivos Particulares .....   | 29          |
| <br>   |             |
| <b>Capítulo 6 DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>  | <b>30</b>   |
| <br>   |             |
| <b>Capítulo 7 MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>   | <b>31</b>   |
| 7.1 Cepas de <i>Escherichia coli</i> y condiciones de cultivo .....  | 31          |
| 7.2 Purificación de <i>DNA</i> genómico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv para la amplificación del gen |             |

|  |           |
|--|-----------|
| <i>pe_pgrs1</i> .....  | 31        |
| 7.3 Amplificación por <i>PCR</i> del gen <i>pe_pgrs1</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv .....                              | 32        |
| 7.4 Clonación del gen <i>pe_pgrs1</i> en el vector de expresión procarionte <i>pET15b</i> .....  | 33        |
| 7.4.1 Captura del producto de <i>PCR</i> en el vector de clonación <i>pCR4®Blunt-TOPO®</i> .....                                       | 33        |
| 7.4.2 Subclonación del gen <i>pe_pgrs1</i> en el vector de expresión <i>pET15b</i> .....   | 33        |
| 7.4.3 Ligación del plásmido recombinante <i>pET15b-pe_pgrs1</i> .....  | 34        |
| 7.5 Producción de las proteínas recombinantes PE_PGRS1 y Sortasa A en <i>Escherichia coli</i> .....                                    | 35        |
| 7.5.1 Expresión de la PE_PGRS1 recombinante de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv .....   | 35        |
| 7.5.2 Expresión de la Sortasa A recombinante de <i>Staphylococcus aureus</i> .....   | 36        |
| 7.6 Purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad a metales .....  | 37        |
| 7.6.1 Purificación de la PE_PGRS1 recombinante de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv .....  | 37        |
| 7.6.2 Purificación de la Sortasa A recombinante de <i>Staphylococcus aureus</i> .....  | 38        |
| 7.7 Ensayos <i>in vitro</i> para evaluar la actividad enzimática de la Sortasa A sobre la PE_PGRS1 .....                               | 39        |
| <b>Capítulo 8 RESULTADOS</b> .....   | <b>41</b> |
| 8.1 Purificación de <i>DNA</i> genómico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv para la amplificación del gen <i>pe_pgrs1</i> ..... | 41        |
| 8.2 Amplificación por <i>PCR</i> del gen <i>pe_pgrs1</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv .....                              | 42        |
| 8.3 Clonación del gen <i>pe_pgrs1</i> en el vector de expresión procarionte <i>pET15b</i> .....  | 43        |
| 8.4 Producción de las proteínas recombinantes PE_PGRS1 y Sortasa A en <i>Escherichia coli</i> .....                                    | 46        |
| 8.4.1 Expresión de la PE_PGRS1 recombinante de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv .....   | 46        |
| 8.4.2 Expresión de la Sortasa A recombinante de <i>Staphylococcus aureus</i> .....   | 49        |
| 8.5 Purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad a metales .....  | 52        |
| 8.5.1 Purificación de la PE_PGRS1 recombinante <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv .....   | 52        |
| 8.5.2 Purificación de la Sortasa A recombinante <i>Staphylococcus aureus</i> .....   | 54        |
| 8.6 Detección de las proteínas por <i>Western-blot</i> en los ensayos <i>in vitro</i> de actividad enzimática .....                    | 55        |
| <b>Capítulo 9 DISCUSIÓN</b> .....  | <b>61</b> |
| <b>Capítulo 10 CONCLUSIONES</b> .....  | <b>67</b> |
| <b>Capítulo 11 PERSPECTIVAS</b> .....  | <b>68</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Capítulo 12 REFERENCIAS .....</b>   | <b>69</b> |
| <b>Capítulo 13 ANEXOS .....</b>  | <b>77</b> |
| 13.1 Anexo I. Protocolos.....  | 77        |
| A) Resolución y Detección de DNA.....  | 77        |
| B) Clonación Zero Blunt® TOPO®.....  | 77        |
| C) Reacción de Digestión .....   | 78        |
| D) Reacción de <i>Gap-filling</i> .....  | 78        |
| E) Reacción de Ligación .....  | 78        |
| F) Medios de Cultivo (Medio LB y Medio SOC).....   | 79        |
| G) Pre-cultivo de Bacterias.....   | 79        |
| H) Células Competentes.....  | 80        |
| I) Transformación de Bacterias .....   | 80        |
| J) Cinética de Crecimiento.....  | 80        |
| K) Extracción de Proteínas.....  | 81        |
| L) Resolución de Proteínas .....   | 81        |
| M) Detección de Proteínas .....  | 82        |
| N) Identificación de Proteínas .....   | 83        |
| O) Purificación de Proteínas (Manual y Automática) .....                                 | 84        |
| P) Cuantificación de Proteínas .....   | 85        |
| 13.2 Anexo II. Materiales .....  | 86        |
| A) Reactivos .....   | 86        |
| B) Enzimas .....   | 87        |
| C) Anticuerpos.....  | 87        |
| 13.3 Anexo III. Secuencias .....   | 89        |
| A) Gen <i>pe_pgrs1</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv .....                             | 89        |
| B) Características de los vectores procariontes de clonación y expresión empleados ..... | 90        |
| C) Secuenciación del gen <i>pe_pgrs1</i> .....   | 91        |
| D) Proteína recombinante PE_PGRS1 .....  | 92        |
| E) Proteína recombinante Sortasa A .....   | 93        |
| F) Fragmentos PE y PGRS de la proteína recombinante PE_PGRS1 .....                       | 93        |



| Figura: | Título:   | Página: |
|---------|---|---------|
| 1       | Koch y la tuberculina.  | 1-2     |
| 2       | Número de nuevos casos de tuberculosis humana en todas sus formas a nivel mundial.  | 3-4     |
| 3       | El agente de la tuberculosis.   | 5       |
| 4       | Características principales de la tuberculosis desde la infección hasta la defensa del hospedero.                               | 6       |
| 5       | Mapa circular del cromosoma de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.  | 7-8     |
| 6       | Familia de proteínas PE de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.  | 8       |
| 7       | Efecto de la sobreexpresión del gen <i>Rv1818c</i> sobre la morfología micro- y macroscópica en micobacterias.                  | 10      |
| 8       | Efecto de la ausencia del gen <i>pe_pgrs33</i> en el crecimiento fenotípico de <i>M. bovis</i> y su infectividad a macrófagos.  | 11      |
| 9       | Envoltura celular de <i>M. tuberculosis</i> .   | 13      |
| 10      | Representación esquemática de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i> .  | 14      |
| 11      | Modelo para la translocación de proteínas por la vía Sec-dependiente.   | 15      |
| 12      | Alineamiento múltiple de las secuencias de proteínas PE_PGRS que presentan el motivo LPXTG.                                     | 17-18   |
| 13      | Mecanismo de anclaje de proteínas a la pared celular por acción de la Srt en <i>S. aureus</i> y otras bacterias Gram-positivas. | 18-19   |
| 14      | Árbol filogenético no enraizado mostrando las relaciones entre las 61 Srt de varias bacterias Gram-positivas.                   | 20      |
| 15      | Modelo del ensamblaje del <i>pili</i> mediado por la Srt en bacterias Gram-positivas.   | 22      |
| 16      | Estructura de la SrtA de <i>S. aureus</i> .   | 23-24   |
| 17      | Alineamiento de las secuencias de la enzima SrtA de <i>C. glutamicum</i> y la posible SrtA-like de <i>M. tuberculosis</i> .     | 25-26   |
| 18      | Purificación de las muestras de <i>gDNA</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.  | 41      |
| 19      | Amplificación por la técnica de <i>PCR</i> del gen <i>pe_pgrs1</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.                             | 42      |
| 20      | Análisis de restricción del plásmido recombinante <i>pCR4®Blunt-TOPO®-pe_pgrs1</i> .  | 43      |
| 21      | Plásmidos para la generación del plásmido recombinante <i>pET15b-pe_pgrs1</i> .   | 44      |
| 22      | Análisis de restricción del plásmido recombinante <i>pET15b-pe_pgrs1</i> .  | 45-46   |
| 23      | Expresión de la proteína recombinante PE_PGRS1 de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en la cepa <i>E. coli</i> Rosetta (DE3).         | 47      |

|    |  |       |
|----|--|-------|
| 24 | Cinética de crecimiento de la cepa de expresión <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) transformada con el plásmido recombinante <i>pET15b-pe_pgrs1</i> .                | 48    |
| 25 | Fraccionamiento de las células inducidas para la expresión de la proteína recombinante PE_PGRS1.   | 49    |
| 26 | Expresión de la proteína recombinante SrtA de <i>S. aureus</i> en las cepas <i>E. coli</i> C41 (DE3) y C43 (DE3).  | 50    |
| 27 | Cinética de crecimiento de las cepas de expresión <i>E. coli</i> Rosetta C41 (DE3) y C43 (DE3) transformadas con el plásmido recombinante <i>pET15b-SrtA</i> . | 51-52 |
| 28 | Purificación y solubilización de los cuerpos de inclusión que contienen a la proteína recombinante PE_PGRS1.   | 52-53 |
| 29 | Purificación de la proteína recombinante PE_PGRS1 por cromatografía de afinidad a metales (IMAC).  | 53-54 |
| 30 | Purificación de la proteína recombinante SrtA por cromatografía de afinidad a metales (IMAC).  | 55    |
| 31 | Ensayo <i>in vitro</i> para determinar la actividad enzimática de la SrtA sobre la PE_PGRS1 con relación molecular 1:5.  | 57    |
| 32 | Ensayo <i>in vitro</i> para determinar la actividad enzimática de la SrtA sobre la PE_PGRS1 con relación molecular 1:10.                                       | 58-59 |
| 33 | Ensayo <i>in vitro</i> para determinar la actividad enzimática de la SrtA sobre la PE_PGRS1 con relación molecular 1:10 y ausencia de calcio.                  | 59    |
| 34 | Ensayo <i>in vitro</i> para determinar la actividad enzimática de la SrtA sobre la PE_PGRS1 con relación molecular 1:10 y ausencia de glicina.                 | 60    |
| 35 | Secuencia del gen <i>pe_pgrs1</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.   | 88    |
| 36 | Vectores de clonación y expresión procariontes con las secuencias codificantes de los genes <i>pe_pgrs1</i> y <i>srtA</i> .                                    | 89    |
| 37 | Secuenciación del gen <i>pe_pgrs1</i> .  | 90-91 |
| 38 | Secuencia de la proteína PE_PGRS1.   | 92    |
| 39 | Secuencia de la proteína SrtA.   | 93    |
| 40 | Secuencia de los fragmentos PE y PGRS de la proteína recombinante PE_PGRS1.  | 94    |

| Tabla: | Título:   | Página: |
|--------|---|---------|
| I      | Clasificación estructural de las Sortasas (Srt) en clases y subfamilias.  | 21      |
| II     | Oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR de la secuencia codificante de la PE_PGRS1 a partir de gDNA de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. | 42      |
| III    | Reactivos utilizados en el ensayo <i>in vitro</i> con relación molecular 1:5  | 56      |
| IV     | Reactivos utilizados en el ensayo <i>in vitro</i> con relación molecular 1:10   | 58      |

## 0 ABREVIATURAS

|                    |  |
|--------------------|--|
| <b>aa</b>          | aminoácidos  |
| <b>Ala</b>         | alanina  |
| <b>Amp</b>         | ampicilina   |
| <b>APS</b>         | persulfato de amonio (Del inglés, <i>ammonium persulfate</i> )                                     |
| <b>Arg</b>         | arginina   |
| <b>Asn</b>         | asparagina   |
| <b>Asp</b>         | ácido aspártico  |
| <b>ATCC</b>        | Colección Americana de Tipos de Cultivo (Del inglés, <i>American Type Culture Collection</i> )     |
| <b>bp</b>          | pares de bases (Del inglés, <i>base pairs</i> )  |
| <b>BCG</b>         | bacilo Calmette-Guérin   |
| <b>BSA</b>         | albúmina de suero bovino (Del inglés, <i>bovine serum albumin</i> )                                |
| <b>buffer</b>      | tampón   |
| <b>Car</b>         | carbenicilina  |
| <b>Cys</b>         | cisteína   |
| <b>DAB</b>         | 3,3-diaminobencidina tetrahidrocloruro (Del inglés, <i>diaminobenzidine</i> )                      |
| <b>DNA</b>         | ADN/ácido desoxirribonucleico (Del inglés, <i>deoxyribonucleic acid</i> )                          |
| <b>dNTP's</b>      | desoxinucleótidos trifosfato (Del inglés, <i>deoxyribonucleotides triphosphate</i> )               |
| <b>DO</b>          | densidad óptica  |
| <b>EDTA</b>        | ácido etilendiaminotetraacético (Del inglés, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )              |
| <b>enhancer</b>    | potenciador/ intensificador/ activador/ estimulador  |
| <b>FPLC</b>        | cromatografía líquida rápida de proteínas (Del inglés, <i>fast protein liquid chromatography</i> ) |
| <b>gap-filling</b> | relleno o llenado de huecos  |
| <b>GC</b>          | guanina-citosina   |
| <b>gDNA</b>        | ADN genómico (Del inglés, <i>genomic DNA</i> )   |
| <b>Gln</b>         | glutamina  |
| <b>Glu</b>         | ácido glutámico  |
| <b>Gly</b>         | glicina  |

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>His</b>                     | histidina   |
| <b>HRP</b>                     | peroxidasa de rábano picante (Del inglés, <i>horseradish peroxidase</i> )   |
| <b>Ile</b>                     | isoleucina  |
| <b>IMAC</b>                    | cromatografía de afinidad a iones metálicos inmóviles (Del inglés, <i>immobilized metal-ion affinity chromatography</i> ) |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | interferón gama (Del inglés, <i>interferon gamma</i> )  |
| <b>IPTG</b>                    | isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido  |
| <b>kDa</b>                     | kilodaltones  |
| <b>kHz</b>                     | kilohertz o kilohercio, unidad de frecuencia (SI)   |
| <b>Kn</b>                      | kanamicina  |
| <b>LB</b>                      | medio de cultivo Luria-Bertani  |
| <b>Leu</b>                     | leucina   |
| <b>loop</b>                    | bucle o asa   |
| <b>Lys</b>                     | lisina  |
| <b>M</b>                       | Molar   |
| <b>Met</b>                     | metionina   |
| <b>N</b>                       | Normal  |
| <b>ORF</b>                     | marco de lectura abierto (Del inglés, <i>open reading frame</i> )   |
| <b>PBS</b>                     | buffer fosfato salino (Del inglés, <i>phosphate buffer saline</i> )   |
| <b>PCR</b>                     | reacción en cadena de la polimerasa (Del inglés, <i>polymerase chain reaction</i> )                                       |
| <b>PE</b>                      | Pro-Glu   |
| <b>PGRS</b>                    | secuencias repetidas polimórficas ricas en GC (Del inglés, <i>polymorphic GC-rich repetitive sequences</i> )              |
| <b>PM</b>                      | peso molecular  |
| <b>PPD</b>                     | derivado proteico purificado (Del inglés, <i>purified protein derivative</i> )  |
| <b>primer F</b>                | oligonucleótido iniciador directo (Del inglés, <i>primer forward</i> )  |
| <b>primer R</b>                | oligonucleótido iniciador reverso (Del inglés, <i>primer reverse</i> )  |
| <b>Pro</b>                     | prolina   |
| <b>psi</b>                     | libra por pulgada cuadrada (Del inglés, <i>pound per square inch</i> ) 15psi = 1.05 Kg/cm <sup>2</sup>                    |
| <b>PVDF</b>                    | polivinilidenofluoruro  |

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>RNA</b>               | ácido ribonucleico (Del inglés, <i>ribonucleic acid</i> )   |
| <b>RNasa</b>             | ribonucleasa  |
| <b>RNI</b>               | intermediarios reactivos de nitrógeno (Del inglés, <i>reactive nitrogen intermediates</i> )   |
| <b>ROI</b>               | intermediarios reactivos de oxígeno (Del inglés, <i>reactive oxygen intermediates</i> )   |
| <b>rpm</b>               | revoluciones por minuto   |
| <b>SDS-PAGE</b>          | electroforesis de gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (Del inglés, <i>Sodium Duodecil Sulfate-Poliacrilamide Gel Electroforesis</i> ) |
| <b>SI</b>                | Sistema Internacional   |
| <b>Ta</b>                | temperatura de alineamiento/ hibridación (Del inglés, <i>annealing temperature</i> )  |
| <b>TAE</b>               | tris-acetato-EDTA   |
| <b>T<sub>amb</sub></b>   | temperatura ambiente  |
| <b>TB</b>                | tuberculosis  |
| <b>TEMED</b>             | N´N´N´N-tetrametilenodiamina  |
| <b>Tm</b>                | temperatura de fusión (Del inglés, <i>melting temperature</i> )   |
| <b>TNF-α</b>             | factor de necrosis tumoral alfa (Del inglés, <i>tumoral necrosis factor alpha</i> )   |
| <b>Tre</b>               | treonina  |
| <b>Tris-ácido, -base</b> | (hidroximetil)aminometano   |
| <b>Tween 20</b>          | polioxietileno-sorbitan monolaurato   |
| <b>mAU</b>               | unidades de absorbancia   |
| <b>Val</b>               | valina  |
| <b>vortex</b>            | agitador de tubos por vibración circular  |
| <b>W</b>                 | watts o watio, unidad de potencia (SI)  |
| <b>Western-blot</b>      | inmunolectrotransferencia   |
| <b>x g</b>               | gravedades  |
| <b>X-gal</b>             | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidasa   |
| <b>α-6His</b>            | anticuerpo para tallo de His  |
| <b>β-ME</b>              | 2-mercaptoetanol (2-ME)   |
| <b>λ</b>                 | longitud de onda  |

### Caracterización de la proteína PE\_PGRS1 de *Mycobacterium tuberculosis*

La secuenciación del genoma de *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis, reveló la existencia de casi 100 genes que poseen los aminoácidos Prolina y Glutámico (PE), en el extremo N-terminal, al que se le denominó PE. Este dominio está unido a una región rica en residuos de Glicina y Alanina (PGRS). Debido a la composición y estructura de la pared celular de la micobacteria y a la abundancia de proteínas secretadas al medio extracelular, algunas de ellas con motivos LPXTG como proteínas de la subfamilia PE\_PGRS, se ha planteado que estas proteínas podrían ser procesadas por un mecanismo de secreción similar al que presentan algunas bacterias Gram-positivas. La enzima responsable de este mecanismo en *Staphylococcus aureus* es la Sortasa A (SrtA), la cual transloca proteínas del citoplasma para anclarlas a la pared celular. El objetivo de este trabajo fue caracterizar en la proteína PE\_PGRS1 de *M. tuberculosis* H37Rv la presencia del péptido LPNTG, como blanco de reconocimiento y corte específico por la SrtA de *S. aureus*. En este trabajo, se obtuvieron en forma recombinante la proteína PE\_PGRS1 y la enzima SrtA. El gen *pe\_pgrs1* fue amplificado por PCR, clonado en el vector *pET15b* fusionado a un tallo de histidina (6His) y expresado en *Escherichia coli* Rosetta. Las proteínas fueron purificadas por cromatografía de afinidad a níquel, cuantificadas, transferidas a membranas de PVDF e incubadas por *Western-blot* con anti-6His y anti-PE\_PGRS33. Se establecieron las condiciones del ensayo *in vitro* y se evaluó la actividad enzimática específica de la SrtA sobre la PE\_PGRS1. En el ensayo se detectó la presencia del fragmento PE (18.9 kDa) de la PE\_PGRS1 a partir de las 2 h de actividad enzimática con anti-6His y anti-PE33. El péptido LPNTG de la PE\_PGRS1 es blanco de procesamiento específico por la SrtA, ya que al eliminar el Calcio del buffer de reacción, requerido para la actividad de la SrtA, estos fragmentos no son generados. Estos resultados sugieren la posibilidad de la existencia de un sistema de anclaje de proteínas en *M. tuberculosis*, que requiera la actividad de una transpeptidasa con la función de la SrtA de *S. aureus*.

**Palabras clave:** *Mycobacterium tuberculosis*, PE\_PGRS, secreción de proteínas, SrtA, ensayo *in vitro*, actividad enzimática.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Historia de la tuberculosis humana.

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades más antiguas que afectan al género humano, debido a que se piensa que es la causante de las anomalías esqueléticas que han sido reconocidas en los huesos de un hombre neolítico (5000 a. C.) y en cuerpos momificados de tumbas egipcias (3000-2400 a.C.) [1,2]. Recientemente, las secuencias específicas de *DNA* para *Mycobacterium tuberculosis* fueron identificadas en las lesiones de una momia peruana precolombina (1000 a. C.) [3]. Además, los antiguos textos médicos de India y Grecia hacen mención de la TB y los textos mesopotámicos del siglo VII a. C. describen procedimientos para el tratamiento de los tipos pulmonar y linfático de la enfermedad [4].

Clínicamente, la TB fue descrita por Hipócrates (460-370 a. C.) quien aplicó el nombre de *tisis* a esta enfermedad [1,5]. Su permanencia alcanzó proporciones epidémicas durante el siglo XVIII cuando los médicos describieron diferentes formas de TB y su transmisión de persona a persona, pero la capacidad infecciosa de la enfermedad no fue probada sino hasta 1865 [1]. En 1882, Koch inoculó animales con la bacteria que aisló de material humano, probando así, que un agente infeccioso es la causa de la enfermedad [4]. Además, en 1890 descubrió la tuberculina, proteínas obtenidas del medio de cultivo de la bacteria, la cual fracasó como una posible vacuna contra la TB y que actualmente es utilizada como una prueba diagnóstica efectiva [4,5] (**Figura 1**). Hasta entonces tres hechos esenciales eran conocidos en la TB: la clínica, la anatomía patológica y la bacteriología, que posteriormente junto con la aplicación del descubrimiento de Röntgen en 1898, el radiodiagnóstico, conformaron los cuatro pilares de la *tisiología* [5].



**Figura 1. Koch y la tuberculina.** Fotografía de Hermann Heinrich Robert Koch (1843-1919) [izq] y la prueba de la tuberculina (PPD) [der]. El 24 de marzo de 1882 ante la Sociedad de Fisiología de Berlín, en su presentación “*Die Aetiologie der Tuberculose*” dio a conocer su sensacional descubrimiento, desde entonces en esa fecha se celebra cada año el Día Mundial de la Tuberculosis. Figura tomada y modificada de [6].

En 1908, Mantoux modificó la forma de aplicar la tuberculina de manera cutánea a intradérmica y en 1941, Seibert propuso el empleo del derivado proteico purificado (PPD, por su sigla en inglés) como un método estándar de diagnóstico de la TB [5]. Los descubrimientos de la estreptomycin en 1944, el ácido para-amino salicílico en 1946 y la isoniazida en 1952 dieron lugar a la primera cura efectiva de la TB [7]. En 1960, Riley y Stead realizaron descripciones de la transmisión aérea de la infección y de la reactivación de la infección latente, lo cual amplió el conocimiento de la epidemiología y la patogénesis de esta enfermedad [7].

Hoy en día, la TB no se manifiesta en niveles epidémicos, pero continúa siendo un problema médico en ciertos ambientes [8]. La causa más probable de su incremento, ha sido el aumento en el número de personas infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV, por su sigla en inglés), así como la aparición de bacterias drogo-resistentes [8,9]. La infección por HIV promueve la reactivación de una infección TB previa o la susceptibilidad a una infección TB primaria [9]. Cuando el tratamiento de la TB es inadecuado o se interrumpe, resulta favorecida la manifestación de resistencias adquiridas a los medicamentos antituberculosos [9].

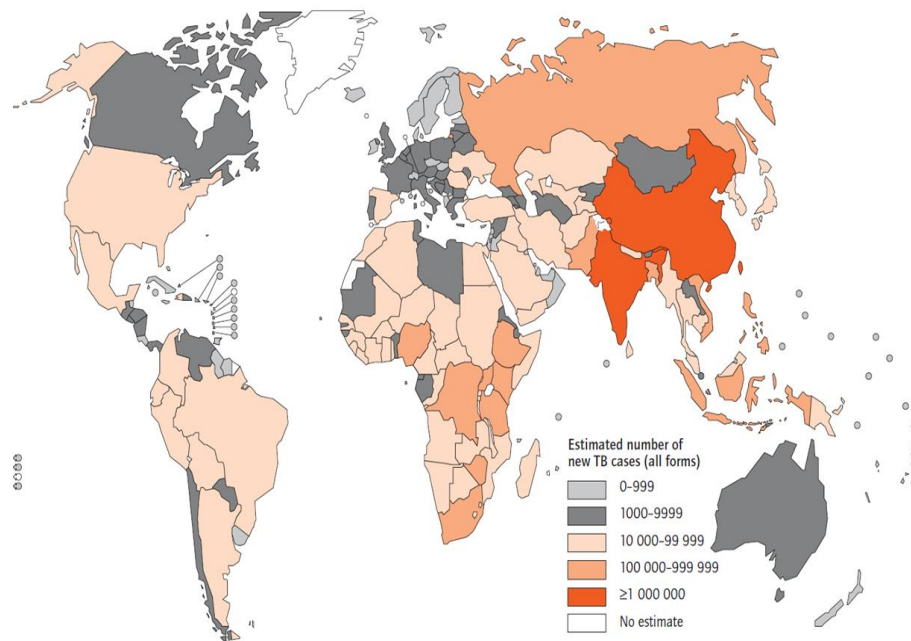
## 1.2 Epidemiología de la tuberculosis humana.

La TB es una enfermedad infecciosa causada por un sólo agente del complejo homónimo *Mycobacterium tuberculosis*, en donde también se encuentran *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium microtti* y *Mycobacterium pinnipedii* [1]. Se ha reportado que es responsable de un estimado de 2.5 millones de muertes por año y existen de 7 a 8 millones de nuevos casos anuales en todo el mundo [1,10]. En 2007, la Organización Mundial de la Salud (WHO, por su sigla en inglés) reportó que el número estimado de nuevos casos de TB fue de 9.27 millones comparado con los 9.24 millones de casos en 2006 [11]. Con este dato la tasa de



incidencia se estimó alrededor de 139 por cada 100,000 personas (**Figura 2**) y de estos nuevos casos un estimado del 44% o 4.1 millones (61 personas por cada 100,000) están secretando *M. tuberculosis* capaz de infectar a más personas [11,12]. Además en el mismo año, la *WHO* estimó 13.7 millones de casos prevalentes y 1.3 millones de defunciones, sin incluir las 456,000 muertes por TB asociada a la infección por el *HIV* y los 0.5 millones de casos multi-resistentes [12].

Diferencias en la epidemiología de la TB son observadas entre las naciones en vías de desarrollo y las industrializadas. En países donde el nivel de vida es bajo y los recursos de salud son escasos, el riesgo reciente de la infección es alto y el 80% de los casos involucran personas en su edad productiva (15-59 años) [7,13]. Por otro lado, en países económicamente desarrollados donde se ha registrado que disminuye progresivamente la incidencia de la TB, el riesgo anual de la infección es bajo [7,13]. Contrario a lo esperado, ningún país ha alcanzado la fase de eliminación y en ningún sector de la sociedad se puede decir, con certeza, que la TB ha sido erradicada [8]. La mayoría de los casos de TB se originan como resultado de una reactivación endógena de la enfermedad durante la vejez (igual o mayor a los 65 años de edad) de infecciones adquiridas en edades tempranas y la actividad de la enfermedad se manifiesta en pacientes jóvenes, usualmente en minorías raciales y étnicas, o asociados a la infección por *HIV* [7,13].



**Figura 2. Número de nuevos casos de tuberculosis humana en todas sus formas a nivel mundial.** En el mapa se muestran los intervalos del número estimado de nuevos

casos de TB a la *WHO* por 196 países o territorios en el año 2007. En estos países vive el 99.7% de la población mundial. Figura tomada y modificada de [12].

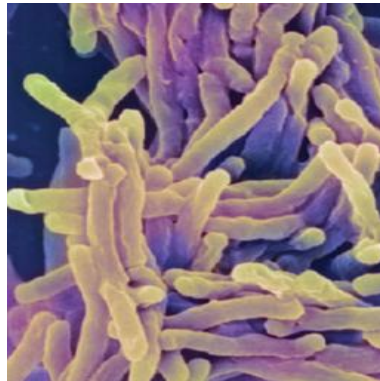
La TB es un problema de salud pública mundial y México no es la excepción. De acuerdo con la información disponible en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) la incidencia de esta enfermedad ha disminuido, aunque la TB continúa presentándose con más de 17 mil casos nuevos y cerca de dos mil defunciones cada año, lo que representa una importante pérdida de años potenciales de vida productiva y por consiguiente, un obstáculo para el desarrollo socioeconómico del país [14]. La TB sigue siendo más frecuente en los varones (razón hombre: mujer 1.5:1), aunque varía de un estado a otro, lo que puede deberse a factores sociales y de comportamiento, ya que en la edad pediátrica prácticamente no existe diferencia (razón 1.1:1, respectivamente) [15].

En lo referente a mortalidad en México, en 2006 se registró una tasa de 1.8 por cada 100,000 habitantes (1,896 defunciones) lo que refleja una disminución importante respecto a 1997, cuando se registraron 3,663 defunciones (tasa de 3.9) [15]. De acuerdo a su distribución geográfica, las entidades federativas con el mayor número de defunciones por TB pulmonar fueron Baja California (234), Chiapas (204), Veracruz (168), Jalisco (120) y Nuevo León (120) que, en conjunto, concentran el 45% de las defunciones [15]. Por otro lado, las localizaciones extrapulmonares frecuentes de la TB en México son la ganglionar (5%), intestinal y peritoneal (1.5%), miliar (<1%) y meníngea (<1%), estas dos últimas presentaciones de TB representan las formas de la enfermedad de mayor gravedad [5,15].

### 1.3 Patogenia e inmunidad de la tuberculosis humana.

La TB, como toda enfermedad infecto-transmisible, es el resultado de la triada epidemiológica y de las relaciones establecidas entre sus elementos: el agente, el hospedero y el ambiente [5]. *M. tuberculosis* es el agente infeccioso de la TB, con forma de bacilo curvo, ligero y delgado de 1–4 µm de largo por 0.4–0.8 µm de ancho, que es aerobio facultativo [5,7] (**Figura 3**). Pertenece al complejo *M. tuberculosis*, Género *Mycobacterium*, Familia *Mycobacteriaceae*, Suborden *Corynebacterineae*, Orden *Actinomycetales*, Subclase *Actinobacteridae*, Clase *Actinobacteria* y División *Actinobacteria* [16]. Los actinomicetos son bacterias Gram-positivas con un alto contenido de nucleótidos G + C en

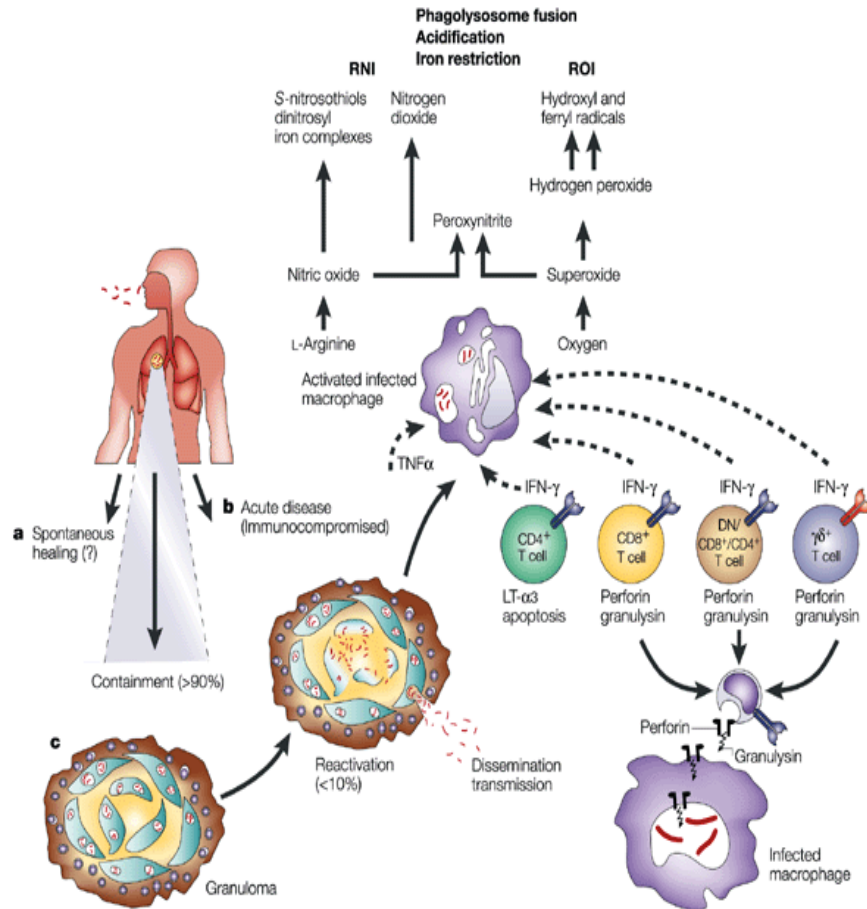
su *DNA*, tienen un conjunto de características morfológicas que comprenden desde especies que se dividen por fisión binaria, como *Corynebacterium spp.*, hasta especies con envoltura celular inusual y algunas ramificadas, como son *Mycobacterium spp.* y *Nocardia spp.*, así como especies altamente ramificadas y filamentosas como *Streptomyces spp.* [17]. En comparación con otras bacterias Gram-positivas, *M. tuberculosis* tiene una pared celular con un alto contenido de lípidos, capaz de retener colorantes aún después del tratamiento con soluciones ácido-alcohólicas, por lo que se conoce como bacilo ácido-alcohol resistente [5,7].



**Figura 3. El agente de la tuberculosis.** El bacilo tuberculoso, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Figura tomada y modificada de [18].

*M. tuberculosis* se transmite vía aérea por partículas pequeñas que son producidas cuando las personas con TB pulmonar y laríngea, tosen, estornudan o hablan, la infección ocurre cuando una persona susceptible inhala estas partículas que contienen a los bacilos tuberculosos [9]. El órgano blanco de la enfermedad es el pulmón, en el que los bacilos son fagocitados por macrófagos alveolares como primer paso de la entrada celular [5,13]. Si los macrófagos no destruyen o inhiben la multiplicación, se convierten en el nicho donde se reproduce esta bacteria [13]. Los macrófagos infectados y los monocitos circulantes secretan enzimas proteolíticas generando una lesión exudada, la activación de los fagocitos mononucleares influye en la formación de un granuloma en el tejido pulmonar con la posible activación de las células T [9,13]. Esta activación da lugar al ataque de inmunidad mediada por células, la producción de citocinas son responsables no sólo para el control o progresión de la enfermedad, sino también de la patogenicidad de la infección [9,13]. Finalmente, los granulomas pueden perder la barrera que los limita y abrirse a los espacios alveolares, descargar su

contenido y éste ser expulsado por las vías respiratorias altas al ambiente y en las secreciones denominadas esputos, cerrando así el ciclo de la enfermedad [5] (Figura 4).



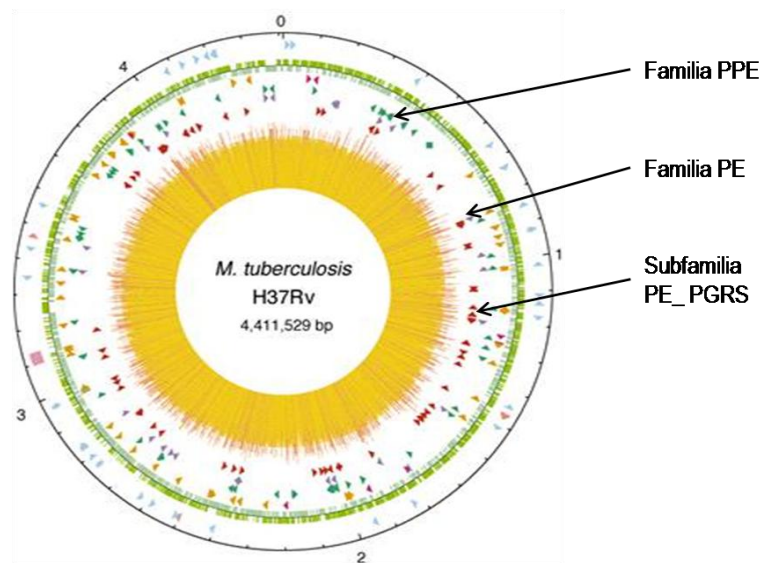
**Figura 4. Características principales de la tuberculosis desde la infección hasta la defensa del hospedero.** Existen tres posibles efectos de la infección del hospedero humano por *M. tuberculosis* (MTB). **a)** La frecuencia de la infección fallida, que resulta en la cura espontánea, es desconocida pero se asume que es mínima. **b)** En el hospedero inmunocomprometido, la enfermedad puede desarrollarse directamente después de la infección. **c)** En la mayoría de los casos, las micobacterias son contenidas inicialmente y la enfermedad se desarrolla más tarde como resultado de una reactivación. El granuloma es el sitio de la infección, persistencia, patología y protección. Las células T efectoras (incluyendo las CD4+ y CD8+ convencionales, y las no convencionales, como las células T  $\gamma\delta$ , y las doble-negativas o CD4/CD8 positivas que reconocen al antígeno) y los macrófagos participan en el control de la TB. El interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), producidos por las células T, son importantes para activar a los

macrófagos. Ésta permite la maduración fagosomal y la producción de moléculas antimicrobianas como los Intermediarios Reactivos de Nitrógeno (*RNI*) e Intermediarios Reactivos de Oxígeno (*ROI*). LT- $\alpha$ 3, linfotoxina- $\alpha$ 3. Figura tomada y modificada de [10].

#### 1.4 Secuencia del genoma de *Mycobacterium tuberculosis*.

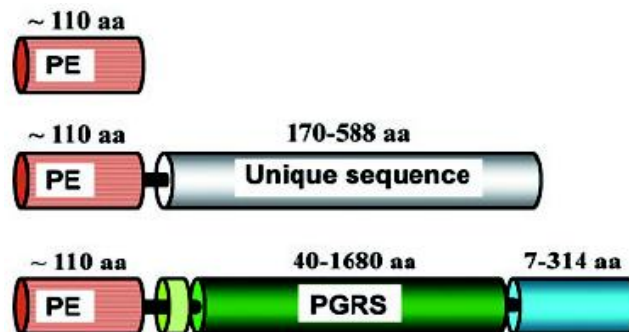
Los miembros del complejo *M. tuberculosis* presentan el 99,95% de identidad genómica entre sí [16]. En los genomas completos de algunos de ellos, como son *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* H37Rv, entre otros, se encontró un par de familias de genes redundantes que ocupan porcentajes importantes en relación con el número de genes (cerca del 10%) y con la longitud de las secuencias codificantes dedicadas a éstos (más del 4% del total de proteínas) [5,16,19]. Estas familias han sido denominadas PE (Pro-Glu) y PPE (Pro-Pro-Glu), ambas se encuentran sobre-representadas en los genomas de micobacterias patógenas integrantes de este complejo [5,19].

La cepa *M. tuberculosis* de laboratorio H37Rv fue aislada por primera vez en 1905, es patógena y ampliamente usada en la investigación de la TB [20]. Con la secuenciación y anotación del genoma de esta cepa se reveló la existencia de casi 100 genes que contienen una secuencia altamente homóloga con los aminoácidos (aa) Pro y Glu (PE) en las posiciones 8 y 9 [20-22]. Estas secuencias codifican para proteínas de alrededor de 110 aa de su extremo amino denominado dominio PE y que por su estructura genómica pueden ser subdivididas en tres clases [20-22] (**Figura 5**).



**Figura 5. Mapa circular del cromosoma de *M. tuberculosis* H37Rv.** El círculo exterior muestra la escala en Mb (Mega bases), con el cero representando el origen de replicación. Las flechas indican: miembros de la familia PPE [cuarto anillo], miembros de la familia PE (excluyendo PGRS) [quinto anillo] y secuencias PGRS [sexto anillo]. El histograma [centro] representa el contenido G + C. Figura tomada y modificada de [22].

La clase I está compuesta por 29 proteínas que contienen únicamente el dominio PE (subfamilia PE), la clase II con 8 proteínas donde el dominio PE incluye una región C-terminal con una secuencia única de 400 aa en promedio (subfamilia PE de secuencia única) y en la clase III con 67 miembros presentes en *M. tuberculosis* H37Rv, el dominio PE se encuentra unido a un dominio en el C-terminal, rico en residuos de glicina (Gly~40%) y alanina (Ala-25%), que es una secuencia repetida polimórfica de longitud variable [5,20,21]. Este dominio ha sido referido como “secuencias repetidas polimórficas ricas en GC” (PGRS, por su sigla en inglés) con la secuencia consenso repetida CGGCGGCAA y el nombre “PE\_PGRS” es usado para los miembros de esta subfamilia con aproximadamente 1900 aa, de los cuales más del 50% puede ser Gly [19,20,23] (Figura 6). Las proteínas PE\_PGRS no sólo se encuentran en *M. tuberculosis* sino también en otras micobacterias patógenas, como *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, *M. bovis* y de forma específica, en *Mycobacterim leprae* se encontró un número importante de secuencias PE\_PGRS en forma de pseudogenes [19,23]. Esto sugiere que probablemente estas proteínas están relacionadas con la sobrevivencia de la micobacteria dentro de su hospedero [19].



**Figura 6. Familia de proteínas PE de *M. tuberculosis* H37Rv.** Clasificación de la familia de proteínas PE: subfamilias PE, PE de secuencia única y PE\_PGRS (con repeticiones de residuos -GGA- y -GGN-). Figura tomada y modificada de [22].

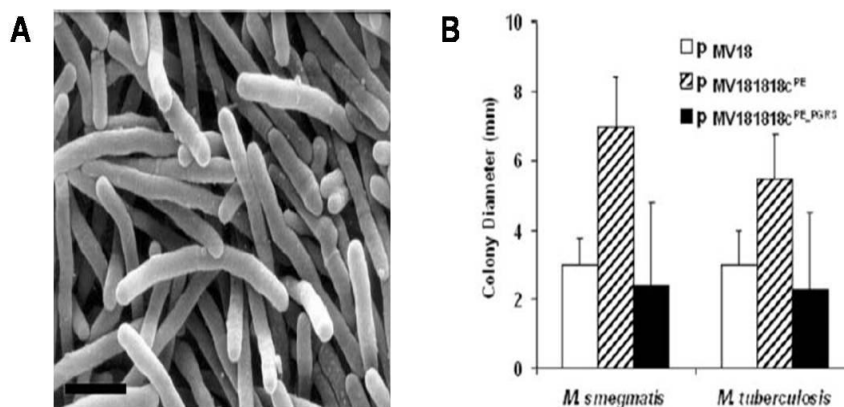
Las funciones de las proteínas de la familia multigénica PE es un área de intenso interés en la investigación de la patogenia de la TB [24]. La abundancia de genes muy similares en las micobacterias sugiere que los productos de esos genes desempeñan una función importante en la homeostasis de la célula micobacteriana o como auxiliar en la sobrevivencia del organismo en el ambiente del hospedero [20]. Al analizar comparativamente diferentes cepas secuenciadas de micobacterias miembros del complejo *M. tuberculosis* entre ellas, *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG, se han encontrado eventos de inserción y delección, asociados principalmente al dominio PGRS [24]. Lo anterior sugiere que las proteínas PE\_PGRS podrían funcionar como posibles fuentes de variación antigénica entre los distintos miembros de este complejo [24]. Con la notable redundancia de las proteínas PE\_PGRS en *M. tuberculosis* y la presencia de estas proteínas en otras especies patógenas relacionadas, como *Mycobacterium ulcerans* y *M. marinum*, se ha sugerido que pueden desempeñar una importante función inmunológica en *M. tuberculosis* [24,25]. Evaluando la respuesta inmune inducida por la proteína PE\_PGRS33 y el dominio PE33 por separado, durante la infección por *M. tuberculosis* en un modelo murino, se confirmó que la respuesta inmune humoral está dirigida hacia epítopes o determinantes antigénicos (regiones de una proteína que son reconocidas por anticuerpos) localizados en el dominio PGRS de la proteína completa [25]. Por otra parte, sólo la reestimulación *in vitro* de esplenocitos murinos inmunizados con el PE33, generó la secreción de IFN- $\gamma$ , sugiriendo que éste induce una respuesta inmune celular efectiva [25].

Las técnicas de genómica y proteómica son ampliamente aplicadas al estudio de *M. tuberculosis* y proveen información clave relacionada con el reconocimiento inmune, las vías metabólicas, la regulación global y la localización de las proteínas [26]. Tal es el caso de las proteínas PE\_PGRS a las que se les atribuye una posible función estructural, lo cual no ha sido posible demostrar de forma contundente. Recientemente en *M. tuberculosis* H37Rv se ha identificado la Wag22, proteína de la subfamilia PE\_PGRS, en el filtrado de cultivo de bacterias cultivadas por 3 semanas en medio Sauton y la PE\_PGRS56 en la fracción de membranas de cultivos de 2 semanas en medio GAS [5].

### **1.5 Localización celular de las proteínas PE\_PGRS de *Mycobacterium tuberculosis*.**

La asociación de los dominios PE con las repeticiones de Gly y Ala en el dominio PGRS de las proteínas PE\_PGRS podría modular la estabilidad del dominio PE y explicar el porqué estas

regiones se encuentran con frecuencia unidas a los dominios PGRS [20]. El análisis de la proteína PE\_PGRS33 mostró que el dominio PE es necesario para la localización en la pared celular de la micobacteria, además la PE\_PGRS completa, y no el dominio PE, afecta la forma de la bacteria y la morfología de la colonia cuando el gen *pe\_pgrs33* (*Rv1818c*) está sobreexpresado en *M. tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis* [24]. La sobreexpresión de este gen causa un significativo cambio en el tamaño celular de 1.5-2  $\mu\text{m}$  hasta 6-10  $\mu\text{m}$  de largo y en el tamaño de la colonia, siendo menor que los controles, en ambos casos [24] (**Figura 7**). De este estudio se obtuvo una consistente observación de que esta proteína se localiza en la superficie celular y que podría ser un componente estructural de la pared celular [24,27]. Uniendo los dominios, los resultados indican que las proteínas PE\_PGRS y PE pueden estar asociadas a la pared celular de la micobacteria e influir en la estructura celular, así como en la formación de las colonias micobacterianas [24].

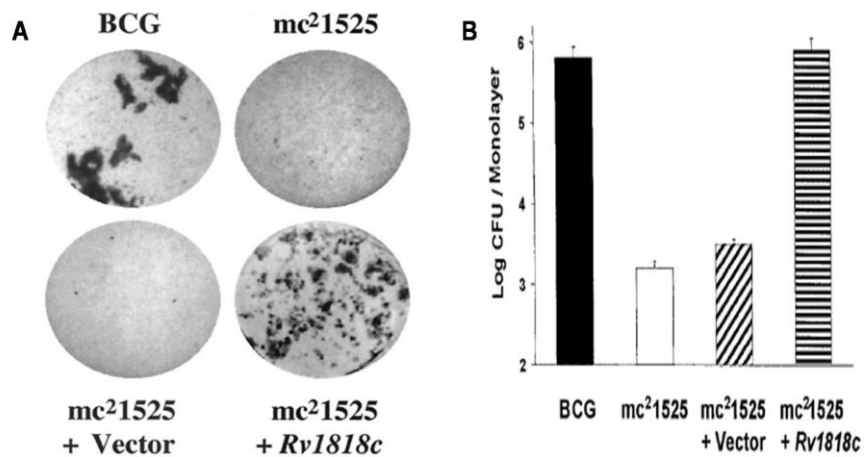


**Figura 7. Efecto de la sobreexpresión del gen *pe\_pgrs33* sobre la morfología micro- y macroscópica en micobacterias. A)** Análisis por microscopía electrónica de la cepa recombinante *M. tuberculosis* pMV1818cPE\_PGRS. La imagen muestra la cepa recombinante sobreexpresando el gen *pe\_pgrs33*, crecida en medios sólido por más de 26 días. Escala 2  $\mu\text{m}$  (esquina inferior izquierda). **B)** Efecto sobre la morfología de la colonia resultado de la sobreexpresión de la PE\_PGRS33 y PE33. El diagrama muestra el diámetro de la colonia en *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* crecidas en medio sólido por 7 y 30 días, respectivamente. Figuras tomadas y modificadas de [24].

En otro estudio, se demostró que la inserción de un transposón (secuencia de ADN que puede moverse por sí misma a diferentes partes del genoma) del gen ortólogo *pe\_pgrs33* encontrado en *M.*



*bovis* BCG Pasteur, induce el crecimiento disperso y una reducción de la infección de macrófagos [28]. Al complementar esta mutante con el gen silvestre, se restauró tanto el crecimiento aglutinado como la infectividad de macrófagos. Estas evidencias sugieren que algunas proteínas PE\_PGRS pueden ser expresadas por las micobacterias y podrían estar localizadas en la superficie celular, donde pueden influir en las interacciones entre micobacterias y de éstas con macrófagos [28] (**Figura 8**). El análisis por *Western-blot* utilizando antisuero contra la proteína PE\_PGRS33, mostró que las proteínas PE\_PGRS se encontraron en lisados celulares de *M. bovis* BCG Pasteur y *M. tuberculosis* H37Ra y en la fracción de la pared celular de *M. tuberculosis* H37Rv [28]. Estudios con marcaje fluorescente de micobacterias, indican que ciertas proteínas PE\_PGRS pueden estar localizadas en la superficie celular de *M. bovis* y *M. tuberculosis* [28]. Tomando juntos los resultados anteriores, se ha propuesto que proteínas PE\_PGRS influyen en las interacciones de la superficie celular entre las micobacterias y de las micobacterias con macrófagos [28].



**Figura 8. Efecto de la ausencia del gen *pe\_pgrs33* en el crecimiento fenotípico de *M. bovis* y su infectividad a macrófagos. A)** Comparación de los patrones de crecimiento fenotípico de la línea BCG-Pasteur, la mutante mc<sub>2</sub>1525, la mutante mc<sub>2</sub>1525 transformada sólo con el vector pMV1-18 y la mutante mc<sub>2</sub>1525 transformada con el vector pMV1-23 que incluye al gen *pe\_pgrs33* (*Rv1818c*). Cultivos de UFC similar en medio 7H9 e incubado a 36°C por 12 días. **B)** Comparación de la infección de la línea celular de macrófagos J774 por BCG-Pasteur, la mutante mc<sub>2</sub>1525, la mutante sólo con el vector y la mutante mc<sub>2</sub>1525 con el gen *pe\_pgrs33* (*Rv1818c*). Incubadas con 2 x 10<sup>5</sup> células por monocapa durante 4 h. Figuras tomadas y modificadas de [28].

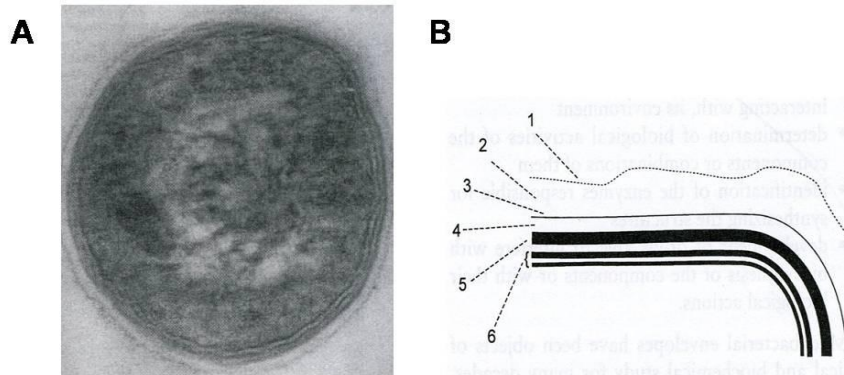
A partir de lo anterior, se cree que las proteínas PE\_PGRS también contienen un supuesto dominio transmembranal, lo cual sugiere que éstas pueden estar insertadas en la pared celular de la micobacteria [28]. Se ha demostrado que el dominio PE de la proteína PE\_PGRS33 y la PE11 (una proteína constituida por el dominio PE únicamente) contienen la información necesaria para su localización en la pared celular y pueden ser usadas en fusiones N-terminal para exponer dominios de proteínas unidos a extremos C-terminal en la superficie celular de micobacterias [29]. Asimismo, se demostró que la PE\_PGRS33 y la Rv3097c (una lipasa perteneciente a la familia PE) están expuestas en la pared celular de *M. smegmatis* [29]. Además, se descubrió que la PE\_PGRS33 es fácilmente extraíble por detergentes, sugiriendo su localización en la membrana externa de la micobacteria [29]. Más allá de determinar la localización de la proteína PE\_PGRS y la función de sus dominio PE, esta información permite la posibilidad de construir micobacterias recombinantes que expresen antígenos heterólogos (antígenos provenientes de otras especies) superficiales para la generación de vacunas contra la TB [29].

### 1.6 Estructura de la envoltura celular de *Mycobacterium tuberculosis*.

En general, las envolturas bacterianas son esenciales para dar protección y soporte celular y también presenta mecanismos que permiten o impiden, el transporte de sustancias entre la célula bacteriana y su ambiente [30]. En patógenos, proveen la inter-fase vital entre la bacteria y el hospedero, resistiendo los mecanismos destructivos y probablemente modificando el comportamiento de las células del hospedero a favor de la bacteria [31]. Existen similitudes notorias entre las envolturas de la mayoría de las bacterias, por lo que la principal división estructural es entre especies Gram-positivas y Gram-negativas, que es dada por una tinción diferencial basada en las variaciones constitutivas de sus paredes celulares [31]. *M. tuberculosis* y otras micobacterias están clasificadas biológicamente como Gram-positivas (no se tiñen como tales), aunque presentan algunas características distintivas [31,32].

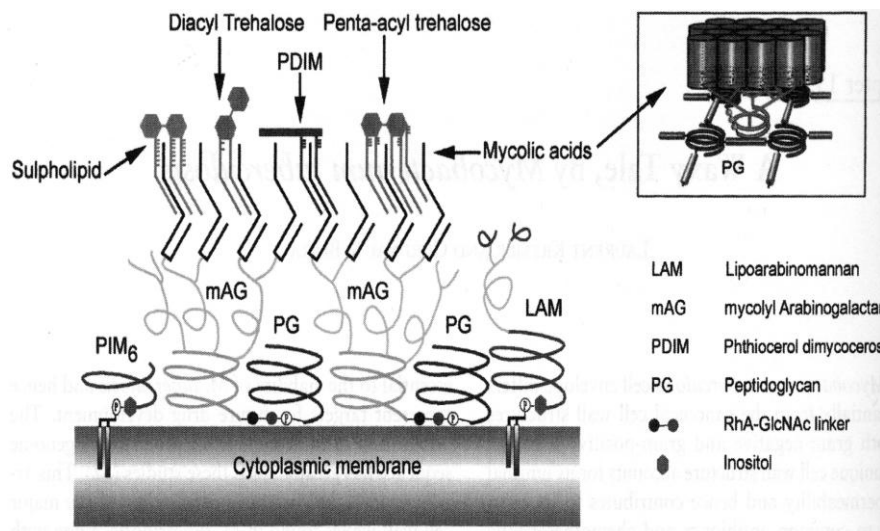
La envoltura celular de *M. tuberculosis* (Figura 9) es esencial para controlar la forma del crecimiento celular, su sobrevivencia dentro del hospedero y la respuesta inmunológica [32], tanto en la protección de forma pasiva, por su habilidad de evitar o reponerse al daño del hospedero y de forma activa, por poseer los componentes responsables de modificar las propiedades y el desarrollo

de las vacuolas que origina el hospedero para residir dentro de ellas [31,33]. La envoltura celular es una barrera permeable por donde atraviesan la mayoría de las drogas antibacterianas, los factores de virulencia y los antígenos protectores, por lo que se requiere del conocimiento de los mecanismos de secreción a través de ésta, dada su naturaleza inusual y la evidente importancia de su éxito como micobacteria patógena [31,34].



**Figura 9. Envoltura celular de *M. tuberculosis*.** **A)** Micrografía electrónica de sección ultrafina de la cepa del complejo de *M. tuberculosis*, con las tres estructuras principales: membrana citoplasmática, pared celular y cápsula. **B)** Diagrama de la estructura de la envoltura: 1, posición de los lípidos superficiales de la cápsula; 2, cápsula compuesta principalmente de polisacáridos y proteínas; 3, posición de los lípidos internos de la cápsula; 4, capa de ácidos micólicos (probablemente incluye otros lípidos); 5, peptidoglicanos y arabinogalactanos (arreglo no establecido); 6, triple capa de la membrana, con la capa externa más gruesa (en micrografías electrónicas) que la capa interna. Figura tomada y modificada de [31].

La envoltura celular de las micobacterias está compuesta por una membrana citoplasmática y una pared celular (**Figura 10**). En ésta última, la parte interna está compuesta por ácidos micólicos (m) anclados a arabinogalactanos (AG), los cuales están unidos covalentemente a peptidoglicanos (PG) (este complejo se conoce como MAPc) y la parte externa por una capa lipídica compuesta por lípidos libres y ácidos micólicos, que reunidos forman una pseudocapa [35-37]. Además, existe evidencia de que *M. tuberculosis* acumula una cápsula alrededor de ésta, que está compuesta de proteínas y polisacáridos con una menor cantidad de lípidos, así como una gran cantidad de sustancias asociadas a esta estructura, la mayoría lípidos y glicolípidos [31].



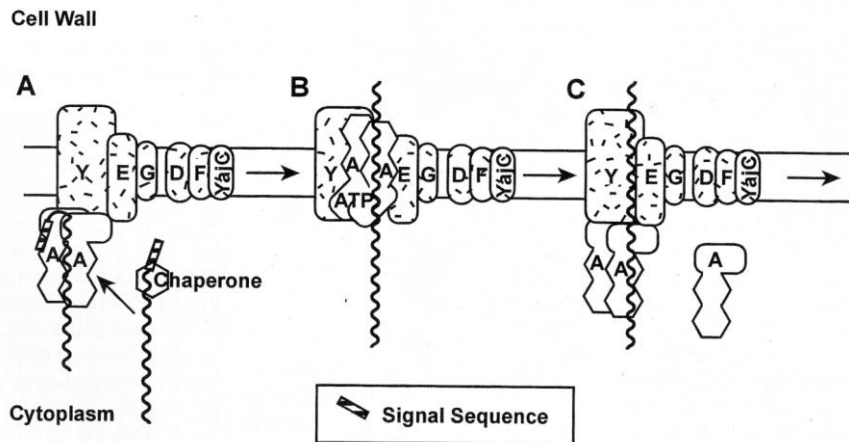
**Figura 10. Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*.** Los tres constituyentes principales son ácidos micólicos (m), arabinogalactanos (AG) y peptidoglicanos (PG); además de lipoarabinomananos (LAM), phthiocerol dimycocerosato (PDIM), unión Rha-GlcNAc e inositol. Figura tomada y modificada de [35].

### 1.7 Secreción de proteínas en *Mycobacterium tuberculosis*.

Las proteínas expresadas por las bacterias pueden clasificarse, de acuerdo a su localización celular, en I) citoplásmicas, II) exportadas y III) secretadas [34]. Las II y III son translocadas a través de la membrana citoplásmica, la diferencia radica en que las II se asocian total o parcialmente a cualquier parte de la envoltura celular (membrana o pared) y las III son transportadas a través de ésta y liberadas al medio [28,34].

De manera general en este trabajo, se aplicará el término “secreción” para denominar al mecanismo de transporte a través de la envoltura celular de ambos tipos de proteínas.

La elucidación de la secuencia genómica de *M. tuberculosis* demuestra que dicho organismo posee los elementos requeridos para la translocación de proteínas por la vía Sec-dependiente, la cual reconoce secuencias que contienen un péptido señal (secuencia de aminoácidos relativamente corta, que conduce a la proteína que la contiene a una determinada localización en la célula) en el N-terminal y las transporta a través de la membrana citoplásmica [34] (Figura 11).



**Figura 11. Modelo para la translocación de proteínas por la vía Sec-dependiente.** A) Un precursor de proteína con un péptido señal N-terminal, es reconocido por una chaperona y llevado a la membrana y al dímero SecA asociado a SecYEG. B) La unión del ATP al SecA permite la inserción de SecA y la unión del precursor a través de la membrana. Después de esta inserción, la peptidasa señal asociada a la membrana (*no mostrada*) puede retirar proteolíticamente el péptido señal. C) Se produce la hidrólisis de ATP, SecA se libera de la membrana y la proteína translocada permanece asociada a SecYEG en un estado parcial translocado. Figura tomada y modificada de [34].

La primera evidencia de la existencia de esta vía en micobacterias, fue el reconocimiento de una señal de péptidos en el N-terminal en secuencias de aminoácidos predichas de proteínas exportadas y secretadas de *M. tuberculosis* [34]. Otra evidencia fue la identificación de factores secretores homólogos, entre ellos, los que corresponden al factor SecA de *Escherichia coli*, nombrados SecA1 y SecA2 [34]. Estos factores contienen motivos (secuencias conservadas asociadas a características funcionales) de unión a ATP y cada uno desempeña una función específica en el proceso [34]. El único factor que aparentemente falta en *M. tuberculosis* es SecB, aunque su ausencia no es extraña debido a que sólo ha sido identificado en bacterias Gram-negativas, además los factores homólogos SecA carecen del sitio de unión a SecB [34]. En el caso de *E. coli*, SecB sólo participa en la translocación de un subgrupo de proteínas exportadas, lo cual permite suponer que *M. tuberculosis* emplea otras chaperonas para translocar a proteínas blanco [34].

El sistema de secreción propuesto para proteínas que no presentan un péptido señal, como los antígenos ESAT-6 y CFP-10, se ha designado ESX-1 y forma parte de los cinco sistemas de

secreción tipo VII (nombrado de acuerdo a la nomenclatura convencional) que se presentan principalmente en micobacterias [38]. Los sistemas ESX-1 y ESX-5 están involucrados en la virulencia de estas bacterias y han sido analizados con mayor detalle en *M. tuberculosis* [38]. Tanto el dímero ESAT-6-CFP-10 como las proteínas PE y PPE comparten la característica de ser secretadas sin poseer una señal de secreción clásica, por lo que se han sometido a estudios que exhiban su secreción por esta vía [38]. Por ejemplo, en un estudio de *Abdallah y colaboradores* en el año 2009, demostraron que el sistema de secreción ESX-5 es responsable del transporte y secreción de varias proteínas PPE y PE\_PGRS en *M. marinum*, lo cual es posible que suceda en *M. tuberculosis*, sin embargo las proteínas extracelulares que fueron identificadas en ese estudio no presentan ortólogos en este patógeno [39]. Además, en otro estudio del mismo año *Carlsson y colaboradores* mostraron evidencias de que el sistema de secreción ESX-1 se localiza en los polos de la micobacteria, principalmente en las zonas de síntesis activa de la pared celular, lo mismo ha sido observado en los tipos de secreción III y IV, utilizados por bacterias patógenas Gram-negativas [40]. Lo anterior supone que la secreción polarizada es una característica común de los patógenos y que podría ser una relación funcional entre el sitio de secreción y la dinámica del crecimiento de la pared celular de manera general para bacterias Gram-positivas, incluidas las micobacterias [40].

La información acerca del mecanismo por el cual las proteínas son transportadas a través de la pared celular de las micobacterias continúa siendo limitada y lo que se ha contemplado es que la estructura de la pared de *M. tuberculosis* podría representar un obstáculo para la secreción de ciertas proteínas sin péptido señal [34]. Sin embargo, es posible que las proteínas traspasen esta barrera por medio de transportadores ABC o por difusión, a través de porinas descritas para *Mycobacterium spp.*, aunque esto ha sido rechazado para proteínas porque estos mecanismos sólo han sido demostrados en el transporte de moléculas pequeñas [34,35]. A pesar de este escenario, ha sido reportado un número considerable de proteínas de *M. tuberculosis* localizadas en el medio extracelular, por ejemplo las lipoproteínas PstS (Rv0932c), PhoS1 (Rv0934) y PhoS2 (Rv0928), que contienen péptidos señal de lipoproteína, las cuales son homólogas de la proteínas periplásmica no lipídica de *E. coli*, PstS [34]. Se han estudiado otras proteínas de *M. tuberculosis* con péptido señal, las cuales se conoce que son exportadas o secretadas, tal es el caso del complejo antígeno 85 (tres micoliltransferasas de unión a fibronectina), antígenos CFP (17, 21 y 25) y MPT (51, 53, 63, 64 y 70), lipoproteínas de 19-kDa y de 24-kDa, por mencionar algunas [34].

Debido a esta situación, se ha planteado que en *M. tuberculosis* podría existir un mecanismo de secreción a través de la pared celular similar al que presentan algunas bacterias Gram-positivas [41]. Este mecanismo está relacionado con la presencia del motivo LPXTG (leucina/Leu, prolina/Pro, X, treonina/Tre y glicina/Gly, donde X puede ser cualquier aminoácido) en algunas proteínas de la micobacteria [34]. Este motivo es reconocido y cortado por la enzima Sortasa A (SrtA) de *S. aureus* durante el mecanismo de anclaje de proteínas superficiales a la pared celular y ha sido reportado en otras bacterias Gram-positivas como *Actinomyces naeslundii*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, entre otras [41]. Mediante un alineamiento múltiple de secuencias (MSA, por su sigla en inglés) de las 63 proteínas PE\_PGRS reportadas en la literatura [19], se encontró en 30 de ellas el motivo LPXTG, aproximadamente en la región de unión entre los dominios PE y PGRS (Figura 12).

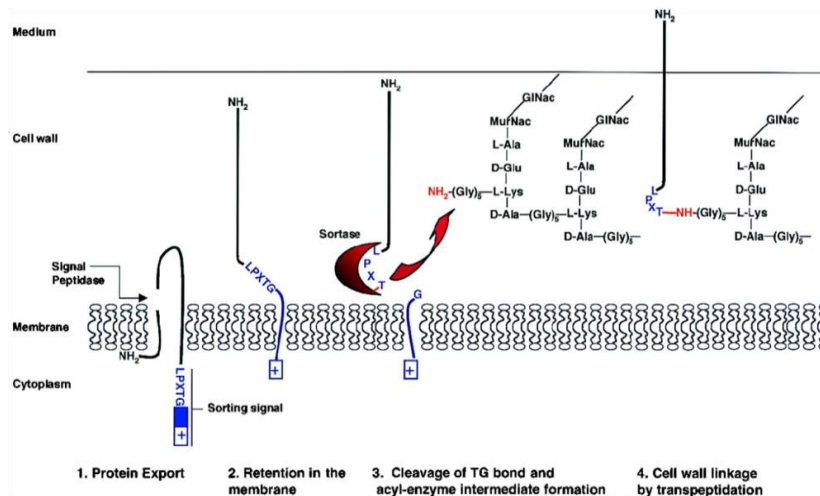
|   |           |   |
|---|-----------|---|
| → | PE_PGRS1  | GRPLIIGNGANGLEPNTGQDGGPGGLLFCNGGNGSSGGVD-----QAGNGGAAGLIG 51    |
|   | PE_PGRS31 | GRPLIIGNGANGLPGTGQNGGDGGILYNGGNGSSGGVN-----QAGNGGNAGLWG 51      |
|   | PE_PGRS14 | GRPLIIGNGTNGAPGTGQAGGPGGWLWNGGNGSSGAPG-----QTGGAGGAAGLIG 51     |
|   | PE_PGRS24 | GRPLIIGNGANGAPGTGQAGGAGLLYNGGAGSSGAPG-----QAGGPGGAAGLFG 51      |
|   | PE_PGRS3  | GRPLIIGNGANGAPGTGANGGDGGWLIWNGGAGSSGAAGVNGGAGNGGAGNGGAGGLIG 60  |
|   | PE_PGRS4  | GRPLIIGNGTNGAPGTGANGGDGGWLIWNGGAGSSGAAGVNG-----GAGNGGAGGLIG 54  |
|   | PE_PGRS10 | GRPLIIGNGANGAPGTGANGGPGWLIWNGGAGSSGAPGA-----GAGNGGAGGLFG 52     |
|   | wao22     | GRPLIIGNGANGAPGTGANGGDAGWLIWNGGAGSSGAKGANG-----GAGGPGGAAGLFG 54 |
| → | PE_PGRS33 | GRPLIIGNGANGAPGTGANGGDGGILYNGGAGSSGAAGMP-----GGNGGAAGLFG 51     |
|   | PE_PGRS9  | GRPLIIGNGANGAPGTGANGAPGGWLIWNGGAGSSAAAGS-----GLPGGAGGAAGLFG 53  |
|   | PE_PGRS61 | GRPLVIGNGANGAPGTGANGGDGGILWFGSGGAGSSGAAG-----MAGNGGAAGLFG 51    |
|   | PE_PGRS25 | GRPLIGHGADGAPGTGQAGGAGGILYNGGNGSSGATG-----QAGGAGGAAGLIG 51      |
|   | PE_PGRS27 | GRPLIGDGAAGAPGTGQAGGAGGILWNGGAGSSGAPG-----QVGGAGGAAGLFG 51      |
|   | PE_PGRS28 | GRPLIGDGAAGAPGTGQAGGAGGILWNGGAGSSGAPG-----QVGGAGGAAGLFG 51      |
|   | PE_PGRS2  | GRPLIIGNGADGAPGTGQAGGAGGILYNGGNGSSGAAG-----QAGGAGGPAGLIG 51     |
|   | PE_PGRS50 | GRPLIGDGVHGAAPGTGQPGGAGLLWNGGNGSSGAAG-----QVGGPGGAAGLFG 51      |
|   | PE_PGRS15 | GRPLIIGNGTNGAPGTGQAGGPGGLLYNGGNGSSGGVG-----QAGGAGGSAGLIG 51     |
|   | PE_PGRS5  | GRPLIIGNGANGAPGTGQAGGDGGLLFCNGGNGSSGAPG-----QAGGAGGAAGFFG 51    |
|   | PE_PGRS58 | GRPLIIGNGADGAPGTGQPGGPGGLLWNGGNGSSGVAVG-----GPGSSGAAGLFG 53     |
|   | PE_PGRS16 | GRPLIIGNGDTGAPGTGQNGGAGGILWNGGNGSSGAPG-----QPGGRGGDAGLFG 51     |
|   | PE_PGRS8  | GRPLIIGNGADGAPGTGQAGGAGGLLFCNGGAGSSGAPG-----GAGG-LLFG 46        |
|   | PE_PGRS17 | GRPLIGDGANGIDGTGQAGGNGGWLWNGGNGSSGAPG-----QAGGAGGAAGLIG 51      |
|   | PE_PGRS18 | GRPLIGDGANGIDGTGQAGGNGGWLWNGGNGSSGAPG-----QAGGAGGAAGLIG 51      |
|   | PE_PGRS45 | GRPLIGDGANGIDGTGQAGGNGGWLWNGGNGSSGAPG-----QAGGAGGAAGLIG 51      |
|   | PE_PGRS13 | GRPLIIGNGANGAPGTGAPGGPAGGMIWNGGAGSSGAP-----GAIAGGAGPAGLIG 51    |
|   | PE_PGRS47 | GRPLIIGNGANGAPGTGQDGGAGGLLYSGGNGSSGLAGSG-----QKGGNGGAAGLFG 53   |
|   | PE_PGRS32 | GRPLIIGNGANGVAGTGQNGGDGGWLYNGGNGSSGGTG-----QNGGNGSSAGLWG 51     |
|   | PE_PGRS6  | GRPLIIGNGADGAPGTGQAGGAGGILYNGGNGSSGAAG-----QAGGAGGAAGLIG 51     |
|   | PE_PGRS7  | GRPLIIGNGADGAPGTGQAGGPGGILYNGGNGSSGAPG-----QRGGAGGAAGLIG 51     |
|   | PE_PGRS46 | GRPLIIGNGANGADGTGAPGGPGGLLWNGGNGSSGAPG-----QPGGAGGDAGLIG 51     |



**Figura 12. Alineamiento múltiple de las secuencias de proteínas PE\_PGRS que presentan el motivo LPXTG.** Se muestran las secuencias del dominio PGRS de 30 proteínas PE\_PGRS que presentan el motivo LPXTG que reconoce la enzima SrtA de *S. aureus*. Las PE\_PGRS1 y 31 presentan el motivo exacto y la mayoría de las proteínas, incluida la PE\_PGRS33, el motivo conservado APGTG. La proteína PE\_PGRS1 es la proteína caracterizada en este trabajo y la proteína PE\_PGRS33 es una proteína típica codificada por miembros de la familia PE\_PGRS y utilizada ampliamente en nuestro laboratorio, ambas proteínas se encuentran señaladas y enmarcadas. El MSA se obtuvo con el programa ClustalW [42] y la secuencia consenso con el programa WebLogo [43].

### 1.8 Secreción de proteínas en *Staphylococcus aureus*.

El modelo de secreción que se conoce mejor es el de proteínas superficiales de *S. aureus* que están unidas covalentemente a los peptidoglicanos de la pared celular [41,44]. Este mecanismo requiere un péptido señal en el extremo amino, el cual dirige a los precursores de proteínas exportadas por la vía Sec-dependiente del citoplasma a la membrana celular, y una señal de 'sorting' de la pared celular (*Cws* por su sigla en inglés) en el extremo carboxilo, que está compuesta por un motivo LPXTG, una región hidrofóbica y una cola de aminoácidos cargados positivamente [41,45-47]. Durante la secreción de proteínas, el dominio hidrofóbico y los aminoácidos positivos del N-terminal probablemente retienen a la proteína para que no sea secretada al medio. Esta relación permite el reconocimiento del motivo LPXTG en el C-terminal y favorece el anclaje proteico a la pared celular por la acción de una transpeptidasa asociada a la membrana, llamada Sortasa (Srt) [41,48] (**Figura 13**).





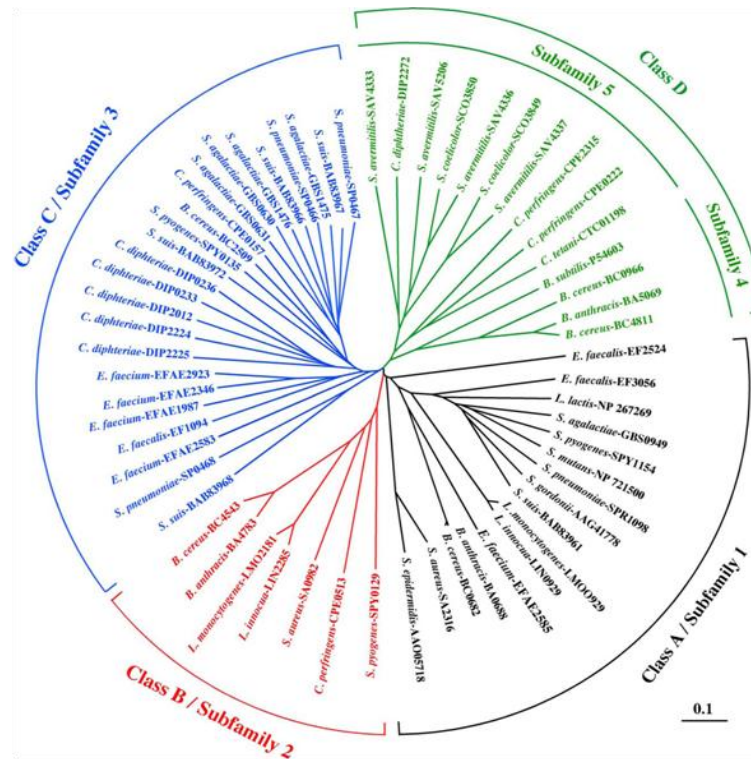
**Figura 13. Mecanismo de anclaje de proteínas a la pared celular por acción de la Srt en *S. aureus* y otras bacterias Gram-positivas.** Este modelo se divide en cuatro pasos.

**1. Exportación:** El precursor de la proteína es exportada desde el citoplasma donde muestra el péptido señal en el N-terminal por la vía Sec-dependiente, el cual posteriormente es removido. **2. Retención:** La proteína es retenida por la señal de 'sorting' en el C-terminal para evitar su liberación al medio extracelular. **3. Corte:** La proteína es cortada por la Srt entre la Tre y la Gly del motivo LPXTG resultando en la formación de un intermediario de la enzima tioéster. **4. Unión:** El C-terminal recién liberado de la Tre se transfiere a través de un intercambio del enlace amida a un grupo amino que se encuentra al final de los puentes cruzados de la pared. En este modelo propuesto, los pasos 3 y 4 se acoplan en una reacción de dos pasos: hidrólisis y transpeptidación. Figura tomada y modificada de [45, 47, 49].

Las Srt son enzimas responsables de la unión covalente de proteínas específicas al peptidoglicano de la pared celular en las bacterias Gram-positivas [41]. Las Srt se dividen en dos grupos basados en el tipo de secuencia topogénica que presentan (secuencias específicas de aminoácidos que ayudan a que la proteína adopte la orientación correcta en la membrana a medida que se va sintetizando): A) Tipo I- es el grupo mayor y comprende enzimas con un péptido señal en el N-terminal que las ancla a la membrana y B) Tipo II- es el grupo menor formado por enzimas con un péptido señal en el N-terminal y una señal de anclaje de membrana en el C-terminal [47,49].

Se ha propuesto otra clasificación estructural de Srt en cuatro clases designadas A, B, C y D, basada en la secuencia, topología de membrana, la posición en el genoma y la preferencia por aminoácidos específicos del péptido señal [50] (**Figura 14**). La clase A o subfamilia 1, incluye al prototipo SrtA de *S. aureus*, que reconoce el motivo LPXTG, y Srt de bacterias Gram-positivas de bajo contenido GC. Éstas presentan un péptido-senal en el N-terminal (dominio transmembranal) y el sitio catalítico en el C-terminal (TLXTC, donde X puede ser Val/valina, Ile/isleucina o Tre/treonina). La clase B o subfamilia 2, es la más pequeña e incluye al prototipo SrtB de *S. aureus*, que reconoce el motivo NPQTN (Asn/asparagina, Pro, Gln/glutamina, Tre, Asn), y Srt de bacilos y cocos Gram-positivos de bajo contenido GC. Estas 7 enzimas presentan además tres segmentos de aminoácidos ausentes en las SrtA. La clase C o subfamilia 3, es la más grande e incluye Srt de bacterias Gram-positivas de alto y bajo contenido GC casi siempre presentes en varias copias por genoma, que reconocen el motivo LPXTG. Estas 42 enzimas presentan un dominio hidrofóbico en el C-terminal (Tipo II- anclaje

de membrana) y un residuo de Pro después del sitio catalítico. La clase D o subfamilias 4 y 5, incluye Srt de bacterias Gram-positivas de alto y bajo contenido GC que reconocen los motivos LPXTA (Leu, Pro, X, Tre, Ala, donde X puede ser cualquier aa) y LAXTG (Leu, Ala, X, Tre, Gly, donde X puede ser cualquier aa). Estas 14 enzimas pueden ser subdivididas en tres subgrupos de acuerdo a la filogenia del huésped (bacilli o actinomycetales) [49,50].



**Figura 14.** Árbol filogenético no enraizado mostrando las relaciones entre las 61 Srt de varias bacterias Gram-positivas. El alineamiento múltiple de las proteínas SrtA se llevó a cabo con el programa CLUSTALX usando la matriz de identidad. El árbol fue establecido a partir de un análisis de este alineamiento por el uso del método Neighbor-joining. La barra de la escala (distancia NJ) representa el 10% de diferencias en la secuencia de aminoácidos. Figura tomada y modificada de [50].

De acuerdo a esta clasificación estructural (Tabla 1), la enzima que se utilizó en el presente trabajo corresponde a la clase A. Se trata del prototipo SrtA de *S. aureus*, que ancla proteínas con el motivo LPXTG y presenta diversas funciones. En patógenos Gram-positivos,

las proteínas con este motivo promueven la adhesión a tejidos de órganos específicos, la resistencia a la muerte por células fagocíticas o la invasión de las células del hospedero. La inactivación de la SrtA afecta la capacidad del patógeno para establecerse durante la infección, como se ha demostrado en *S. aureus* y *Listeria monocytogenes*. Debido a esto, la SrtA es un blanco de interés para el desarrollo de terapias preventivas para enfermedades causadas por patógenos Gram-positivos [50].

**Tabla I. Clasificación estructural de las Sortasas (Srt) en clases y subfamilias [49].**

| Clase <sup>a</sup> | Sitio de Corte <sup>b</sup> | Dominio <sup>c</sup> | Taxa de Bacterias <sup>d</sup>  |
|--------------------|-----------------------------|----------------------|---|
| A (1)              | LPkT - Ge                   | N-terminal           | <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i>   |
| B (2)              | NPqt - nd                   | N-terminal           | <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcaceae</i> , <i>Clostridia</i>                               |
| C (3)              | 1PkT - GG                   | C-terminal           | <i>Actinobacteria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Leuconoctocaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> , <i>Clostridia</i> |
| D (4)              | LPnT - AT                   | N-terminal           | <i>Bacillus</i>   |
| D (5)              | LAeT - Ga                   | N-terminal           | <i>Actinobacteria</i>   |

<sup>a</sup> Basada en la secuencia, topología de membrana, posición en el genoma y preferencia por aa específicos dentro de la región del motivo del pentapéptido señal (*Cws*) de sus substratos similares. Entre paréntesis se indica la subfamilia a la que corresponde cada clase.

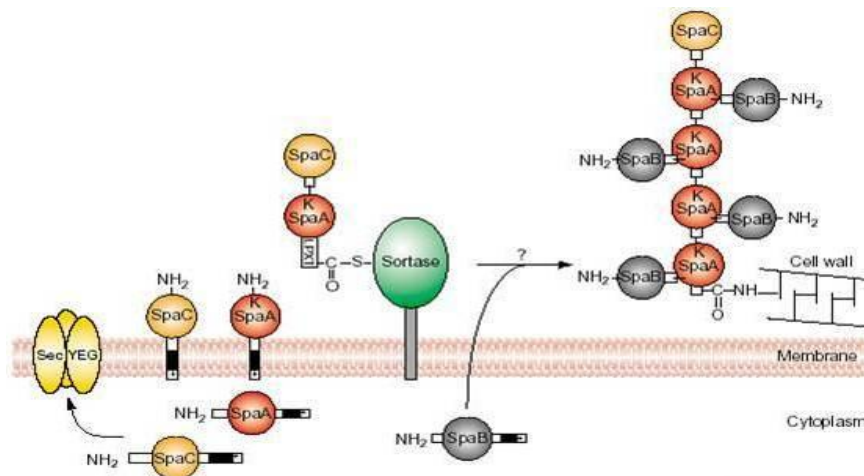
<sup>b</sup> Motivo del pentapéptido señal (*Cws*). Las mayúsculas representan los aa conservados absolutamente.

<sup>c</sup> Región anclada a la membrana basada en predicciones transmembranales y alta hidrofobicidad.

<sup>d</sup> Taxa de bacterias que presentan uno o más genes *srt* dentro de su genoma.

## 2 ANTECEDENTES

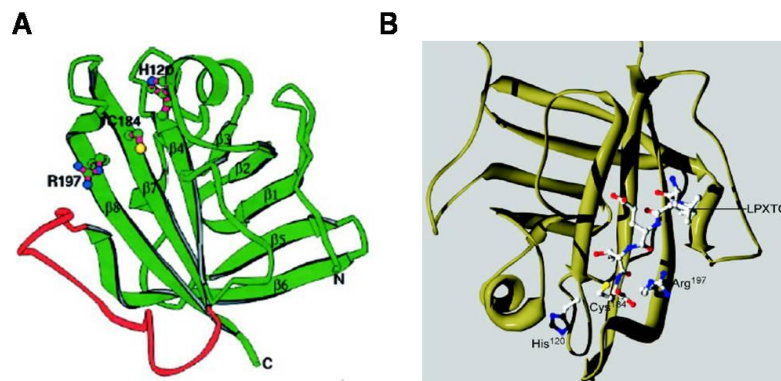
Como ha sido ya reportado para proteínas de superficie ancladas por las Srt, la envoltura de la pared celular de bacterias Gram-positivas, parece servir también como sitio de ensamblaje para 'pili' o 'fimbria' (Figura 15), que son filamentos de proteínas que surgen de la superficie del microorganismo y realizan funciones importantes durante la patogénesis de infecciones humanas o animales [51,52]. La Srt cataliza la polimerización del *pili* en la superficie de bacterias Gram-positivas [49,52]. Las tres subunidades que componen el *pili* (SpaA, Spa B y SpaC) son típicos sustratos de la Srt, los cuales contienen un péptido señal en el N-terminal que promueven la secreción a través de la vía Sec-dependiente y una señal de *sorting* de la pared celular [49]. SpaA, la proteína principal del *pili*, está distribuida uniformemente a lo largo de eje del *pili*, mientras que SpaB es observada a intervalos regulares y SpaC está ubicada en la punta del *pili* [47]. La señal de *sorting* de SpaA es cortada por la Srt y unida a la Lys de una segunda subunidad SpaA y así consecutivamente, el *pili* polimerizado es translocado a la pared celular de la bacteria [49].



**Figura 15. Modelo del ensamblaje del pili mediado por Srt en bacterias Gram-positivas.** Las subunidades SpaA, SpaB y SpaC son translocadas a través de la membrana por la maquinaria Sec y retenidas en la vía secretoria por el corte de Srt. Su polimerización es un mecanismo que requiere el ataque nucleofílico del grupo amino (NH<sub>2</sub>) de la Lys/lisina en la enzima acil unida al grupo tioéster (S-CyO), el cual se genera por el corte de la señal de 'sorting' en el motivo LPXTG. Se cree que las SpaA son anclados a la envoltura de la pared celular de *Actinomyces spp.*, *Corynebacterium spp.* y *Streptococcus spp.*, entre otras. Figura tomada y modificada de [49,52].

En las micobacterias no se ha reportado la existencia de enzimas parecidas a las Srt de *S. aureus*; sin embargo, para algunos patógenos Gram-positivos emparentados con *M. tuberculosis*, los experimentos de microscopía electrónica proveen una primera evidencia de la presencia de pili en las superficies de *Actinomyces spp.*, *Corynebacterium spp.* y *Streptococcus spp.* [52,53]. Aunado a lo anterior, se han encontrado Srt codificadas en los genomas de corynebacteria y streptococci que pertenecen a la clase D subfamilia 5 [53]. Este grupo de enzimas comparten la especificidad para proteínas que contienen el motivo LAXTG, como las proteínas superficiales llamadas ‘chaplins’ que lo llevan en la señal de ‘sorting’ del C-terminal, involucradas en el desarrollo de hifas de *Streptomyces spp.* [47,49,52].

La SrtA de *S. aureus* (enzima Tipo I de la clase A) es un polipéptido compuesto por 206 aminoácidos con un péptido señal para su secreción y con una señal de término de transferencia, ambos en el segmento hidrofóbico localizado en el extremo N-terminal y el sitio activo en el extremo C-terminal traslocado a través de la membrana plasmática [45,47,49,54]. Para estudiar la estructura tridimensional de esta proteína, se construyó una versión recombinante trunca (SrtA $_{\Delta 59}$ ) que fue analizada por resonancia magnética nuclear (NMR, por su sigla en inglés) (**Figura 16**) [54]. Aunque a esta versión le falta la secuencia de 59 aa del extremo N-terminal, es capaz de retener el péptido LPXTG para la actividad *in vitro* de corte y transpeptidación [43,54]. Los resultados revelaron una estructura  $\beta$ -plegada con ocho bandas alineadas en forma paralela y anti-paralela, con dos hélices cortas y dos *loops* grandes, los cuales definen el sitio activo de la enzima [43,45].



**Figura 16. Estructura de la SrtA $_{\Delta N59}$  de *S. aureus*.** A) Estructura completa de la SrtA. El centro de la SrtA es una estructura  $\beta$  plegada de 8 bandas:  $\beta 4$ ,  $\beta 7$  y  $\beta 8$  forman una hoja cóncava rodeada por algunas regiones *loop*. Los tres residuos importantes que forman el sitio activo, localizados a la mitad de la hoja  $\beta$ , están marcados individualmente. B)

Estructura de la SrtA unida al sustrato LPETG. La SrtA se pliega en la estructura  $\beta$ -plegada de 8 bandas y el sitio activo reside en la depresión formada por las bandas  $\beta 7$  y  $\beta 8$ . Los residuos His<sup>120</sup>, Cys<sup>184</sup> y Arg<sup>197</sup>, los cuales están totalmente conservados en entre las Srt y son requeridos para su actividad, así como el sustrato LPETG, están dibujados con estructuras de esferas y barras. Figuras tomadas y modificadas de [49,54].

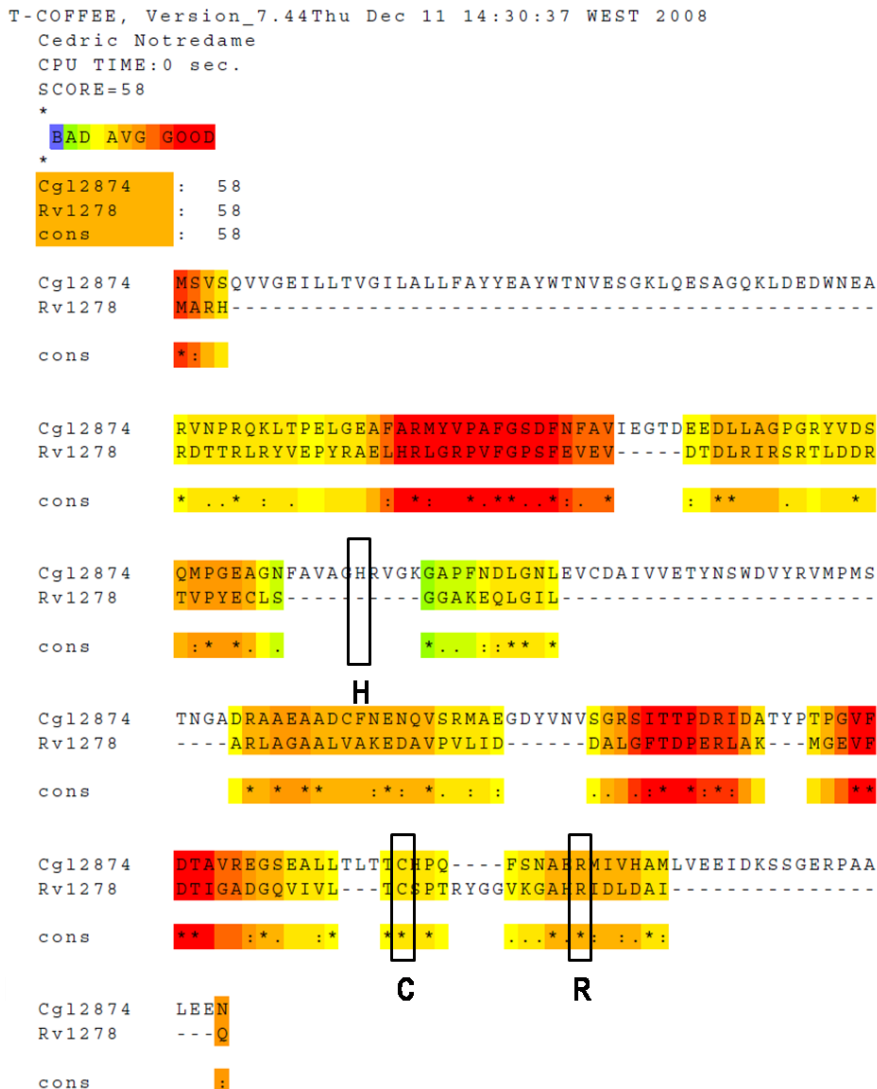
El sitio activo se encuentra dentro de una depresión hidrofóbica alongada, que es capaz de posicionar proteínas desnaturalizadas, sugiriere que el mecanismo puede translocar el motivo LPXTG [43]. Se cree que el grupo sulfhidrilo (-SH) de la cisteína (Cys<sup>184</sup>), que actúa como un nucleófilo atacando la unión Tre-Gly del motivo, junto con la histidina (His<sup>120</sup>) y la arginina (Arg<sup>197</sup>) de la SrtA, funcionan como un posible sitio activo (dominio transmembranal N-terminal y la secuencia TLXTC, donde C corresponde al residuo Cys<sup>184</sup>) [43,49]. La unión y el corte del motivo LPXTG es seguido por la incorporación del sustrato en el sitio activo para la separación del intermediario acil (paso de acilación) [49,54]. Éste se elimina por un segundo ataque nucleofílico en la unión tioéster, la cual resulta en la liberación de los productos de la reacción (paso de desacilación) [49,54]. Cada uno de estos pasos limitantes es llevado a cabo por una reacción distinta que consiste en, el paso de acilación durante la reacción de transpeptidación y el de desacilación durante la hidrólisis [49].

*In vitro*, la adición de sustratos de peptidoglicano como Gly, Gly<sub>2</sub>, Gly<sub>3</sub>, Gly<sub>4</sub> y Gly<sub>5</sub>, a la mezcla de reacción de la SrtA estimula el corte del péptido y resulta en la formación de una unión amida entre el grupo carboxilo de la Tre y el grupo amino de la Gly del peptidoglicano de la pared celular [49,56]. Estudios de la estructura RMN revelaron que los *loops*  $\beta 3$ - $\beta 4$  y  $\beta 6$ - $\beta 7$  contienen un grupo de residuos de aminoácidos involucrados en la unión calcio (Ca<sup>2+</sup>), el cual está presente en cantidades milimolares en los tejidos de hospedero [43,49]. Al analizar la presencia y ausencia de Ca<sup>2+</sup> se observó que los aminoácidos ácido glutámico (Glu<sup>105</sup> y Glu<sup>108</sup>) y ácido aspártico (Asp<sup>108</sup>) de los *loops* interactúan con el catión [49,56]. La unión de los iones Ca<sup>2+</sup> activa a la SrtA por un mecanismo que puede facilitar la unión al sustrato, debido a que se afecta la pared que forma el sitio activo y adopta una conformación adecuada para la unión del péptido LPXTG, efecto que no es observado en ausencia de Ca<sup>2+</sup> [49,56].

El genoma de *Corynebacterium diphtheriae* contiene 6 genes que codifican para posibles Srt, entre ellos el DIP2272 que es el ortólogo del gen Cgl2874 en *Corynebacterium glutamicum* [57]. Este gen está clasificado en la agrupación de grupos ortólogos COG3764 (COG, por su sigla en inglés)

llamado *Sortase* (proteínas superficiales transpeptidasas). Dentro de este grupo se encontró que el gen *Cgl2874* está relacionado con el gen *ML1120* de *M. leprae* y éste último, a su vez, se relaciona con el gen *Rv1278* de *M. tuberculosis* H37Rv, que codifica una proteína hipotética de 875 aa [16].

Considerando la información de estos genes ortólogos *Cgl2874* y *Rv1278*, se realizó un alineamiento de ambas secuencias proteicas en el que se obtuvo un score de 58 con el programa T-Coffee [58] (se considera una identidad significativa cuando el score es >50). Cabe señalar que de la secuencia *Rv1278* se utilizó únicamente la región de 140 aa del extremo C-terminal. Por lo tanto, en este análisis de identidad se observa el sitio activo de la posible SrtA-like de *M. tuberculosis* constituido por los aminoácidos Cys y Arg, el cual es diferente al de la mayoría de las Srt que lo presentan en el extremo N-terminal (**Figura 17**).



**Figura 17. Alineamiento de las secuencias de la enzima SrtA de *C. glutamicum* y la posible SrtA-like de *M. tuberculosis*.** El primer renglón corresponde a la secuencia de la SrtA de *C. glutamicum* [Cgl2874], el segundo a la secuencia del extremo C-terminal de la posible SrtA-like de *M. tuberculosis* [Rv1278] y el tercero a los aminoácidos conservados entre las dos secuencias [cons]. Los aminoácidos del sitio activo de la SrtA se muestran enmarcados [Hys, Cys y Arg], dos de ellos se encuentran en la secuencia de la posible SrtA-like. El asterisco [\*] indica los aminoácidos altamente conservados. El alineamiento del par de secuencias y la identificación de regiones conservadas dentro de ellas fueron realizados con el programa T-Coffee 7.44 <sup>[58]</sup>.



En la actualidad, no se cuenta con información suficiente sobre la secreción y señales o mecanismos de *sorting* o localización de proteínas superficiales en las micobacterias. Resulta esencial que los sistemas de secreción bien caracterizados empleados por otras bacterias Gram-positivas, sean utilizados como paradigmas para desarrollar experimentos con el fin de investigar aspectos moleculares de la secreción de proteínas en *M. tuberculosis*, como una bacteria de gran importancia clínica [33].

Reportes previos demuestran que la enzima SrtA reconoce como blanco al motivo LPXTG en proteínas ancladas a la pared celular de bacterias Gram-positivas, como es *Staphylococcus aureus* [41,48]. La presencia de este motivo en algunas proteínas PE\_PGRS, localizadas en la pared celular de *M. tuberculosis*, sugiere que estas secuencias podrían ser blanco de un mecanismo similar.

Por lo que para determinar esta vía de secreción, en este trabajo se caracterizó el reconocimiento y corte por la enzima SrtA de *S. aureus* sobre la proteína PE\_PGRS1 de *M. tuberculosis* H37Rv que presenta el motivo LPNTG, blanco de esta enzima. Dentro de este contexto, el conocer ampliamente las vías de secreción en *M. tuberculosis* permitirá la identificación de nuevos blancos farmacológicos para el tratamiento de la TB humana, así como la mejora de vacunas para su prevención.

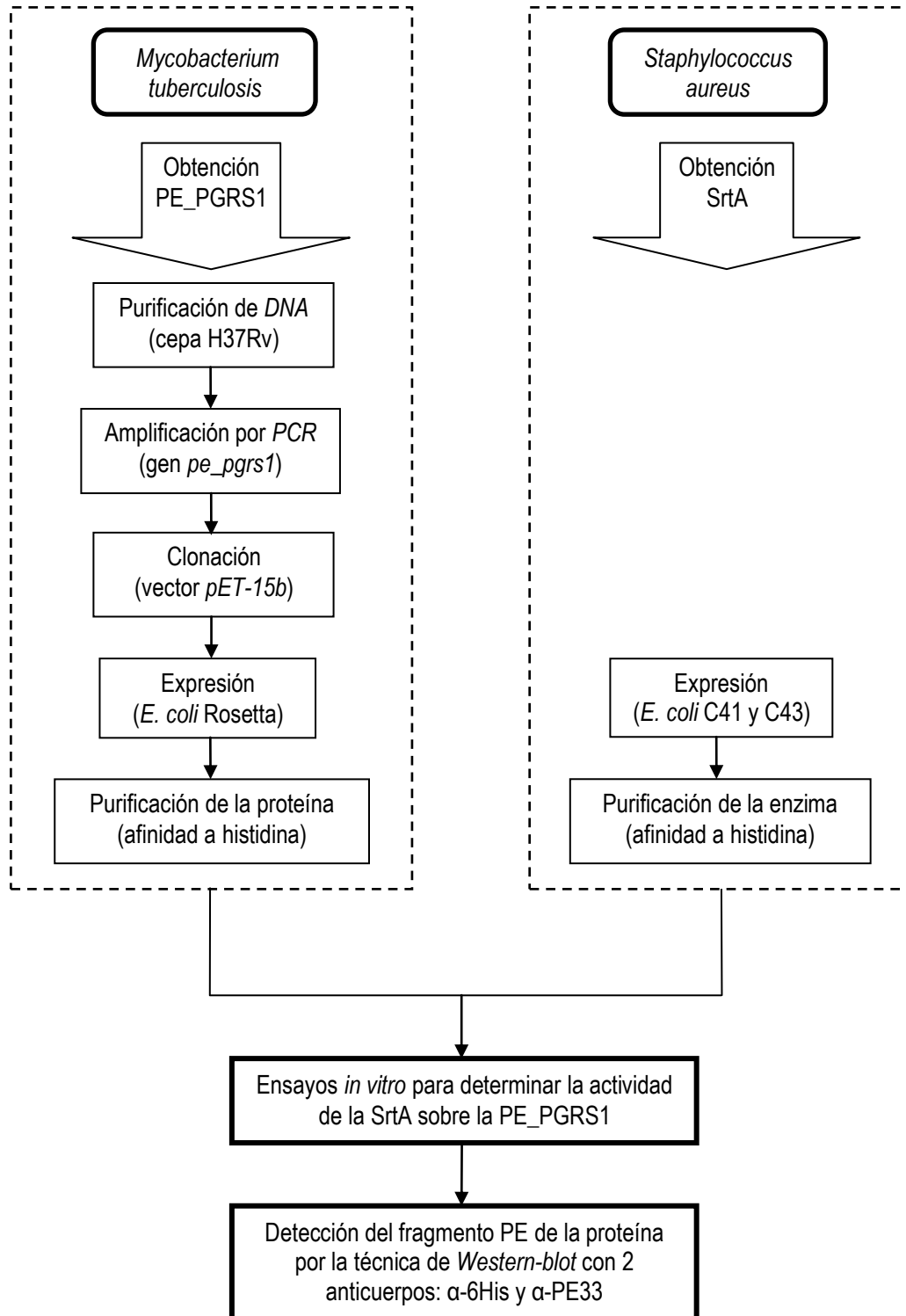
“El péptido LPNTG presente en la proteína PE\_PGRS1 de *M. tuberculosis*, miembro de la subfamilia PE\_PGRS, será blanco de procesamiento enzimático por la SrtA de *S. aureus*, la cual reconoce el motivo LPXTG”.

### 5.1 Objetivo General

Caracterizar en la proteína PE\_PGRS1 de *M. tuberculosis* H37Rv la presencia del péptido LPNTG como blanco de reconocimiento y corte específicos por la SrtA de *S. aureus*.

### 5.2 Objetivos Particulares

- Obtener la proteína recombinante PE\_PGRS1 de *M. tuberculosis* H37Rv.
- Obtener la proteína recombinante SrtA de *S. aureus*.
- Establecer las condiciones del ensayo *in vitro* de actividad enzimática de la SrtA sobre la PE\_PGRS1.
- Evaluar la actividad enzimática específica de la SrtA sobre la PE\_PGRS1.



### 7.1 Cepas de *Escherichia coli* y condiciones de cultivo.

**Cepa Top10** [ $F^-$  *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*].

**Cepa Top10F'**: derivada de la cepa Top10,  $F'$  {*lacI<sub>q</sub>* Tn10 (Tet<sup>R</sup>)}.

**Cepa BL21 (DE3)** [ $F^-$  *ompT hsdS<sub>B</sub>* (*r<sub>B</sub> m<sub>B</sub>*) *gal dcm* (DE3 [*lacI ind1* Sam7 *nin5 lacUV5-T7* gene 1]).

**Cepa Rosetta (DE3)** derivada de la cepa BL21 (DE3), pRARE<sup>2</sup> (Cam<sup>R</sup>).

**Cepa C41 (DE3)**: derivada de la cepa BL21 (DE3) [59].

**Cepa C43 (DE3)**: derivada de la cepa C41 (DE3) [59].

Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en medio LB sólido/líquido en presencia/ausencia del antibiótico correspondiente a 37°C con/sin agitación constante de 200 rpm (Ver Anexo I: H).

### 7.2 Purificación de *DNA* genómico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv para la amplificación del gen *pe\_pgrs1*.

Se utilizaron las muestras de 100 ng de *DNA* genómico (*gDNA*) de dos colonias de la cepa H37Rv, que se extrajeron de acuerdo a un protocolo establecido (obtenidas por M.C. Ingrid B. Cohen Falquez, estudiante de Doctorado en Ciencias Biomédicas, IIB-UNAM) [60]. Se tomaron 2  $\mu$ L de muestra de cada colonia, los cuales se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa-TAE [40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0] al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio (0.33 mg/mL, adicionado al gel) (Ver Anexo I: C) para visualizar la calidad de *gDNA* en cada muestra (Figura 18A).

Para eliminar el *RNA* contaminante de las muestras, éstas se mezclaron con 200  $\mu$ L de *buffer* TE [Tris-base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0] y 1  $\mu$ L de RNasa A 1 mg/mL (BOEHRINGER) en un tubo de micro-centrífuga, y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente ( $T_{amb}$ ). Para purificar el *gDNA* de la reacción se añadieron 300  $\mu$ L de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v) y se agitaron por 30 s en *vortex* (MS1, IKA WORKS). Se obtuvo una mezcla de color blanco lechoso que se centrifugó por 10 min a 11,000 x *g* (5415 C, EPPENDORF), así se formaron dos fases en cada muestra. La fase superior es la que corresponde al *gDNA* (200  $\mu$ L), por lo que se colectó cuidadosamente en otro tubo

y se añadieron 20 µL de acetato de amonio 3 M (pH 5.4) para precipitarlo, se centrifugó en las mismas condiciones y se decantó el sobrenadante. La pastilla obtenida fue lavada dos veces con 440 µL de etanol absoluto y al 70% frío (-20°C), respectivamente. La pastilla de *gDNA* fue secada por 1 h a  $T_{amb}$  en un concentrador (5301, EPPENDORF), resuspendida en 40 µL de *buffer* TE e incubada por 10 min a 60°C (*Thermomixer comfort*, EPPENDORF). Finalizando el procedimiento, 2 µL de las muestras fueron resueltas en gel de agarosa-TAE al 1% (**Ver Anexo I: C**) para visualizar el *gDNA* purificado (**Figura 18B**) que fue utilizado en la amplificación del gen *pe\_pgrs1* (**Ver Anexo III: A**).

### 7.3 Amplificación por PCR del gen *pe\_pgrs1* de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

A partir de la secuencia del gen *pe\_pgrs1*, que tiene un tamaño de 1,491 *bp*, dentro del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (4,411,532 *bp*) [16] y mediante la utilización del programa DNAMAN [61], se diseñaron los oligonucleótidos iniciadores PEPGRS1F y PEPGRS1R (*primers Forward (F)*  $T_m=70^\circ\text{C}$  y *Reverse (R)*  $T_m=66^\circ\text{C}$ ) verificando que no existiera plegamiento entre sí (el diseño fue realizado con la ayuda de D.C. Antonio J. Vallecillo Maza, IIB-UNAM) (**Ver Resultados: Tabla II**).

La secuencia *pe\_pgrs1* fue amplificada por la técnica de PCR con 1.25 U/µL de DNA polimerasa de alta fidelidad *Pfx* (Platinum®, INVITROGEN), en una mezcla de reacción de 125 µL que contenía 1X de *buffer* de PCR 10X, 3X de *enhancer* 30X, 400 µM de  $\text{MgSO}_4$ , 8 µM de cada uno de los *dNTP*'s, 0.8 µM de *primers F* y *R* y 50 ng de *gDNA* de *M. tuberculosis* H37Rv. Esta mezcla se separó en 5 reacciones de 25 µL c/u variando la temperatura de alineamiento ( $T_a$ ): 57.0, 58.7, 60.4, 61.1 y 61.8°C, por 35 ciclos en un termociclador (Mastercycler® ep gradient, EPPENDORF) bajo la siguiente rampa de temperatura:

| Pasos:      | Desnaturalización |                    | Amplificación |            | Extensión final: |
|-------------|-------------------|--------------------|---------------|------------|------------------|
|             | inicial:          | Desnaturalización: | Alineamiento: | Extensión: |                  |
| Temperatura | 94°C              | 94°C               | 55-62°C       | 68°C       | 68°C             |
| Tiempo      | 3 min             | 1 min              | 25 s          | 80 s       | 6 min            |

Los productos de PCR de cada reacción (**Figura 19**) fueron visualizados en gel de agarosa-TAE al 1% (**Ver Anexo I: C**). La amplificación se repitió con la  $T_a$  considerada como óptima y la totalidad del producto fue resuelta en una electroforesis en gel de agarosa-TAE al 0.8% (**Ver Anexo I: C**) para

purificar del gel el fragmento del tamaño esperado (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN) y descartar los fragmentos inespecíficos. El producto de *PCR* correspondiente fue secado a  $T_{amb}$ , resuspendido en 4  $\mu$ L de agua destilada y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta ser clonado en el vector *pET15b*.

#### 7.4 Clonación del gen *pe\_pgrs1* en el vector de expresión procarionte *pET15b*.

##### 7.4.1 Captura del producto de *PCR* en el vector de clonación *pCR4<sup>®</sup>Blunt-TOPO<sup>®</sup>*.

El producto de *PCR* correspondiente al gen *pe\_pgrs1* (1,491 *bp*) fue capturado en el vector *pCR4<sup>®</sup>Blunt-TOPO<sup>®</sup>* (3,956 *bp*) en dirección 3'-5' siguiendo las instrucciones del fabricante (Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> PCR Cloning Kit for Sequencing, INVITROGEN) (**Ver Anexo I: D**), con lo que se obtuvo la reacción de ligación utilizada para transformar la cepa de manipulación Top10F' competente químicamente.

Las bacterias transformadas se sembraron en placas de medio LB/Car [100 mg/mL] (INVITROGEN), con el inductor IPTG (GIBCO) (40  $\mu$ L de solución 100 mM) y el sustrato cromogénico X-gal (FERMENTAS) (40  $\mu$ L de solución al 2% en Dimetilformamida) de la enzima  $\beta$ -galactosidasa dispersados en la superficie. Las placas se incubaron por 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$  (417, LAB-LINE) (**Ver Anexo I: H**) para seleccionar las colonias que presentan el plásmido recombinante utilizando el método  $\alpha$ -complementación [62]. Estas colonias fueron amplificadas en 5 mL de medio LB/Kn [50 mg/mL] (INVITROGEN) por 16 h a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación constante (Incubator 1000/ Orbimix 1010 BRINKMANN) (**Ver Anexo I: I**) y a estos cultivos les fue extraído el plásmido (Rapid Plasmid Miniprep System Kit, QIAGEN).

Para verificar la identidad del plásmido recombinante *pCR4<sup>®</sup>Blunt-TOPO<sup>®</sup>-pe\_pgrs1* (5,447 *bp*) (**Ver Anexo III: B**), se realizó un análisis de restricción (**Ver Anexo I: E<sub>1</sub>**) con la enzima *Pst*I (BOEHRINGER) (**Figura 20A**). Las muestras de cada digestión fueron sometidas a una electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1% (**Ver Anexo I: C**) para visualizar el patrón esperado (**Figura 20B**). Finalmente, el plásmido que incluía el inserto fue sometido a secuenciación automática en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM con los oligonucleótidos universales T7 (TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG) y T3 (CGC ATT TAA CCC TCA CTA AAG) [63] (**Ver Anexo III: C**).

##### 7.4.2 Subclonación del gen *pe\_pgrs1* en el vector de expresión *pET15b*.

Para la subclonación, los dos plásmidos recombinantes requeridos se expandieron en *E. coli*, el correspondiente al vector *pET15b* y el que contenía al gen *pe\_pgrs1*. Se utilizaron 1  $\mu$ L del *pET15b*-

*Hsp70* (7,586 bp) y 0.5 µL del *pCR®4Blunt-TOPO®-pe\_pgrs1* (5,447 bp) para transformar por choque térmico (**Ver Protocolo K**) a la cepa competente Top10F', que se cultivó en medio LB/Amp [100 mg/mL] (INVITROGEN). Se realizaron los pre-cultivos en LB/Car [100 mg/mL] (**Ver Anexo I: I**) para purificar ambos plásmidos por separado (Plasmid Purification Kit, QIAGEN). Las muestras obtenidas fueron sometidas a una electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1% (**Ver Anexo I: C**) para verificar la presencia de cada uno de los plásmidos (**Figura 21**).

Los plásmidos se linearizaron con las enzimas de restricción correspondientes por 1.5 h a 37°C: el *pET15b-Hsp70* con *BamHI* (BOEHRINGER) y el *pCR®4Blunt-TOPO®-pe\_pgrs1* con *EcoRI* (FERMENTAS) (**Ver Anexo I: E<sub>2,3</sub>**), y al terminar el tiempo de incubación se purificaron (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN). Para obtener extremos romos en ambos plásmidos, se adicionaron nucleótidos con una reacción de *gap-filling* por 10 min a 72°C en un termociclador (**Ver Anexo I: F**) y de nuevo se purificaron. El vector *pET15b* (5,708 bp) y el inserto *pe\_pgrs1* (1,491 bp) fueron digeridos con la enzima *NdeI* (BOEHRINGER) por 1.5 h a 37°C (**Ver Anexo I: E<sub>2</sub>**), a éste último le fue adicionado el sitio de restricción con el oligonucleótido PEPGRS1F (**Ver Resultados: Tabla II**). Ambos fueron purificados juntos de un gel de agarosa-TAE al 0.8% (**Ver Anexo I: C**) (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN), se eluyeron 40 µL y se secaron por 1 h a T<sub>amb</sub> en un concentrador.

#### 7.4.3 Ligación del plásmido recombinante *pET15b-pe\_pgrs1*.

El gen *pe\_pgrs1* y el vector *pET15b* se mezclaron juntos en una reacción de ligación con *buffer* 10X y 2 unidades de T4 DNA ligasa (ROCHE) por 16 h a 16°C (Thermomixer, EPPENDORF) (**Ver Anexo I: G**). Con los 10 µL de la reacción se transformó por choque térmico (**Ver Anexo I: K**) a la cepa de manipulación Top10 competente químicamente (INVITROGEN). Las cuatro colonias seleccionadas en medio LB con 100 mg/mL de Car (**Ver Anexo I: H**) fueron amplificadas en 5 mL de LB/Car [100 mg/mL] por 16 h a 37°C en agitación constante (**Ver Anexo I: I**).

A los plásmidos extraídos de estos cultivos (Plasmid Purification, QIAGEN) les fue realizado un análisis de restricción (**Figuras 22A, 22D y 22E**) con las endonucleasas *BamHI*, *NdeI*, *KpnI* y *PstI* (**Figuras 22B, 22C y 22F**). Cada reacción de digestión se incubó por 1 h a 37°C (**Ver Anexo I: E<sub>1</sub>**) y cada muestra se resolvió en geles de agarosa-TAE al 1% (**Ver Anexo I: C**) para verificar la ligación del inserto correspondiente. Finalmente, el plásmido recombinante *pET15b-pe\_pgrs1* (7,199 bp) (**Ver Anexo III: B**) fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* para ligar un fragmento del gen *pe\_pgrs1* en el vector de clonación *pUC18* previamente digerido (*EcoRI-BamHI*). La parte



correspondiente al extremo 3' del gen fue liberada del vector (*EcoRI-HpaI*) y autoligada (ligación forzada) para someterla a secuenciación automática en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM, con los oligonucleótidos universales M13: M13/pUC -40F (GTT TTC CCA GTC ACG TTG TA) y M13 pUCR (TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC) [63] (**Ver Anexo III: C**).

## 7.5 Producción de las proteínas recombinantes PE\_PGRS1 y SrtA en *Escherichia coli*.

### 7.5.1 Expresión de la PE\_PGRS1 recombinante de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Para analizar la inducción de una proteína correspondiente al tamaño esperado y con un tallo de His, se utilizó una alícuota de 200  $\mu$ L de la cepa de expresión Rosetta (DE3) (NOVAGEN) competente químicamente y 1  $\mu$ L del plásmido *pET15b-pe\_pgrs1* (7,199 bp) para transformarla por choque térmico [64,65] (**Ver Anexo I: K**) y cultivarla en LB/Car [100 mg/mL] por 16 h a 37°C (**Ver Anexo I: H**).

De este cultivo se seleccionaron dos colonias que se inocularon en 5 mL de LB/Car [100 mg/mL] y se incubaron por 3 h a 37°C en agitación constante, la inducción de cada una se realizó con 250 y 500  $\mu$ M de IPTG y se incubaron por 3 h más. Se obtuvieron alícuotas de 1 mL de cada cultivo (con y sin inductor) que se centrifugaron por 3 min a 11,000 x g. Las pastillas obtenidas se disolvieron en 80  $\mu$ L de *buffer* de carga 2X [25% *buffer* de gel concentrador 4X, 20% glicerol, 5%  $\beta$ -ME, 2% SDS, 0.0025% azul de bromofenol, 0.0025% rojo de pironina] y se agitaron en *vortex*. Éstas se hirvieron 5 min para resolver las muestras por *SDS-PAGE* y electrotransferirlas a membrana PVDF (Immobilon™-P, MILLIPORE) (**Ver Anexo I: N**), en donde se visualizó la proteína con azul Coomassie (**Figuras 23A y 23B**). Se identificó por *Western-blot* (**Ver Anexo I: O y P**) utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón  $\alpha$ -6His marcado con peroxidasa [1/2000] ( $\alpha$ -6His *HRP*, ROCHE) (**Figura 23C**) y el anticuerpo policlonal de ratón  $\alpha$ -PE\_PGRS33 sin marcar [1/1000] (obtenido por M.C. Ingrid B. Cohen Falquez, IIB-UNAM) (**Figura 23D**), respectivamente.

Para establecer el tiempo de inducción de la PE\_PGRS1 recombinante de *M. tuberculosis* H37Rv (**Ver Anexo III: D**), se realizaron dos pre-cultivos *Rosetta* (DE3):*pET15b-pe\_pgrs1* (**Ver Anexo I: I**) diluidos 1:50 en 50 mL de LB/Car [100 mg/mL] e incubados por 12 h a 37°C en agitación constante. A cada cultivo se le realizó una lectura de la densidad óptica en un espectrofotómetro (6305, JENWAY) al inicio y a cada hora durante el periodo establecido, los datos de las lecturas fueron graficados (**Figura 24A y 24B**). De acuerdo con la cinética de crecimiento establecida (**Ver Anexo I: L**) se decidió realizar la

inducción de la expresión de la proteína con una concentración final de 250  $\mu\text{M}$  de IPTG para 1 L de cultivo con un tiempo de crecimiento de 3 h, después de haber sido inoculados con una dilución de 1:50 de un pre-cultivo de 16 h (**Ver Anexo I: I**). Al término de un tiempo de inducción de 8 h, la masa bacteriana fue cosechada por centrifugación a 11,000 x  $g$  por 15 min a 4°C. A la pastilla bacteriana obtenida le fue retirado lo más posible el medio de cultivo, fue pesada (6.89 g) y congelada a -80°C hasta su purificación por cromatografía de afinidad a metales.

Para determinar la fracción celular donde se localiza la mayor proporción de la proteína recombinante, 3 mL de cultivo inducido se centrifugaron por 15 min a 11,000 x  $g$  y la pastilla obtenida fue disuelta en 150  $\mu\text{L}$  de *buffer* PBS 1X [0.15 M NaCl, 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.4]. Ésta fue sonicada por 1 min (2 ciclos de 30 s de sonicado por 2 min de descanso) a una frecuencia de 20 kHz y una potencia de 95 W (VirSonic Digital 475, VIRTIS), manteniendo el tubo en hielo para evitar el calentamiento excesivo. El sonicado se centrifugó por 5 min y el sobrenadante fue retirado de la pastilla, para resolver ambas muestras por *SDS-PAGE* y electrotransferirlas a membrana PVDF (**Ver Anexo I: N**), en donde se visualizó la proteína con azul Coomassie (**Figura 25A**) y se identificó por *Western-blot* (**Ver Anexo I: O y P**) con  $\alpha$ -6His peroxidasa [1/2000] (**Figura 25B**), respectivamente.

### 7.5.2 Expresión de la SrtA recombinante de *Staphylococcus aureus*.

Para analizar la inducción de una proteína correspondiente al tamaño esperado y con un tallo de His en las cepas de expresión C41 (DE3) y C43 (DE3) (AVIDIS) <sup>[59]</sup>. Estas cepas se sembraron por agotamiento en placa y se prepararon los pre-cultivos diluidos 1:50 en medio LB para cultivarse por 3 h a 37°C en agitación constante (**Ver Anexo I: I**). De estos cultivos se prepararon células competentes por tratamiento químico con  $\text{CaCl}_2$  (**Ver Anexo I: J**) para transformarlas por choque térmico (**Ver Anexo I: K**) con 1  $\mu\text{L}$  del plásmido *pET15b-srtA* (6,146 bp) (**Ver Anexo III: B**) (obtenido por D.C. Antonio J. Vallecillo Maza, IIB-UNAM a partir de una cepa de *S. aureus* proveniente de un aislado clínico, donada por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM).

Las bacterias transformadas se cultivaron en placas con medio LB/Car [100 mg/mL] para seleccionar seis colonias (tres de cada cepa) que se inocularon en 5 mL de LB/Car [100 mg/mL] y se incubaron por 4 h a 37°C en agitación constante. La inducción se realizó con diferentes concentraciones de IPTG (100, 250 y 500  $\mu\text{M}$ ) y tiempos de incubación (3, 4 y 5 h). Se obtuvieron alícuotas que se centrifugaron por 3 min a 11,000 x  $g$ . Las pastillas obtenidas se disolvieron en

*buffer* de lisis 1X [50 mM de Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA] y fueron sonicadas por 1 min (2 ciclos de 30 s de sonication por 2 min de descanso) y centrifugadas para resolver únicamente 50  $\mu$ L de sobrenadante de cada una por SDS-PAGE y electrotransferirlos a membrana PVDF (Ver Anexo I: N). La proteína se visualizó con azul Coomassie (Figuras 26A y 26B) y se identificó por Western-blot (Ver Anexo I: O y P) con el  $\alpha$ -6His peroxidasa [1/2000] (Figuras 26C y 26D), respectivamente.

Para establecer el tiempo de inducción de la proteína SrtA recombinante de *S. aureus* (Ver Anexo III: E), se realizaron los pre-cultivos C41 (DE3):pET15b-srtA y C43 (DE3):pET15b-srtA (Ver Anexo I: I) diluidos 1:50 en 50 mL de LB/Car [100 mg/mL] e incubados por 8 h a 37°C en agitación constante. A cada uno de estos cultivos les fue realizada una lectura de la densidad óptica en espectrofotómetro al inicio y a cada hora durante todo el periodo establecido, los datos de las lecturas fueron graficados (Figura 27A y 27B). De acuerdo con la cinética de crecimiento establecida (Ver Anexo I: L) se decidió realizar la inducción de la proteína con una concentración final de 100  $\mu$ M de IPTG para 200 mL de cultivo con un tiempo de crecimiento de 4 h, después de haber sido inoculados con una dilución de 1:50 de un pre-cultivo C43 (DE3):pET15b-srtA. Al término de un tiempo de inducción de 4 h, la masa bacteriana fue cosechada por centrifugación a 11,000 x g por 15 min a 4°C. A la pastilla bacteriana obtenida le fue retirado lo más posible el medio de cultivo, fue pesada (0.89 g) y congelada a -80°C hasta su purificación por cromatografía de afinidad a metales.

## 7.6 Purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad a metales.

### 7.6.1 Purificación de la PE\_PGRS1 recombinante de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Para extraer la proteína PE\_PGRS1 recombinante de *M. tuberculosis* H37Rv, la células de la pastilla se rompieron y del procedimiento de fraccionamiento celular se obtuvieron los cuerpos de inclusión limpios que se solubilizaron en *buffer* de equilibrio A [20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -ME, 8 M urea] (Ver Anexo I: M). Las muestras de las fracciones obtenidas de este proceso fueron resueltas por SDS-PAGE y electrotransferidas a membrana PVDF (Ver Anexo I: N) para visualizar con azul Coomassie la fracción donde se localiza la mayor proporción de la proteína recombinante (Figura 28A) e identificarla por Western-blot (Ver Anexo I: O y P) con  $\alpha$ -6His peroxidasa [1/1000] (Figura 28B), respectivamente.

La purificación por cromatografía de afinidad a metales (*IMAC*) [66,67] se efectuó de forma automática en el equipo *FPLC* (de la sigla en inglés, *Fast Purification Liquid Chromatography*) (ÄKTA-Prime, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) (**Ver Anexo I: Q**). Se colocaron 3 mL de proteína en una columna comercial que tiene acoplado el sulfato de níquel a la matriz de sefarosa (HisTrap™HP, GE), la cual inmoviliza el tallo de His fusionado a proteínas recombinantes. Se utilizó un programa diseñado previamente para proteínas solubles (*Software* UNICORN 5.1) que consta de tres etapas: unión, lavado y elución de la proteína, del que se colectaron varias fracciones (Frac920, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) (**Figura 29A**). Las muestras de las fracciones que mostraban aumento de absorbancia (mAU) en la gráfica obtenida de la purificación, fueron resueltas por *SDS-PAGE* y electrotransferidas a membrana PVDF (**Ver Anexo I: N**). La proteína se visualizó con azul Coomassie (**Figura 29B**) y se identificó por *Western-blot* (**Ver Anexo I: O y P**) con  $\alpha$ -6His peroxidasa [1/2000] (**Figura 29C**), respectivamente.

La fracción con la proteína pura (5 mL) fue re-naturalizada en membrana de diálisis (SPECTRA/POR® MWCO 3500, DAIGGER) contra 500 mL del *buffer* de equilibrio A a 4°C en agitación constante (HS, BRINKMANN) reduciendo gradualmente la concentración de urea (4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0 M cada 12 h) para evitar la precipitación de la proteína. Además, 50  $\mu$ L de proteína se dializaron contra 1 L de agua para determinar su concentración por el método de Löwry modificado y ajustado para placas de microtitulación (Microtiter®, THERMO) (**Ver Anexo I: R**). Se prepararon alícuotas de 500  $\mu$ L de la proteína PE\_PGRS1 recombinante de *M. tuberculosis* H37Rv para almacenarlas a -20°C y utilizarla en el ensayo de actividad enzimática *in vitro* junto con la SrtA recombinante.

### 7.6.2 Purificación de la SrtA recombinante de *Staphylococcus aureus*.

Para extraer la proteína SrtA recombinante de *S. aureus*, la pastilla bacteriana se disolvió en 4 mL de *buffer* de equilibrio B [20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -ME] con 300  $\mu$ g/mL de lisozima (BOEHRINGER) y se incubó a 16°C por 30 min con 600 rpm (*Thermomixer comfort*, EPPENDORF). Ésta se sonicó en hielo por 2 min (2 ciclos de 1 min de sonicado por 2 min de descanso) y se centrifugó por 10 min a 11,000 x *g* (5415c, EPPENDORF) para recuperar el sobrenadante.

La purificación por cromatografía de afinidad a metales (*IMAC*) se efectuó manualmente (**Ver Anexo I: Q**), se adicionaron 6 mL de proteína disuelta en *buffer* de equilibrio B, en una columna de poliestireno (Disposable Polystyrene Columns, PIERCE) con 2 mL de matriz de sefarosa (Chelating Sepharose™ Fast Flow, GE), la cual inmoviliza el tallo de His fusionado a proteínas recombinantes.

Posteriormente a la columna se le acopló sulfato de níquel 100 mM de acuerdo a un protocolo establecido de tres etapas: unión, lavado y elución de la proteína, de las que se colectaron varias fracciones. Las muestras de cada fracción colectada (100  $\mu$ L) se dializaron contra 500 mL de agua destilada por 3 días para resolverlas por SDS-PAGE y electrotransferirlas a membrana PVDF (**Ver Anexo I: N**) para visualizar la proteína con azul Coomassie (**Figura 30A**) e identificarla por *Western-blot* (**Ver Anexo I: O y P**) con  $\alpha$ -6His peroxidasa [1/2000] (**Figura 30B**), respectivamente.

La fracción con la proteína pura (6 mL) fue dializada contra *buffer* de equilibrio B para retirar el imidazol y una muestra contra agua destilada para determinar su concentración por Löwry (**Ver Anexo I: R**). Se prepararon alícuotas de 500  $\mu$ L de la enzima SrtA recombinante de *S. aureus* para almacenarlas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y utilizarla en el ensayo de actividad enzimática *in vitro* junto con la PE\_PGRS1 recombinante.

### 7.7 Ensayos *in vitro* para determinar la actividad de la SrtA sobre la PE\_PGRS1.

La actividad enzimática se determinó por ensayos *in vitro* en tubos de micro-centrífuga utilizando el *buffer* R1 [20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl] para equiparar las concentraciones de solutos en la mezcla de reacción y el *buffer* R2 [20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM Gly, 10 mM  $\beta$ -ME] para activar a la SrtA y generar el reconocimiento y corte del motivo LPXTG de la PE\_PGRS1 (**Ver Anexo III: F**). En cada ensayo se tuvieron a la SrtA y a la PE\_PGRS1 por separado como controles negativos, los cuales fueron incubados por 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$  (417, LAB-LINE).

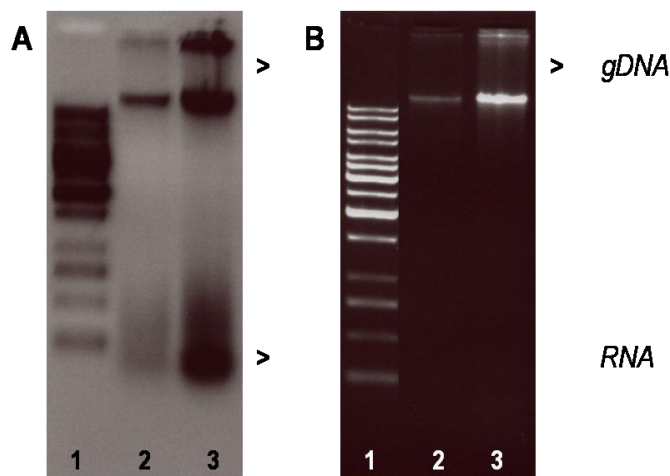
La mezcla de reacción suponiendo una relación molar (1:5) y (1:10) contenía SrtA (112.5 nmoles, esto es 106 ng) y PE\_PGRS1 (562.5 y 1125 nmoles, esto es 1250 y 2500 ng, respectivamente) (**Ver Resultados Tablas III y IV**), se aforó a 25  $\mu$ L con *buffer* R1 (puede variar de acuerdo a la concentración de la proteína). Para el inicio de la reacción enzimática *in vitro* de la SrtA, se le adicionó a la mezcla anterior 25  $\mu$ L del *buffer* R2 para obtener un volumen final de 50  $\mu$ L. Además, se prepararon mezclas de reacción de la misma forma, pero eliminando del *buffer* R2, la Gly o el  $\text{CaCl}_2$ . Los reactivos adicionados se mezclaron en *vortex* y la reacción se incubó por 0, 2, 4, 6 y 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Después de la incubación, la actividad enzimática fue inactivada por la adición del mismo volumen de *buffer* de carga 2X [25% *buffer* de gel concentrador 4X, 20% glicerol, 5%  $\beta$ -ME, 2% SDS, 0.0025% azul de bromofenol, 0.0025% rojo de pironina]. Los tubos de micro-centrífuga se hirvieron por 5 min y se almacenaron a

-20°C hasta resolver las muestras por *SDS-PAGE* y electrotransferirlas a membranas PVDF para visualizar las proteínas con azul Coomassie (**Figuras 31A, 32A, 33A y 34A**) (**Ver Anexo I: N y O**).

Para evaluar el reconocimiento y corte específicos del péptido LPNTG y la generación de los dos fragmentos de la PE\_PGRS1 (PE de 15.6 kDa y PGRS de 28.9 kDa) (**Ver Anexo III: F**) por la actividad enzimática *in vitro* de la SrtA, el fragmento PE fue identificado por *Western-blot* (**Ver Anexo I: P**) con el anticuerpo monoclonal de ratón  $\alpha$ -6His peroxidasa [1/1000] (**Figuras 31B, 32B, 33B y 34B**) y con el anticuerpo policlonal de conejo  $\alpha$ -PE33 [1/500] (obtenido por M.C. Ingrid B. Cohen Falquez, IIB-UNAM) (**Figura 31C**), respectivamente.

### 8.1 Purificación de *DNA* genómico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv para la amplificación del gen *pe\_pgrs1*.

Para eliminar cualquier contaminación de *RNA* que pudiera interferir con la amplificación del gen *pe\_pgrs1*, las dos muestras de *gDNA* se sometieron a un procedimiento de purificación. En la **figura 18A**, las bandas superiores corresponden al *gDNA* y el barrido inferior al *RNA* contaminante, en ambas muestras. Después de la purificación, en la **figura 18B**, es posible observar únicamente el *gDNA* en las dos muestras, lo que indica que se encuentran libres de *RNA* contaminante, por lo que se eligió la muestra de la colonia 1 (*carril 2*) del *gDNA* de *M. tuberculosis* H37Rv para ser utilizada en la técnica de amplificación por *PCR* del gen *pe\_pgrs1* (**Ver Anexo III: A**).



**Figura 18. Purificación de las muestras de *gDNA* de *M. tuberculosis* H37Rv.** Electroforesis en geles de agarosa-TAE al 1% (p/v) con las dos muestras de *gDNA* de las colonias de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*: **A)** Muestras contaminadas con *RNA*, y **B)** Muestras sometidas al procedimiento de purificación con RNasa A. *Carril 1*: marcador de PM (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, FERMENTAS), *Carril 2*: muestra de la colonia 1, *Carril 3*: muestra de la colonia 2; en ambas figuras. Las marcas muestran la posición del *gDNA* y del *RNA* en cada uno de los geles.

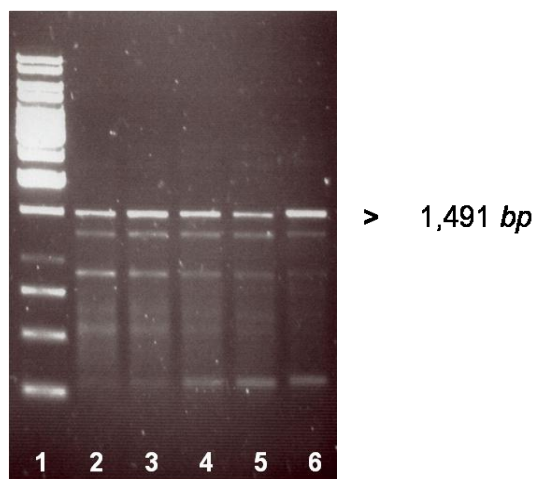
**8.2 Amplificación por PCR del gen *pe\_pgrs1* de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.**

Para la estandarización de la técnica de amplificación por PCR, se utilizaron los oligonucleótidos (Ver **Tabla II**) de la secuencia del gen *pe\_pgrs1* (1,491 bp), a partir del gDNA de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. En la **figura 19**, se observa que en la temperatura de alineamiento de 61.8°C se consiguió una mejor amplificación de esta secuencia (*carril 6*), debido a que la banda del producto se aprecia de mayor intensidad denotando especificidad, así como con una menor intensidad de fragmentos que son inespecíficos.

**Tabla II: Oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR de la secuencia codificante de la PE\_PGRS1 a partir de gDNA de *M. tuberculosis* H37Rv.**

| <b>Primer:</b> | <b>Secuencia (5' → 3'):</b>                    | <b>Longitud:</b> | <b>PM:</b> |
|----------------|--|------------------|------------|
| PEPGRS1F       | GGA <b>CAT ATG</b> TCG CTT TTG ATC ACA TCA CCG | 30 bases         | 7.3 kDa    |
| PEPGRS1R       | CCT AGC TCG GCC CGG GGG                        | 18 bases         | 5.6 kDa    |

\*El sitio de corte añadido para la enzima de restricción *NdeI* se muestra en negritas y subrayado.

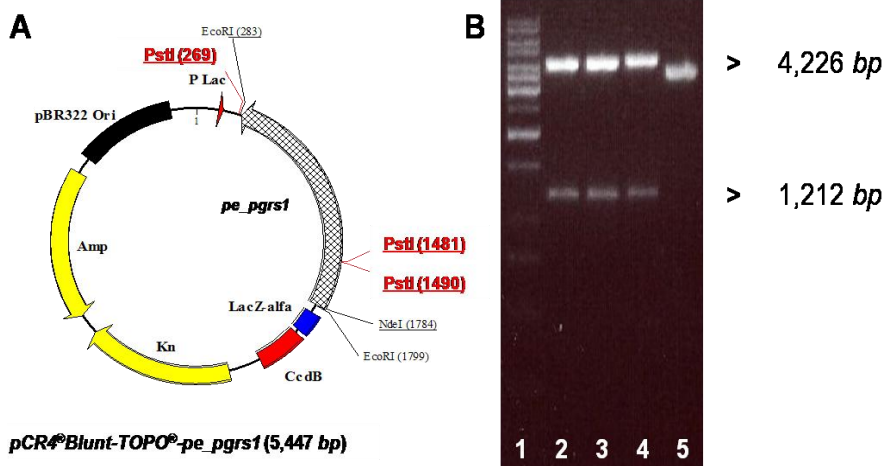


**Figura 19. Amplificación por la técnica de PCR del gen *pe\_pgrs1* de *M. tuberculosis* H37Rv.** Electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1% (p/v) con las alícuotas de 2 µl de las mezclas de reacción amplificadas con diferentes temperaturas de alineamiento (*Ta*): *Carril 1*: marcador de PM (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, FERMENTAS), *Carril 2*: 57.0°C, *Carril 3*: 58.7°C, *Carril 4*: 60.4°C, *Carril 5*: 61.1°C, *Carril 6*: 61.8°C. La marca muestra un producto con el tamaño esperado de 1,491 bp.



### 8.3 Clonación del gen *pe\_pgrs1* en el vector de expresión procarionte *pET15b*.

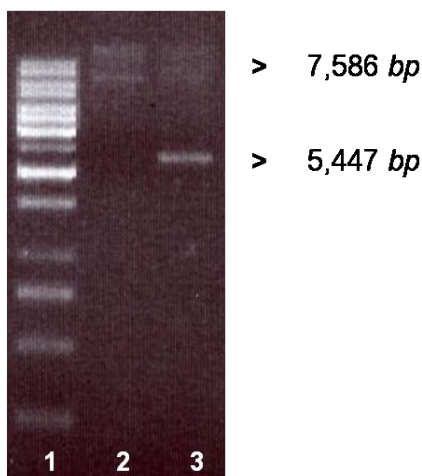
Para clonar el producto amplificado en el vector *pET15b*, fue necesario capturarlo previamente en el vector de clonación *pCR4Blunt-TOPO*<sup>®</sup> (3,956 bp). En la **figura 20A**, se muestra el mapa de restricción del plásmido recombinante *pCR4Blunt-TOPO*<sup>®</sup>-*pe\_pgrs1* (5,447 bp) (*Ver Anexo III: B*) que se obtuvo con el programa *DNAMAN*, en el cual se señalan los sitios de corte para la endonucleasa *Pst*I en las posiciones 269 del vector y 1,481 y 1,490 del marco de lectura abierto (*ORF*, por su sigla en inglés). En la **figura 20B**, se muestra la digestión del plásmido con los fragmentos generados de 4,226, 1,212 y 9 bp que corresponden a los esperados (*carriles 2-4*, el último fragmento no se observa). La construcción *pCR4Blunt-TOPO*<sup>®</sup>-*pe\_pgrs1* se corroboró mediante secuenciación (*Ver Anexo III: C*).



**Figura 20. Análisis de restricción del plásmido recombinante *pCR4*<sup>®</sup>*Blunt-TOPO*<sup>®</sup>-*pe\_pgrs1*.** **A)** Mapa de restricción del plásmido *pCR4*<sup>®</sup>*Blunt-TOPO*<sup>®</sup>-*pe\_pgrs1* (5,447 bp) con los sitios de corte para la endonucleasa *Pst*I. **B)** Electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1% (p/v) que muestra el plásmido *pCR4*<sup>®</sup>*Blunt-TOPO*<sup>®</sup>-*pe\_pgrs1* digerido con la endonucleasa *Pst*I y sin digerir (control negativo). *Carril 1*: marcador de PM (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, FERMENTAS), *Carriles 2-4*: plásmido digerido (colonias 1-3), *Carril 5*: plásmido sin digerir. Las marcas indican los fragmentos de 4,226 y 1,212 bp, lo que señala que efectivamente fue capturado en dirección 3'-5'.

Posteriormente, fue necesario extraer el vector *pET15b* (5,708 bp) y el gen *pe\_pgrs1* (1,491 bp). En la **figura 21**, se muestran los plásmidos recuperados de la cepa de manipulación *E. coli* Top10F'

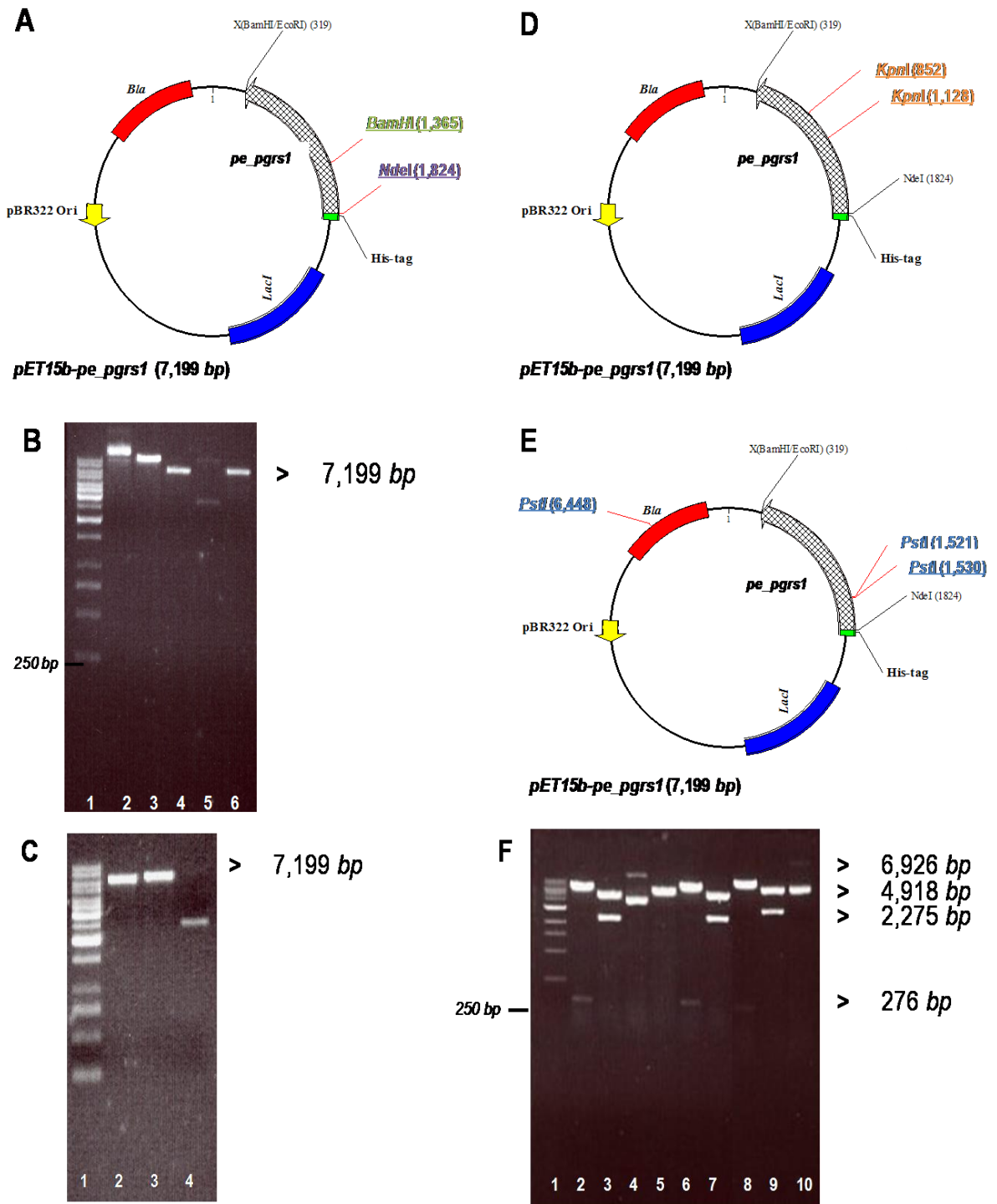
transformada, *pET15b-Hsp70* (carril 2) y *pCR®4Blunt-TOPO®-pe\_pgrs1* (carril 3), que fueron utilizados para la subclonación del gen *pe\_pgrs1* en el vector de expresión *pET15b* para la construcción del plásmido *pET15b-pe\_pgrs1*, que tiene un tamaño de 7,199 bp.



**Figura 21. Plásmidos para la generación del plásmido recombinante *pET15b-pe\_pgrs1*.** Electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1% (p/v) con los plásmidos para purificar el vector *pET15b* (5,708 bp) y el gen *pe\_pgrs1* (1,491 bp). Carril 1: marcador de PM (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, FERMENTAS), Carril 2: plásmido *pET15b-Hsp70* (7,586 bp), Carril 3: plásmido *pCR®4Blunt-TOPO®-pe\_pgrs1* (5,447 bp).

En la **figura 22A**, se muestra el mapa de restricción del plásmido *pET15b-pe\_pgrs1* (7,199 bp) obtenido (**Ver Anexo III: B**) con los sitios de corte para las endonucleasas *Bam*HI y *Nde*I. *Bam*HI presenta un sitio en la posición 1,365 del *ORF*, en la **figura 22B** se observan dos de los cuatro plásmidos extraídos en forma lineal (carriles 4 y 6). *Nde*I presenta un sitio en la posición 1,824 del *ORF*, en la **figura 22C** se observan los dos plásmidos en forma lineal (carriles 2 y 3). En la **figura 22D**, se muestra el mapa de restricción para la endonucleasa *Kpn*I mostrando dos sitios de corte en las posiciones 852 y 1,128 del *ORF*. En la **figura 22E**, se puede observar el mapa de restricción para la endonucleasa *Pst*I, mostrando un sitio de corte en la posición 6,448 del vector y dos en las posiciones 1,521 y 1,530 del *ORF*. En la **figura 22E**, se aprecia que *Kpn*I produjo fragmentos de 6,926 y 276 bp (carriles 2,6 y 8) y *Pst*I de 4,918, 2,275 y 9 bp (carriles 3, 7 y 9, el último fragmento no se

observa), este patrón se observa en tres de los cuatro plásmidos digeridos. La construcción *pET15b-pe\_pgrs1* se corroboró mediante secuenciación (Ver Anexo III: C).

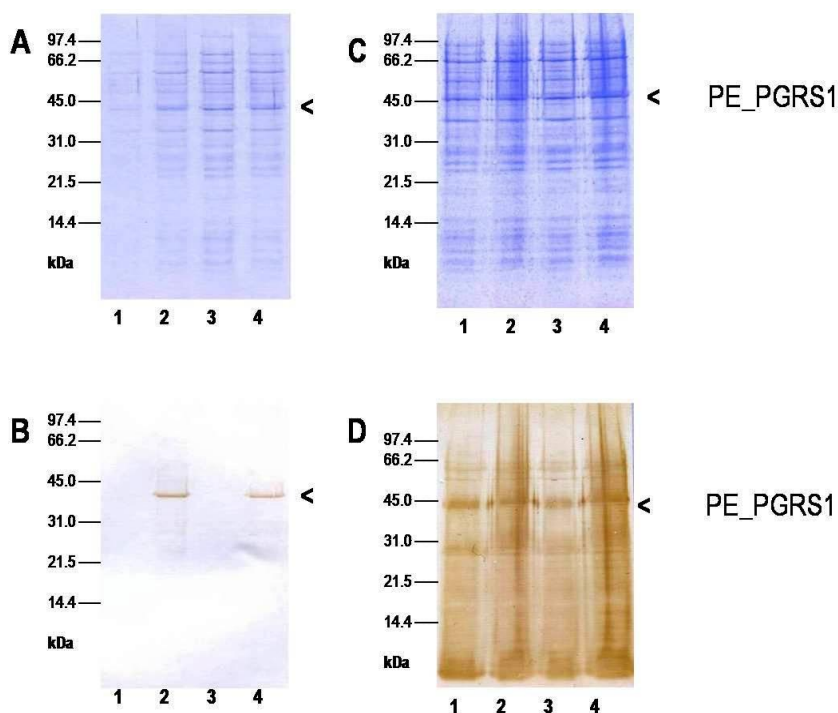


**Figura 22. Análisis de restricción del plásmido recombinante *pET15b-pe\_pgrs1*.** **A)** Mapa de restricción del plásmido *pET15b-pe\_pgrs1* con los sitios de corte para las endonucleasas *Bam*HI y *Nde*I. **B)** Electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1% (p/v) de la digestión con *Bam*HI; *Carril 2*: plásmido sin digerir (control negativo), *Carriles 3-6*: plásmido digerido; las marcas señalan las dos construcciones correctas con los fragmentos esperados. **C)** Electroforesis en gel de agarosa-TAE 1% (p/v) de la digestión con *Nde*I; *Carriles 2 y 3*: plásmido digerido, *Carril 4*: plásmido sin digerir (control negativo). **D y E)** Mapas de restricción del plásmido *pET15b-pe\_pgrs1* con los sitios de corte para las endonucleasas *Kpn*I y *Pst*I, respectivamente. **F)** Electroforesis en gel de agarosa-TAE 1% (p/v) de las digestiones con *Kpn*I y *Pst*I; *Carriles 2, 4, 6, 8*: plásmido digerido con *Kpn*I, *Carriles 3, 5, 7, 9*: plásmido digerido con *Pst*I, *Carril 10*: plásmido sin digerir (control negativo); las marcas señalan las tres construcciones correctas con los fragmentos esperados. \* En todos los geles, *Carril 1*: marcador de PM (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, FERMENTAS).

## 8.4 Producción de las proteínas recombinantes PE\_PGRS1 y SrtA en *Escherichia coli*.

### 8.4.1 Expresión de la PE\_PGRS1 recombinante de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Para encontrar la condición óptima para la expresión de la proteína recombinante PE\_PGRS1 de *M. tuberculosis* H37Rv en *E. coli* Rosetta (DE3), se utilizó el IPTG a 250 y 500  $\mu$ M. La migración de la proteína fue analizada por SDS-PAGE, la cual se localizó en el peso esperado de 44.5 kDa predicho con el programa WinPep<sup>[68]</sup>. Después de la inducción, en las **figuras 23A y 23C**, se observa la expresión de la proteína recombinante en mayor cantidad a diferencia de los cultivos sin inducir. Con la finalidad de corroborar que las proteínas sobre-expresadas eran las esperadas, se realizó un Western-blot con el anticuerpo monoclonal para el tallo de 6His, que reconoció al antígeno recombinante de manera específica, como se observa en la **figura 23B** (*carriles 2 y 4*). Además, se evaluó la especificidad con un anticuerpo policlonal dirigido contra la proteína completa PE\_PGRS33 recombinante, que reconoció al antígeno recombinante así como a proteínas de *E. coli*, como se muestra en la **figura 23D**, por lo que es inespecífico y no podrá seguir utilizándose (**Ver Anexo III: D**). Con estas observaciones, se decidió utilizar una concentración final de 250  $\mu$ M de IPTG para la inducción de la proteína recombinante PE\_PGRS1.



**Figura 23. Expresión de la proteína recombinante PE\_PGRS1 de *M. tuberculosis* H37Rv en la cepa *E. coli* Rosetta (DE3).** Membranas PVDF con las proteínas expresadas de cultivos de *E. coli* Rosetta (DE3) transformada con el plásmido *pET15b-pe\_pgrs1* antes y después de la inducción (lisado celular). **A)** Tinción Azul Coomassie con 10  $\mu$ l de muestra por pozo. Carriles 1 y 3: sin inducción, Carril 2: con IPTG [250  $\mu$ M], Carril 4: con IPTG [500  $\mu$ M]. **B)** Western-blot para el reconocimiento de la PE\_PGRS1 por el anticuerpo  $\alpha$ -6His HRP [1:2000]. **C)** Tinción Azul Coomassie con 25  $\mu$ l de muestra por pozo. Carriles 1 y 3: sin inducción, Carril 2: con IPTG [250  $\mu$ M], Carril 4: con IPTG [500  $\mu$ M]. **D)** Western-blot para el reconocimiento de la PE\_PGRS1 por el anticuerpo  $\alpha$ -PE\_PGRS33 [1:1000]. Las marcas señalan la proteína recombinante PE\_PGRS1 de 44.5 kDa. Marcador de PM (SDS\_PAGE Standards Low Range, BIO-RAD).

Para determinar el tiempo de incubación antes de adicionar el inductor, se realizó la cinética de crecimiento por 12 h a 37°C en agitación constante. En la **figura 24A**, se observa el comportamiento de dos colonias de la cepa de expresión Rosetta (DE3) transformadas con el plásmido *pET15b-pe\_pgrs1*. La fase logarítmica intermedia se alcanzó a las 3 h de crecimiento con una  $DO_{600nm}$  de 0.6 y la inducción se realizó durante 8 h. Para confirmar el intervalo de tiempo de crecimiento, en la

figura 24B, se observa que a las 3 h es cuando la Tasa de Crecimiento Específico [TCE] se desacelera y el Tiempo de Duplicación [TD] aumenta.

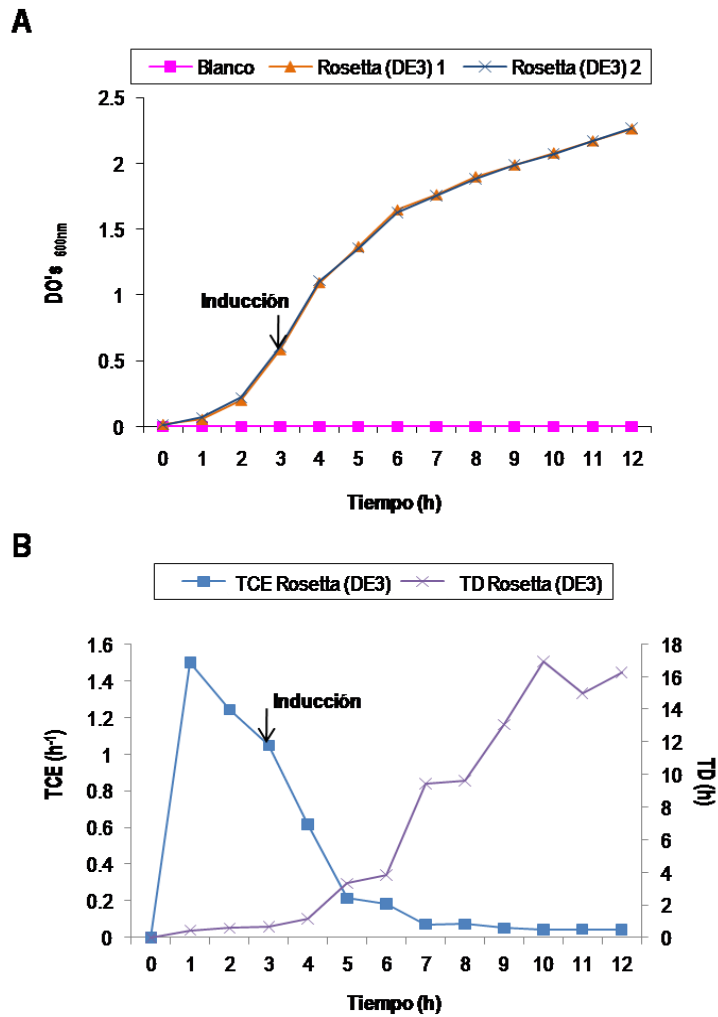
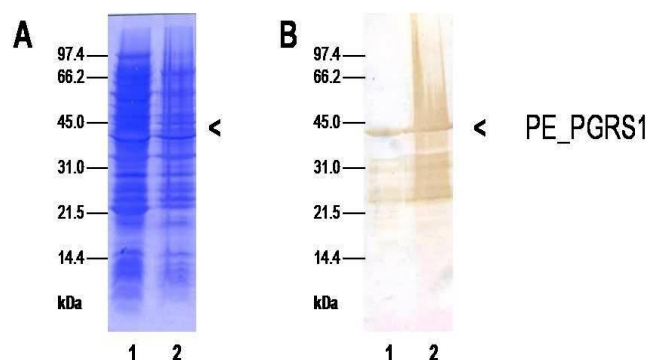


Figura 24. Cinética de crecimiento de la cepa de expresión *E. coli* Rosetta (DE3) transformada con el plásmido recombinante *pET15b-pe\_pgrs1*. **A)** Gráfica de las lecturas de los valores de las densidades ópticas a 600nm tomadas cada hora durante 12 h de los cultivos de la cepa de expresión *E. coli* Rosetta (DE3) colonia 1 (triángulo) y colonia 2 (cruz) en medio líquido LB/Car [100 mg/mL]. El medio de cultivo LB como control negativo con un valor constante de cero (cuadrado). **B)** Gráfica del promedio de los datos de la Tasa de Crecimiento Específico [TCE = h<sup>-1</sup>] (cuadrado) y el Tiempo de Duplicación [TD = h] (cruz), calculados para cada una de las lecturas de densidad óptica de la curva de crecimiento. Las flechas indican el momento en que se decidió realizar la inducción de la cepa de expresión (3 h).

La proteína recombinante PE\_PGRS1 se obtuvo a partir de 500 mL de un cultivo de 8 h de *Rosetta (DE3):pET15b-pe\_pgrs1* y al efectuar la separación de las fracciones, tanto la fracción soluble como la insoluble fueron analizadas por *SDS-PAGE* y *Western-blot*, respectivamente. En la **figura 25A**, se observa una mayor expresión de proteína insoluble (*carril 2*), lo cual indica que se forman cuerpos de inclusión producto de la sobre-expresión. Con la finalidad de corroborar que la proteína expresada es la esperada, en la **figura 25B**, se muestra el reconocimiento del antígeno recombinante por el anticuerpo monoclonal específico para el tallo de 6His fusionado. Además, es posible observar el reconocimiento de otras bandas por debajo de la PE\_PGRS1 en ambas fracciones.

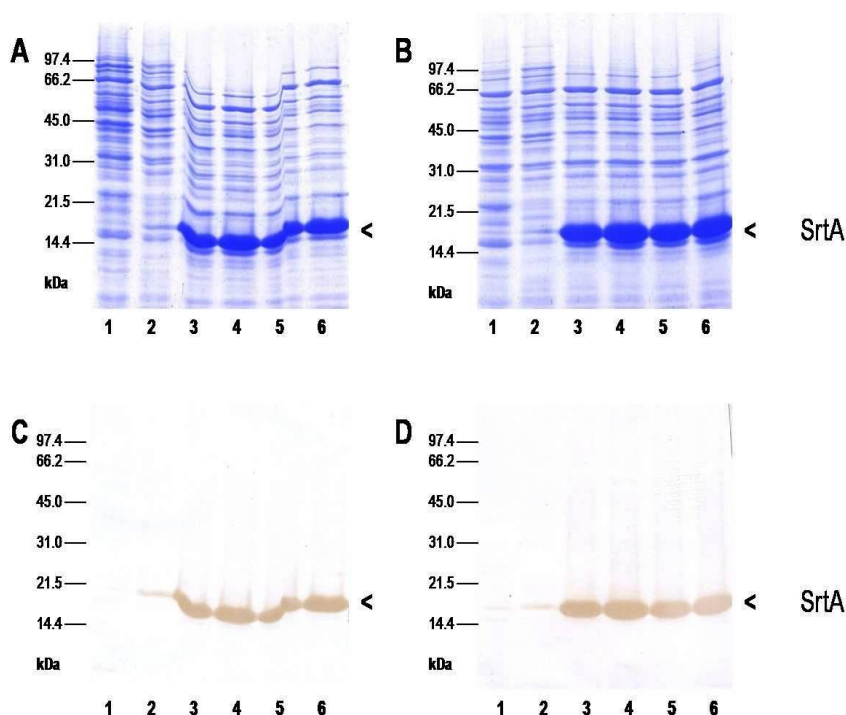


**Figura 25. Fraccionamiento de las células inducidas para la expresión de la proteína recombinante PE\_PGRS1.** Membranas PVDF con las proteínas del lisado celular del cultivo de la cepa *Rosetta (DE3)* de *E. coli*. **A)** Tinción Azul Comassie. **B)** *Western-blot* para el reconocimiento de la PE\_PGRS1 por el anticuerpo  $\alpha$ -6His HRP [1:2000]. *Carril 1*: Fracción soluble (sobrenadante), *Carril 2*: Fracción insoluble (pastilla). Las marcas señalan la proteína recombinante PE\_PGRS1 de 44.5 kDa. Marcador de PM (*SDS-PAGE Standards Low Range*, BIO-RAD).

#### 8.4.2 Expresión de la SrtA recombinante de *Staphylococcus aureus*.

Para encontrar la condición óptima para la expresión de la proteína recombinante SrtA de *S. aureus* en *E. coli* C41 (DE3) y C43 (DE3), se utilizó el IPTG a 100 y 500  $\mu$ M con 3 y 5 h de inducción. La migración de la proteína fue analizada por *SDS-PAGE*, la cual se localizó en el peso esperado de 18.9 kDa predicho con el programa *WinPep*. Después de la inducción, en las **figuras 26A y 26B**, se

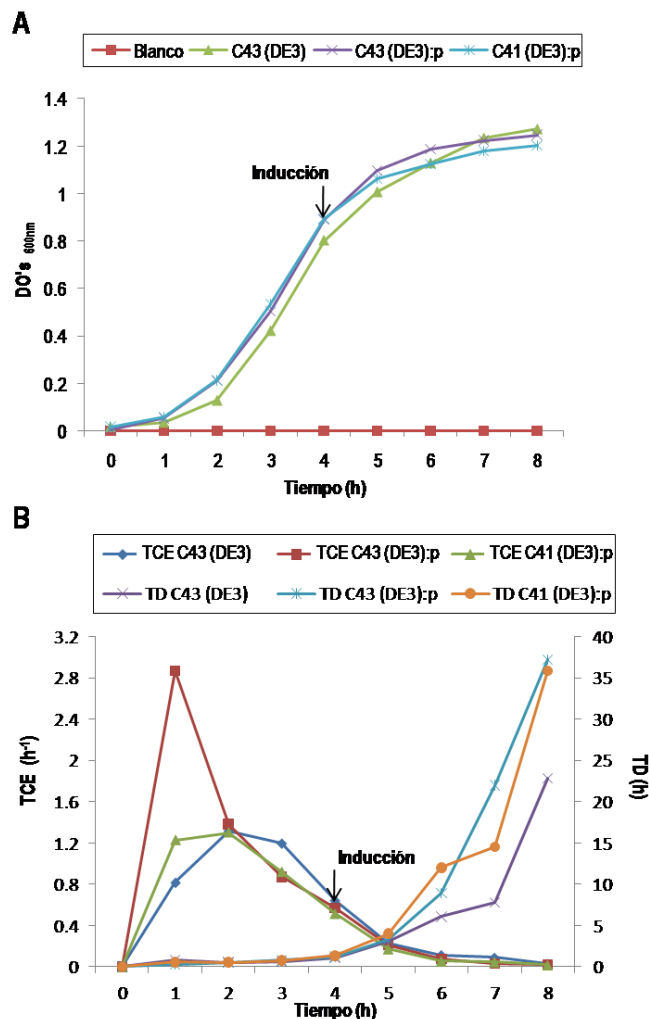
observa la expresión de la proteína recombinante en mayor cantidad (*carriles 3-6*) a diferencia de los cultivos sin inducir y sin plásmido, respectivamente (*carriles 1 y 2*). Con la finalidad de corroborar que la proteína expresada es la esperada se realizó un *Western-blot*, donde se identificó con el anticuerpo monoclonal para el tallo de 6His. En la **figura 26C**, se observa el antígeno recombinante expresado por la cepa C41 (DE3) y en la **figura 26D**, el antígeno expresado por la cepa C43 (DE3) (*Ver Anexo III: E*). Con estas observaciones, se decidió inducir con una concentración final de 100  $\mu\text{M}$  de IPTG de la cepa *E. coli* C43 (DE3) para expresar la proteína recombinante SrtA.



**Figura 26. Expresión de la proteína recombinante SrtA de *S. aureus* en las cepas *E. coli* C41 (DE3) y C43 (DE3).** Membranas PVDF con las proteínas expresadas de cultivos de *E. coli* C41 y C43 transformada con el plásmido *pET15b-srtA* antes y después de la inducción (lisado celular). Tinción Azul Comassie: **A)** Cepa C41 y **B)** Cepa C43. *Western-blot* para el reconocimiento de la SrtA por el anticuerpo  $\alpha$ -6His *HRP* [1:2000]: **C)** Cepa C41 y **D)** Cepa C43. *Carril 1*: Sin plásmido e inducida [100  $\mu\text{M}$  y 5 h] (control negativo), *Carril 2*: Con plásmido sin inducir [5 h] (control positivo), *Carriles 3-6*: Con plásmido e inducidas [100  $\mu\text{M}$  y 3 h], [100  $\mu\text{M}$  y 5 h], [500  $\mu\text{M}$  y 3 h] y [500  $\mu\text{M}$  y 5 h]. Las marcas señalan la proteína recombinante SrtA de 18.9 kDa. Marcador de PM (*SDS\_PAGE Standards Low Range*, BIO-RAD).



Para determinar el tiempo de incubación antes de adicionar el inductor, se realizó una cinética de crecimiento por 8 h a 37°C en agitación constante. En la **figura 27A**, se observa el comportamiento de dos colonias de las cepas de expresión C41 (DE3) y C43 (DE3) transformadas con el plásmido *pET15b-srtA*. La fase logarítmica intermedia se alcanzó a las 4 h de crecimiento con una  $DO_{600nm}$  de 0.9 y la inducción se realizó durante 4 h. Para confirmar el intervalo de tiempo de crecimiento, en la **figura 27B**, se observa que a las 4 h es cuando la Tasa de Crecimiento Específico [TCE] se desacelera y el Tiempo de Duplicación [TD] aumenta.



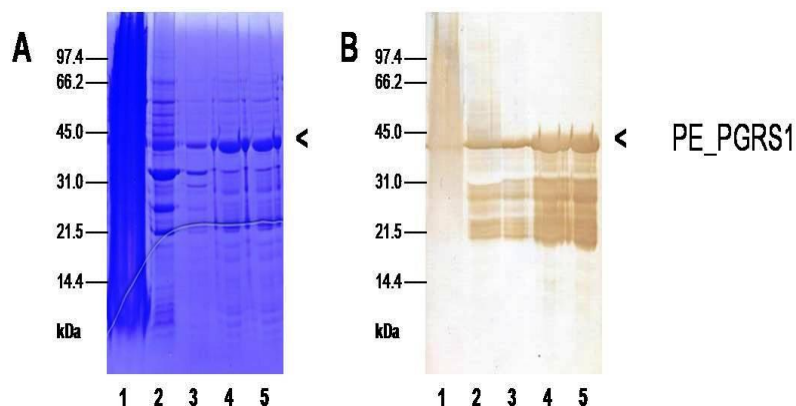
**Figura 27. Cinética de crecimiento de las cepas de expresión *E. coli* C41 (DE3) y C43 (DE3) transformadas con el plásmido recombinante *pET15b-srtA*. Gráfica de las lecturas de los valores de las densidades ópticas a 600 nm tomadas cada hora durante 8 h de los cultivos de las cepas de expresión *E. coli* C43 (DE3) con plásmido (círculo) y *E.***

*coli* C41 (DE3) con plásmido (cruz) en medio líquido LB/Car [100 mg/mL]. La cepa *E. coli* C43 (DE3) sin plásmido como control positivo (triángulo) y el medio de cultivo LB como control negativo con un valor constante de cero (cuadrado). **B)** Gráfica de los datos de Tasa de Crecimiento Específico [TCE = h<sup>-1</sup>] (cuadrado) y Tiempo de Duplicación [TD = h] (cruz), calculados para cada una de las lecturas de densidad óptica de la curva de crecimiento. Las flechas indican el momento en que se decidió realizar la inducción de la cepa de expresión (4 h).

## 8.5 Purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad a metales.

### 8.5.1 Purificación de la PE\_PGRS1 recombinante de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

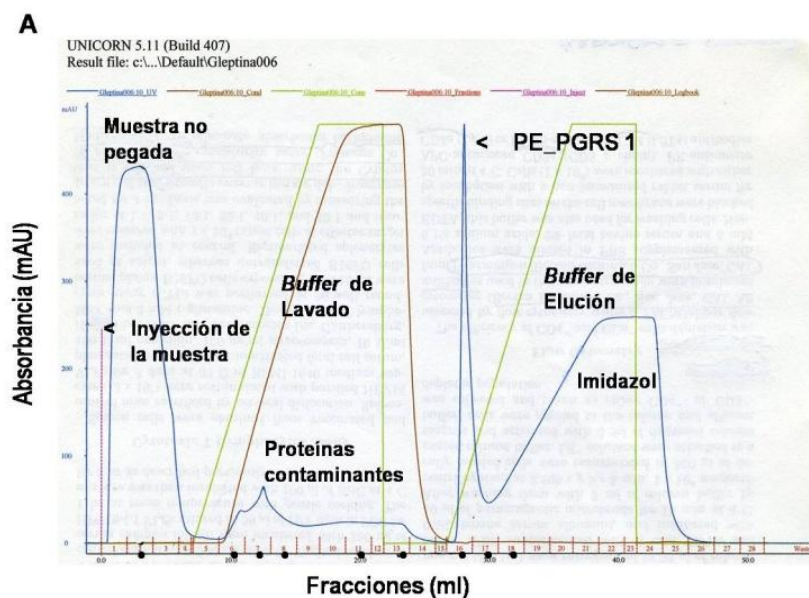
Para el proceso de purificación de la proteína recombinante PE\_PGRS1 insoluble, fue necesario extraer los cuerpos de inclusión formados por *E. coli* Rosetta (DE3). Después de realizar el procedimiento de recuperación de los cuerpos de inclusión, las proteínas obtenidas del fraccionamiento celular se analizaron por SDS-PAGE, en la **figura 28A**, se observa una menor cantidad de proteínas contaminantes después de los lavados (*carriles* 4 y 5). Para corroborar la presencia de la proteína PE\_PGRS1, se realizó un *Western-blot* con el anticuerpo monoclonal para el tallo de 6His, en la **figura 28B**, se muestra el reconocimiento del antígeno recombinante.

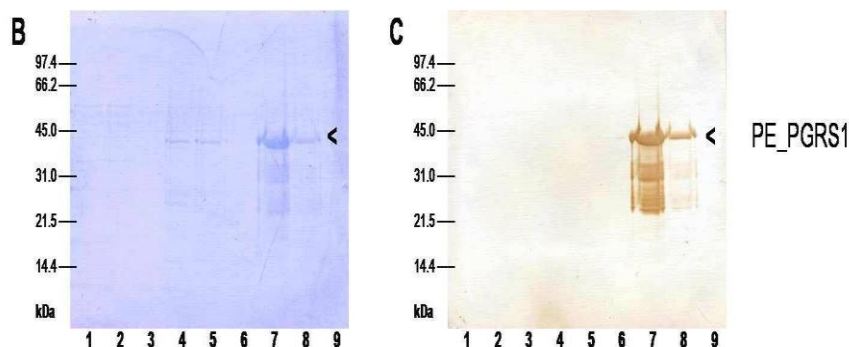


**Figura 28. Purificación y solubilización de los cuerpos de inclusión que contienen a la proteína recombinante PE\_PGRS1. A)** Gel de poliacrilamida al 12% teñido con Azul Coomassie. **B)** *Western-blot* para el reconocimiento de la PE\_PGRS1 por el anticuerpo  $\alpha$ -

6His HRP [1:2000]. *Carril 1*: Sobrenadante del sonicado con *Buffer* de Lisis 1X, Lisozima y Triton X-100, *Carriles 2 y 3*: Primer y segundo lavado con *Buffer* de Lisis 1X, *Carriles 4 y 5*: Cuerpos de inclusión limpios. Las marcas muestran a la proteína PE\_PGRS1 de 44.5 kDa. Marcador de PM (*SDS\_PAGE Standards Low Range*, BIO-RAD).

La proteína recombinante PE\_PGRS1 solubilizada, se purificó por cromatografía de afinidad a níquel de forma automática. En la **figura 29A**, se muestra el cromatograma donde se distingue el momento en el que la muestra problema es inyectada, las fracciones de lavado y elución del procedimiento de purificación y la señal por la presencia de imidazol en el *buffer* de elución. Las fracciones con un aumento en el valor de la absorbancia (mAU) fueron analizadas por *SDS-PAGE*. En la **figura 29B**, se detectaron las proteínas contaminantes de *E. coli* Rosetta (DE3) en la muestra no pegada (*carril 1*) y en las fracciones de lavado (*carriles 2-6*), así como la proteína de interés en las fracciones de elución (*carril 7-9*). Para confirmar que se trata de la PE\_PGRS1 se realizó un *Western-blot*, en la **figura 29C**, se muestra el reconocimiento del anticuerpo monoclonal contra el tallo de 6His únicamente en las fracciones de elución (*carril 7 y 8*). Como resultado de la purificación se obtuvo una cantidad adecuada de la PE\_PGRS1, la cual fue re-naturalizada por diálisis contra el *buffer* de equilibrio reduciendo gradualmente la concentración de urea (4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0 M) sin observarse precipitación.



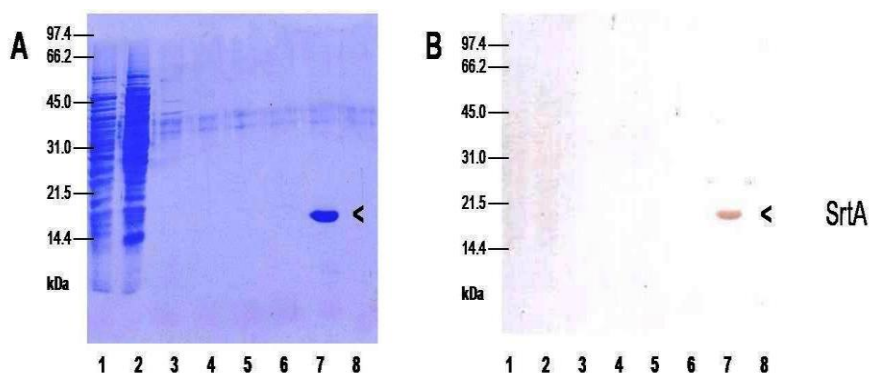


**Figura 29. Purificación de la proteína recombinante PE\_PGRS1 por cromatografía de afinidad a níquel (IMAC).** **A)** Cromatograma obtenido con el *Software* UNICORN 5.1 (Fracciones [mL] vs. Absorbancia [mAU= miliunidades de absorbancia]). *Leyenda:* Luz UV, Conductancia, Concentración, Fracciones, Inyección, Guía. Los puntos (\*) muestran las fracciones resueltas por SDS-PAGE de izquierda a derecha **B)** Tinción Azul Coomassie. **C)** *Western-blot* para el reconocimiento de la PE\_PGRS1 por el anticuerpo  $\alpha$ -6His HRP [1:1000]. *Carril 1:* Fracción de muestra no pegada, *Carriles 2-6:* Fracciones del lavado, *Carriles 7-9:* Fracciones de elución. Las marcas muestran a la proteína recombinante PE\_PGRS1 de 44.5 kDa. Marcador de PM (SDS-PAGE Standards Low Range, BIO-RAD).

La concentración de la PE\_PGRS1 purificada fue de 0.097 mg/mL, se obtuvieron seis alícuotas de 500  $\mu$ l c/u y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Por lo tanto, el rendimiento fue de 0.582 mg/l, lo necesario para realizar el ensayo *in vitro* de actividad enzimática con la SrtA.

### 8.5.2 Purificación de la SrtA recombinante de *Staphylococcus aureus*.

La proteína recombinante SrtA de la fracción soluble fue purificado por cromatografía de afinidad a níquel de forma manual. Las fracciones obtenidas del procedimiento de purificación se analizaron por SDS-PAGE. En la **figura 30A**, se observa la proteína purificada en la fracción de elución (*carril 7*), así como proteínas de 38 kDa, que corresponden a contaminación con queratina por la manipulación inadecuada del gel de poliacrilamida [69]. Al realizar un *Western-blot* con el anticuerpo monoclonal para el tallo de 6His, en la **figura 30B**, se confirmó que se trata de la SrtA, ésta fue dializada contra *buffer* de equilibrio para retirar el imidazol sin observarse precipitación.



**Figura 30. Purificación de la proteína recombinante SrtA por cromatografía de afinidad a metales (IMAC).** Membranas PVDF de las fracciones de proteínas obtenidas del procedimiento de purificación. **A)** Tinción Azul Coomassie. **B)** *Western-blot* para el reconocimiento de la SrtA por el anticuerpo  $\alpha$ -6His HRP [1:2000]. *Carril 1:* Fracción de muestra no pegada, *Carriles 2-6:* Fracciones del lavado, *Carril 7:* Fracción de elución, *Carril 8:* Fracción de lavados con EDTA y NaCl. Las marcas muestran a la proteína recombinante SrtA de 18.9 kDa. Marcador de PM (SDS\_PAGE Standards Low Range, BIO-RAD).

La concentración de la SrtA purificada fue de 0.420 mg/mL, se obtuvieron doce alícuotas de 500  $\mu$ l c/u, cuatro se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y ocho a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Por lo tanto, el rendimiento fue de 12.6 mg/l, lo necesario para realizar el ensayo *in vitro* de actividad enzimática con la PE\_PGRS1.

### 8.6 Detección de las proteínas por *Western-blot* en los ensayos *in vitro* de actividad enzimática.

La actividad enzimática de la SrtA se determinó por ensayos *in vitro* en los que se probaron dos diferentes concentraciones de la proteína PE\_PGRS1 como sustrato (562.5 y 1125 nmoles), de acuerdo a la sensibilidad del anticuerpo monoclonal para el tallo 6His, considerando dos relaciones moleculares enzima/sustrato (1:5 y 1:10) y cinco intervalos de tiempo de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  (0, 2, 4, 6 y 24 h). Por otro lado, la actividad enzimática específica se evaluó eliminando de los ensayos, los elementos indispensables para la activación de la SrtA (Gly y calcio, respectivamente) con el fin de

anular la actividad enzimática [55,67,70,71]. Las mezclas de reacción almacenadas a -20°C, se descongelaron y se resolvieron en SDS-PAGE para detectar las proteínas por Western-blot con los anticuerpos correspondientes (Ver Anexo III: F).

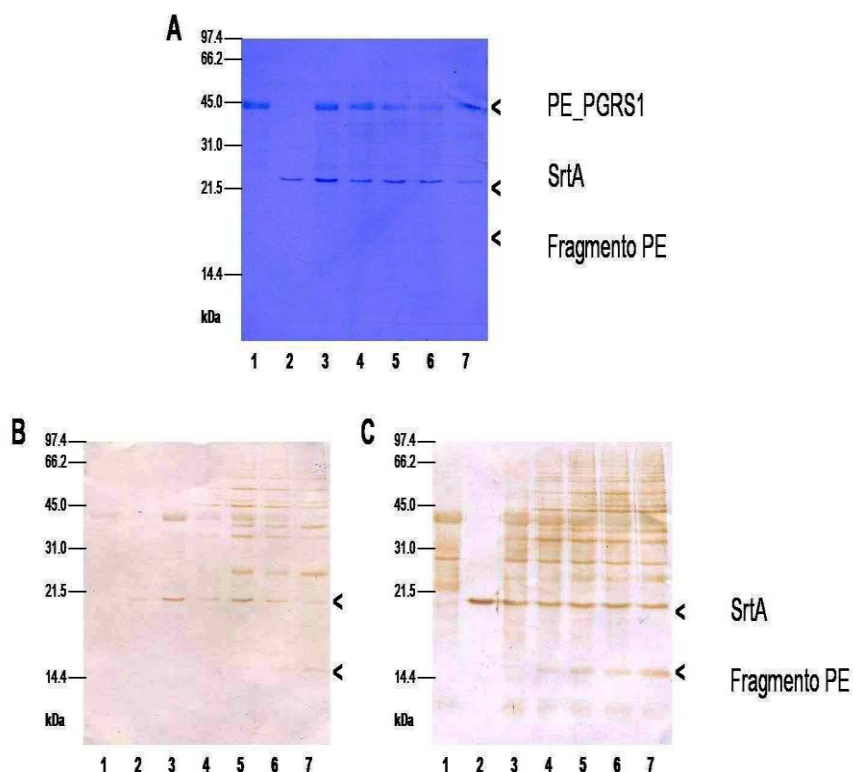
Para el ensayo enzimático *in vitro* con una relación molecular de 1:5, se utilizaron los reactivos necesarios para producir la actividad esperada (Ver Tabla III), lo que no debe suceder en los controles negativos dado que no incluyen a la SrtA o a la PE\_PGRS1, respectivamente.

Tabla III. Reactivos utilizados en el ensayo *in vitro* con relación molecular 1:5.

| Reactivos            | Control PE_PGRS1 | Control Sortasa A | Reacción enzimática |
|----------------------|------------------|-------------------|---------------------|
| PE_PGRS1             | 12.89µl          | -                 | 12.89µl             |
| Buffer R1*           | 12.11µl          | 24.75µl           | 11.86µl             |
| Buffer R2            | 25µl             | 25µl              | 25µl                |
| SrtA                 | -                | 0.25µl            | 0.25µl              |
| <b>Volumen Final</b> | <b>50µl</b>      | <b>50µl</b>       | <b>50µl</b>         |

\* El volumen del *buffer* R1 varía de acuerdo a la concentración de las proteínas.

Únicamente en las reacciones del ensayo donde se incluyó la PE\_PGRS1 se logró detectar la actividad de la SrtA. En la **figura 31A**, se observa la tinción de Coomassie de la PE\_PGRS1 de 44.5 kDa, la SrtA de 18.9 kDa y por debajo una ligera banda, en el tiempo máximo de incubación (*carril 7*). En la **figura 31B**, se muestra el reconocimiento de la SrtA y la banda de menor tamaño con el anticuerpo anti-6His, lo cual indica que esta última se trata del fragmento esperado, ya que presenta un tallo 6His fusionado al extremo N-terminal y coincide con el peso esperado de 15.6 kDa (*carril 7*). En la **figura 31C**, es posible observar el reconocimiento de las mismas proteínas con el anticuerpo anti-dominio PE33 que presenta mayor sensibilidad, con lo que se confirma que se trata del fragmento PE de la PE\_PGRS1 generado desde las 2 h de reacción (*carriles 4-7*). En ambos casos se observan otras bandas no identificadas de mayor tamaño que el fragmento esperado. Algo interesante, es que en ninguno de los dos casos se determinó el reconocimiento de la proteína completa después del proceso de re-naturalización (**figuras 31B y 31C**).



**Figura 31. Ensayo *in vitro* de la actividad enzimática de la SrtA sobre la PE\_PGRS1 con relación molecular 1:5.** Membranas PVDF con las proteínas recombinantes utilizadas en el ensayo *in vitro* para determinar la actividad enzimática a diferentes tiempos de incubación. **A)** Tinción Azul Coomassie. **B)** *Western-blot* para el reconocimiento de la SrtA y la PE\_PGRS1 por el anticuerpo  $\alpha$ -6His HRP [1:1000]. **C)** *Western-blot* con el anticuerpo  $\alpha$ -PE33 [1:500] para el reconocimiento del fragmento PE. *Carril 1:* Proteína PE\_PGRS1 (control negativo), *Carril 2:* Enzima SrtA (control negativo), *Carriles 3-7:* Actividad enzimática 0, 2, 4, 6 y 24 h, respectivamente. Las marcas muestran a la PE\_PGRS1 de 44.5 kDa, la SrtA de 18.9 kDa y el fragmento PE de la PE\_PGRS1 con un peso estimado de 15.7 kDa, producto del corte del motivo LPXTG por la SrtA.

Con la intención de observar notoriamente la actividad de la SrtA sobre la PE\_PGRS1 se decidió aumentar al doble la concentración de ésta última, manteniendo una relación molecular de 1:10. Para este ensayo enzimático *in vitro* se utilizaron los reactivos correspondientes para producir la

actividad esperada (Ver Tabla IV), lo que no debe suceder en los controles negativos dado que no incluyen a la SrtA o a la PE\_PGRS1, respectivamente.

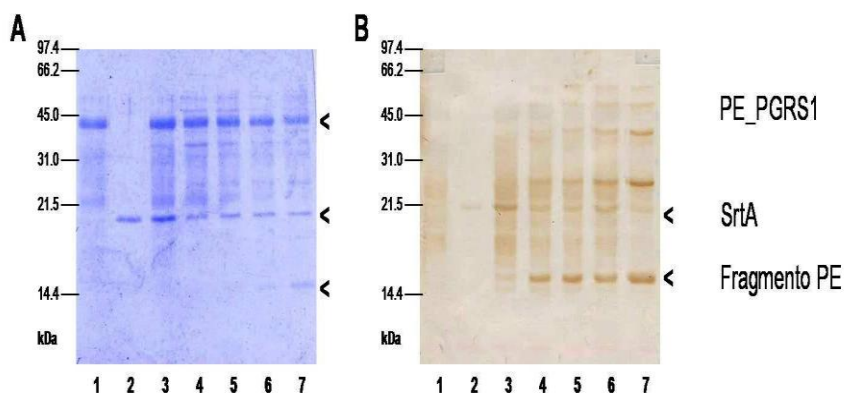
Tabla IV. Reactivos utilizados en el ensayo *in vitro* con relación molecular 1:10.

| Reactivos            | Control PE_PGRS1 | Control Sortasa A | Reacción enzimática |
|----------------------|------------------|-------------------|---------------------|
| PE_PGRS1             | 25.77µl          | -                 | 25.77µl             |
| Buffer R1*           | 24.23µl          | 49.75µl           | 23.98µl             |
| Buffer R2**          | 50µl             | 50µl              | 50µl                |
| SrtA                 | -                | 0.25µl            | 0.25µl              |
| <b>Volumen Final</b> | <b>100µl</b>     | <b>100µl</b>      | <b>100µl</b>        |

\* El volumen del *buffer* R1 varía de acuerdo a la concentración de las proteínas.

\*\* El *buffer* R2 cambia de composición eliminando la Gly o el calcio, respectivamente.

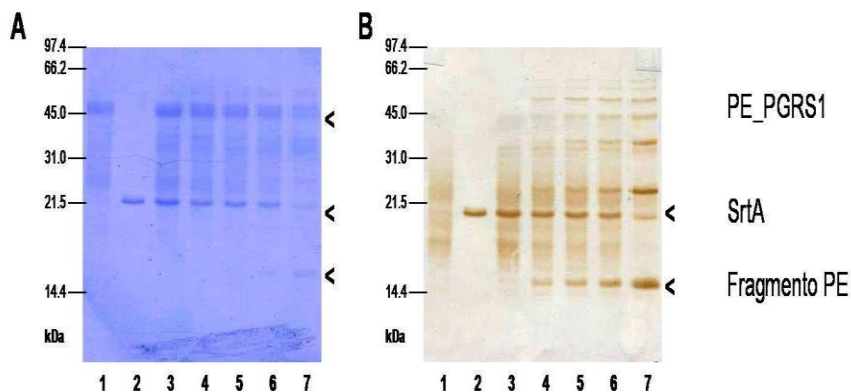
En el ensayo *in vitro* con una relación molecular de 1:10 se logró detectar mejor la actividad de la SrtA. En la **figura 32A**, se observa la tinción de Coomassie de la PE\_PGRS1 y la SrtA, que presenta una disminución en la señal de cada una de las proteínas recombinantes. Existe la aparición del fragmento PE debajo de la SrtA a partir de las 6 h de incubación y aumenta a las 24 h (*carriles* 6 y 7, respectivamente). En la **figura 32B**, es posible observar el aumento en la señal del fragmento PE generado por la actividad de la SrtA (*carriles* 4-7). Además, el anti-6His reconoce otras bandas de mayor tamaño, que también presentan un aumento en la señal al transcurrir el tiempo de reacción y que no aparecen en los controles negativos, lo cual sugiere se debe a la activación de la SrtA.





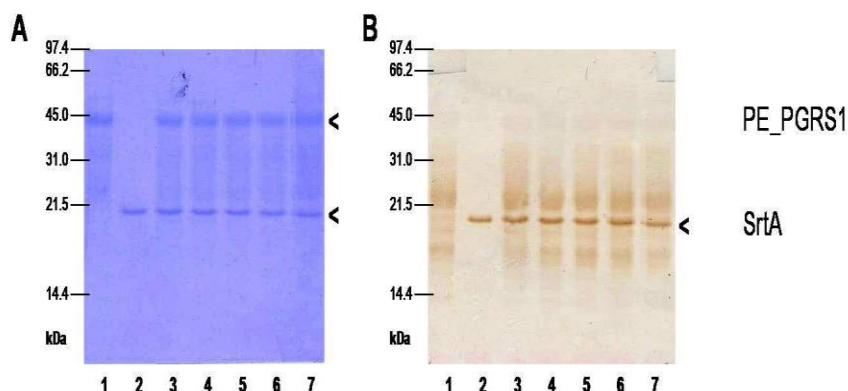
**Figura 32. Ensayo *in vitro* de la actividad enzimática de la SrtA sobre la PE\_PGRS1 con relación molecular 1:10.** Membranas PVDF con las proteínas recombinantes utilizadas en el ensayo *in vitro* para determinar la actividad enzimática a diferentes tiempos de incubación. **A)** Tinción Azul Coomassie. **B)** *Western-blot* para el reconocimiento de la SrtA y la PE\_PGRS1 por el anticuerpo  $\alpha$ -6His HRP [1:1000]. *Carril 1:* Proteína PE\_PGRS1 (control negativo), *Carril 2:* Enzima SrtA (control negativo), *Carriles 3-7:* Actividad enzimática 0, 2, 4, 6 y 24 h, respectivamente. Las marcas muestran a la PE\_PGRS1 de 44.5 kDa, la SrtA de 18.9 kDa y el fragmento PE de la PE\_PGRS1 de 15.7 kDa, producto del corte del motivo LPxTG por la SrtA.

Como control para detectar la actividad enzimática específica se eliminó la Gly de la mezcla de reacción esperando que no existiera actividad de la SrtA. En la **figura 33A**, se observa el fragmento PE en el tiempo máximo de incubación 24 h (*carril 7*), lo que indica que la enzima se activó. En la **figura 33B**, se observa el mismo patrón de bandas reconocidas por el anti-6His en el ensayo enzimático completo.



**Figura 33. Ensayo *in vitro* de la actividad enzimática de la SrtA sobre la PE\_PGRS1 con relación molecular 1:10 en ausencia de glicina.** Membranas PVDF con las proteínas recombinantes utilizadas en el ensayo *in vitro* para determinar la actividad enzimática a diferentes tiempos de incubación. **A)** Tinción Azul Coomassie. **B)** *Western-blot* para el reconocimiento de la SrtA y la PE\_PGRS1 por el anticuerpo  $\alpha$ -6His HRP [1:1000]. *Carril 1:* Proteína PE\_PGRS1 (control negativo), *Carril 2:* Enzima SrtA (control negativo), *Carriles 3-7:* Actividad enzimática 0, 2, 4, 6 y 24 h, respectivamente. Las marcas muestran a la PE\_PGRS1 de 44.5 kDa y a la SrtA de 18.9 kDa.

Finalmente, cuando en la mezcla de reacción se omite el  $\text{Ca}^{2+}$ , no se detectó actividad de la SrtA. En la **figura 34A**, con la tinción de Coomassie no se observa el fragmento PE en la reacción, lo que indica que no hay actividad enzimática. En la **figura 34B**, con el *Western-blot* utilizando el anticuerpo para el tallo 6His, se observa el reconocimiento de la SrtA y un pequeño barrido de fondo que corresponde a la PE\_PGRS1, que también se observa en el control negativo (*carril 1*). Lo cual sugiere que se trata de una actividad enzimática específica de la SrtA sobre la PE\_PGRS1.



**Figura 34. Ensayo *in vitro* de la actividad enzimática de la SrtA sobre la PE\_PGRS1 con relación molecular 1:10 en ausencia de calcio.** Membranas PVDF con las proteínas recombinantes utilizadas en el ensayo *in vitro* para determinar la actividad enzimática a diferentes tiempos de incubación. **A)** Tinción Azul Coomassie. **B)** *Western-blot* para el reconocimiento de la SrtA y la PE\_PGRS1 por el anticuerpo  $\alpha$ -6His HRP [1:1000]. *Carril 1*: Proteína PE\_PGRS1 (control negativo), *Carril 2*: Enzima SrtA (control negativo), *Carriles 3-7*: Actividad enzimática 0, 2, 4, 6 y 24 h, respectivamente. Las marcas muestran a la PE\_PGRS1 de 44.5 kDa, la SrtA de 18.9 kDa y el fragmento PE de la PE\_PGRS1 de 15.7 kDa, producto del corte del motivo LPXTG por la SrtA.

Estos resultados confirman: 1) el reconocimiento de la secuencia LPNTG y 2) el corte de la proteína PE\_PGRS1 de *M. tuberculosis* H37Rv por la enzima SrtA de *S. aureus*, la cual es capaz de generar el fragmento PE. Lo cual sugiere que existe una interacción enzimática a nivel de pared celular entre las PE\_PGRS, que contienen el motivo LPXTG, y una SrtA-like, quien participa en el transporte de proteínas en *M. tuberculosis*.

La investigación de la interacción de las proteínas de *M. tuberculosis* con el sistema inmune del hospedero, se ha centrado en identificar factores de virulencia, inmunógenos y antígenos que intervienen en el proceso patogénico [72]. Existen evidencias de que algunas proteínas PE\_PGRS que están en la pared de la micobacteria pueden influir en la estructura celular, así como en la aglutinación de micobacterias [24], por lo que se sugiere que estas proteínas están interviniendo en las interacciones celulares entre las micobacterias y de éstas con las células del sistema inmune, como macrófagos [28]. Se ha encontrado que las proteínas PE\_PGRS inducen una respuesta inmune, tanto humoral como celular; sin embargo, la respuesta de anticuerpos está dirigida exclusivamente hacia el dominio PGRS, lo cual sugiere que estos dominios están preferencialmente expuestos al sistema inmune [25]. Estudios proteómicos han mostrado que *M. tuberculosis* secreta diversas proteínas, sin embargo muchas de esas proteínas son producidas sin un péptido señal clásico, al relacionar esto con la alta complejidad de la estructura de la pared celular de la micobacteria, se sugiere la existencia de una vía de secreción especializada en *M. tuberculosis* [34]. Experimentos recientes han determinado que el dominio PE de las PE\_PGRS es el responsable de la translocación y localización de estas proteínas en la pared celular de micobacterias, lo cual indica que este dominio podría funcionar como una especie de péptido líder [39,72]. Sin embargo, la información acerca del mecanismo por el cual estas proteínas son transportadas a la pared celular es limitada, por lo que utilizar modelos bien caracterizados en otras bacterias para investigar los aspectos moleculares de la secreción de proteínas, puede ser de gran relevancia biológica [34]. Uno de estos modelos, es el que se utiliza para el procesamiento de proteínas de patógenos Gram-positivos por la enzima Sortasa A (SrtA), la cual reconoce el motivo LPXTG para la secreción de proteínas [49]. En el presente trabajo se eligió este modelo, ya que un análisis *in silico* de las secuencias PE\_PGRS mostró la presencia de este motivo en la PE\_PGRS1 y la 31, y en 28 PE\_PGRS más el motivo se detectó con algunos cambios, pero conservando una alta homología entre estas secuencias proteicas. El motivo LPXTG se localizó justamente en la región que define a los dominios PE y PGRS, por lo que para este trabajo se decidió utilizar a la PE\_PGRS1 a fin de determinar si era blanco de la SrtA. Para este fin, se obtuvo la proteína PE\_PGRS1 de la cepa de

laboratorio H37Rv de *M. tuberculosis* en forma recombinante, y de la misma forma a la enzima SrtA de *S. aureus*.

De manera interesante, se han encontrado Srt codificadas en los genomas patógenos Gram-positivos emparentados con *M. tuberculosis* como *Corynebacterium spp.* y *Streptomyces spp.*, los cuales están involucradas en el desarrollo de fimbrias y de hifas, respectivamente [53]. Actualmente, no se ha reportado la existencia de una SrtA-like involucrada en la secreción de proteínas en las micobacterias, sin embargo una búsqueda en las bases de datos nos muestra que la proteína Rv1278 de *M. tuberculosis* H37Rv presenta una similitud significativa con la enzima SrtA de *Corynebacterium glutamicum*.

Con el fin de estudiar si el motivo LPXTG de las PE\_PGRS de *M. tuberculosis* era blanco de la SrtA de *S. aureus*, el gen *pe\_pgrs1* se clonó en el vector de expresión *pET15b* y se expresó en la cepa Rosetta (DE3) de *E. coli*. La proteína recombinante PE\_PGRS1 se recuperó en forma insoluble (cuerpos de inclusión) y fue necesario re-naturalizarla de manera gradual. La PE\_PGRS1 mostró una masa molecular de 44.5 kDa en SDS-PAGE en donde se observaron otras bandas menores a ésta que pueden deberse a contaminación por proteínas nativas de *E. coli*, degradación de la PE\_PGRS1 por almacenamiento o traducción deficiente de la cepa Rosetta (DE3). Sin embargo, la contaminación fue descartada por la detección con el anticuerpo específico para 6His, que reconoce el barrido de proteínas, lo que indica la presencia del tallo de histidina (6His), que no poseen las proteínas de *E. coli*. La degradación de la PE\_PGRS1 también se descartó porque estas bandas están presentes, sin que exista almacenamiento previo de la proteína, esto es inmediatamente después de haberla extraído de la pastilla bacteriana. Estas observaciones sugieren que estas bandas pueden tratarse de proteínas trucas producto de una traducción deficiente de la cepa, que podría mejorarse si se optimizan las condiciones de cultivo, como composición del medio, condiciones de crecimiento y cantidad de inductor, entre otras [73]. La SrtA se obtuvo también en forma recombinante en la cepa C43 (DE3) de *E. coli* y se recuperó en forma soluble.

Las condiciones del ensayo *in vitro* para determinar la actividad enzimática de la SrtA sobre la PE\_PGRS1, se establecieron de acuerdo a protocolos reportados en la literatura. Durante la determinación de la actividad enzimática se utilizaron la Gly y el Ca<sup>2+</sup>, los cuales son los elementos indispensables para la activación de la enzima y función sobre el sustrato [55,56,67].

La relación molecular 1:5 en un volumen de 50  $\mu$ l de reacción, hizo evidente un decremento en la cantidad de SrtA y PE\_PGRS1 a medida que transcurría el tiempo de reacción, así como el aumento de una banda que migra alrededor del tamaño del fragmento esperado (15.7 kDa) en el tiempo máximo (24 h). Sin embargo, la relación molecular 1:10 en un volumen de 100  $\mu$ l de reacción, permitió que las bandas de la PE\_PGRS1 y el fragmento PE aumentaran su señal y por lo tanto que se observaran con mayor claridad que en el ensayo anterior, inclusive desde las 6 h de reacción. Lo mismo ocurrió con el reconocimiento utilizando el anticuerpo anti-6His, el fragmento PE resulta evidente desde las 2 h de reacción,.

Se confirmó con anticuerpos anti-6His y anti-PE33, que esta banda correspondía al fragmento PE, el primero reconoce el tallo de 6His de la región N-terminal y el segundo la secuencia conservada PE presente en todos los miembros de la subfamilia PE\_PGRS, lo cual sugiere la participación del dominio PE en el transporte de proteínas PE\_PGRS con el motivo LPXTG en *M. tuberculosis*. Cabe resaltar que el anticuerpo PE presentó mayor sensibilidad comparado con el anticuerpo para el tallo 6His cuando se utilizó en el ensayo 1:5, lo cual se explica porque este anticuerpo fue producido contra el antígeno PE recombinante fusionado al tallo de 6His, generándose anticuerpos contra éste que también reconocen el tallo de 6His de la SrtA. Algo importante a señalar es que el anticuerpo anti-6His comercial no reconoce a la PE\_PGRS1 después del procedimiento de re-naturalización, lo cual indica que el tallo de 6His fusionado es poco accesible al anticuerpo al plegarse *in vitro*.

En todos los ensayos se observaron bandas de mayor tamaño que el fragmento PE y la SrtA, lo cual puede ser debido a la formación de productos ciclados (monómeros) y productos ligados (oligómeros) que se atribuyen al efecto de actividad de la enzima, ya que sólo se observaron después del periodo de reacción. Esta observación ha sido reportada en diversos trabajos, en uno de ellos Parthasarathy y colaboradores en 2007 se utilizó a la SrtA para la formación de oligómeros de la proteína blanco por 3 h a 37°C y el efecto se anuló cuando se omitió la enzima [74]. En otro estudio realizado por Mao en 2004, bajo las mismas condiciones de incubación, se utilizaron concentraciones crecientes de Gly<sub>3</sub> donde se observó que a medida que ésta aumentó se produjo una mayor cantidad de monómeros lineales y una menor cantidad de monómeros ciclados [67]. Esto explica porqué la Gly compete con la SrtA y al añadirla disminuye la formación de oligómeros, confirmándose que la reacción es catalizada por la enzima SrtA [75]. En el mismo estudio, también se

reportó la presencia de bandas de mayor peso molecular (posibles tetra- y pentámeros), las cuales fueron detectadas por *Western-blot* con el anticuerpo anti-GFP. El uso de proteínas marcadas con GFP permitió detectar estas formas que están presentes en cantidades pequeñas no detectables con la tinción de Coomassie (en la que la banda del trímero es ligeramente visible) [67]. Es claro, que la SrtA puede ser usada para crear uniones intra- o intermoleculares entre proteínas, este efecto de ligación puede ser revertido con nucleófilos pequeños, estudios iniciales sugieren que la Gly puede ser usada para este propósito [74]. A partir de estas observaciones se realizaron otros trabajos, en donde se observó la formación del dímero de la SrtA por electroforesis de gel de poliacrilamida bajo condiciones nativas [76]. Posteriormente en otro estudio de *Zhu y colaboradores* en 2008, se demostró que una sola mutación puntual de residuos de aminoácidos en la superficie de la SrtA puede inhibir completamente su dimerización [77].

Para evaluar la actividad enzimática específica de la SrtA sobre la PE\_PGRS1, la Gly y el  $\text{Ca}^{2+}$ , se eliminaron del buffer de reacción en los ensayos restantes, a diferencia de las condiciones previamente establecidas que se conservaron tanto para la mezcla de reacción como para la detección de las proteínas utilizadas y los posibles fragmentos generados.

La Gly participa en la reacción de transpeptidación posterior a la reacción de hidrólisis, ésta reemplaza a la molécula de agua uniéndose al sitio activo de la enzima, por medio de un ataque nucleofílico para que se produzca el corte en la unión Tre-Gly del motivo LPXT↓G [49,54,55]. La adición de sustratos de peptidoglicano a la mezcla de reacción de la SrtA, estimula el corte del péptido LPXTG y resulta en la formación de unión amida entre el grupo carboxilo de la Tre y el grupo amino de la Gly en los puentes cruzados del peptidoglicano. Gly, Gly<sub>2</sub>, Gly<sub>3</sub>, Gly<sub>4</sub> y Gly<sub>5</sub> funcionan como sustratos *in vitro*, aunque el aumento en su longitud mejora la reacción de transpeptidación [49,55,67]. En el presente trabajo, la Gly se utilizó a una concentración de 5 mM que contribuyó a producir la actividad de la SrtA. Contrario a lo esperado cuando se eliminó de la reacción, la actividad continuó observándose. La persistencia de actividad, puede explicarse a causa de la clonación de ambas proteínas en el vector *pET15b*, el cual adiciona la secuencia que incluye un tallo de 6His y un sitio trombina MGSSHHHHHSSGLVPRGSHM al extremo N-terminal de las proteínas PE\_PGRS1 y SrtA [67]. De esta forma la aminopeptidasa endógena de *E. coli* remueve eficientemente la metionina (Met) inicial de esta secuencia, durante el proceso post-traducciona, por lo que el nuevo extremo N-

terminal que tiene una Gly, que puede actuar como un nucleófilo permitiendo el reconocimiento y el corte del péptido LPXTG por la acción de la SrtA [67].

El  $\text{Ca}^{2+}$  actúa como cofactor *in vivo* e *in vitro*, es responsable de modular la conformación del sitio activo de la SrtA que contiene un grupo de residuos de aminoácidos involucrados en la unión a  $\text{Ca}^{2+}$  [49]. Un ion  $\text{Ca}^{2+}$  se une al *loop*  $\beta 3/\beta 4$  lo que provoca que el *loop*  $\beta 7/\beta 8$  cambie de posición para permitir el reconocimiento del motivo LPXTG de la proteína blanco, esta unión activa la enzima por un mecanismo que puede facilitar la unión al substrato, por lo tanto el  $\text{Ca}^{2+}$  es requerido en la reacción de activación [49,56,67]. La adición de iones  $\text{Ca}^{2+}$  promueve la actividad de la SrtA *in vitro*, dado que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM) que estimula a la enzima es similar a los niveles que *S. aureus* encuentra en el tejido del hospedero ( $\leq 1.5$  mM), puede ser que el mecanismo, sea utilizado para incrementar la proteína superficial anclada a la pared celular durante la interacción celular con el hospedero [78]. Cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  se eliminó de la mezcla de reacción la SrtA no se generó el fragmento PE, sólo se reconoció la enzima sin variación en su concentración y las proteínas PE\_PGRS1 trucas, lo mismo se observó en los controles negativos.

La SrtA no corta la totalidad de la PE\_PGRS1, esto puede deberse al plegamiento de algunas moléculas del substrato que hace inaccesible el reconocimiento del motivo por la enzima. En trabajos previos, respecto a la fusión de un tallo de 6His a los extremos N- y C-terminal se reportó que la SrtA recombinante, corta el péptido LPNTG *in vitro* entre los residuos Tre y Gly [55]. Además, el centro catalítico de la SrtA corta la proteína fusionada en el sistema de purificación por cromatografía de afinidad a metales (IMAC), dado que se demostró que el tallo fusionado es pequeño y por lo tanto no afecta la actividad catalítica de la SrtA [67]. Algunas opciones para modificar la eficiencia de la actividad enzimática son el aumento de la concentración de SrtA en relación a la PE\_PGRS1, basado en un estudio de Parthasarathy y colaboradores en 2007, se sugiere que usando una alta concentración de enzima se obtiene un mayor grado de reacción y menores tiempos de actividad [74]. En otro estudio de Mao en 2004, se probó que la variación en la temperatura de incubación, tiene un efecto sobre la actividad de la enzima SrtA, donde aumentó con una temperatura de 25°C comparada con una temperatura de 4°C [67].

En general, los blancos de procesamiento de la SrtA se localizan en el extremo C-terminal, de esta manera la mayor parte de la proteína se encuentra expuesta en la superficie de la bacteria. En el caso de las PE\_PGRS el motivo LPNTG y homólogos se encuentran entre el dominio PE y el

PGRS, lo cual tiene relación con que el dominio PE sea el responsable del transporte de proteínas hacia la superficie de la micobacteria y con la función inmunológica que desempeña el dominio PGRS. En el presente trabajo, se demostró que el motivo LPNTG de la PE\_PGRS1 de *M. tuberculosis* es blanco de la SrtA de *S. aureus*, lo que sugiere que otras PE\_PGRS con el motivo conservado, pueden ser blanco del mismo procesamiento por parte de una SrtA-like en *M. tuberculosis*.



- El péptido LPNTG de la proteína PE\_PGRS1 de *M. tuberculosis* H37Rv es blanco de reconocimiento y corte por la enzima SrtA de *S. aureus* en ensayos *in vitro*. Existe una correlación evidente entre la disminución de la SrtA y de la PE\_PGRS1 y el aumento del fragmento PE conforme transcurre el tiempo, detectándose a partir de las 2 h desde el inicio de incubación de la reacción a 37°C.
- La actividad específica de la SrtA fue confirmada en los ensayos *in vitro*, ya que cuando se eliminó la Gly de la reacción, la actividad enzimática persistió. Esto se relaciona con el péptido adicionado en el extremo N-terminal por el vector *pET15b* en el que se encuentran clonados los genes *srtA* y *pe\_pgrs1* y su expresión en *E. coli* que expone la Gly, por lo que cada una de las proteínas recombinantes es capaz de generar un ataque nucleofílico. Por otro lado, cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  se eliminó, la actividad enzimática se abatió, demostrando que es imprescindible para la interacción enzima-substrato y que los productos generados se deben a la actividad de la SrtA, quien reacciona específicamente con  $\text{Ca}^{2+}$ .
- El análisis *in vitro* de la actividad enzimática de esta proteína recombinante permitió determinar la presencia del fragmento PE, que participa en funciones celulares como el transporte de proteínas, por lo que este método permitió relacionar la actividad enzimática con funciones derivadas que pueden estar siguiendo este proceso en *M. tuberculosis*.

- Los resultados de este trabajo demuestran que el péptido LPNTG de la PE\_PGRS1 de *M. tuberculosis* H37Rv es blanco de procesamiento por la SrtA de *S. aureus*, sin embargo se requerirán de nuevos abordajes experimentales *in vitro* e *in vivo*, a fin de demostrar la participación de una SrtA-like, que podría ser la proteína hipotética Rv1268 de *M. tuberculosis*.
  
- Para evaluar si la sustitución de aminoácidos de la misma naturaleza del motivo LPXTG es susceptible al reconocimiento y corte de la SrtA, es necesario repetir el ensayo *in vitro* en las mismas condiciones con la proteína recombinante PE\_PGRS33, prototipo de la subfamilia PE\_PGRS que en su secuencia presenta el motivo conservado APGTG.
  
- Evaluar la función *in vivo* del fragmento PE liberado durante la actividad enzimática de la SrtA y comprobar así, la relación funcional de la vía de señalización entre *M. tuberculosis* y *S. aureus*.

1. **Hopewell PC** (1996) *Mycobacterium tuberculosis*: An Emerging Pathogen? In Emerging and Reemerging Global Microbial Threats. *West J Med* 164: 33.
2. **Zink A, Sola C, U Reischl, W Grabner, N Rastogi, H Wolf, A Nerlich** (2003) Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J Clin Microbiol* 41: 359.
3. **Salo WL, AC Aufderheide, J Buikstra, TA Holcomb** (1994) Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci* 91: 2091.
4. **Bullen L** (2003) *How Tuberculosis Affects the Skeleton: Regional and Sex Differences in the Distribution and Severity of the Lesions*. (MA Thesis - University George Washington) [Unpublished].
5. **Vallecillo, AJ** (2009) *Caracterización de la región promotora de la PE\_PGRS33 de Mycobacterium tuberculosis*. (Tesis de Doctorado – Universidad Nacional Autónoma de México) [No publicada].
6. **Silverstein AM** (1989) *A History of Immunology*. Academic, Press. San Diego, California USA: 422pp.
7. **Leung AN** (1999) Pulmonary Tuberculosis: The Essentials. *Radiology* 210: 307.
8. **Davies PDO, KM De Cock, J Leese & J Moore-Gillon** (1996) Tuberculosis 2000. *J R Soc Med* 89:431.
9. **Gazzard B** (2001) Tuberculosis, HIV and the developing world. *Clin Med* 1: 62.
10. **Kaufmann SH** (2001) How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol* 1: 20.
11. **World Health Organization** (2008) Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO Report 2008, Geneva (WHO/HTM/TB/2008.393).
12. **World Health Organization** (2009) Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. WHO Report 2009, Geneva (WHO/HTM/TB/2009.411).
13. **Rajagopalan S** (2001) Tuberculosis and Aging: A Global Health Problem. *Aging and Infectious Diseases. Clin Infect Dis* 33: 1034.

14. **Castellanos M, MA García & HA Téllez** (2008) Tuberculosis en México, primera de dos partes. Sistema Nacional de Vigilancia Nacional Epidemiológica, Secretaría de Salud *Epidemiología* 13:1.
15. **Castellanos M, MA García & HA Téllez** (2008) Tuberculosis en México, segunda y última parte. Sistema Nacional de Vigilancia Nacional Epidemiológica, Secretaría de Salud *Epidemiología* 14:1.
16. **NCBI** - National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
17. **Connell ND** (2001) Expression systems for use in actinomycetes and related organisms. *Curr Opin Biotech* 12: 446.
18. **Jabado N & P Gros** (2005) Tuberculosis: The genetics of vulnerability. *Nature* 434: 709.
19. **Brennan MJ, NC Gey Van Pittius & C Espitia** (2005) The PE and PPE Multigene Families of Mycobacteria in ST Cole, et. al. [eds] *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, ASM Press. Washington, USA: 513-525.
20. **Brennan MJ & G Delogu** (2002) The PE multigene family: a `molecular mantra` for mycobacteria. *T Microbiol* 10:246.
21. **Banu S, N Honore, B Saint-Joanis, D Philpott, MC Prevost, ST Cole** (2002) Are the PE\_PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? *Mol Microbiol* 44: 9.
22. **Cole ST, R Brosch, J Parkhill, T Garnier, C Churcher, D Harris, SV Gordon, K Eiglmeier, S Gas, CE Barry, F Tekaia, K Badcock, D Basham, D Brown, T Chillingworth, R Connor, R Davies, K Devlin, T Feltwell, S Gentles, N Hamlin, S Holroyd, T Hornsby, K Jagels, A Krogh, J McLean, S Moule, L Murphy, K Oliver, J Osborne, MA Quail, MA Rajandream, J Rogers, S Rutter, K Seeger, J Skelton, R Squares, S Squares, JE Sulston, K Taylor, S Whitehead & BG Barrell** (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537.
23. **Poulet, S & ST Cole** (1995) Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Microbiol* 163: 87.
24. **Delogu G, C Pusceddu, A Bua, G Fadda, MJ Brennan & S Zanetti** (2004) Rv1818c-encoded PE\_PGRS protein of *Mycobacterium tuberculosis* is surface exposed and influences bacterial cell structure. *Mol Microbiol* 52: 725.

25. **Delogu G & MJ Brennan** (2001) Comparative immune response to PE and PE\_PGRS antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 69: 5606.
26. **Belisle JT, M Braunstein, I Rosenkrands & P Andersen** (2005) The proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in ST Cole, et. al. [eds] *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, ASM Press. Washington DC, USA: 235-260.
27. **Dheenadhayalan V, G Delogu, & MJ Brennan** (2006) Expression of the PE\_PGRS33 protein in *Mycobacterium smegmatis* triggers necrosis in macrophages and enhanced mycobacterial survival. *Microbes and Infection* 8: 262.
28. **Brennan MJ, G Delogu, Y Chen, S Bardarov, J Kriakov, M Alavi & WR Jacobs** (2001) Evidence that mycobacterial PE\_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. *Infect Immun* 69: 7326.
29. **Cascioferro A, G Delogu, M Colone, M Sali, A Stringaro, G Arancia, G Fadda, G Palù & R Manganelli** (2007) PE is a functional domain responsible for protein translocation and localization on mycobacterial cell wall. *Mol Microbiol* 66: 1536.
30. **Brennan PJ & P Draper** (1994) Ultrastructure of *Mycobacterium tuberculosis* in Bloom, BR [ed] *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*, ASM Press. Washington DC, USA: 271-284.
31. **Draper P & M Daffé** (2005) The cell envelope of *Mycobacterium tuberculosis* with special reference to the capsule and outer permeability barrier in ST Cole, et. al. [eds] *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, ASM Press. Washington DC, USA: 261-273.
32. **Alsteens D, C Verbelen, E Dague, D Raze, AR Baulard, YF Dufrêne** (2007) Organization of the mycobacterial cell wall: a nanoscale view. *Eur J Physiol* 456: 117.
33. **Daffé M & P Draper** (1998) The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Advances in Microbial Physiology* 39: 132.
34. **Braunstein M & JT Belisle** (2000) Genetics of protein secretion in Hatfull GF & WR Jacobs [eds] *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM Press, Washington, DC, USA: 203-215.
35. **Kremer L & GS Besra** (2005) A waxy tale, by *Mycobacterium tuberculosis* in ST Cole, et. al. [eds] *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, ASM Press. Washington DC, USA: 287-305.
36. **Brennan PJ** (2003) Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 83: 91.

37. **Belanger AE & JM Inamine** (2000) Genetics of cell wall biosynthesis *in* Hatfull GF & WR Jacobs [eds] *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM Press, Washington, DC, USA: 191-202.
38. **Abdallah MA, NC Gey van Pittius, PA DiGiuseppe Champion, J Cox, J Luirink, CMJE Vandenbroucke-Grauls, BJ Appelmelk & W Bitter** (2007) Type VII secretion- mycobacteria show the way. *Nature Rev Microbiol* 5: 883.
39. **Abdallah, MA, T Verboom, EM Weerdenburg, NC Gey van Pittius, PWMahasha, C Jiménez, M Parra, N Cadieux, MJ Brennan, BJ Appelmelk & W Bitter** (2009) PPE and PE\_PGSR proteins *Mycobacterium marinum* are transported via the type VII secretion system ESX-5. *Mol Microbiol* 73: 329.
40. **Carlsson F, SA Joshi, L Rangell, EJ Brown** (2009) Polar localization of virulence-related Esx-1 secretion in Mycobacteria. *PLoS Pathog* 5: e1000285.
41. **Paterson GK & TJ Mitchell** (2004) The biology of Gram-positive sortase enzymes. *T Microbiol* 12: 89.
42. **Larkin MA, G Blackshields, NP Brown, R Chenna, PA McGettigan, H McWilliam, F Valentin, IM Wallace, A Wilm, R Lopez, JD Thompson, TJ Gibson & DG Higgins** (2007) ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 2007 23(21): 2947 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>
43. **Crooks GE, G Hon, JM Chandonia, SE Brenner** (2004) WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research* 14: 1188 <http://weblogo.berkeley.edu/>
44. **Mazmanian SK, G Liu, H Ton-That & O Schneewind** (1999) *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* 285: 760.
45. **Mazmanian SK, H Ton-That & O Schneewind** (2001) Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 40: 1049.
46. **Boekhorst J, MWHJ de Been, M Kleerebezem & RJ Siezen** (2005) Genome-wide detection and analysis of cell wall-bound proteins with LPXTG-like sorting motifs. *J Bacteriol* 187: 4928.
47. **Ton-That H, LA Marraffini & O Schneewind** (2004) Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1694: 269.
48. **Cossart P & R Jonquières** (2000) Sortase, a universal target for therapeutic agents against Gram-positive bacteria? *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 5013.

49. **Marraffini LA, AC DeDent & O Schneewind** (2006) Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 192.
50. **Dramsı S, P Trieu-Cuot & H Bierne** (2004) Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. *R Microbiol* 156: 289.
51. **Abraham SN, AB Jonsson & S Normark** (1998) Fimbriae-mediated host-pathogen cross-talk. *Curr Opin Microbiol* 1: 75.
52. **Ton-That H & O Schneewind** (2004) Assembly of pili in Gram-positive bacteria. *T Microbiol* 12: 228.
53. **Comfort D & RT Clubb** (2004) A comparative genome analysis identifies distinct sorting pathways in Gram-positive bacteria. *Infect Immun* 72: 2710.
54. **Zong Y, TW Bice, H Ton-That, O Schneewind & SVL Narayana** (2004) Crystal structures of *Staphylococcus aureus* Sortase A and its substrate complex. *J Biol Chem* 279: 31383.
55. **Ton-That H, SK Mazmanian, KF Faull & O Schneewind** (2000) Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*: Sortase catalyzed *in vitro* transpeptidation reaction using LPXTG peptide and NH<sub>2</sub>-GLY<sub>3</sub> substrates. *J Biol Chem* 275: 9876.
56. **Naik MT, N Suree, U Ilangoan, CK Liew, W Thieu, DO Campbell, JJ Clemens, ME Jung & RT Clubb** (2006) *Staphylococcus aureus* Sortase A transpeptidase: Calcium promotes sorting signal binding by altering the mobility and structure of an active site loop. *J Biol Chem* 281: 1817.
57. **Cerdeño-Tárraga AM, A Efstratiou, LG Dover, MTG Holden, M Pallen, SD Bentley, GS Besra, C Churcher, KD James, A De Zoysa, T Chillingworth, A Cronin, L Dowd, T Feltwell, N Hamlin, S Holroyd, K Jagels, S Moule, MA Quail, E Rabinowitsch, KM Rutherford, NR Thomson, L Unwin, S Whitehead, BG Barrell & J Parkhill** (2003) The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic Acids Res* 31: 6516.
58. **Notredame C, DG Higgins & J Heringa** (2000) T-COFFEE: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302: 205: <http://www.tcoffee.org/homepage.html>
59. **Miroux B & JE Walker** (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* 260: 289.

60. Flores P, LF (2006) Efecto de los cambios genéticos en un miembro de la familia PE\_PGRS (Rv1818c) de *Mycobacterium tuberculosis* sobre la respuesta inmune humoral (Tesis de Licenciatura - Universidad Nacional Autónoma de México) [No publicada].
61. DNAMAN - one-for-all software package for molecular biology applications: <http://www.lynnon.com/>
62. Ullman A, F Jacob & J Monod (1967) Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the  $\beta$ -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 24:339.
63. IBT- Instituto de Biotecnología, UNAM: <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/secuenciacion.html>
64. Devlin, TM (2000) Bioquímica. Libro de Texto con Aplicaciones Clínicas. 3<sup>ra</sup> ed, vol. 2. Reverté. México: 772-773.
65. Chung CT, SL Niemela & RH Miller (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86: 2172.
66. Scopes RK [ed] (1988) Protein Purification: Principles and Practice. 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Verlag New York Inc. New York, NY USA: 329pp.
67. Mao H (2004) A self-cleavable sortase fusion for one-step purification of free recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* 37: 253.
68. Hennig, L (1999) WinGene/WinPep: User-friendly software for the analysis of aminoacid sequences. *BioTechniques* 26: 1170: <http://n.ethz.ch/~lhennig/winpep.html>
69. Yokota H, K Mori, H Kaniwa & T Shibanuma (2000) Elimination of artifactual bands from polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 280: 188.
70. Ton-That H, G Liu, SK Mazmanian, KF Faull & O Schneewind (1999) Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif. *Proc Natl Acad Sci* 96: 12424.
71. Kruger RG, B Otvos, BA Frankel, M Bentley, P Dostal & DG McCafferty (2004) Analysis of the substrate specificity of the *Staphylococcus aureus* sortase transpeptidase SrtA. *Biochem* 43: 1541.



72. Andersen AB & P Brennan (1994) Proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in Bloom, BR [ed] Tuberculosis: *Pathogenesis, Protection and Control*. ASM Press. Washington, USA: 307-332.
73. Sorensen HP & KK Mortensen (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotech* 115: 113.
74. Parthasarathy R, S Subramanian & ET Boder (2007) Sortase A as a novel molecular “stapler” for sequence-specific protein conjugation. *Bioconjugate Chem* 18:469.
75. Mao H, SA Hart, A Schink & BA Pollok (2004) Sortase-mediated protein ligation: a new method for protein engineering. *J Am Chem Soc* 126: 2670.
76. Lu C, J Zhu, Y Wang, A Umeda, RB Cowmeadow, E Lai, GN Moreno, MD Person & Z Zhang (2007) *Staphylococcus aureus* Sortase A exists as a dimeric protein *in vitro*. *Biochem* 46: 9346.
77. Zhu J, C Lu, M Standland, E Lai, GN Moreno, A Umeda, X Jia & Z Zhang (2008) Single mutation on the surface of *Staphylococcus aureus* Sortase A can disrupt its dimerization. *Biochem* 47: 1667.
78. Ilangovan U, H Ton-That, J Iwahara, O Schneewind & Robert T. Clubb (2001) Structure of sortase, the transpeptidase that anchors proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci* 98: 6056.
79. Sambrook J, EF Fritsch, T Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol. I, II & III. 2<sup>nd</sup> Ed. CSH Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, USA.
80. Sharp PA, B Sugden & J Sambrook (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochem* 12: 3055.
81. INVITROGEN (2004) Zero Blunt® TOPO® PCR cloning kit for sequencing. User Manual. Invitrogen. Version N 19 July 2004, 25-0277.
82. Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J Mol Biol* 166: 557.
83. Hanahan D, J Jessee & FR Bloom (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* 204: 63.

84. **McGettrick AF & DM Worrall** (2004) Extraction of recombinant protein from bacteria *in* Cutler, P. [ed] *Methods in Molecular Biology: Protein Purification Protocols* 244 2nd Ed. *Humana Press*. USA.
85. **Creighton TE [ed]** (1997) *Protein Structure: A Practical Approach*. IRL Press. USA.
86. **Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680.
87. **Westermeier R** (1997) *Electrophoresis in practice*. 2<sup>nd</sup> Ed. Wiley Company. Germany.
88. **Lowry OH, NJ Rosebrough, AL Farr & RJ Randall** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265.
89. **Layne E** (1957) Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol* 3: 447.
90. **Nicholas, KB, HB Jr Nicholas & DW Deerfield** (1997) GenDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW.NEWS* 4: 14.

## 13.1 ANEXO I. Protocolos

## A) RESOLUCIÓN Y DETECCIÓN DE DNA

Para resolver el *DNA* de las muestras (mezclar con el mismo volumen de Buffer de Carga 6X), se prepara un Gel de Agarosa <sup>[79]</sup> (ch.6.9: **Gel Electrophoresis DNA**) y en los pozos se cargan las muestras y el marcador de PM.

**Buffer de Carga 6X (Tipo III)**

|                    |       |
|--------------------|-------|
| Glicerol en Agua   | 30%   |
| Azul de Bromofenol | 0.25% |
| Xileno Cianol FF   | 0.25% |

**Gel de Agarosa al 0.8 ó 1% (Mini-gel de 6 mm)**

|                                |              |
|--------------------------------|--------------|
| Agarosa                        | 0.24 ó 0.3 g |
| Buffer TAE 1X                  | 30 mL        |
| *Bromuro de Etidio (0.33mg/mL) | 1 $\mu$ L    |

Se utiliza el Buffer TAE 1X para la electroforesis en cámara horizontal (Horizon® 58, GIBCO BRL) durante 1 h a 60 V (1100, BIO-RAD).

**Buffer de TAE 50X**

|                       |           |
|-----------------------|-----------|
| Tris-base             | 242 g/L   |
| Ácido Acético Glacial | 57.1 mL/L |
| EDTA 0.5 M (pH 8.0)   | 100 mL/L  |

**Buffer de TAE 1X**

|              |         |
|--------------|---------|
| Tris-Acetato | 0.04 M  |
| EDTA         | 0.001 M |

Para visualizar el *DNA* en geles de agarosa se utiliza la tinción fluorescente con Bromuro de Etidio <sup>[80]</sup>, esta sustancia contiene un grupo plano que se intercala entre las bases apiladas del *DNA*, mostrando un campo fluorescente de mayor intensidad, comparado con el colorante libre en la solución (lo mismo ocurre con el *RNA*, aunque la afinidad es menor y por lo tanto la intensidad del campo fluorescente es menor). El gel se observa en el transiluminador UV con  $\lambda=365$  nm (UVA-40, ULTRA-LUM) por iluminación transmitida y se fotografía (MI™, KODAK) por iluminación incidental; en ambos casos la energía de la unión, es retransmitida en el espectro de luz visible  $\lambda=590$  nm <sup>[79]</sup> (ch.6.18: **Gel Electrophoresis DNA**).

B) CLONACIÓN Zero Blunt® TOPO® <sup>[81]</sup>

Para la clonación por esta técnica, se requiere obtener el producto de *PCR* romo, que se mezcla con el vector de clonación, se centrifuga (5415c, EPPENDORF) para colectar y se incuba por 5-30 min a  $T_{amb}$  (22-23°C); colocar en hielo. Con esta reacción de ligación (1-2  $\mu$ L), se transforman las células competentes *E. coli* (**Ver Protocolo K**), las colonias se seleccionan y se analizan.

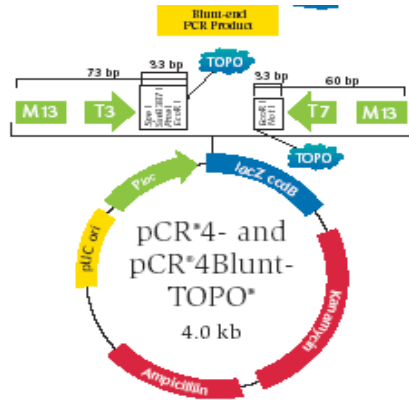
**Reacción**

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| Producto <i>PCR</i> romo | 4 $\mu$ L |
|--------------------------|-----------|

|  |      |
|--|------|
| Solución NaCl 1.2 M, MgCl <sub>2</sub> 0.06 M    | 1 µL |
| Vector pCR <sup>®</sup> 4Blunt-TOPO <sup>®</sup> | 1 µL |

|          |      |      |       |
|----------|------|------|-------|
| Plásmido | 4 µL | 8 µL | 16 µL |
| *Buffer  | 1 µL | 1 µL | 2 µL  |
| *Enzima  | 1 µL | 1 µL | 2 µL  |

\* Disponibles comercialmente (Ver Anexo II: B)



\* El mapa muestra las características de la secuencia del vector de clonación pCR<sup>®</sup>4Blunt-TOPO<sup>®</sup> (3,956 bp), con la región promotora *lac* (2-216), la fusión LacZα-*ccdB* (217-810), los genes de resistencia a kanamicina (1,159-1,953) y ampicilina (2,203-3,063), y el pUC ori (3,161-3,834); y la secuencia que rodea al Sitio de Clonación TOPO<sup>®</sup> (294-295), con los sitios de restricción para *SpeI*, *PstI*, *PmeI*, *EcoRI* (flanquea al sitio de clonación) y *NotI*.

### C) REACCIÓN DE DIGESTIÓN [79]

Para cortar un plásmido con endonucleasas (enzimas de restricción), es necesario conocer los sitios de corte en su secuencia de DNA, para llevar a cabo una reacción de digestión e incubar a 37°C por 1-1:30 h (417, LAB-LINE). Este método es útil para producir un plásmido en forma lineal o para realizar un análisis de restricción.

|                 |          |          |          |
|-----------------|----------|----------|----------|
| <b>Reacción</b> | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> |
| Agua destilada  | 4 µL     | -        | -        |

### D) REACCIÓN DE GAP-FILLING [79]

Para rellenar los huecos de la secuencia de DNA de un plásmido, se lleva a cabo una reacción de *gap-filling*, con la enzima *Taq DNA* polimerasa, incubándola por 10 min a 72°C en el termociclador (Mastercycler<sup>®</sup> gradient, EPPENDORF).

|                 |          |          |
|-----------------|----------|----------|
| <b>Reacción</b> | <b>1</b> | <b>2</b> |
| Plásmido        | 37 µL    | 35 µL    |
| Agua destilada  | 6.5 µL   | 8 µL     |
| Buffer 10X      | 5 µL     | 5 µL     |
| dNTP's          | 1 µL     | 1 µL     |
| Enzima          | 0.5 µL   | 0.5 µL   |

### E) REACCIÓN DE LIGACIÓN [79]

Para clonar un gen en un vector, se lleva a cabo una reacción de ligación, con la enzima *T4 DNA* ligasa, incubándola por 16 h a 16°C sin agitación (Thermomixer, EPPENDORF).

|                 |      |
|-----------------|------|
| <b>Reacción</b> |      |
| Vector y Gen    | 7 µL |
| Buffer 10X      | 1 µL |
| Enzima          | 2 µL |

## F) MEDIOS DE CULTIVO <sup>[79]</sup>

### • Medio LB

Para preparar el medio de cultivo LB, los componentes se diluyen y aforan con agua destilada a la cantidad deseada. Se esteriliza en autoclave (SSR-3A, CONSOLIDATED) durante 20 min en ciclo líquido (121°C/15 *psi*) y se incuban sin agitación (417, LAB-LINE) a 37°C durante 12 h para descartar contaminación. Si es requerido, el antibiótico (almacenado a -20°C) se adiciona en condiciones estériles en relación 1/1000 (**app.A: A.1 Bacterial Media, A.6 Antibiotics**).

#### Componentes

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Extracto de Levadura | 5 g/L  |
| Triptona de Caseína  | 10 g/L |
| NaCl                 | 10 g/L |
| *Agar                | 15 g/L |

\* El medio sólido LB se enfría a 55°C, se añade el antibiótico y se vierte en placas Petri (25 mL c/u).

### • Medio SOC

Para preparar el medio de cultivo SOC se pesan los componentes y se diluyen en agua destilada, se adiciona 1 mL de KCl y se ajusta el pH a 7.0 con NaOH 5 M (**Ver Protocolo B**). Se esterilizan por separado, el medio y la solución de MgCl<sub>2</sub>, en autoclave (SSR-3A, CONSOLIDATED) durante 20 min en ciclo líquido (121°C/15 *psi*), se enfrían a 55°C y se adiciona 1 mL de la solución y 1 mL de Glucosa esterilizada por filtración (0.22 µm,

MILLIPORE). Se preparan alícuotas que se guardan a -20°C (**app.A: A.2 Bacterial Media**).

#### Componentes

|   |        |
|---|--------|
| Triptona de Caseína                               | 2%     |
| Extracto de Levadura                              | 0.5%   |
| NaCl  | 10 mM  |
| Solución KCl 250 mM                               | 2.5 mM |
| Solución MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O 1 M | 10 mM  |
| Solución Glucosa 2 M                              | 20 mM  |

## G) PRE-CULTIVO DE BACTERIAS\*

Previamente se siembran las bacterias de interés en medio LB (marcado con la cepa y la fecha) (**Ver Protocolo H**), incubar durante 16 h a 37°C (417, LAB-LINE) y observar el crecimiento. Para preparar el pre-cultivo, con un palillo se toma una colonia de bacterias y se coloca en un tubo con 5 mL de medio líquido LB sin/con antibiótico dilución 1/1000 (marcado con la cepa y la fecha). El tubo se incuba durante toda la noche (14-16 h) a la temperatura indicada en agitación constante (Incubator1000/ Orbimix1010, BRINKMANN).

\*Procedimiento en condiciones estériles.

Para recuperar las células bacterianas, el pre-cultivo se centrifuga a 4°C por 15 min a 2,050 x g (Universal 16R, HETTICH) y se elimina el sobrenadante (medio LB). Se calcula el peso húmedo de la pastilla bacteriana (pesando

previamente los tubos de centrifugación y se resta el peso total) y se almacena a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## H) CÉLULAS COMPETENTES

Para preparar células competentes, se puede utilizar el **tratamiento químico con  $\text{CaCl}_2$** . Se requiere de un cultivo de 3 h de la cepa de interés en 100 mL de medio LB, que se coloca en hielo por 30 min, y se centrifuga a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 min a  $2,050 \times g$  (Universal 16R, HETTICH). Se adicionan 20 mL de una solución de  $\text{CaCl}_2$  50mM, se traslada al hielo por 10 min y se centrifuga en las mismas condiciones (se repite una vez). La pastilla se disuelve en 5 mL de la solución  $\text{CaCl}_2$ /Glicerol 20%, se preparan alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  y se almacenan a  $-70^{\circ}\text{C}$  con una solución de hielo seco con etanol, para congelarlas rápidamente.

## I) TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS <sup>[82,83]</sup>

Para transformar bacterias con el plásmido de interés, se puede utilizar el **método de choque térmico**. Se requiere una alícuota de células competentes ( $-80^{\circ}\text{C}$ ), que se mezclan con el plásmido y se incuban durante 5-30 min en hielo. En seguida, se produce un choque de calor por 50 s a  $42^{\circ}\text{C}$  (Thermomixer comfort, EPPENDORF) y se traslada de nuevo al hielo. Se añaden 800  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo SOC (alta eficiencia en

crecimiento de células competentes) (**Ver Protocolo H**) y se incuban 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$  con 550 rpm. Para finalizar, las células transformadas se siembran por extensión en medio LB sólido y se incuban durante 12 h a  $37^{\circ}\text{C}$  (417, LAB-LINE).

## J) CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Para obtener la curva de crecimiento, se requiere de los pre-cultivos (**Ver Protocolo I**) de las cepas indicadas, transformadas con el plásmido de interés (**Ver Protocolo E**); además, de las mismas cepas sin plásmido (control positivo) y el medio LB (control negativo). De cada uno, se toma una alícuota que se coloca en medio LB líquido en dilución 1/50 (antibiótico 1/1000), se incuban en agitación constante durante varias horas (Incubator1000/ Orbimix1010, BRINKMANN). El crecimiento de las bacterias, se mide cada hora por densidad óptica (DO) en el espectrofotómetro (6305, JENWAY) con  $\lambda=600$  nm, tomando una alícuota de 1 mL en condiciones estériles. Los datos obtenidos de las lecturas con dos repeticiones (colonias distintas), se registran en una tabla de Excel y se construye la gráfica (Tiempo [h] vs.  $\text{DO}_{[600\text{ nm}]}$ ).

Para determinar el momento de la inducción, se requiere el cálculo de la Tasa de Crecimiento Específico ( $\text{TC}=\text{Ln}[\text{DO}_2/\text{DO}_1]/[\text{T}_2-\text{T}_1]$ ; donde: Ln=Logaritmo natural, DO=Densidad Óptica [600 nm], T=Tiempo [h]) y el Tiempo de Duplicación

( $TD = \ln 2 / TC$ ; donde:  $\ln 2$  = Logaritmo natural de 2,  $TC$  = Tasa de Crecimiento Específico) para cada una de las lecturas de DO de la curva de crecimiento de cada repetición, se registra en una tabla de Excel y se construye la gráfica con dos ejes Y (Tiempo [h] vs.  $TC [h^{-1}] / TD [h]$ ).

### K) EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS [84]

Para extraer las proteínas, la pastilla bacteriana se descongela y se disuelve en Buffer de Lisis 1X (3 mL/g de peso húmedo). Se añade Lisozima (10 mg/mL) para una concentración final de 300 µg/mL y se deja incubando durante 30 min a 4°C con 600 rpm (16°C en Thermomixer Comfort, EPPENDORF). Se adiciona Tritón X-100 1% (v/v) y se usa el sonicador con potencia del 15-20% (VirSonic Digital 475, VIRTIS) 2 veces (1 min c/u) con un lapso de 1 min en hielo. Se centrifuga a 4°C por 10 min a 3,400 x g (Rotina 420R, HETTICH) y se separa el sobrenadante [S]. La pastilla resultante se disuelve en Buffer de Lisis 1X, se centrifuga en las mismas condiciones y se separa el sobrenadante [L1], se repite este procedimiento [L2], y estas muestras se almacenan a -20°C (ch.4: **Extraction of Recombinant Protein from Bacteria**).

#### **Buffer de Lisis 1X**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Tris-ácido (pH 8.0) | 50 mM  |
| NaCl                | 100 mM |
| EDTA                | 1 mM   |

#### **Buffer de Equilibrio**

|                    |       |
|--------------------|-------|
| Tris-base (pH 7.5) | 20 mM |
| NaCl               | 50 mM |
| β-ME               | 5 mM  |
| Urea               | 8 M   |

### L) RESOLUCIÓN DE PROTEÍNAS [85-87]

Para resolver las proteínas de las muestras desnaturalizadas (hervidas con el mismo volumen de Buffer de Carga 2X por 5 min), se prepara un Gel de Poliacrilamida (SE245, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) [85] (ch.1: **Protein MW determination by SDS-PAGE**) y en los pozos se cargan las muestras y el marcador de PM.

#### **Buffer de Carga 2X**

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Buffer de Gel Concentrador 4X | 25%     |
| Glicerol                      | 20%     |
| β-ME                          | 5%      |
| SDS                           | 2%      |
| Azul de Bromofenol            | 0.0025% |
| Rojo de Pironina              | 0.0025% |

#### **Buffer de Gel Separador 4X**

|                    |       |
|--------------------|-------|
| Tris-base (pH 8.8) | 1.5 M |
| SDS                | 0.4%  |

#### **Buffer de Gel Concentrador 4X**

|                    |       |
|--------------------|-------|
| Tris-base (pH 6.8) | 0.5 M |
| SDS                | 0.4%  |

**Solución de Poliacrilamida**

|                |      |
|----------------|------|
| Acrilamida     | 30%  |
| Bis-acrilamida | 0.8% |

**Gel Separador al 12% (Mini-gel de 0.75 mm\*)**

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Buffer Gel Separador 4X    | 1.25 mL |
| Agua destilada             | 1.75 mL |
| Solución de Poliacrilamida | 2 mL    |
| APS 10%                    | 50 µL   |
| TEMED                      | 5 µL    |

**Gel Concentrador al 4.5% (Mini-gel de 0.75 mm\*)**

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| Buffer de Gel Concentrador 4X | 625 µL |
| Agua destilada                | 1.5 mL |
| Solución de Poliacrilamida    | 375 µL |
| APS 10%                       | 50 µL  |
| TEMED                         | 5 µL   |

\*Volumen máximo por pozo (25 µL), para mayor capacidad se utiliza el mini-gel de 1.5 mm (50 µL), es necesario aumentar 30 min el tiempo de electroforesis y de transferencia para obtener mejores resultados al realizar la detección de proteínas.

Se utiliza el Buffer de Electroforesis 1X en lámina vertical (SE280, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) durante 30 min a 60 V y 1 h a 120 V (EPS3501XL, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH).

**Buffer de Electroforesis 10X**

|                    |        |
|--------------------|--------|
| Tris-base (pH 8.3) | 250 mM |
| Glicina            | 1.91 M |
| SDS                | 10%    |

\*Diluir a 1X antes de usar

Se utiliza el Buffer de Transferencia 1X en cámara vertical (TE22, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) con membrana PVDF (Immobilon™-P, MILLIPORE) (previamente se sumerge en metanol 100% por 5 min para activarla) durante 1 h a 60 V (EPS3501XL, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH).

**Buffer de Transferencia 10X**

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Tris-base (pH 8.3)               | 250 mM |
| Glicina                          | 1.91 M |
| *Diluir a 1X y adicionar Metanol | 20%    |

**M) DETECCIÓN DE PROTEÍNAS** <sup>[85]</sup>

Para detectar proteínas en Gel de Poliacrilamida, éste se puede teñir y después secar para conservarlo a temperatura ambiente ( $T_{amb}$ ) (5: **Conservación de los geles de electroforesis**):

El gel se lava durante 30 s con agua destilada y sumerge en la Solución de Tinción durante 1 h, después se cambia a la Solución para Desteñir (hasta observar las bandas de las proteínas teñidas de color azul) y se almacena en agua destilada a 4°C <sup>[84]</sup> (**ch.1: Protein MW determination by SDS-PAGE**).

**Solución de Tinción**

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| Isopropanol                    | 25%   |
| Ácido Acético Glacial          | 10%   |
| Azul Brillante Coomassie R-250 | 0.25% |



**Solución para Desteñir**

|                       |    |
|-----------------------|----|
| Ácido Acético Glacial | 7% |
|-----------------------|----|

Para detectar proteínas en membrana PVDF (Immobilon™-P, MILLIPORE), ésta se sumerge en la Solución de Tinción durante 5 min, después en la Solución para Desteñir durante 1 h (hasta observar claramente las proteínas).

**Solución de Tinción**

|                                |      |
|--------------------------------|------|
| Metanol                        | 50%  |
| Ácido Acético                  | 7%   |
| Azul Brillante Coomassie R-250 | 0.1% |

**Solución para Desteñir**

|               |     |
|---------------|-----|
| Metanol       | 50% |
| Ácido Acético | 7%  |

\*Las técnicas de detección se llevan a cabo en incubación a  $T_{amb}$  y con agitación suave [velocidad 4-5] (RM1030, BRINKMANN).

**N) IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

Para utilizar la membrana PVDF (Immobilon™-P, MILLIPORE), teñida con azul Coomassie, en la identificación de proteínas; es necesario sumergirla en la Solución para Eliminar Fondo, para desteñirla por completo.

**Solución para Eliminar Fondo**

|         |     |
|---------|-----|
| Metanol | 90% |
|---------|-----|

|               |     |
|---------------|-----|
| Ácido Acético | 10% |
|---------------|-----|

La identificación de proteínas se realiza por la **técnica de Western-blot** de la siguiente manera: La membrana se bloquea sumergiéndola por 30 min en Solución de Incubación, se diluye el anticuerpo primario y se incuba por 1 h. Se cambia a Solución de Lavado por 5 min y se sumerge 1 h en Solución de Incubación con el anticuerpo secundario. Se cambia a Solución de Lavado 3 veces por 5 min c/u y se sumerge en Solución de Revelado hasta observar la banda de la proteína de interés. Para detener la reacción, la solución se desecha y se lava con agua destilada.

\* Al utilizar un anticuerpo marcado, se omite el primer lavado y la segunda incubación.

\*\* El tiempo de incubación es a  $T_{amb}$  con agitación suave (RM1030, BRINKMANN).

**Buffer PBS 10X pH 7.4**

|   |       |
|---|-------|
| NaCl  | 1.5 M |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                    | 1 M   |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •1H <sub>2</sub> O | 1 M   |

**Solución de Incubación**

|                |       |
|----------------|-------|
| Buffer PBS 10X | 1X    |
| Tween 20       | 0.05% |
| BSA            | 3%    |

**Solución de Lavado**

|                |       |
|----------------|-------|
| Buffer PBS 10X | 1X    |
| Tween 20       | 0.05% |

**Solución de Revelado**

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| Buffer PBS 10X                | 1X     |
| Tween 20                      | 0.05%  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 0.01%  |
| DAB                           | 0.025% |

\* Las membranas PVDF secas se escanean como imágenes \*.jpg (HP-Scanjet 4670, Hewlett-Packard).

**O) PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

- **Manual**

La matriz se lava (2 mL Chelating Sepharose™ Fast Flow, GE) con 5 volúmenes (vols.) (10 mL) de agua destilada para retirar el Etanol en el que se encuentra resuspendida. Se adiciona 0.5 vol. (1 mL) de una solución de 100 mM de Sulfato de Níquel. Se lava con 5 vol. de agua para retirar el exceso de Níquel. Se lava con un 1 vol. (2 mL) de una solución de Acetato de Sodio 0.02 M, NaCl 0.5 M, pH 4.0. Se adicionan 2 vols. (4 mL) de Buffer de Equilibrio\*. Se adicionan 2 mL de la muestra resuspendida en el mismo *Buffer* y se colecta la muestra no pegada. Se adicionan 2 vols. por 5 veces con el Buffer de Lavado\* y se colectan cada uno de los lavados por separado. Se adicionan 3mL de Buffer de Elución\*, cada mL por separado y colectarlos juntos o separados. Se retira el Níquel adicionando 1 mL de la solución de 200 mM de EDTA, pH 8.0 y 500mM de NaCl. Se retira el exceso de EDTA con 2-3 vols. (4-6 mL) de una solución de NaCl 0.5 M (estos dos últimos

pasos son necesarios sólo cuando se quiere verificar si restos de la proteína no son logrados eluir con el Imidazol). Para almacenar la matriz por largos periodos de tiempo mantenerla en Etanol al 20%.

\* Se preparan sin Urea.

- **Automática**

Se utiliza un equipo de **FPLC** con colector (ÄKTA-Prime y Frac920, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH). La matriz (HisTrap™HP, GE) y las mangueras (línea A y B) se lavan con agua\* (10 mL, 2 'pump wash'). Se lavan con NaOH (25 mL, 2 'pump wash', 1 'flow' 2 mL/ min). Se lavan con agua\* (70 mL, 6 'pump wash' y 1 'flow' 2 mL/ min). La línea A se coloca en el Buffer de Equilibrio\*\* y la línea B en el Buffer de Lavado\*\*. Se cargan 5 mL de la muestra y se inicia el programa de purificación. Cuando termina de lavar, la línea B se cambia al Buffer de Elución\*\*. Después de la corrida de la muestra todo se lava con agua\* (2 'pump wash' y 1 'flow' 1 mL/ min).

\* Sistema de Purificación de Agua Ultrapura Milli-Q®, filtrada (0.45 µm, MILLIPORE) y desgasificada.

\*\* Se preparan con 8M de Urea.

**Buffer de Equilibrio**

|                |      |
|----------------|------|
| Tris-HCl pH7.5 | 20mM |
| NaCl           | 50mM |
| β-ME           | 5mM  |

**Buffer de Lavado**

|                |       |
|----------------|-------|
| Tris-HCl pH7.5 | 20mM  |
| NaCl           | 500mM |
| β-ME           | 5mM   |

Imidazol 30mM

#### **Buffer de Elución**

Tris-HCl pH 7.5 20mM

NaCl 50mM

B-ME 5mM

Imidazol 500mM

\* Se preparan con agua destilada, se filtran (0.45  $\mu$ m, MILLIPORE), se desgasifican y se almacenan a 4°C.

## **P) CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS <sup>[88,89]</sup>**

Para determinar la concentración de una proteína, se puede utilizar el **método colorimétrico de Löwry**, de la siguiente manera: en una placa de micro-titulación (Microtiter®, THERMO) adicionar 50  $\mu$ L de agua destilada a cada pozo. Colocar 5  $\mu$ L por duplicado (2 pozos) de cada una de las concentraciones de las curvas estándar (mg/mL) y de las muestras problema. Adicionar 150  $\mu$ L de la Solución de Trabajo a cada pozo, agitar durante 20 s e incubar en oscuridad por 10 min a  $T_{amb}$ . Adicionar 15  $\mu$ L de la Solución de Revelado a cada pozo, agitar durante 20 s e incubar en la oscuridad por 30 min a  $T_{amb}$ . Leer la densidad óptica (DO) con filtro  $\lambda=620$  nm en el Lector de

ELISA (Multiskan Ascent, THERMO). Utilizar el programa de cómputo Excel para elaborar una tabla con los datos obtenidos de la lectura y obtener las gráficas de las curvas estándar, agregar la línea de tendencia de regresión lineal y presentar la ecuación y el valor  $R^2$ . Calcular la concentración de las muestras problema en relación a las curvas estándar.

#### **Solución A\***

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 2%    |
| NaOH                            | 0.4%  |
| Tartrato de Na y K              | 0.16% |
| SDS                             | 1%    |

#### **Solución B\***

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O | 4% |
|---------------------------------------|----|

#### **Solución de Trabajo**

|            |     |
|------------|-----|
| Solución A | 99% |
| Solución B | 1%  |

#### **Solución de Revelado**

|                    |     |
|--------------------|-----|
| Reactivo Folin 2 N | 1 N |
|--------------------|-----|

\* Para la preparación de las soluciones A y B, utilizar agua destilada, esterilizar por filtración (0.22  $\mu$ m, MILLIPORE) y almacenar a  $T_{amb}$ .

## 13.2 ANEXO II. Materiales

## A) REACTIVOS

| Nombre                             | PM     | Fórmula  | Proveedor     | Catálogo  | E | T   |
|------------------------------------|--------|--|---------------|-----------|---|-----|
| Ácido Acético Glacial              | 60,05  | CH <sub>3</sub> COOH   | J.T. BAKER    | 9507-02   | L | N   |
| Ácido Cítrico Anhidro              | 192,13 | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>                                   | J.T. BAKER    | 0122      | S | N   |
| Ácido Clorhídrico                  | 36,46  | HCl  | J.T. BAKER    | 9535-02   | L | N   |
| Acrilamida                         | 71,80  | CH <sub>2</sub> CHCONH <sub>2</sub>  | BIO-RAD       | 161-0101  | S | N   |
| Agar Bacteriológico                |        |  | BD DIFCO      | 0140-01   | S | N   |
| Agarosa                            |        |  | BIO-RAD       | 162-0102  | S | N   |
| APS (Persulfato de Amonio)         | 228,20 | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>                  | BIO-RAD       | 161-0700  | S | N   |
| Azul Brillante Coomassie R-250     | 825,99 | C <sub>45</sub> H <sub>44</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>7</sub> S <sub>2</sub> | BOEHRINGER    | 100-871   | S | N   |
| Azul de Bromofenol                 | 669,99 | C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S               | BIO-RAD       | 161-0404  | S | N   |
| Bis-Acrilamida                     | 154,17 | C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub>                   | BIO-RAD       | 161-0201  | S | N   |
| Bromuro de Etidio                  | 394,31 | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub>                               | SIGMA         | E-7637    | S | N   |
| BSA (Albúmina de Suero Bovino)     |        |  | SIGMA         | A9647     | S | 4   |
| Buffer pH 10                       |        |  | MERCK         | 109438    | L | N   |
| Buffer pH 4                        |        |  | MERCK         | 109435    | L | N   |
| Buffer pH 7                        |        |  | MERCK         | 109439    | L | N   |
| Carbonato de Sodio Anhidro         | 105,99 | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>  | MERCK         | 6392      | S | N   |
| Cloruro de Magnesio Hexahidratado  | 203,31 | MgCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O  | SIGMA         | M-2670    | S | N   |
| Cloruro de Potasio                 | 74,55  | KCl  | J.T. BAKER    | 3040-01   | S | N   |
| Cloruro de Sodio                   | 58,44  | NaCl   | QUÍMICA MEYER | 2365-2500 | S | N   |
| DAB (Diaminobencidina)             | 214,30 | C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub>                                 | SIGMA         | D5637     | S | -20 |
| EDTA (Sal Disódica)                | 292,24 | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>                  | SIGMA         | E-5134    | S | N   |
| Etanol absoluto                    | 46,07  | CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH   |               |           |   |     |
| Extracto de Levadura               |        |  | BD BIOXON     | 230900    | S | N   |
| Fosfato de Sodio                   | 119,97 | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>   | FERMONT       | 35942     | S | N   |
| Fosfato de Sodio Monohidratado     | 137,99 | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O                            | J.T. BAKER    | 3822-01   | S | N   |
| Glicerol Anhidro                   | 92,10  | C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>                                   | J.T. BAKER    | 2136-03   | L | N   |
| Glicina (Ácido Aminoetanoico)      | 75,07  | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>                                  | SIGMA         | G8898     | S | N   |
| Glucosa (Dextrosa)                 | 180,16 | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>                                  | MERCK         | 308342    | S | N   |
| Hidróxido de Sodio                 | 40,00  | NaOH   | J.T. BAKER    | 3722-20   | S | N   |
| Imidazol                           | 68,08  | C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub>                                   | USB           | 288-32-4  | S | N   |
| IPTG                               | 238,31 | C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> SO <sub>5</sub>                                 | GIBCO BRL     | 15529019  | S | -20 |
| Isopropanol (Alcohol Isopropílico) | 60,09  | C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O  | SIGMA         | I-9516    | L | N   |
| Metanol (Alcohol Metílico)         | 32,04  | CH <sub>4</sub> O  | J.T. BAKER    | 9070-03   | L | N   |
| Peróxido de Hidrógeno              | 34,01  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | SIGMA         | H1009     | L | 4   |
| Reactivo Folin 2N                  |        |  | FLUKA         | 47641     | S | N   |
| Rojo de Pironina                   | 302,67 | C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> O                             | BIO-RAD       | 161-0425  | S | N   |
| SDS (Dodecilsulfato de Sodio)      | 288,00 | C <sub>12</sub> O <sub>4</sub> SNa   | BIO-RAD       | 1616-0302 | S | N   |

|                                 |         |   |            |           |   |     |
|---------------------------------|---------|---|------------|-----------|---|-----|
| Sulfato de Cobre Pentahidratado | 159,6   | CuSO <sub>4</sub>   | FLUKA      | 61245     | S | N   |
| Sulfato de Zinc Heptahidratado  | 287,56  | ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O  | J.T. BAKER | 8880      | S | N   |
| Tartrato de Sodio y Potasio     | 282,23  | C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNaO <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O              | FLUKA      | 60410     | S | N   |
| TEMED                           | 116,21  | C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>                                   | BIO-RAD    | 161-0800  | L | N   |
| Triptona de Caseína             |         |   | BD DIFCO   | 0123-17-3 | S | N   |
| Tris-base                       | 121,14  | (HOCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>                              | BIO-RAD    | 161-0719  | S | N   |
| Tritón X-100                    | 628,00  | tert-C <sub>8</sub> ΦE <sub>9,6</sub>   | SIGMA      | T-8787    | L | N   |
| Tween 20                        | 1226,00 | C <sub>12</sub> sorbE <sub>20</sub>   | SIGMA      | P-1379    | L | N   |
| Urea                            | 60,07   | CON <sub>2</sub> H <sub>4</sub>   | SIGMA      | U-0631    | S | N   |
| X-gal                           | 408,63  | C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> BrClNO <sub>6</sub>                             | FERMENTAS  | R-0402    | S | -20 |
| Xileno Cianol FF                | 538,61  | C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> Na | SIGMA      | X-4126    | S | N   |
| β-mercaptoetanol (β-ME/ BME)    | 78,1    | C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS  | BIO-RAD    | 161-0710  | L | N   |

\* PM= Peso Molecular; E= Estado, L=Líquido, S= Sólido; T= Temperatura, N=Ambiente, 4= 4°C, -20=-20°C.

## B) ENZIMAS

| Nombre                               | Especificidad (5'→3') | Proveedor  | Catálogo    | Buffer        |
|--------------------------------------|-----------------------|------------|-------------|---------------|
| Endonucleasa <i>Bam</i> HI           | G↓GATCC               | BOEHRINGER | 239275      | <i>Bam</i> HI |
| Endonucleasa <i>Eco</i> RI           | G↓AATTC               | FERMENTAS  | ER0271      | H             |
| Endonucleasa <i>Hpa</i> I            | GTT↓AAC               | BOEHRINGER | 567647      | B             |
| Endonucleasa <i>Kpn</i> I            | GGTAC↓C               | GIBCO BRL  | 15232-010   | <i>Kpn</i> I  |
| Endonucleasa <i>Nde</i> I            | CA↓TATG               | BOEHRINGER | 1040219     | O             |
| Endonucleasa <i>Pst</i> I            | CTGCA↓G               | BOEHRINGER | 621625      | <i>Pst</i> I  |
| RNasa A                              |                       | BOEHRINGER | 109169      |               |
| <i>Pfx</i> DNA polimerasa            |                       | INVITROGEN | 11708013    |               |
| <i>Buffer Taq</i> DNA polimerasa 10X |                       | STRATAGENE | 600131-82   |               |
| <i>T4</i> DNA ligasa                 |                       | ROCHE      | 10481220001 |               |
| Lisozima (Muramidasa) 14,4 kDa       |                       | BOEHRINGER | 1243004     |               |

## C) ANTICUERPOS

| Nombre                            | Tipo         | Animal | Proveedor    | Catálogo    |
|-----------------------------------|--------------|--------|--------------|-------------|
| Anti-6His <i>HRP</i>              | Monoclonal   | Ratón  | ROCHE        | 1965085     |
| Anti-rProteína A <i>HRP</i>       | Recombinante |        | ZYMED        | 10-1123     |
| Anti-PE_PGRS33 <sup>Rv1818c</sup> | Policlonal   | Ratón  | Ingrid Cohen | Laboratorio |
| Anti-PE <sup>Rv1818c</sup>        | Policlonal   | Conejo | Ingrid Cohen | Laboratorio |

## 13.3 ANEXO III. Secuencias

A) Gen *pe\_pgrs1* de *M. tuberculosis* H37Rv.

Genoma: 4,411,532 bp      Locus: Rv0109  
 Inicio: 131,382 bp      Longitud: 1491 bp  
 Fin: 132,872 bp      Contenido G + C: 72.57%

```

1 ATGTCGCCTTT TGATCACATC ACCGGCGACG GTGGCTGCGG CGGCAACACA
51 TCTGGCGGGT ATCGGATCGG CGCTCAGCAC AGCCAACGCG GCAGCGGCCG
101 CTCCGACGAC GGCGCTATCG GTCGCGGGTG CCGATGAGGT CTCGGTGCTG
151 ATCGCAGCGC TATTCGAGGC GTACGCCCGAG GAGTATCAGG CGCTGAGTGC
201 ACAGGCAC TG CGGTTCCACG ACCAGTTCGT GCAGGCGCTC AACATGGGTG
251 CGGTTTCTA TGCGGCCGCA GAGACAGCCA ACGCAACTCC GCTGCAGGCT
301 CTGCAGACTG TGCAGCAGAA CGTCCTCACC GTGGTCAACG CGCCCACCCA
351 GGCATTGCTA GGTCGACCAA TCATCGGCCAA CGGTGCCAAC GGGTTACCGA
401 ACACCGGGCA AGACGGTGGG CCCGGCGGGT TGCTGTTCCG CAACGGTGGC
451 AACGGCCGAT CCGGCGGGGT GGATCAGGCC GGTGGTAAACG GCGGTGCAGC
501 CGGCCTGATC GGTAACGGCG GGTCCGGCGG CGTCGGCGGG CCGGGGATAG
551 CTGGCAGTGC GGGCGGGGCG GGCGGCGCGG GTGGGCTGCT GTTCCGGCAA
601 GGCGGGCCCG GCGGGGCCCG TGGGATTGGC ACCACCGGTG ACGGTGGGCC
651 TGGCGGTGCC GGCGGTAAACG CCATCGGTCT GTTTGGCAGC GGAGGTACCG
701 GCGGGATGGG CGGCGTCCGC GGCATGGGCG GTGTCCGGCAA CGGCGGCAA
751 GCGGGTAAACG GCGGCACCGC CGGACTGTTC GGTACGGCG GGGCCGGCGG
801 TGCCGGGGGC ATCGGCAGCG CCGACGGCGG GCTCGGTGGT GGCGGCGCA
851 ATGGCCGGTT CATGGGCAAC GGTGGGGTTCG GCGGTGCCCG CGGTACGGC
901 GCTAGCGGAG ACGGCGGAAA CGCCGGCAA GGCGGCTTGG GCGGCGTGT
951 CGGCGATGGC GGGGCCGGTG GTACCGGCGG TCFGGGTGAC GTTAACGGCC
1001 GGCTTGCCCG TATTGGCCGT AACGCCGGGT TCGTCCGCAA CGGCGGAGCC
1051 GGCGGCAATG GCCAGCTCGG CAGCGGCGCA GTCTCCTCGG CGGGTGGGAT
1101 GGGCGGCAA GGGGGCTTGG TGTTCCGCAA CGGCGGCCCC GGCGGTCTAG
1151 GCGGGCCGGG CACGTCCGCC GGCAACGGCG GTATGGGCGG CAACGCTGTC
1201 GGACTGTTCG GCCAGGGCGG GGCCGGCGGG GCCGGCGGGT CCGGATPCGG
1251 GGCCGGTATT CCAGGTGGCA GGGGCGGTGA CGGCGGTAGC GGCGGGCTGA
1301 TCGGCGACGG CGGCACCGGT GGCGGTGCAG GCGCGGGTGA CGCTGCTGCA
1351 TCGGCCGGTG GTAACGGTGG TAACGCCCGG TTCATCGGGA ACGGCGGTGA
1401 CGGTGGCCCG GGCATGTTCG GCGGGCCCGG CGGAGCTGGC GGCAGCGGCG
1451 GCACGATATT CGGCTTCGCC GGAACCCCGG GGCCGAGCTA G

```

Figura 35. Secuencia del gen *pe\_pgrs1* de *M. tuberculosis* H37Rv. Longitud de la secuencia 1491 bp con 72.57% de G + C. Minisatélites (12) CGG CGG CAA (secuencias consenso repetidas de 9 bp propias de la familia PE\_PGRS, donde el triplete CGG puede cambiar por CAA) se muestran en negritas y subrayados. Microsatélites (36) CGG CGG (hexámeros), donde un triplete puede cambiar por CAA se muestran subrayados. Los nucleótidos que codifican el dominio PE se muestran en negritas, los codones (tRNA) de inicio (ATG = M/Metionina) y de término (TAG) se muestran subrayados. Figuras obtenidas y modificada de [16,22] señalando las secuencias repetidas reportadas en la literatura [19].

## B) Características de los vectores de clonación y expresión procariontes empleados.

- **Vector de clonación *pCR<sup>®</sup>4Blunt-TOPO<sup>®</sup>*** (3,956 bp): contiene dos topoisomerasas I del virus *Vaccinia* unidas a los extremos 3' se lineariza (referido como un "vector activado"), una región promotora *lac*, un gen *ccdB* fusionado al C-terminal del fragmento *lacZα*, un gen de resistencia a Kn y otro a Amp, un origen pUC y sitios para los oligonucleótidos universales M13R, M13F (-20), T3 y T7 [81].
- **Vector de expresión *pET-15b*** (5,708 bp): contiene una secuencia de tallo de Histidina<sup>®</sup> en el extremo N-terminal seguido de un sitio de trombina y tres sitios de clonación, una región promotora T7 de expresión, una secuencia codificante *lacI* y otra *bla*, un origen pBR322 (NOVAGEN).

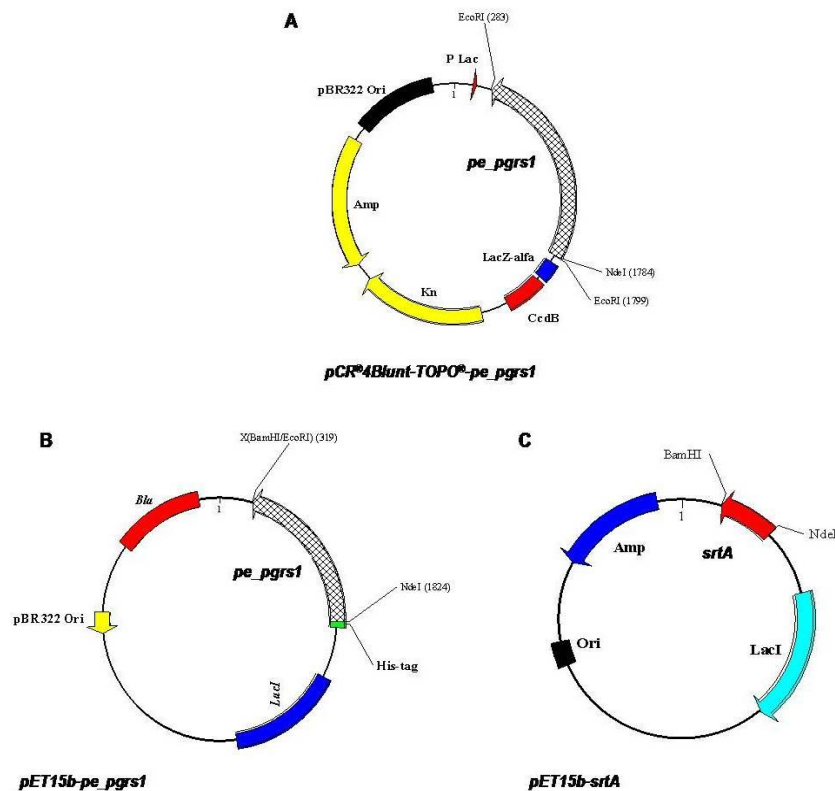


Figura 36. Vectores de clonación y expresión procariontes con las secuencias codificantes de los genes *pe\_pgrs1* y *srtA*. **A)** Plásmido *pCR<sup>®</sup>4Blunt-TOPO<sup>®</sup>-pe\_pgrs1* (5,447 bp). **B)** Plásmido *pET15b-pe\_pgrs1* (7,199 bp). **C)** Plásmido *pET15b-srtA* (6,146 bp). El tallo de Histidina no se muestra en el extremo N-terminal del gen *srtA*. La secuencia codificante *bla* fue sustituida por un gen de resistencia a Amp, en ambos casos. Figura obtenida por el D.C. Antonio Javier Vallecillo Maza, IIB-UNAM.

### C) Secuenciación del gen *pe\_pgrs1*.

El gen *pe\_pgrs1* de *M. tuberculosis* H37Rv se secuenció tres veces. La primera, con el gen insertado en el vector de clonación *pCR*<sup>®</sup>*4Blunt-TOPO*<sup>®</sup> utilizando los oligonucleótidos T7 y T3 donde se obtuvo la secuencia de los extremos N- y C-terminal, pero la secuencia central se obtuvo con nucleótidos indeterminados. La segunda, con el gen liberado del vector de expresión *pET-15b*, pero no fue posible obtener la secuencia por los valores altos de la *Tm* de los oligonucleótidos PE\_PGRS1F y R, donde la mayoría de la secuencia no se determinó. La tercera, con la región central del gen subclonado en el vector *pUC18* utilizando los oligonucleótidos M13: M13F (-40) y M13R, donde se obtuvo la secuencia correcta.

```

Rv0109      : 1-----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*-----80-----: 67
SECPCR4-T3  : -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*-----80-----: -
SECPCR4-T7  : CNCCCTTGACATATGTCGCTTTTGATCACATCACCGGCGACGGTGGTCCGGCGGCAACACATCTGGCGGGTATCGGAT : 80
3EH-1      : -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*-----80-----: -

Rv0109      : -----*-----100-----*-----120-----*-----140-----*-----160-----: 147
SECPCR4-T3  : -----*-----100-----*-----120-----*-----140-----*-----160-----: -
SECPCR4-T7  : CCGCGCTCAGCACAGCCAACGCGGCAGCGGCGCTCCGACGACGGCGCTATCGGTCCGGGTGCCGATGAGGTCTCGGTG : 160
3EH-1      : -----*-----100-----*-----120-----*-----140-----*-----160-----: -

Rv0109      : -----*-----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----: 227
SECPCR4-T3  : -----*-----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----: -
SECPCR4-T7  : CTGATCGCAGCGCTATTCGAGCGTACGCCAGGAGTATCAGGCGGTGAGTGCCGAGGCACTGGCGTCCACGACCACTT : 240
3EH-1      : -----*-----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----: -

Rv0109      : -----*-----260-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----: 307
SECPCR4-T3  : -----*-----260-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----: -
SECPCR4-T7  : CGTGCAGGCGCTCAACATGGGTGGGTTTGCTATGCGGCCGAGAGACAGCCAACGCAACTCCGCTGCAGGCTCTCAGA : 320
3EH-1      : -----*-----260-----*-----280-----*-----300-----*-----320-----: -

Rv0109      : -----*-----340-----*-----360-----*-----380-----*-----400-----: 387
SECPCR4-T3  : -----*-----340-----*-----360-----*-----380-----*-----400-----: -
SECPCR4-T7  : CTGTGCAGCAGAAGCTCCTCACCGTGGTCAACGCGCCACCCAGGCATTGCTAGTTCGACCAATCATCGGCAACGGTGC : 400
3EH-1      : -----*-----340-----*-----360-----*-----380-----*-----400-----: -

Rv0109      : -----*-----420-----*-----440-----*-----460-----*-----480-----: 467
SECPCR4-T3  : -----*-----420-----*-----440-----*-----460-----*-----480-----: -
SECPCR4-T7  : AACGGTTACCGAACACCGGCAAGACGGTGGGCCCGGGTGGTGTTCGGCAACGGTGGCAACGGCGGATCCGGCGG : 480
3EH-1      : -----*-----420-----*-----440-----*-----460-----*-----480-----: 11
                LPNTG
                -----*-----420-----*-----440-----*-----460-----*-----480-----:

Rv0109      : -----*-----500-----*-----520-----*-----540-----*-----560-----: 547
SECPCR4-T3  : -----*-----500-----*-----520-----*-----540-----*-----560-----: -
SECPCR4-T7  : GGTGGATCAGGCGGTTGTAACGGCGGTGCAGCGGCGCTGATCGGTAAACGGCGGTCCGGCGGCTCCGGCGGCGGGA : 560
3EH-1      : GGTGGATCAGGCGGTTGTAACGGCGGTGCAGCGGCGCTGATCGGTAAACGGCGGTCCGGCGGCTCCGGCGGCGGGA : 91
                -----*-----500-----*-----520-----*-----540-----*-----560-----:

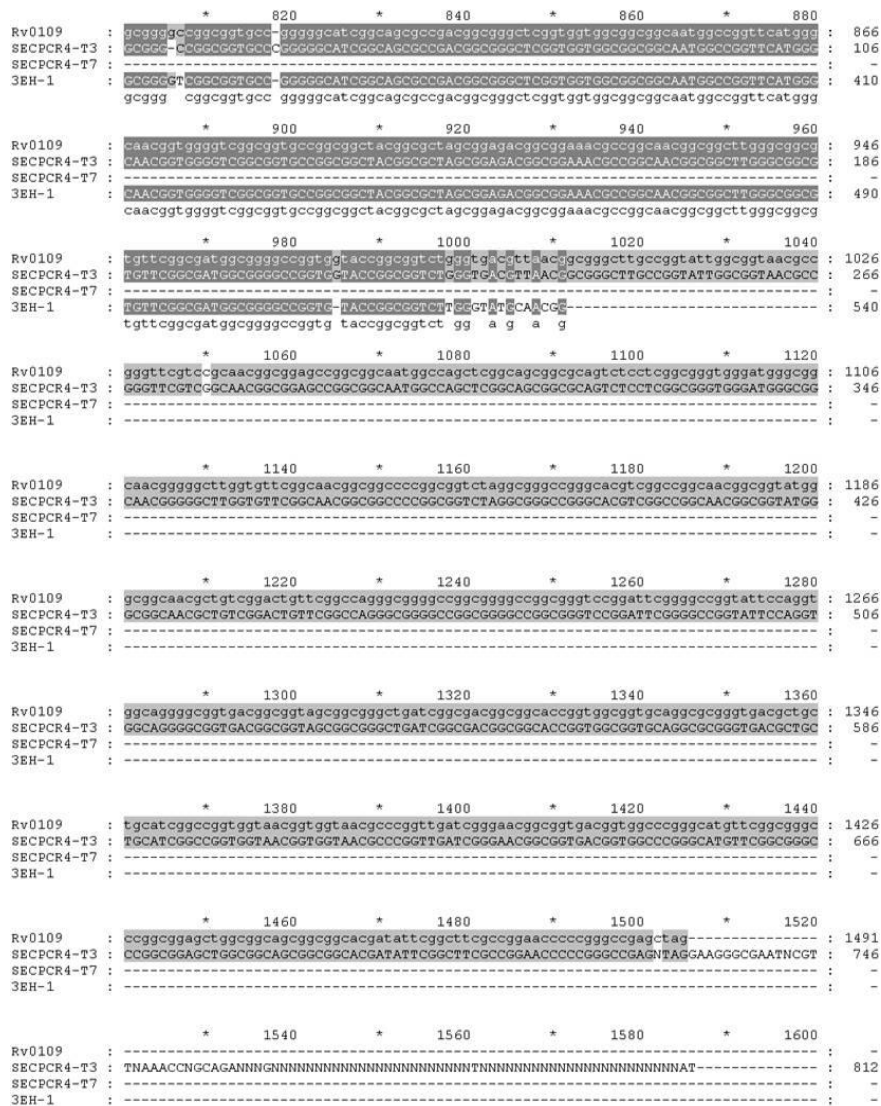
Rv0109      : -----*-----580-----*-----600-----*-----620-----*-----640-----: 627
SECPCR4-T3  : -----*-----580-----*-----600-----*-----620-----*-----640-----: -
SECPCR4-T7  : TAGCTGCCANFGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTGGCTGCTTCGGCAACGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGGAAT : 640
3EH-1      : TAGCTGCCANFGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTGGCTGCTTCGGCAACGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGGAAT : 171
                -----*-----580-----*-----600-----*-----620-----*-----640-----:

Rv0109      : -----*-----660-----*-----680-----*-----700-----*-----720-----: 707
SECPCR4-T3  : -----*-----660-----*-----680-----*-----700-----*-----720-----: -
SECPCR4-T7  : GGCACCACCGGTGACGGTGGGNTGGCGGTGCNTCCGGTAACGCCATCGGTCTGTTGGCA-----: 701
3EH-1      : GGCACCACCGGTGACGGTGGGNTGGCGGTGCNTCCGGTAACGCCATCGGTCTGTTGGCAAGCGGAGGTACCGCGGGAT : 251
                -----*-----660-----*-----680-----*-----700-----*-----720-----:

Rv0109      : -----*-----740-----*-----760-----*-----780-----*-----800-----: 787
SECPCR4-T3  : -----*-----740-----*-----760-----*-----780-----*-----800-----: 27
SECPCR4-T7  : -----*-----740-----*-----760-----*-----780-----*-----800-----: -
3EH-1      : GGGCGGCGTCCGGCGCATGGCGGTGTCGGCAACGGCGGCAACGGCGGTAAACGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG : 331
                -----*-----740-----*-----760-----*-----780-----*-----800-----:
                gggcaccgcccggactgttcggtcaag

```





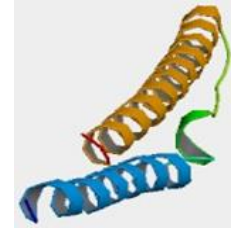
**Figura 37. Secuenciación del gen *pe\_pgrs1*.** Alineamiento de las secuencias del gen *pe\_pgrs1* de los extremos N- y C-terminal (vector *pCR<sup>®</sup>4Blunt-TOPO<sup>®</sup>*) y la central (vector *pUC18*). Los nucleótidos traducidos del motivo LPNTG se muestran enmarcados. Los oligonucleótidos universales T7 (TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG) [SECPCR4-T7: N-terminal] y T3 (CGC ATT TAA CCC TCA CTA AAG) [SECPCR4-T3: C-terminal]; y M13/pUC -40F (GTT TTC CCA GTC ACG TTG TA) y M13 pUCR (TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC) [3EH-1: central] fueron utilizados para la secuenciación automática en la Unidad de Síntesis y Secuenciación, IBT-UNAM. En la región central se muestran los aminoácidos conservados de cada secuencia (debajo de 3EH-1). El programa utilizado para el alineamiento de las secuencias fue GeneDoc [90]. Figura obtenida por el D.C. Antonio Javier Vallecillo Maza, IIB-UNAM.

## D) Proteína recombinante PE\_PGRS1.

Peso Molecular: 44.453 kDa Punto Isoeléctrico: 3.08

Composición de Aminoácidos:

|               |                |              |              |
|---------------|----------------|--------------|--------------|
| A: 73 (14.1%) | C: 1 (0.2%)    | D: 13 (2.5%) | E: 4 (0.8%)  |
| F: 16 (3.1%)  | G: 197 (38.2%) | H: 10 (1.9%) | I: 15 (2.9%) |
| K: 0 (0%)     | L: 34 (6.6%)   | M: 9 (1.7%)  | N: 32 (6.2%) |
| P: 18 (3.5%)  | Q: 14 (2.7%)   | R: 6 (1.2%)  | S: 27 (5.2%) |
| T: 21 (4.1%)  | V: 22 (4.3%)   | W: 0 (0%)    | Y: 4 (0.8%)  |



**A** **1MSLLITSPAT VAAAATHLAG IGSALSTANA AAAAPTALS VAGADEVSVL**  
**51IAALFEAYAQ EYQALSAQAL AFHDQFVQAL NMGAVCYAAA ETANATPLQA**  
**101LQTVQQNVLT VVNAPTQALL GRPIIGNGAN GLPNTGQDGG PGGLLFGNGG**  
**151NGGSGGVDQA GGNGGAAGLI NGGSGGVGG PGIAGSAGGA GGAGLLFGN**  
**201GGPGGAGGIG TTGDGGPGGA GGNAIGLFGS GGTGGMGGVG GMGGVNGGN**  
**251AGNGGTAGLF GHGGAGGAGG IGSADGGLGG GGGNGRFMGN GGVGGAGGYG**  
**301ASGDGGNAGN GGLGGVFGDG GAGGTGGLGD VNGGLAGIGG NAGFVRNGGA**  
**351GGNQLGSGA VSSAGGMGGN GGLVFGNGGP GGLGGPGTSA GNGGMGGNAV**  
**401GLFGQGGAGG AGGSGFGAGI PGGRRGDGGS GGLIGDGGTG GGAGAGDAAA**  
**451SAGGNGGNAR LINGGDGGP GMFGGPGGAG GSGGTIFGFA GTPGPS**

**B** **1MGSSHHHHHHH SSGLVPRGSH MSLLITSPAT VAAAATHLAG IGSALSTANA**  
**51AAAAAPTALS VAGADEVSVL IAALFEAYAQ EYQALSAQAL AFHDQFVQAL**  
**101NMGAVCYAAA ETANATPLQA LQTVQQNVLT VVNAPTQALL **GRPIIGNGAN****  
**151GLPNTGQDGG PGGLLFGNGG NGGSGGVDQA GGNGGAAGLI NGGSGGVGG**  
**201PGIAGSAGGA GGAGLLFGN GGPGGAGGIG TTGDGGPGGA GGNAIGLFGS**  
**251GGTGGMGGVG GMGGVNGGN AGNGGTAGLF GHGGAGGAGG IGSADGGLGG**  
**301GGGNGRFMGN GGVGGAGGYG ASGDGGNAGN GGLGGVFGDG GAGGTGGLGD**  
**351VNGGLAGIGG NAGFVRNGGA GGNQLGSGA VSSAGGMGGN GGLVFGNGGP**  
**401GGLGGPGTSA GNGGMGGNAV GLFGQGGAGG AGGSGFGAGI PGGRRGDGGS**  
**451GGLIGDGGTG GGAGAGDAAA SAGGNGGNAR LINGGDGGP GMFGGPGGAG**  
**501GSGGTIFGFA GTPGPS**

Figura 38. Secuencia de la proteína PE\_PGRS1 [16]. A) Proteína PE\_PGRS1 de *M. tuberculosis* H37Rv de 496 aa (42.289 kDa): el dominio PE (1-94) se muestra en negritas y el resto de la secuencia corresponde al dominio PGRS (95-496) con las repeticiones de residuos -GGA- y -GGN- subrayadas. B) Proteína recombinante PE\_PGRS1 de 516 aa (44.453 kDa): el tallo de 6His (21) añadido por el vector de expresión pET15b y el dominio PGRS (115-516) se muestra en negritas y el resto de la secuencia corresponde al dominio PE (22-114). \* El motivo LPXTG (A: 132-136 y B: 152-156), donde X es Asn<sup>134</sup> (N) se muestra en negritas y subrayado. Información obtenida con el programa WinPep [68]. Estructura predicha de la proteína PE\_PGRS1 (esquina superior derecha). Figura obtenida por el D.C. Antonio Javier Vallecillo Maza, IIB-UNAM.

### E) Proteína recombinante Sortasa A.

Peso Molecular: 18.892 kDa    Punto Isoeléctrico: 4.13

Composición de Aminoácidos:

|              |                |       |        |       |        |       |        |
|--------------|----------------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|
| A: 9         | (5.4%)         | C: 1  | (0.6%) | D: 12 | (7.1%) | E: 11 | (6.5%) |
| F: 5         | (3%)           | G: 12 | (7.1%) | H: 8  | (4.8%) | I: 10 | (6%)   |
| <u>K: 19</u> | <u>(11.3%)</u> | L: 7  | (4.2%) | M: 4  | (2.4%) | N: 7  | (4.2%) |
| P: 10        | (6%)           | Q: 7  | (4.2%) | R: 6  | (3.6%) | S: 11 | (6.5%) |
| T: 10        | (6%)           | V: 12 | (7.1%) | W: 1  | (0.6%) | Y: 6  | (3.6%) |

**A**    **1 MKKWTNRIMT IAGVVLILVA AYLFKPHID NYLHDKDKDE KIEQYDKNVK**  
**51 EQASKDNKQQ AKPQIPKDKS KVAGYIEIPD ADIKEPVYPG PATPEQLNRG**  
**101 VSF AEENESL DDQNISIAGE TFIDRPNYQF TNLKAAKKS M VYFKVGNET**  
**151 RKYKMTSIRD VKPTDVEVLD EQKGKDKQLT LITCDDYNEK TGVWEKRIE**  
**201 VATEVK**

**B**    **1 MGSSHHHHHHH SSGLVPRGSH MQAKPQIPKD KSKVAGYIEI PDADIKEPVY**  
**51 PGPATPEQLN RGVSAEENE SLDDQNISIA GHTFIDRPNY QFTNLKAAK**  
**101 GSMVYFKVGN ETRKYKMTSI RDVKPTDVG V LDEQKGKDKQ LITCDDYN**  
**151 EKTGVWEKRIE IFVATEVK**

**Figura 39. Secuencia de la proteína Sortasa A** [16]. **A)** Proteína SrtA de *S. aureus* de 206 aa (23.541 kDa): los 59 aa truncados del extremo N-terminal en la proteína recombinante se muestran en negritas. **B)** Proteína recombinante SrtA de 168 aa (18.892 kDa): el tallo de 6His (1-21) añadido por el vector de expresión pET15b se muestra en negritas. La secuencia del sitio activo de la enzima (A: 180-184 y B: 142-146), conformado por tres aa, H-His<sup>120</sup>, R-Arg<sup>197</sup> y C-Cys<sup>184</sup>, que forma parte del motivo TLXTC, se muestran en negritas y subrayados. Información obtenida con el programa WinPep [68]. Figura obtenida por el D.C. Antonio Javier Vallecillo Maza, IIB-UNAM.

### F) Fragmentos PE y PGRS de la proteína recombinante PE\_PGRS1.

- **Fragmento PE**

Peso Molecular: 15.567 kDa    Punto Isoeléctrico: 3.54

Composición de Aminoácidos:

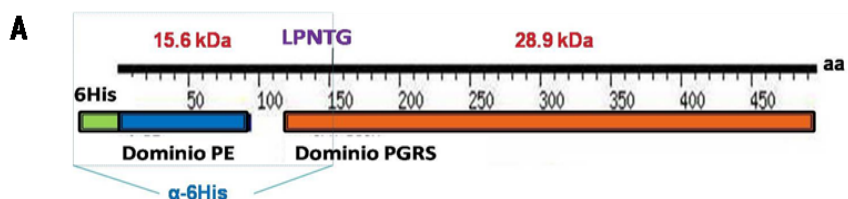
|       |         |       |        |      |        |       |        |
|-------|---------|-------|--------|------|--------|-------|--------|
| A: 35 | (22.6%) | C: 1  | (0.6%) | D: 2 | (1.3%) | E: 4  | (2.6%) |
| F: 3  | (1.9%)  | G: 11 | (7.1%) | H: 9 | (5.8%) | I: 5  | (3.2%) |
| K: 0  | (0%)    | L: 17 | (11%)  | M: 3 | (1.9%) | N: 8  | (5.2%) |
| P: 7  | (4.5%)  | Q: 10 | (6.5%) | R: 2 | (1.3%) | S: 12 | (7.7%) |
| T: 12 | (7.7%)  | V: 11 | (7.1%) | W: 0 | (0%)   | Y: 3  | (1.9%) |

- Fragmento PGRS

Peso Molecular: 28.904 kDa      Punto Isoeléctrico: 2.77

Composición de Aminoácidos:

|               |                |             |              |
|---------------|----------------|-------------|--------------|
| A: 38 (10.5%) | C: 0 (0%)      | D: 11 (3%)  | E: 0 (0%)    |
| F: 13 (3.6%)  | G: 186 (51.5%) | H: 1 (0.3%) | I: 10 (2.8%) |
| K: 0 (0%)     | L: 17 (4.7%)   | M: 6 (1.7%) | N: 24 (6.6%) |
| P: 11 (3%)    | Q: 4 (1.1%)    | R: 4 (1.1%) | S: 15 (4.2%) |
| T: 9 (2.5%)   | V: 11 (3%)     | W: 0 (0%)   | Y: 1 (0.3%)  |



**B**    **1MGSSHHHHHHH **SSGLVPRGSH** MSLITSPAT VAAAATHLAG IGSALSTANA  
**51**AAAAPTALS VAGADEVSVL IAALFEAYAQ EYQALSAQAL AFHDQFVQAL  
**101**NMGAVCYAAA ETANATPLQA LQTVQQNVLV VVNAPTQALL GRPIIGNGAN  
**151**GLPNT**

**C**    **1G**QDGGPGGLL FGNGGNGGSG GVDQAGGNGG AAGLIGNGGS GGVGGPGIAG  
**51**SAGGAGGAGG LLEFGNGGPGG AGGIGTTGDG GPGGAGGNAI GLFGSGGTGG  
**101**MGGVGGMGV GNGGNAGNGG TAGLFGHGGA GGAGGIGSAD GGLGGGGGNG  
**151**RFMNGGVGG AGGYGASGDG GNAGNGGLGG VFGDGGAGGT GGLGDVNGGL  
**201**AGIGGNAGFV RGGAGGNGQ LGSGAVSSAG GMGGNGGLVF GNGGPGGLGG  
**251**PGTSAGNGGM GNAVGLFGQ GGAGGAGGSG FGAGIPGGRG GDGGSGGLIG  
**301**DGGTGGGAGA GDAAASAGN GGNARLIGNG GDGGPGMFGG PGGAGGSGGT  
**351**IFGFAGTPGP S

**Figura 40. Secuencia de los fragmentos PE y PGRS de la proteína recombinante PE\_PGRS1** [16]. **A)** Diagrama de la proteína PE\_PGRS1 de 496 aa: el tallo de Histidina (6His), el dominio PE de 15.6 kDa (1-94) [pf:PE] rico en Alanina (9-95) [ps:ALA\_RICH] y el dominio PGRS de 28.9 kDa [ps:GLY\_RICH] rico en Glicina (121-494) se muestran en rectángulos y los números indican los aminoácidos de la secuencia lineal de la proteína. Cuando se produce el corte del péptido LPNTG, el anticuerpo  $\alpha$ -6His y el  $\alpha$ -PE reconocen el fragmento PE. **B)** Fragmento PE de 155 aa: el tallo de 6His añadido por el vector de expresión pET15b se muestra en negritas y subrayado y la secuencia LPNT producto del corte de la SrtA se muestra subrayada. **C)** Fragmento PGRS de 361 aa: la glicina inicial producto del corte de la SrtA se muestra subrayada. Información obtenida con el programa WinPep [68]. Figura obtenida por el D.C. Antonio Javier Vallecillo Maza, IIB-UNAM.