



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio de la expresión y glicosilación de la
subunidad periplásmica del transportador específico
de fosfatos (PstS-1) de *Mycobacterium tuberculosis* en
Streptomyces coelicolor

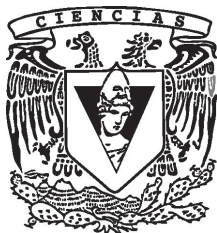
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A:

Manuel de Jesús Tavares Cornejo



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Luis Servín González
2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno
Tavares
Cornejo
Manuel de Jesús
52763801
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
306563245
2. Datos del tutor.
Dr.
Luis
Servín
González
3. Datos del sinodal1.
Dra.
Clara
Inés
Espitia
Pinzón
4. Datos del sinodal 2.
Dra.
Claudia
Andrea
Segal
Kischinevzky
5. Datos del sinodal 3.
Dr.
Víctor
Manuel
Valdés
López
6. Datos del sinodal 4.
M. en C.
Gabriela
González
Cerón
7. Datos de la tesis.
Estudio de la expresión y glicosilación de la subunidad periplásmica del transportador específico de fosfatos (PstS-1) de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces coelicolor*
78p.
2013

DEDICATORIA

A mis padres y a Ana Paula. Por su comprensión, su apoyo incondicional y su inmenso cariño, les doy las gracias.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Luis Servín, por permitirme participar en su laboratorio y en este proyecto y por todos los conocimientos que me transmitió.

A la Dra. Clara Espitia, por su colaboración en este proyecto y por sus correcciones de este trabajo.

A la Biol. Laura Elena Córdova, por siempre apoyarme tanto en la parte teórica como en la práctica durante la realización de este trabajo.

A la M. en C. Gabriela González por sus consejos y asesorías en la mayoría de las técnicas utilizadas en este trabajo.

A la M. en C. Cristina Parada, por el préstamo y la asesoría sobre el uso de los anticuerpos utilizados en este trabajo.

A la Dra. Yolanda López Vidal, por la donación de material con el cual se pudo llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Claudia Segal y al Dr. Víctor Valdés, cuyas acertadas observaciones y correcciones enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Antonio Vallecillos, por la asesoría sobre las características de la proteína de este estudio.

A la Dra. Gloria Soberón y a los integrantes de su laboratorio por sus comentarios y recomendaciones sobre este trabajo.

A la unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por sus servicios.

A CONACYT por el financiamiento del proyecto #103214 “Glicosilación de proteínas en *Streptomyces*. Mecanismos de glicosilación y expresión de proteínas endógenas y de *Mycobacterium tuberculosis*”

Al programa de Becas para la Educación Superior, por otorgarme la beca de Titulación 2012.

A mis compañeros del laboratorio Auri, Christian, Dany, Gaby, Isaí, Jaqueline, Julio, Kevin, Laurita, Lalo, Martí, Tania y Trini, por las risas tan contagiosas que se generaron en nuestras tardes de trabajo.

Tabla abreviaturas

Da: Daltons

DO: Densidad óptica

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

kb: Kilobases

kDa: Kilodaltons

mM: Mili molar

mAmp: Mili Amperes

pb: Pares de bases

PBS: Buffer fosfato salino

PEG: Polietilenglicol

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Pmt: Proteína manosil transferasa

PVDF: Polivinilo de difluorido

rpm: Revoluciones por minuto

SDS: Dodecil sulfato sódico

TBS: Buffer tris-salino

UFC: Unidades formadoras de colonias

X-gal: 5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosido

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Organismos Modelo	2
2.1.1. <i>Streptomyces coelicolor</i>	2
2.1.2. <i>Streptomyces</i> como hospederos de proteínas heterólogas	4
2.1.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
2.1.4. Estrategias contra la tuberculosis	7
2.2. Modificaciones postraduccionales en actinomicetos	8
2.2.1. O-manosilación de proteínas	8
2.2.2. Lipidilación de proteínas	10
2.3. Transporte de fosfato	11
2.3.1. Función de PstS en <i>S. coelicolor</i> y en <i>M. tuberculosis</i>	11
2.3.2. PstS-1 como blanco inmunológico	13
2.4. Secreción de proteínas en actinomicetos	15
2.4.1. Péptidos señales	15
2.4.2. Vías de secreción Sec y Tat	16
2.4.3. Péptido señal de lipasa	17
3. Antecedentes	18
4. Justificación	19
5. Objetivos	20
5.1. Objetivo General	20
5.2. Objetivos particulares	20
6. Metodología	21
6.1. Plásmidos utilizados	21
6.2. Cepas utilizadas	22
6.3. Construcciones de plásmidos	23
6.3.1. Amplificación del gen Rv0934 de <i>M. tuberculosis</i> y su clonación en pSET152 (pBM1.1)	23
6.3.2. Construcción del gen Rv0934 modificado que codifica a la proteína PstS-1 fusionada al péptido señal de LipA y su clonación en pSET152 (pBM1.2)	24
6.3.3. Subclonación de los genes Rv0934 y Rv0934 modificado en el vector monocopia pIJ6902 (pBM2.1 y pBM2.2)	25
6.3.4. Subclonación de los genes Rv0923 y Rv0934 modificado en el vector multicopia (pBM3.1 y pBM3.2)	26
6.4. Ensayos de expresión	27
6.4.1. Experimento control con cepas <i>S. lividans</i> 66, <i>S. coelicolor</i> M145 y <i>S. coelicolor</i> IB69	28
6.4.2. Expresión de la proteína PstS-1 con los vectores monocopia en <i>S. coelicolor</i> IB69	28
6.4.3. Expresión de la proteína PstS-1 con los vectores multicopia en <i>S. coelicolor</i> IB69	29
6.5. Análisis bioinformáticos	29
7. Resultados y Discusión	30
7.1. Amplificación y clonación del gen Rv0934 y del gen Rv0934 modificado	30

7.1.1. Clonación y secuenciación de los fragmentos generados para la expresión de PstS-1 y la proteína quimérica PS-lipA/PstS-1	30
7.1.2. Subclonación de los genes que codifican a la PstS-1 y la proteína quimérica en vectores de expresión monocopia y multicopia	33
7.2. Expresión y localización de la proteína PstS-1 en <i>S. coelicolor</i> IB69 ..	34
7.2.1. Control de la cepa <i>S. coelicolor</i> IB69	34
7.2.2. Expresión de PstS-1 y de la proteína quimérica PS-LipA/PstS-1 en <i>S. coelicolor</i> IB69 a partir de los plásmidos pBM2.1 y pBM2.2	37
7.2.3. Expresión de PstS-1 de <i>M. tuberculosis</i> en <i>S. coelicolor</i> IB69 a partir del plásmido pBM3.1	39
7.2.4. Expresión de la proteína quimérica, PS-LipA/Rv0934 en <i>S. coelicolor</i> IB69	41
7.3. Glicosilación de PstS-1 en <i>S. coelicolor</i> IB69	42
7.3.1. Glicosilación de la PstS-1 presente en el sobrenadante del cultivo y en la fracciones membranal	42
7.3.2. Glicosilación de la proteína quimérica PS-LipA/PstS-1	46
7.4. Análisis bioinformático de los péptidos señales	47
8. Conclusiones	51
9. Perspectivas	52
10. Anexo #1: Medios	53
11. Anexo #2: Protocolos	57
12. Bibliografía	74

1) Resumen

Las lipoglicoproteínas son esenciales para la patogénesis de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Se sabe que las diferentes estructuras con las que se modifican postraduccionalmente a las proteínas, tanto lípidos como glicanos, son determinantes en las interacciones patógeno-hospedero. Es por esto que el estudio de las lipoglicoproteínas es de gran importancia, en particular aquellas que son factores de virulencia, como las proteínas producidas como respuesta al estrés ambiental. Debido al peligro intrínseco de manipular a *M. tuberculosis*, decidimos utilizar como hospedero para la sobreproducción y caracterización de sus antígenos a *Streptomyces coelicolor*, ya que presenta numerosas ventajas en comparación con otros microorganismos. Entre éstas se encuentran: su fácil manipulación genética, la cercanía filogenética con *M. tuberculosis*, su falta de patogenicidad, su capacidad de modificar postraduccionalmente a las proteínas y un tiempo generacional mucho más corto que las micobacterias de lento crecimiento, como *M. tuberculosis*. El objetivo del presente trabajo fue el de expresar el antígeno inmunodominante PstS-1 de *M. tuberculosis* en *S. coelicolor*. Los resultados mostraron que la proteína expresada con su péptido señal nativo está manosilada y tiene aproximadamente el mismo tamaño tanto en el sobrenadante como en la membrana; sin embargo, ambas proteínas presentaron un tamaño menor al esperado debido posiblemente a proteólisis. Por otra parte, se construyó una proteína con su péptido señal nativo intercambiado por uno del género *Streptomyces*, la cual al ser expresada no presentó manosilación y mostró un tamaño mucho menor al esperado, también producto de la proteólisis. Estos resultados sugieren que el péptido señal endógeno de la proteína PstS-1 es necesario para su manosilación en *S. coelicolor*.

2) Introducción

2.1) Organismos Modelo

2.1.1) *Streptomyces coelicolor*

El género *Streptomyces* es considerado como el mayor productor de compuestos bioactivos para la industria biotecnológica. Está constituido por bacterias Gram-positivas con un alto contenido de C-G (72-74% del genoma) y pertenece al orden actinomicetales. Son los productores de la mayoría de los antibióticos usados clínicamente, además de ser capaces de producir múltiples medicamentos para otras enfermedades comunes, como el cáncer (Medema et al, 2011).

El ciclo de vida tan complejo que presenta este género se lleva a cabo predominantemente en el suelo y en plantas en proceso de descomposición. Su crecimiento vegetativo micelial es a través de hifas, y se caracteriza por la capacidad de formar esporas. Esta esporulación se presenta en las últimas etapas del ciclo de vida y es concomitante con la producción de múltiples metabolitos secundarios y se deriva de la producción de hifas aéreas. Al igual que otras bacterias Gram-positivas, la pared celular de las especies pertenecientes a *Streptomyces* está predominantemente compuesta por una mezcla simple de peptidoglicanos (Scherr et al, 2009).

Del saprofitismo, el estilo de vida más común en los integrantes de los *Streptomyces*, se deriva el hecho de que produzcan una gran cantidad de proteínas que al ser secretadas les permiten capturar nutrientes del medio. De igual forma, producen una gran cantidad de hidrolasas que degradan carbohidratos complejos, péptidos y compuestos fosfatados (Palmer & Hutchings, 2011).

Dentro de los estreptomicetos, *Streptomyces coelicolor* A3(2) es considerado como el representante mejor conocido y más estudiado de este grupo taxonómico, por lo que mucho del conocimiento sobre el género se basa en los estudios genéticos y genómicos realizados en esta especie (Jayapal et al., 2007). Cuenta con un cromosoma lineal de 8,667 kb con origen de replicación localizado en el centro y se predice que contiene 7,825 genes, haciéndolo uno de los genomas con mayor potencial codificante entre los procariontes. El centro del genoma presenta una importante sintenia con otros actinomicetos, específicamente con el patógeno humano *Mycobacterium*

tuberculosis. La ausencia de sintenia en los extremos del cromosoma de *S. coelicolor* con el actinomiceto arriba mencionado sugiere que estos dos organismos tuvieron un ancestro común cercano, pero que *S. coelicolor* fue adquiriendo una gran cantidad de DNA a lo largo de su proceso evolutivo (Bentley et al, 2002), muy probablemente debido a transferencia horizontal de genes y eventos de recombinación (Lewis et al, 2010). (**Fig. 1**).

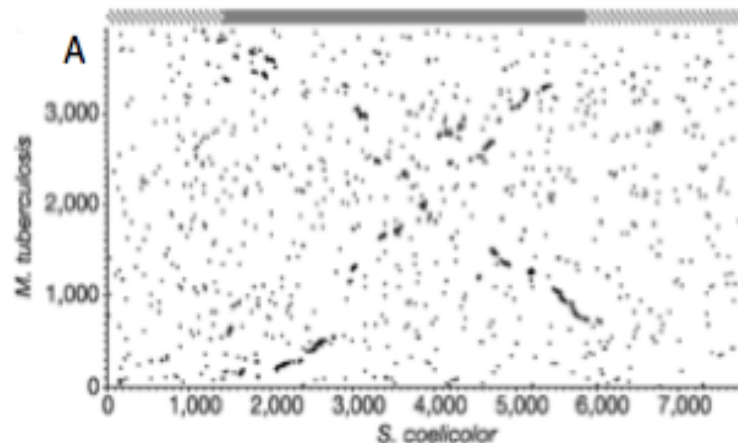


Fig1. Comparación de la estructura del cromosoma de *S. coelicolor* con *M. tuberculosis*. Las vértices representan a las proteínas codificadas por el orden en el que ocurren en el cromosoma. Para cada genoma, DnaA está localizado en el centro. Los puntos representan una coincidencia recíproca, gracias a una comparación por FASTA, entre grupos de proteínas. Las barras sobre la gráfica representan a las regiones del núcleo (oscuro) y de los brazos del cromosoma de *S. coelicolor* (claro). Tomado de Bentley et al. 2002.

S. coelicolor cuenta con un sistema genético y de manipulación molecular muy bien desarrollado. Recientemente se desarrolló el protocolo *Redirect*[®] (Gust, Kieser & Chateren, 2002) en el cual mediante un PCR-Targeting es posible sustituir una secuencia dentro de un cósmido de *S. coelicolor*, por un marcador seleccionable generado por PCR utilizando fragmentos con extensiones homólogas de 39 nucleótidos (Datsenko & Wanner, 2000). Este marcador es posteriormente eliminado también por recombinación, dejando solamente una secuencia cicatriz, por lo que en una misma cepa se pueden hacer numerosas mutaciones utilizando el mismo marcador (Gust, Kieser & Chateren, 2002).

La secuenciación del genoma completo de *S. coelicolor*, la capacidad de generar cepas mutantes y los estudios genómicos y transcripcionales realizados, permiten identificar y mutar genes de interés industrial para mejorar

la producción de metabolitos secundarios e incluso de proteínas heterólogas en *S. coelicolor* (Jayapal et al, 2007).

2.1.2) *Streptomyces* como hospederos de proteínas heterólogas

Los actinomicetos, y en específico los estreptomicetos, han generado un particular interés en el campo de la industria, debido a su diversidad metabólica y sus inmensas capacidades enzimáticas (Nakashima et al, 2005). Esto, aunado al hecho de que ya se han liberado las secuencias de los genomas de algunos integrantes del género *Streptomyces* (*S. coelicolor*, *S. avermitilis*, *S. griseus* y *S. scabies*), ha llevado a que se hayan diseñado numerosos sistemas de expresión constitutiva o inducible (Takano et al, 1995; Huang et al, 2005; Palmer & Hutchings, 2011), los cuales han sido utilizados tanto para aumentar la producción endógena de metabolitos secundarios, como para la producción de proteínas heterólogas eucariontes y procariontes.

Dentro de los actinomicetos, *S. lividans* es considerado como el mejor hospedero para la expresión de proteínas heterólogas. Esto se debe principalmente a que a diferencia de *E. coli*, las proteínas producidas en *S. lividans* tienen un mayor grado de solubilidad, lo que evita la formación de cuerpos de inclusión (Lewis et al, 2010). Otras características que son de especial interés biotecnológico son su actividad de proteasas atenuada comparada con otros estreptomicetos, lo que permite una mejor recuperación de proteínas secretadas y su fácil adquisición de DNA exógeno, gracias a un sistema de modificación-restricción muy laxo (Jayapal et al, 2007). Esto último también ha hecho que la cepa *S. lividans* 66 (número 1326 de la colección del centro John Innes) sea el hospedero más utilizado para la clonación de DNA para todas las especies de los estreptomicetos (Zhou et al, 2004).

De igual forma se ha constatado numerosas veces la capacidad de *S. lividans* para la producción de proteínas bioactivas de eucariontes. Como ejemplo de lo anterior, en esta se han logrado producir proteínas de gran valor clínico, como receptores de células TCD4, factor alfa de necrosis tumoral trimérico y receptor de interleucina 4, todos biológicamente activos y solubles (Fornwald et al, 1993; Pozodis et al, 2001; Zhang et al, 2004).

Filogenéticamente, *S. lividans* es muy cercana a *S. coelicolor*, ya que tienen una secuencia de rDNA 16S virtualmente idéntica. A pesar de esto,

cuentan con algunas diferencias fenotípicas, entre las que destacan: una mayor actividad de proteasas extracelulares y producción de antibióticos por parte de *S. coelicolor* y la incapacidad de *S. lividans* para restringir DNA exógeno metilado y de degradar el agar. Se ha postulado que las discrepancias fenotípicas entre estos dos estreptomicetos se deben a islas genómicas presentes en *S. coelicolor*, ausentes en *S. lividans*, de las cuales sólo el 7% de los genes que contienen son expresados en condiciones de laboratorio. Estas sutiles diferencias pudieran ser resultado de los diferentes nichos que ocupan cada una de estas cepas naturalmente (Jayapal et al, 2007).

2.1.3) *Mycobacterium tuberculosis*

Las micobacterias, al igual que el género *Streptomyces* arriba descrito, pertenecen al grupo de los actinomicetos. La filogenia del género esta basada en un análisis de 16S rRNA y se subdivide comúnmente en dos grupos de especies: de rápido y de lento crecimiento. Estas últimas tienen un tiempo generacional inusualmente largo con respecto a otros procariontes (de 1 hasta 14 días), y son las principales patógenas de humanos. Dentro de las micobacterias de lento crecimiento se encuentra el complejo *M. tuberculosis*, el cual está constituido por *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caneti* y *M. microti*. Todos los miembros del complejo están definidos como una sola especie, gracias a estudios de hibridación DNA-DNA y se distinguen solamente por sus hospederos y el grado de patogenicidad (Brosch et al, 2001).

Cada vez más evidencia apunta a que este grupo se originó de un ancestro común, localizado en la región del este de África, denominado como *M. prototuberculosis*, mediante un fenómeno evolutivo de cuello de botella y una posterior expansión clonal. De igual forma, se propone que las micobacterias patógenas se originaron a partir de organismos de vida libre y que su capacidad infectiva y su parasitismo se desarrollaron gracias a una reducción de su genoma, a la adquisición de nuevos genes a través de transferencia horizontal y a diferentes rearrreglos genéticos (Zakham et al, 2012).

M. tuberculosis es el agente etiológico de la tuberculosis en humanos, enfermedad establecida como la segunda causa de muertes en el mundo ocasionadas por un agente infeccioso (WHO, 2011). Este bacilo infecta a los macrófagos y se desarrolla dentro de las estructuras granulomatosas del

pulmón, conocidas como granulomas, los cuales están constituidos por diferentes estirpes celulares. En estos granulomas es donde su crecimiento se puede suprimir por acción del sistema inmune del hospedero, obligando a *M. tuberculosis* a entrar en un estado de vida latente (Sherr et al, 2009). La reactivación de las células puede ser provocada por desgaste endógeno del sistema inmune, desviación de la respuesta inmune o incluso por factores inmunocomprometedores exógenos, como una coinfección con VIH. Este último es, para algunos, una de las causas principales por las cuales se dio un resurgimiento de la infección a nivel mundial (Kaufmann, 2011).

Una de las razones de la alta prevalencia de la tuberculosis es que este patógeno cuenta con numerosas estrategias para eludir al sistema inmune y a los diferentes tratamientos. Entre ellas esta la capacidad de evitar la fusión de los fagosomas con los lisosomas, evitando así ser blanco de los macrófagos (Kaufmann, 2011). De igual forma, la composición de la pared celular de *M. tuberculosis*, denominada comúnmente como mico-membrana, es reconocida como un factor importante de la patogenicidad del organismo, ya que es extremadamente hidrofóbica y le permite actuar como una barrera contra muchas clases de drogas hidrofílicas antibacterianas (Sonewane et al., 2012). La estructura de ésta es una característica única entre los procariontes debido a su complejidad y está compuesta principalmente por capas de mezclas de arabinogalactano y cadenas largas de ácidos micólicos que están erigidas sobre sáculos de peptidoglicanos (Scherr et al, 2009). (Fig. 2)

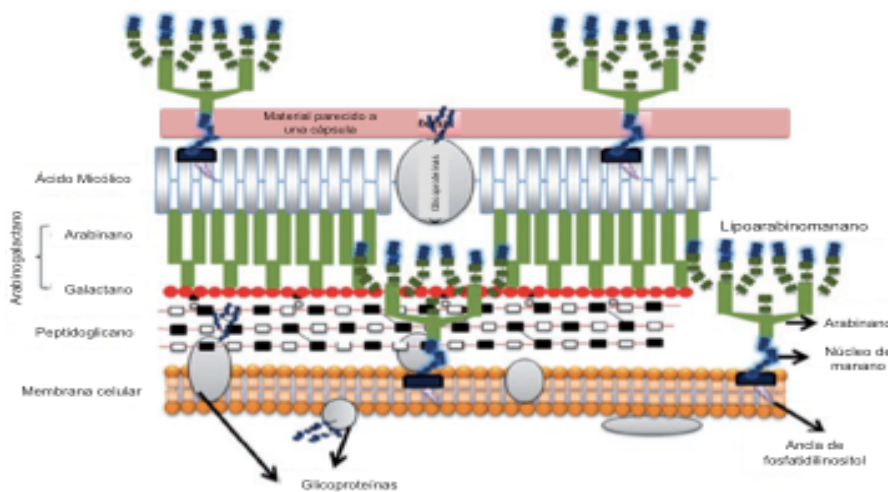


Fig. 2. Esquema de la pared celular y la micomembrana de *M. tuberculosis*. Tomado de Sonewane et. al. 2012.

2.1.4) Estrategias contra la tuberculosis

Debido a la aparición de cepas de *M. tuberculosis* multiresistentes a antibióticos, una de las estrategias que se han tomado para combatir esta enfermedad es la producción de vacunas de nueva generación. Lamentablemente, hoy en día la única vacuna clínicamente aprobada sigue siendo la Bacillus Calmette Guérin (BCG), que fue desarrollada en 1924 y que consiste de una cepa de *M. bovis* atenuada. Esta confiere una moderada protección ante la forma infantil de la tuberculosis y una limitada protección contra la tuberculosis pulmonar adulta, la forma más prevalente de infección hoy en día (Lamrabet & Drancourt, 2012).

Por lo anterior muchos estudios se han enfocado en identificar y caracterizar funcionalmente productos génicos que sean esenciales para entender los mecanismos mediante los cuales *M. tuberculosis* ocasiona la enfermedad y que actúen como antígenos inmuno-reguladores. Son de particular interés aquellos genes expresados bajo condiciones de estrés, debido a que están estrechamente ligados a la virulencia de los organismos (Torres et al, 2001).

Se han seguido diferentes estrategias para la generación de nuevas vacunas. Entre ellas se encuentra la generación de cepas mutantes de *M. tuberculosis* atenuadas de tal forma que se previene su reversión de virulencia (mediante mutaciones en los genes *phoP* y *fadD26*) y la producción de proteínas recombinantes como adyuvantes, como el diseño de una proteína fusión compuesta por Ag85B, ESAT-6 y el producto de Rv2660 (Kaufmann, 2011).

Lamentablemente, se ha retrasado de manera importante el desarrollo de vacunas de nueva generación que sean producidas fácilmente gracias a las dificultades técnicas que representa el trabajar con *M. tuberculosis* y *M. bovis* (la complejidad de su pared celular que no permite la fácil adquisición de DNA, además del extenso tiempo generacional), aunado al riesgo intrínseco que implica su manipulación. Debido a lo anterior, se han buscado alternativas para la producción de antígenos de *M. tuberculosis*. Entre éstas se encuentra la clonación y caracterización de la proteína PstS-1 de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis*, una micobacteria de crecimiento mucho más rápido, no patógena y filogenéticamente muy cercana. En este estudio, la proteína expresada contaba

con las mismas características bioquímicas que la endógena de *M. tuberculosis* (Torres et al., 2001). Por otra parte, se han logrado generar antígenos bioactivos en hospederos que no se encuentran dentro de las micobacterias, siendo el ejemplo más claro la sobreproducción de la proteína Apa en *S. lividans* (Lara et al., 2004).

2.2) Modificaciones postraduccionales en actinomicetos

2.2.1) O-manosilación de proteínas

La glicosilación de proteínas es considerada como un fenómeno ubicuo en la conformación de matrices extracelulares y de la superficie de la membrana celular (Szymanski et al, 2005). Aunque en un principio sólo se había descrito la glicosilación en los eucariontes y en la capa S de las arqueobacterias, hoy en día ya se tiene registro de que existe en los tres dominios de la vida (Dell et al, 2011). La estructura de los glicanos unidos a las glicoproteínas comparte precursores biosintéticos, lo que sugiere que la glicosilación puede tener roles similares en todos los organismos, como son la regulación de la estructura y la funcionalidad de las proteínas tanto membranales como secretadas (Zamorano et al, 2009).

En eucariontes, aunque ya se tiene bien definido el motivo de los sitios que son modificados por una *N*-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr), los sitios en los que se da la *O*-glicosilación han sido difíciles de establecer. Mediante cassettes de glicosilación en proteínas reporteras, ensayos *in vitro* y la compilación de información sobre *O*-glicoproteínas conocidas, se ha podido establecer que las regiones que sufren esta modificación en eucariontes están caracterizadas por ser residuos de serinas o treoninas flanqueados por secuencias ricas en residuos de prolina, glicina y alanina (Herrmann et al., 2000)

Las coincidencias que presentan algunos mecanismos de glicosilación entre organismos de diferentes dominios, tanto en la presencia de enzimas que la llevan a cabo, como en los precursores y donadores de los glicanos, sugieren un mecanismo conservado evolutivamente. Un ejemplo de lo anterior, es el caso entre las actinobacterias y *Saccharomyces cerevisiae*, en el cual ambos presentan un mecanismo de *O*-manosilación de proteínas muy parecido. En esta modificación post-traducciona se ha postulado que se

necesita que la proteína blanco de la manosilación sea translocada por la vía Sec (Vander Venn et al., 2005) (**Fig. 3**).

Ambas vías de glicosilación cuentan con una maquinaria enzimática que está compuesta principalmente por una Pmt (proteína manosil-transferasa) membranal, que es la encargada de poner el primer residuo de la estructura, y usan lípidos (undecaprenil-bifosfato para bacterias) como donadores del sustrato para modificar a la proteína. Es importante mencionar que hasta ahora se considera que la Pmt es necesaria para que se pueda dar la O-glicosilación en actinomicetos (Wehmeier et al, 2009), y que hay homólogos teóricos de todos los componentes necesarios descritos en la vía de la O-manosilación de *S. cerevisiae* en *S. coelicolor* y *M. tuberculosis* (Espitia et al, 2010).

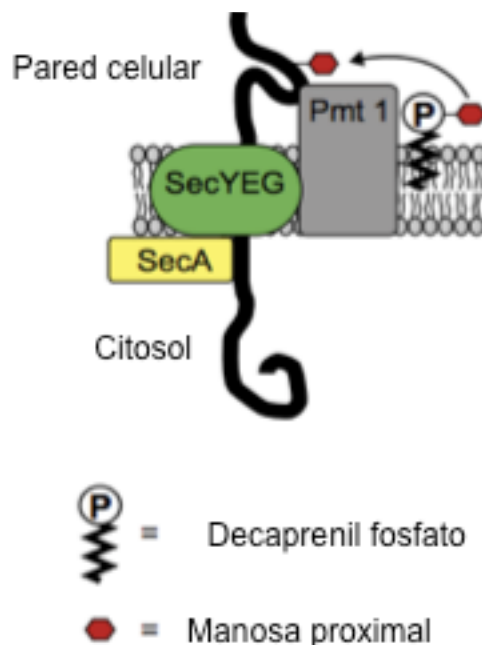


Figura 3. Esquema de la propuesta del mecanismo de la O-manosilación. Tomada de VanderVen et al., 2005

Aunque ya se ha comprobado *in vivo* que tanto *M. tuberculosis* como *S. coelicolor* son capaces de manosilar proteínas y que éstas juegan un papel importante en los procesos biológicos de ambos organismos (González-Zamorano et al, 2009; Wehmeier et al, 2009), se necesitan más estudios para establecer y estudiar todo tipo de estructuras glicosiladas. Las secuencias específicas de azúcares, tanto en glicoproteínas como en otros glicoconjugados, determinan su reconocimiento y la interacción con otras

moléculas de la célula. Por ejemplo, se ha demostrado en diferentes trabajos que los oligosacáridos y polisacáridos encontrados en la superficie de bacterias son responsables de varias de las interacciones patógeno-hospedero (Sonawane et al, 2012).

Para lo anterior, el programa NetOglyc ha resultado ser una herramienta muy valiosa. Este sistema de predicción es una red neural que en varias ocasiones ha acertado en establecer sitios en donde se podría dar la O-glicosilación. Aunque fue desarrollada a partir de información recopilada en eucariontes, ésta se ha utilizado como un punto de inicio para comenzar a caracterizar a las glicoproteínas, particularmente, en las micobacterias (Herrmann et al, 2000).

2.2.2) Lipidilación de proteínas

Las lipoproteínas son una subclase de proteínas que se encuentran en la envoltura celular de todas las bacterias. Éstas pueden ser generalmente diaciladas, en bacterias Gram-positivas, o triaciladas, en Gram-negativas (Brülle et al, 2010) y se caracterizan por tener un motivo *lipobox* [LVI/ASTVI/GAS/C] en la parte C-terminal del péptido señal, el cual funciona como un sitio de reconocimiento para la maquinaria de lipidilación. La adición de los diferentes grupos lipídicos se realiza en la cisteína, la cual está altamente conservada, y resulta esencial para el anclaje y el acomodo de las proteínas en la superficie celular (Rezwan et al, 2007). Aunque se ha descrito que los precursores de las lipoproteínas generalmente son translocados por la vía Sec para ser modificados subsecuentemente, se sabe que algunas lipoproteínas tienen que ser translocadas por la vía Tat para ser funcionales, por ejemplo, las β -lactamasas (MacDonough et al., 2005).

La lipidilación de proteínas se lleva a cabo después de su translocación a la membrana citoplásmica, gracias a la actividad de tres enzimas: la pre-lipoproteína diacilgliceriltransferasa (Lgt), prolipoproteína peptidasa señal (LspA) y la apolipoproteína N-aciltransferasa (Lnt). La Lgt añade un residuo diacil-gliceril a la cisteína en la *lipobox* mediante una unión tioéter. Posteriormente, la LspA quita el péptido señal de lipoproteína, permitiendo así que la Lnt añada una tercera cadena de acilo al grupo amino de la cisteína modificada (Brülle et al, 2010). La última modificación, N-acilación, se da

preponderantemente en las bacterias Gram-negativas. Se sabe, gracias a trabajos realizados en *E. coli*, que esta modificación post-traducciona es necesaria para el transporte de lipoproteínas a través del periplasma hacia la membrana externa, la cual es altamente hidrofóbica (Rezewan et al, 2007) (Fig. 4).

En las micobacterias, gracias a estudios realizados en *M. smegmatis* con proteínas de *M. tuberculosis* como blancos de acilación, se han encontrado genes con actividad de Lnt a pesar de ser bacterias Gram-positivas. Esto se debe probablemente a que la capa exterior de la micomembrana, la cual se asemeja a la membrana exterior de las bacterias Gram-negativas, haga de la N-acilación de lipoproteínas micobacteriales un requisito para su transporte al exterior de ésta (Tschumi et al, 2009).

Finalmente, a las lipoproteínas se les ha descubierto un papel importante en la virulencia de algunas bacterias, ya que pueden participar en la interacción patógeno-hospedero, actuando en la adhesión superficial, y en el inicio del proceso inflamatorio, a través de la translocación de factores de virulencia dentro del citoplasma del hospedero (Kovacs-Simon et al, 2011). En las micobacterias, además de las funciones ya mencionadas, las lipoproteínas son esenciales para poder sintetizar la micomembrana, además de que son responsables de proteger al organismo del estrés ambiental (Rezwan et al, 2007).

2.3) Transporte de fosfato

2.3.1) Función de PstS en *S. coelicolor* y en *M. tuberculosis*

La ausencia del fosfato inorgánico es muchas veces un factor limitante para el crecimiento de las bacterias (Peirs et al, 2005). Es por esto que se han desarrollado diferentes mecanismos para solventar condiciones de estrés producidas por la falta de éste nutriente. Tanto para *M. tuberculosis* como para *S. coelicolor* se han descrito transportadores específicos de fosfatos pertenecientes a la superfamilia de transportadores ABC, conocidos como complejos Pst, los cuales están organizados en operones regulados por fosfato (Torres et al, 2001). Estos arreglos genéticos son una característica que comparten con muchos otros actinomicetos (Wehmeier, 2009).

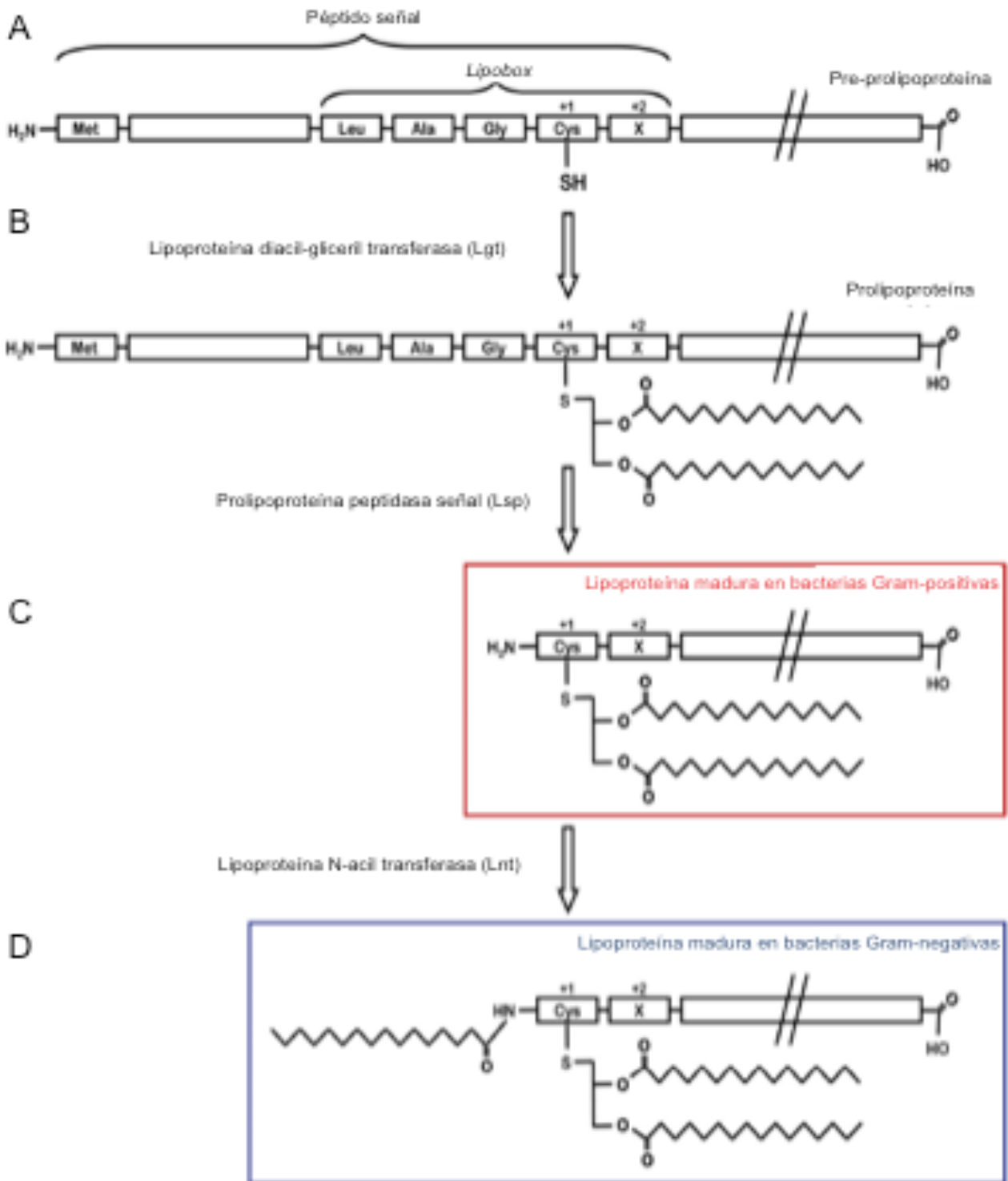


Figura 4. Esquema de la biosíntesis de lipoproteínas bacterianas. (A) El precursor de las lipoproteínas tiene un péptido señal N-terminal que contiene la secuencia característica *lipobox* y es denominado pre-lipoproteína. (B) Durante la maduración de la lipoproteína, el grupo tiol de la cisteína conservada en la *lipobox* es modificado por la Lgt, la cual le añade un residuo diacil-gliceril que sirve como una ancla membranal. (C) Después de la lipidilación, la Lsp remueve al péptido señal, dejando a la cisteína como el residuo N-terminal, generando así una lipoproteína madura en bacterias Gram-positivas. (D) En bacterias Gram-negativas y en algunas Gram-positivas, la Lnt le añade a la lipoproteína un ácido graso mediante un enlace amido en la cisteína N-terminal. Modificada de Kovacs-Simon et al., 2011.

En *E. coli* y en muchos otros procariontes el complejo Pst es un heterotetrámero conformado por las siguientes subunidades: PstS, PstA, PstC y PstB. PstA y PstC son las proteínas integrales de la membrana interna, mientras que PstB provee de energía al complejo mediante la hidrólisis de ATP. PstS es la proteína periplásmica responsable del reconocimiento y la unión con alta afinidad del fosfato (Peirs et al, 2005).

En *M. tuberculosis* se han encontrado cuatro grupos de genes que codifican para genes del Pst cuya similitud con genes presentes en *E. coli* sugiere que son ortólogos. Tres de estos genes se encuentran contiguos en una región de 10.3 kb de DNA, mientras que el último se encuentra a más de 130 kb. Este inusual arreglo de los operones podría representar una adaptación necesaria para sobrevivir a los diferentes ambientes a los que se ve expuesta a lo largo de su ciclo de vida (Vanzenberg et al, 2010).

2.3.2) PstS-1 como blanco inmunológico

Una de las copias del transportador específico de fosfatos, codificada por el gen Rv0934 y denominada PstS-1, es considerada como uno de los antígenos inmunodominantes más importantes de *M. tuberculosis*, jugando un papel preponderante en el metabolismo del fosfato (Torres et al, 2001). Además de esto, se ha corroborado la importancia de esta proteína en el ciclo de virulencia, mediante la observación de una disminución de unidades formadoras de colonias, o UFC's, tanto en pulmón como en bazo en ratones infectados con *M. tuberculosis* mutantes en PstS-1 (Peirs et al, 2005).

La PstS-1 es sintetizada como una preproteína con un péptido señal que es removido proteolíticamente para generar una proteína madura de 351 residuos de aminoácidos, con un peso aproximado de 38 kDa, después de que la cadena polipeptídica es exportada a la superficie de la membrana externa de *M. tuberculosis*. El grupo lipídico que está unido enzimáticamente al grupo tiol del primer residuo, la denominada cisteína de anclaje, es el responsable de anclar a PstS-1 a la superficie externa de la pared celular (Vyas et al., 2003).

La PstS-1 se acumula en grandes cantidades en los filtrados de cultivo de *M. tuberculosis* y se ha comprobado que encuentra manosilada, gracias a su reactividad con la lectina concanavalina-A (Torres et al, 2001). De igual forma, mediante análisis bioinformáticos, se ha establecido que cuenta con un

péptido señal reconocible por la vía Sec y una *lipobox*, lo que la hace una lipoglicoproteína, y con los residuos Serina/Treonina de la secuencia ⁴²VATTPASSPVTL⁵² que pudieran ser sitios de O-manosilación (Espitia et al., 2010)(Figura 5).

```

1      ATGAAAATTCGTTTGCATACGCTGTTGGCCGTGTTGACCGCTGCGCCGCTGCTGCTAGCAGCGGCGGGCTGGCTCGAAACCACCGAGC
1      M K I R L H T L L A V L T A A P L L L A A A G G S K P P S
91     GGTCGCCTGAAACGGGCGCGGCGCCGGTACTGTGCGACTACCCCGCGTCGTCGCGGTGACGTTGGCGGAGACCGGTAGCAGCTG
31     G S P E T G A G A G T V A T T P A S S P V T L A E T G S T L
181    CTCTACCCGCTGTTCAACCTGTGGGGTCCGGCCTTTACAGAGAGGTATCCGAACGTCACGATCACCGCTCAGGGCACCAGGTTCTGGTGCC
61     L Y P L F N L W G P A F H E R Y P N V T I T A Q G T G S G A
271    GGGATCGCGCAGGCGCGCGGCGGACGGTCAACATTGGGGCCTCCGACGCTATCTGTGGAAGGTGATATGGCCGCGCACAAGGGGCTG
91     G I A Q A A A G T V N I G A S D A Y L S E G D M A A H K G L
361    ATGAACATCGCGCTAGCCATCTCCGCTCAGCAGGTCAACTACAACCTGCCCGGAGTGAGCGAGCACCTCAAGCTGAACGAAAAGTCTCTG
121    M N I A L A I S A Q Q V N Y N L P G V S E H L K L N G K V L
451    GCGGCCATGTACCAGGGCACCATCAAAACCTGGGACGACCCGCGAGATCGCTGCGCTCAACCCCGGCGTGAACCTGCCCGCACCAGCGGTA
151    A A M Y Q G T I K T W D D P Q I A A L N P G V N L P G T A V
541    GTCCGCTGCACCGCTCCGACGGTCCGGTGACACCTTCTTGTTCACCCAGTACCTGTCCAAGCAAGATCCCGAGGGCTGGGGCAAGTCG
181    V P L H R S D G S G D T F L F T Q Y L S K Q D P E G W G K S
631    CCCGGCTTCGGCACCACCGTCTGACTTCCCGGCGGTGCGGGTGCCTGGGTGAGAACGGCAACGGCGCATGGTGACCGGTTGCGCCGAG
211    P G F G T T V D F P A V P G A L G E N G N G G M V T G C A E
721    ACACCGGGCTGCGTGGCCTATATCGGCATCAGCTTCTCGACCAGGCCAGTCAACGGGGACTCGGCGAGGCCCAACTAGGCAATAGCTCT
241    T P G C V A Y I G I S F L D Q A S Q R G L G E A Q L G N S S
811    GGCAATTTCTTGTGCCCCGACGCGCAAAGCATTGAGCCGCGGGGCTGGCTTCGCATCGAAAACCCCGGCAACAGGCGATTTCGATG
271    G N F L L P D A Q S I Q A A A A G F A S K T P A N Q A I S M
901    ATCGACGGGCCCCCGGACGGCTACCCGATCATCAACTACGAGTACGCCATCGTCAACAACCGGCAAAAGGACGCCGCCACCGCGCAG
301    I D G P A P D G Y P I I N Y E Y A I V N N R Q K D A A T A Q
991    ACCTTGACGGCATTTCGCACTGGGCGATCACCGACGGCAACAAGGCTCGTTCTCGACCAGGTTTCATTTCCAGCCGCTGCCGCCGCG
331    T L Q A F L H W A I T D G N K A S F L D Q V H F Q P L P P A
1081  GTGGTGAAGTTGTCTGACGCGTTGATCGCGACGATTTCCAGCTAG
361    V V K L S D A L I A T I S S *

```

Figura 5. Secuencia de DNA y aminoácidos de la PstS-1. Se puede observar la secuencia del péptido señal (amarillo), el *lipobox* (subrayado), la cisteína de anclaje (rojo) y los posibles sitios de glicosilación según la predicción de Net-O-Glyc (azul claro). La proteína madura, según la composición de su aminoácidos, tiene un peso molecular estimado de 38,182 Da.

En *S. coelicolor*, el homólogo de la PstS-1 de *M. tuberculosis* es una lipoproteína adherida a la membrana celular requerida para el transporte de

alta afinidad de fosfatos. Al igual que en *M. tuberculosis*, se sabe que la proteína PstS se encuentra manosilada, aunque no se ha determinado la estructura específica de los azúcares (Wehmeier et al., 2009). Tiene una identidad de 100% con la presente en *S. lividans* y con un 42-43% de identidad con los tres diferentes receptores de fosfato (PstS-1, PstS-2 y PstS-3) de *M. tuberculosis* (Lefèvre et al., 1997).

De igual forma, se ha reportado que en presencia de diferentes fuentes de carbono, la PstS de *S. lividans* puede acumularse en el sobrenadante del cultivo cuando el medio se encuentra enriquecido con fructosa y glucosa, posiblemente porque el aumento de la fuente de carbono genera una necesidad de fosforilar todos los azúcares al internalizarlos, ocasionando un decremento en el fosfato inorgánico dentro de la célula (Díaz et al, 2005).

2.4) Secreción de proteínas en actinomicetos

2.4.1) Péptidos señales

Los péptidos señales son secuencias cortas de aminoácidos que se encuentran en el extremo N-terminal y son los responsables del control de la localización y secreción de proteínas. Desde su descubrimiento, éstos se han utilizado para ser blancos de diferentes medicamentos, para el diseño de una sobreproducción de proteínas e incluso para el descubrimiento de biomarcadores (Lai et al., 2012). Los péptidos señales de las proteínas son reconocidos y cortados por sus respectivas proteasas, permitiendo que la proteína se secrete. Esto sucede durante el proceso de translocación, y se considera indispensable para liberar a la proteína madura de la membrana citoplásmica (Anné et al, 2012).

La secuencia de aminoácidos que codifica al péptido señal es variable y se han encontrado pocos consensos. A pesar de esto, tiene una estructura sistemática bien definida: una región amino-terminal cargada positivamente (región *n*), seguida de una región central hidrofóbica (región *h*) y, finalmente, una región carboxilo-terminal con mayor polaridad (región *c*) flanquea al péptido señal. El núcleo de la región *h* es reconocida por la llamada partícula de reconocimiento de señal (*SRP* por sus siglas en inglés), mientras que la región *c* usualmente contiene un motivo de corte para una proteasa específica (Lai et al, 2012).

Los estreptomicetos, según análisis genómicos, son capaces de codificar las proteínas necesarias de las maquinarias de por lo menos tres vías de secreción: la vía general secretoria (Sec), la vía Tat y la ESX-1/tipo 4 (Palmer & Hutchings, 2011).

El estudio de la conformación de los diferentes péptidos señales es de gran importancia biotecnológica, ya que estos son el requerimiento primario para que ocurra la secreción de proteínas, aunque su inclusión no garantiza la secreción eficiente de una proteína heteróloga. Para la producción de proteínas quiméricas generalmente se opta por utilizar péptidos señales reconocidos por la vía Sec debido a su efectividad, aunque no se descarta el uso de péptidos señales reconocidos por otras vías (Anné et al, 2012).

2.4.2) Vías de secreción Sec y Tat

En el caso de las bacterias, hay dos vías preponderantes de secreción: Sec y Tat (**Fig 6**). La primera vía reconoce péptidos señales que consisten en residuos de aminoácidos con carga positiva, un núcleo hidrofóbico y un motivo Ala-X-Ala, justo antes del sitio de corte. Por esta vía de secreción las proteínas se pliegan mientras ocurre la translocación, con lo que adquieren su conformación tridimensional al ser secretadas (Lai et al., 2012).

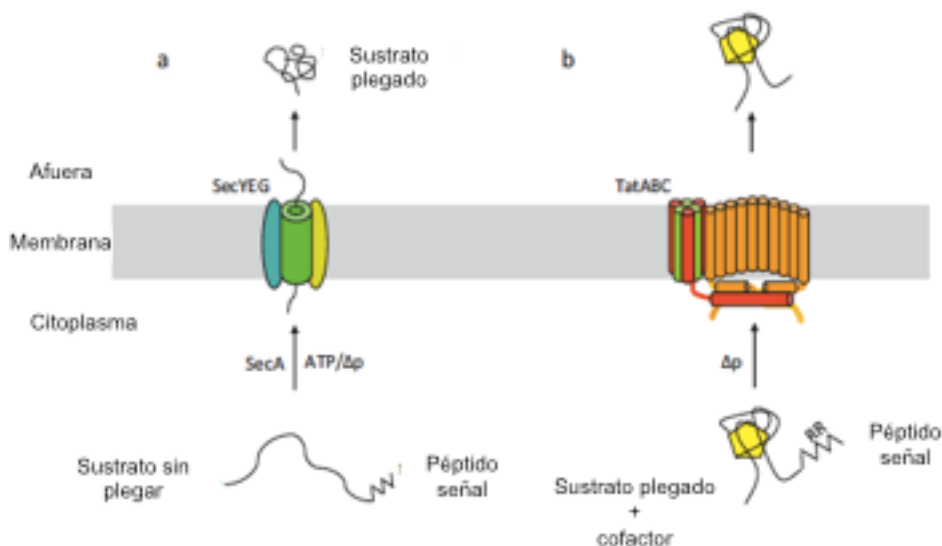


Figura 6. Esquema de las dos vías de secreción Sec (**A**) y Tat (**B**). Modificado de Anné et al., 2012.

El péptido señal para la vía Tat, por otra parte, se caracteriza generalmente por la presencia de dos argininas consecutivas en la región n (Lai et al., 2012). Estas argininas se encuentran en una conformación R-R-X- ϕ - ϕ , en donde ϕ son residuos sin carga, y aunque las dos argininas son características de esta vía, no son absolutamente necesarias, ya que hay sustratos que se translocan por esta vía que no las contienen (MacDonough et al., 2005).

Esta vía de secreción, a diferencia de Sec, transporta proteínas que ya se encuentran plegadas, y se ha visto específicamente involucrada en la secreción de proteínas directamente relacionadas con la virulencia del organismo. En *M. tuberculosis*, por ejemplo, se ha visto que la vía Tat se ocupa de la secreción de β -lactamasas, lo que le confiere resistencia a antibióticos, al igual que en la secreción de fosfolipasa C, importante para la infección de los macrófagos (Lee et al., 2006).

2.4.3) Péptido señal de lipasa

El estudio de las lipasas tiene un amplio rango de aplicaciones biotecnológicas, particularmente en los procesos industriales, que incluyen la fermentación llevada a cabo por estreptomicetos, debido a que mediante éstas se puede optimizar el uso de diferentes fuentes de carbono, como aceites y grasas. Una de éstas, codificada por el gen *lipA* de *S. exfoliatus* M11, tiene un péptido señal de 48 residuos, el cual es reconocido por la maquinaria de Sec de *S. lividans* (Pérez et al. 1993).

S. coelicolor M145 también cuenta con un gen *lipA*, el cual codifica para una lipasa extracelular funcional que es secretada al medio en grandes cantidades cuando es clonada en el plásmido con alto número de copias, pIJ6021, en *S. lividans*. Tiene una identidad de 82% con la de *S. exfoliatus* M11, que es suficiente para que ambas sean reconocidas por anticuerpos policlonales generados contra la primera. A pesar de su gran parecido, una de las diferencias de mayor interés, es que la proveniente de *S. exfoliatus* M11 es mucho más estable que la de *S. coelicolor* (Valdez et al., 1999).

3) Antecedentes

En el trabajo de Lara et al. (2004) se logró sobreexpresar en *S. lividans* la proteína de *M. tuberculosis* de 45/47 kDa, también conocida como Apa, posiblemente involucrada en el transporte del molibdeno y reconocida como un antígeno importante. Se obtuvo un doble bandeo de proteínas solubles que reaccionaban con el anticuerpo producido usando la proteína de 45/47 kDa expresada en *E. coli*. Sólo una de ellas, la de mayor peso molecular, reaccionaba con la lectina concanavalina-A. Esto demostraba que la banda de mayor tamaño se encontraba manosilada, y la de menor tamaño no.

Posteriormente, se probaron ambas proteínas, manosilada y no manosilada, con sueros de pacientes infectados con tuberculosis. En este estudio se observó que sólo reaccionaba la de mayor peso molecular con el suero, con lo cual se estableció que probablemente los anticuerpos generados por los pacientes estaban dirigidos preponderantemente contra las estructuras O-manosiladas de las proteínas.

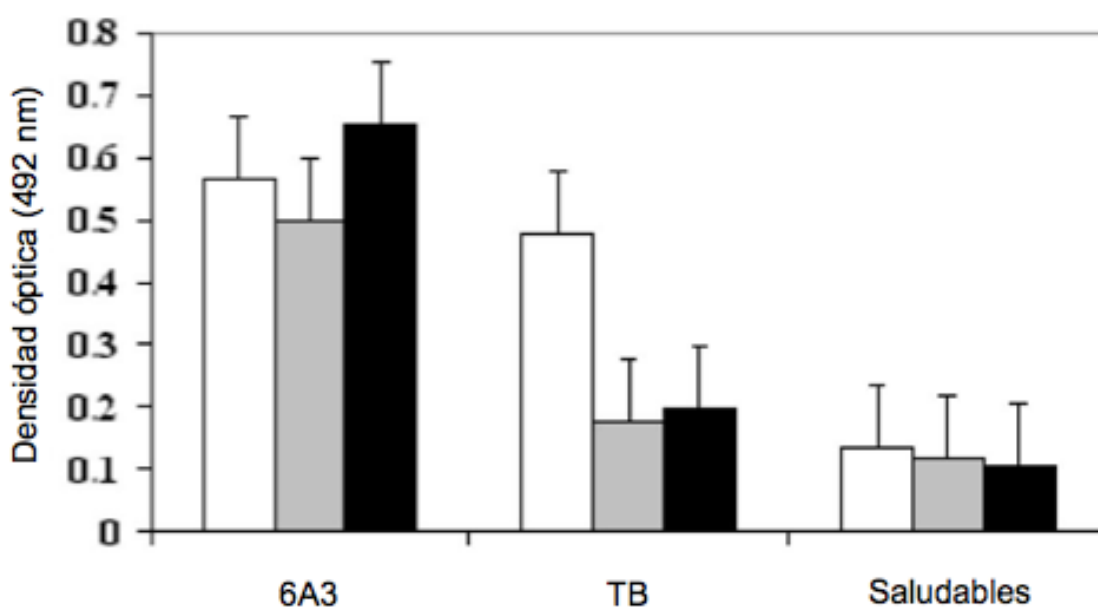


Figura 7. Ensayo ELISA de la proteínas Apa manosilada y sin manosilar. Se observó la reactividad de los anticuerpos con la proteína manosilada (barras blancas), tratada con α -manosidasa (barras grises) y sin manosilar (barras oscuras). La reactividad se probó utilizando un anticuerpo dirigido contra la parte peptídica de la proteína (*Mab 6A3*), suero de pacientes con tuberculosis (*TB*) y suero de individuos saludables. Modificado de Lara et al. 2004.

4) Justificación

La tuberculosis es considerada una de las infecciones más prevalentes en el mundo, afectando a casi 9 millones de personas (WHO,2011). Cerca de un tercio de la población mundial se encuentra infectada en su forma latente, y alrededor de 2 millones de muertes anuales son provocadas por ella, haciéndola hoy en día la segunda causa de muertes en el mundo generada por un agente infeccioso sólo por debajo del VIH.

Aunque se creyó en algún momento que la tuberculosis podría llegar a ser erradicada, la aparición de cepas multirresistentes a antibióticos, aunado a la coinfección que se da con VIH y la ineficiencia en algunos casos de la actual vacuna (BCG), han hecho que ocurra un resurgimiento de esta enfermedad a nivel mundial en países tanto de tercer como de primer mundo. Por lo anterior, se han redoblado esfuerzos por generar productos biotecnológicos (vacunas o biomarcadores) a partir de, particularmente, proteínas recombinantes producidas en diferentes hospederos.

Estudios han demostrado que lipoglicoproteínas de *M. tuberculosis* actúan como determinantes de antigenicidad y de inmunomodulación. Muchas veces, son las mismas modificaciones post-traduccionales las encargadas de generar la respuesta inmune o de la interacción hospedero-patógeno, por lo que cuando se planea la producción de proteínas antigénicas, se intenta mantener las modificaciones post-traduccionales de las proteínas, tanto la glicosilación como la lipidilación.

El género *Streptomyces* ha demostrado ser idóneo para la producción de proteínas heteróloga, ya sean de origen bacteriano o eucarionte, debido a su facilidad de manejo industrial, la gran cantidad de plataformas de sobre expresión de proteínas con las que cuentan y sus capacidades para modificarlas postraduccionalmente. *S. coelicolor* A3(2) es la cepa mejor caracterizada genómicamente, y filogenéticamente muy cercana al hospedero más utilizado para la producción de proteínas heterólogas.

Estas características, sumadas al hecho de la cercanía filogenética existente entre *S. coelicolor* y *M. tuberculosis*, sugiere que el primero puede ser el mejor hospedero para producir proteínas recombinantes que en un futuro pudieran tener aplicaciones biotecnológicas, tanto en el diagnóstico de la tuberculosis como en la producción de vacunas contra ésta.

5) Objetivos

5.1) Objetivo General

Obtener una glicoproteína antigénica (PstS-1) de *M. tuberculosis* que sea fácilmente recuperable para aplicaciones biotecnológicas, utilizando a *S. coelicolor* como hospedero.

5.2) Objetivos Particulares

- Sobreexpresar a la PstS-1 de *M. tuberculosis* en *S. coelicolor*
- Generar y sobreexpresar una proteína fusión fácilmente secretable, mediante el intercambio del péptido señal de la proteína PstS-1 por el de la lipasa A de *Streptomyces exfoliatus* M11
- Analizar la presencia ó ausencia de ambas proteínas en las tres fracciones del cultivo celular (citoplasma, membrana y sobrenadante)
- Establecer si la proteína observada, tanto con su propio péptido señal como con el péptido señal de lipasa, fue manosilada mediante su reactividad con la lectina concanavalina-A.

6) Metodología

6.1) Plásmidos utilizados

En este trabajo se utilizaron plásmidos integrativos y no integrativos en *S. coelicolor*, al igual que plásmidos replicativos en *E. coli* para generar suficiente material plasmídico para realizar las construcciones, entre otros. Se pueden ver las especificaciones de cada uno en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia
pSET152	<i>aac(3)IV/Ap^R</i> , <i>lacZ</i> , <i>rep^{pUC}</i> , <i>att^{φC31}</i> , <i>int^{φC31}</i> , <i>oriT</i> . Plásmido replicable en <i>E. coli</i> con resistencia a apramicina e integrativo en <i>Streptomyces</i>	Bierman et al., 1992
pB13	Derivado del vector multicopia pIJ486. Contiene el gen que codifica para la lipasa de <i>S. exfoliatus</i> M11.	Perez et al., 1993
pIJ6902	<i>aac(3)IV/Ap^R</i> , <i>P_{tipA}</i> , <i>tsr/Thio^R</i> , <i>ori^{pUC18}</i> , <i>oriT RK2</i> , <i>att^{φC31}</i> , <i>int^{φC31}</i> . Vector de expresión integrativo monocopia inducible por tioestreptón, replicable en <i>E. coli</i> y con resistencia a apramicina.	Huang et al., 2005
pIJ6021	Derivado del replicón de pIJ101, <i>Km^R</i> , <i>tsr/Thio^R</i> . Plásmido multicopia que contiene un MCS después del promotor <i>P_{tipA}</i> de <i>S. lividans</i> (inducible por tioestreptón).	Takano et al., 1995
pBM1.1	Gen Rv0934 completo clonado en pSET152	Este trabajo
pBM1.2	Fusión del gen Rv0934 y la secuencia del péptido señal de la lipasa de <i>S. exfoliatus</i> M11 clonados en pSET152	Este trabajo
pBM2.1	Gen Rv0934 completo clonado en pIJ6902	Este trabajo
pBM2.2	Fusión del gen Rv0934 y la secuencia del péptido señal de la lipasa <i>S. exfoliatus</i> M11 clonados en pIJ6902	Este trabajo
pBM3.1	Gen Rv0934 completo clonado en pIJ6021	Este trabajo
pBM3.2	Fusión del gen Rv0934 y la secuencia del péptido señal de la lipasa <i>S. exfoliatus</i> M11 clonados en pIJ6021	Este trabajo

6.2) Cepas utilizadas

Las cepas utilizadas en este trabajo pertenecen al género *Streptomyces* y a la especie *E. coli*. *E. coli* fue utilizada primordialmente para la manipulación de DNA plasmídico, al igual que para llevar a cabo clonaciones, subclonaciones y conjugaciones. Las cepas pertenecientes a *Streptomyces* fueron utilizadas para la manipulación de DNA, *S. lividans*, y finalmente para la expresión de la proteína objetivo, *S. coelicolor*. En la **Tabla 2** se pueden observar todas las cepas que se usaron en este trabajo.

Tabla 2. Cepas de *E. coli* y *Streptomyces* usadas en el presente trabajo

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 α	F <i>endA1 hsdR17</i> ($r_k^- m_k^-$) <i>supE44 thi-1λ^- recA1 gyrA96 relA1 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 ϕ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15 .	Grant et. al., 1990
<i>E. coli</i> ET12567/ pUZ8002	<i>dam-13::Tn9, dcm-6, hsd-M</i> . El plásmido que contiene codifica los elementos necesarios para que se de la conjugación interespecifica con <i>Streptomyces</i> .	McNeil et. al., 1992
<i>E. coli</i> IBEC58	Δ <i>dam, dcm, hsd</i> . Derivada de Bw25113. Permite generar plásmidos sin metilar, con los cuales se puede transformar a <i>S. lividans</i> vía protoplastos .	González-Cerón et. al., 2009
<i>S. lividans</i> 66	Cepa silvestre. Se utilizó para revisar construcciones del vector multicopia antes de transformar a <i>S. coelicolor</i>	Kieser et. al., 2002
<i>S. coelicolor</i> M145	Cepa silvestre. Se utilizó para los controles de cepa de expresión.	Kieser et. al., 2002
<i>S. coelicolor</i> IB69	Δ SCO4142:: <i>scar</i> . Cepa derivada de <i>S. coelicolor</i> A3(2), mutada en el gen SCO4241 que codifica a la proteína homóloga a PstS-1 de <i>M. tuberculosis</i> por el método <i>Redirect</i> [®]	Cadena-Sandoval et. al. datos no publicados

6.3) Construcción de plásmidos

6.3.1) Amplificación del gen Rv0934 de *M. tuberculosis* y su clonación en pSET152 (pBM1.1)

El gen que codifica a la PstS-1 (Rv0934) de *M. tuberculosis* fue amplificado por una reacción de PCR (ver **Protocolo #1**), usando los oligonucleótidos Rv0934**BamHI/NdeI** (5'-CG **GGATCC**CATATGAAAATTCGTTTGCATACGC-3') y Rv0934EcoRI (5'-CTC**GAATTC**GCGTGGTGGTCAACGA-3'), y DNA cromosómico de *M. tuberculosis* H37Rv como molde, donado por la Dra. Yolanda López Vidal (Facultad de Medicina, UNAM). El diseño de los oligonucleótidos permitió que el gen Rv0934, al ser amplificado, contara con sitios de restricción *BamHI/NdeI* en el extremo 5' y con un sitio de restricción *EcoRI* en 3'. El primer sitio de restricción, *BamHI*, sirvió para poder clonarlo en el vector pSET152, mientras que el sitio *NdeI* se utilizó para poder subclonarlo después en los vectores de expresión de *S. coelicolor*, pIJ6902 y pIJ6021. Por otra parte, el sitio *EcoRI* permitió tanto la clonación en pSET152 como la posterior subclonación en los vectores de expresión. Una vez terminada la reacción de PCR, el producto se corrió en un gel de agarosa LMP 1% y se purificó (ver **Protocolo #6**).

El gen Rv0934 amplificado por PCR se digirió con las enzimas *BamHI* y *EcoRI* para clonarlo en pSET152, previamente digerido con las mismas enzimas, mediante una reacción de ligación (ver **Protocolo #2**). Con el producto de ésta se transformaron células de *E. coli* DH5 α electrocompetentes (ver **Protocolo #4**), plaqueando en medio LB con apramicina (50 μ g/mL), X-gal (200 μ g/mL) e IPTG (0.1 mM). Se seleccionaron colonias transformantes de las cuales se realizaron minipreparaciones de DNA plasmídico (ver **Protocolo #5**), para posteriormente digerirlas con las enzimas que se clonaron, de tal forma que se revisara el tamaño del inserto. Después se confirmó la estructura del plásmido de una colonia seleccionada digiriendo con otras 2 enzimas (*SstII* y *HindIII*) y finalmente se mandó a secuenciar, para corroborar que no existieran errores debidos a la amplificación.

6.3.2) Construcción del gen Rv0934 modificado que codifica a la proteína PstS-1 fusionada al péptido señal de LipA y su clonación en pSET152 (pBM1.2)

En este trabajo se optó por utilizar el péptido señal de la lipasa A de *S. exfoliatus* M11 para sustituir el péptido señal de PstS-1 mediante una PCR de doble unión.

Primero, se amplificó mediante una reacción de PCR la secuencia que codifica al péptido señal de lipasa de *S. exfoliatus* M11 a partir del vector pB13, utilizando los oligonucleótidos NDE/M11 (5'-CACCGAGAGGATCC**CATATGCC**CCAGCACCTCC-3') y RvPslipA (5'-GAACCGCTCGGTGGTTTCGAGCC**GCCGCGGCCGCCTGGGCGCCAG**-3'). El primero cuenta con un sitio *NdeI* (**negritas**) que permitió su clonación en los vectores de expresión de *S. coelicolor*, mientras que el segundo es la unión de las secuencias que codifican para el final del péptido señal de la lipasa (**negritas**) y para la PstS-1 sin el péptido señal (*cursivas*). Posteriormente, se obtuvo la segunda parte que codificaría a la proteína fusión: la secuencia de PstS-1 sin su péptido señal. Para esto, se hizo una reacción de PCR en la cual se usó a los oligonucleótidos FwRv0934 (5'-**CTGGCGCCCAGGCGGCCGCGGCCGGCTCG**AAACCACCGAGCGGTTC-3') y Rv0934, y como molde al vector pBM1.1. El primer oligonucleótido es el reverso complementario del oligonucleótido RvPslipA, mientras que el segundo funcionó como se describió anteriormente. Los dos productos fueron separados en un gel de agarosa LMP, con una concentración de 2% para el fragmento que codifica al péptido señal y de 1% para el que codifica a la proteína sin su péptido señal, y se purificaron.

Finalmente, se llevó a cabo una reacción de PCR con los oligonucleótidos NDE/M11 y Rv0934Eco y se tomaron ambos productos de las reacciones de PCR como moldes ("PCR de doble unión"). Con esto se generó el gen *lipA/Rv0934* que codifica a la proteína PstS-1 sin su péptido señal, el cual se encuentra intercambiado por el de la lipasa A de *S. exfoliatus* M11 (PS-LipA/PstS-1). El producto de la reacción de PCR se purificó mediante un gel de agarosa LMP al 1% (ver **Protocolo #6**).

Para la construcción del pBM1.2 se hizo una reacción de ligación mediante la unión de extremos romos. Para esto, al inserto *lipA/Rv0934* construido por el PCR de doble unión se le dio un tratamiento con DNA polimerasa T4 (Invitrogen). Posteriormente, se hizo la reacción de ligación (ver

Protocolo #2), utilizando fragmento tratado y a pSET152 que contaba con extremos romos gracias a que previamente se había digerido con *EcoRV*. Se transformaron células de *E. coli* DH5 α electrocompetentes (ver **Protocolo #4**) con el producto de la reacción de ligación, flaqueando en cajas de LB con apramicina (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), X-gal (200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e IPTG (0.1 mM). Se escogieron colonias para hacer minipreparaciones de DNA plasmídico (ver **Protocolo #5**) y se revisó la estructura del plásmido de éstas digiriendo con la enzima *EcoRI*, previo a su secuenciación. Una vez revisado el material que se utilizaría en los ensayos de expresión, tanto el gen que codifica a la proteína PstS-1 con su propio péptido señal como sin su péptido señal, el cual se está intercambiado por el del péptido señal de la lipasa, se pudo subclonar ambos insertos en los vectores de expresión multicopia (pIJ6902) y monocopia (pIJ6021).

6.3.3) Subclonación de los genes Rv0934 y Rv0934 modificado en el vector monocopia pIJ6902 (pBM2.1 y pBM2.2)

Debido a que el vector de expresión monocopia, pIJ6902, es replicable en *E. coli* y conjugable con *S. coelicolor* a través de la cepa ET12567/pUZ8002, toda manipulación de las construcciones se hizo sin la necesidad de usar a *S. lividans*.

Para subclonar los insertos que codifican a la proteína PstS-1 con su propio péptido señal y con el péptido señal de la lipasa de *S. exfoliatus* M11 en el vector monocopia, se tomaron a los plásmidos pBM1.1 y pBM1.2, y cada uno fue sometido a una doble digestión con las enzimas *NdeI-EcoRI*. Se recuperaron ambos insertos mediante geles de agarosa LMP 1% (ver **Protocolo #6**), y se subclonaron en el vector pIJ6902, digerido con las mismas enzimas, por reacciones de ligación (ver **Protocolo #2**). Se obtuvieron entonces los plásmidos pBM2.1, con el gen Rv0934, y pBM2.2, con el gen Rv0934 modificado. Con éstos se transformaron células de *E. coli* DH5 α electrocompetentes (ver **Protocolo #4**), plaqueando en LB con apramicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se tomaron transformantes con cada una de las construcciones, se hicieron minipreparaciones de DNA plasmídico (ver **Protocolo #5**) y ambas se digirieron con *SstII*, de tal forma que se revisara la estructura de las dos construcciones.

Una vez revisados, se transformaron células de *E. coli* ET12567 / pUZ8002 electrocompetentes con los vectores pBM2.1 y pBM2.2, plaqueando en ambos casos en LB con apramicina (50 µg/mL). Posteriormente, se tomaron transformantes de ambas construcciones y se conjugaron con *S. coelicolor* IB69 (ver **Protocolo #7**). De las transformantes de *S. coelicolor* IB69 se tomaron colonias y se obtuvieron preparaciones densas de esporas (ver **Protocolo #9**) para los ensayos de expresión.

6.3.4) Subclonación de los genes Rv0934 y Rv0934 modificado en el vector multicopia (pBM3.1 y pBM3.2)

Para las construcciones en el vector multicopia fue necesario utilizar a *S. lividans* para su manipulación, debido a que éste no es replicable en *E. coli*. De igual forma, fue necesario utilizar a la cepa *E. coli* IB58 para la producción de vectores y de DNA sin metilar para realizar la subclonación en el vector de expresión pIJ6021, ya que es una característica necesaria para obtener un alto rendimiento en la transformación de *S. lividans*.

Se transformaron células de *E. coli* IB58 electrocompetentes (ver **Protocolo #4**) con los plásmidos pBM1.1 y pBM1.2, plaqueando en medio LB con apramicina (50 µg/mL). Para obtener los insertos de ambas construcciones, se sometió a cada uno a una digestión doble con las enzimas *NdeI-EcoRI* y se purificaron con geles de agarosa LMP al 1%. Para hacer las reacciones de ligación se usó un vector pIJ6021 sin metilar y previamente digerido con las enzimas *NdeI-EcoRI*, en el cual se clonaron el gen Rv0934 y la forma modificada de este, obteniendo los plásmidos pBM3.1 y pBM3.2, respectivamente.

Se transformaron protoplastos de *S. lividans* (ver **Protocolo #8**) con ambas construcciones en el vector multicopia, y se agregó kanamicina (200 µg/mL) a las transformantes a las 18 horas. Se tomaron colonias de las posibles transformantes, tanto de pBM3.1 como de pBM3.2, se plaquearon en sectores en cajas de MS con kanamicina (50 µg/mL) para obtener esporas con las cuales hacer minipreparaciones de DNA plasmídico (ver **Protocolo #5**) y se revisó la estructura de las construcciones, mediante digestión con la enzima *SstII*, y una posterior digestión con *BglII* de una colonia con el vector pBM3.2.

Una vez revisados, se transformaron protoplastos de *S. coelicolor* IB69 con los plásmidos pBM3.1 y pB3.2 obtenidos de *S. lividans*, agregando kanamicina (200 µg/mL) a las transformantes a las 18 horas. Posteriormente se tomaron colonias de cada una de las construcciones y se obtuvieron preparaciones densas de esporas para los ensayos de expresión.

6.4) Ensayos de expresión

Para algunos ensayos de expresión fue necesario realizar ensayos de Western blot, tanto con anticuerpo policlonal dirigido contra la proteína PstS-1 de *M. tuberculosis*, donado por la Dra. Clara Espitia (Dpto. Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), como con la concanavalina-A para detectar proteínas O-manosiladas.

Para los ensayos de Western blot con el anticuerpo anti-PstS-1, al terminar la electroforesis en geles de SDS-PAGE se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de PVDF activada con metanol, utilizando una cámara semiseca a 12 V por 1 hora con un buffer de glicina 1.4%, Tris HCl 0.3% y metanol 20%. Después, se dejó incubando toda la noche la membrana en una solución de TBS Tween 0.05% con leche sin grasa 5%. A la mañana siguiente, se le agregó el anticuerpo primario contra PstS-1, en una relación 1:1000 en TBS Tween 0.05% con leche sin grasa 5%, y se incubó toda la noche. Al día siguiente se sometió a la membrana a un lavado de 5 minutos con agua destilada, seguido de 3 lavados con TBS Tween 0.05% de 10 minutos cada uno. Terminados los lavados, se le agregó el anticuerpo secundario (*Anti-Rabbit IgG-Peroxidase* Sigma, desarrollado en cabra) en una relación 1:1000 en la misma solución TBS Tween con leche sin grasa y se incubó por dos horas. Al terminar el tiempo de incubación, se realizaron lavados a la membrana iguales a los ya descritos (agua destilada primero, seguida de TBS Tween 0.05%), y finalmente se revelaron placas radiográficas Kodak con la membrana por quimioluminiscencia, utilizando el kit *BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)*[®] de Roche.

Por otro lado, las muestras de proteínas que serían sometidas a reconocimiento por la concanavalina-A unida a peroxidasa (Sigma[®]) mediante un ensayo de Western blot, se transfirieron del gel SDS-PAGE en el que se separaron a una membrana PVDF toda la noche en cámara húmeda a 30

mAmp con el mismo buffer utilizado con la cámara semiseca. Cuando las proteínas ya se encontraban en la membrana, esta se bloqueó con una solución TBS con albúmina al 1% toda la noche. Al día siguiente, se hicieron 3 lavados con TBS de 5 minutos cada uno. Al terminar los lavados, se incubaron con Concanavalina-A en una solución 1:1000 de TBS 1mM MgCl, 1 mM MnCl y 1 mM CaCl por 16 horas. Al terminar se le hizo una serie de lavados con TBS iguales a los descritos, y finalmente se revelan placas radiográficas por quimioluminiscencia, como se describió previamente.

6.4.1) Experimento control con cepas *S. lividans* 66, *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* IB69.

Para comprobar que la delección del gen que codifica a la proteína PstS endógena de *S. coelicolor* evitaba falsos negativos, se hicieron dos ensayos de Western blot con los sobrenadantes de los cultivos de las cepas *S. lividans* 66, *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* IB69. En el primero, se usó al anticuerpo anti-PstS-1, mientras que en el segundo se utilizó a la concanavalina-A .

Para este ensayo de expresión de proteínas (ver **Protocolo #10**), se inocularon 25 mL de LB con sacarosa al 25% con 100 μ L de esporas pregerminadas de cada una de las cepas. Se tomaron 1.5 mL de sobrenadante de cada uno estos cultivos y se precipitaron proteínas con metanol-cloroformo (ver **Protocolo #12**). Las muestras de proteínas precipitadas de las tres cepas se corrieron en geles SDS-PAGE con acrilamida al 10%.

6.4.2) Expresión de la proteína PstS-1 con los vectores monocopia en *S. coelicolor* IB69

Para establecer la expresión y localización de la proteína PstS-1 en cultivos con los vectores monocopia, en este ensayo de expresión (ver **Protocolo #10**) se inocularon 25 mL de LB con sacarosa al 25% con apramicina (50 μ g/mL), con 100 μ L de esporas pregerminadas de *S. coelicolor* IB69 con los plásmidos pBM2.1 y pBM2.2 y con el vector pIJ6902.

Se prepararon muestras de micelio (ver **Protocolo #10**) con 15 μ g de proteína. Para las muestras de las proteínas secretadas se tomaron 1.5 mL de cada uno de los sobrenadantes de los cultivos y se precipitaron proteínas por

metanol-cloroformo (ver **Protocolo #12**). Todas las muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE con acrilamida al 10%, el cual se tiñó con azul de Coomassie (ver **Protocolo #13**).

6.4.3) Expresión de la proteína PstS-1 con los vectores multicopia en *S. coelicolor* IB69

Por otra parte, para los ensayos de expresión de proteínas (ver **Protocolo #11**) en el vector multicopia, se llevaron a cabo tomando 0.5 mL de esporas pregerminadas de *S. coelicolor* IB69 con las construcciones pBM3.1, pBM3.2, y con el vector pIJ6021 vacío. Se inocularon con cada una de las esporas pregerminadas, 100 mL de LB con sacarosa al 25% con kanamicina (50 µg/mL).

Se obtuvo el sobrenadante y el micelio de los tres cultivos, y al micelio se sometió a fraccionamiento celular (ver **Protocolo #11**). Se prepararon muestras de las proteínas secretadas precipitando con metanol-cloroformo (ver **Protocolo #12**) 1 mL de cada uno de los sobrenadantes, y se prepararon muestras con 15 µg de proteína de las fracciones citoplásmica y membranal de la cepa con los tres vectores.

Teniendo todas las muestras preparadas, se corrieron en geles de SDS-PAGE al 10% de acrilamida. Un gel con un grupo de muestras se tiñó con azul de Coomassie y otros dos geles se sometieron a Western blot con el anticuerpo anti-PstS-1 y con concanavalina-A, como se describió previamente.

6.5) Análisis bioinformáticos

Para predecir el reconocimiento de ambos péptidos señales en la proteína PstS-1, las dos secuencias de aminoácidos de las proteínas se analizaron mediante los programas de predicción para las vías más comunes de secreción de este organismo: Sec y Tat. Esto se llevó a cabo ingresando las dos secuencias a los programas SignalP y TatP, respectivamente, los cuales se encuentran dentro de los Servidores de Predicción del Centro para Análisis de Secuencias Biológicas (<http://www.cbs.dtu.dk/>). Para el primer programa de predicción se especificó de que se trataba de secuencias provenientes de bacterias Gram-positivas.

7) Resultados y Discusión

7.1) Amplificación y clonación del gen Rv0934 y del gen Rv0934 modificado

7.1.1) Clonación y secuenciación de los fragmentos generados para la expresión de PstS-1 y la proteína quimérica PS-lipA/PstS-1

Mediante electroforesis en geles de agarosa, se revisó el tamaño de los fragmentos generados a partir de la amplificación por PCR. Estos concordaban con los pesos esperados para el gen Rv0934 completo, el gen Rv0934 sin su péptido señal, el fragmento del gen *lipA* que codifica al péptido señal de lipasa de *S. exfoliatus* y el producto de la fusión de esta secuencia con el gen Rv0934 modificado. La secuencia del gen Rv0934 silvestre fue obtenida a partir de la base de datos *Tuberculist* del Instituto Pasteur (<http://tuberculist.epfl.ch/>), en la cual está reportado el genoma completo de *M. tuberculosis* H37Rv.

Una vez que se corroboró que estos fragmentos tenían el tamaño esperado, se prosiguió a generar las construcciones clonando los dos fragmentos en el vector pSET152, para generar a pBM1.1 y pBM1.2. Estos fueron previamente diseñados *in silico* y los sitios para enzimas de restricción fueron establecidos mediante el análisis de ambas secuencias teóricas, usando el programa DNAMAN[®].

La estructura del plásmido pBM1.1 fue revisada en primera instancia realizando con las minipreparaciones de DNA la misma doble digestión con la que se clonó el inserto, con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI, para una vez más revisar el tamaño de éste. Después, se eligió la primera del conjunto de minipreparaciones y se decidió hacer dos digestiones sencillas usando a las enzimas *Sst*II y *Hind*III, teniendo en cuenta la secuencia teórica y los diferentes sitios de restricción presentes en el pBM1.1. Las anteriores endonucleasas fueron elegidas, debido a que había sitios de corte tanto en el inserto como en el vector, esperando fragmentos de 6,320 pb, 315 pb y 228 pb para la digestión con *Sst*II y de 5,153 pb, 969 pb y 723 pb para la realizada con *Hind*III.

Por otra parte, para revisar la estructura del plásmido pBM1.2, se sometió a las minipreparaciones a una digestión sencilla con la enzima *Eco*RI. Con esta digestión se revisó no solamente el tamaño del inserto, sino también la orientación en que se había insertado, debido a que se clonó usando

extremos romos y que había un sitio de *EcoRI* cercano al sitio de *EcoRV* (**Fig. 8**).

Una vez que se tuvo la certeza de que se tenían como insertos los productos amplificados por PCR, gracias a las diferentes digestiones enzimáticas de los plásmidos pBM1.1 y pBM1.2, se secuenciaron y las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias teóricas del gen Rv0934 y del gen que codifica para la proteína quimérica. En ambos casos se obtuvo un 100% de identidad, lo cual nos indicó que no hubo cambios en la secuencia codificante de ambas proteínas maduras. Es importante mencionar que la secuenciación y posterior alineamiento fueron necesarios, debido a que se quería lograr que la proteína PstS-1 sobreexpresada en *S. coelicolor* expusiera los mismos epítopes que la producida en *M. tuberculosis*, lo que aseguraría que fuera reconocida por el anticuerpo y posibilitaba su bioactividad.

El diseño de los oligonucleótidos iniciadores para realizar la PCR de doble unión y así generar la proteína quimérica, permitió que ésta mantuviera los sitios predichos por el programa NetO-Glyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) para que ocurriera la O-manosilación (Espitia et al, 2010), como se ve en la **Fig. 9**. Esto es de vital importancia, ya que, como se ha visto anteriormente (Lara et al., 2004), la presencia de la glicosilación en la proteína puede ser determinante en su capacidad inmunogénica.

Según el análisis de la secuencia de aminoácidos realizado por el programa LipoP, la PstS-1 de *M. tuberculosis* cuenta con un motivo *lipobox* reconocible por la peptidasa señal II. Sin embargo, el motivo presente en esta proteína difiere al consenso: el primer aminoácido (G) no es ninguno de los reportados (LVI) (Rezewan et. al., 2007). Aunque el motivo *lipobox* es un motivo consenso, los aminoácidos que la conforman pueden ser altamente variables, con excepción de la cisteína de anclaje que se mantiene en todos los motivos descritos hasta ahora.

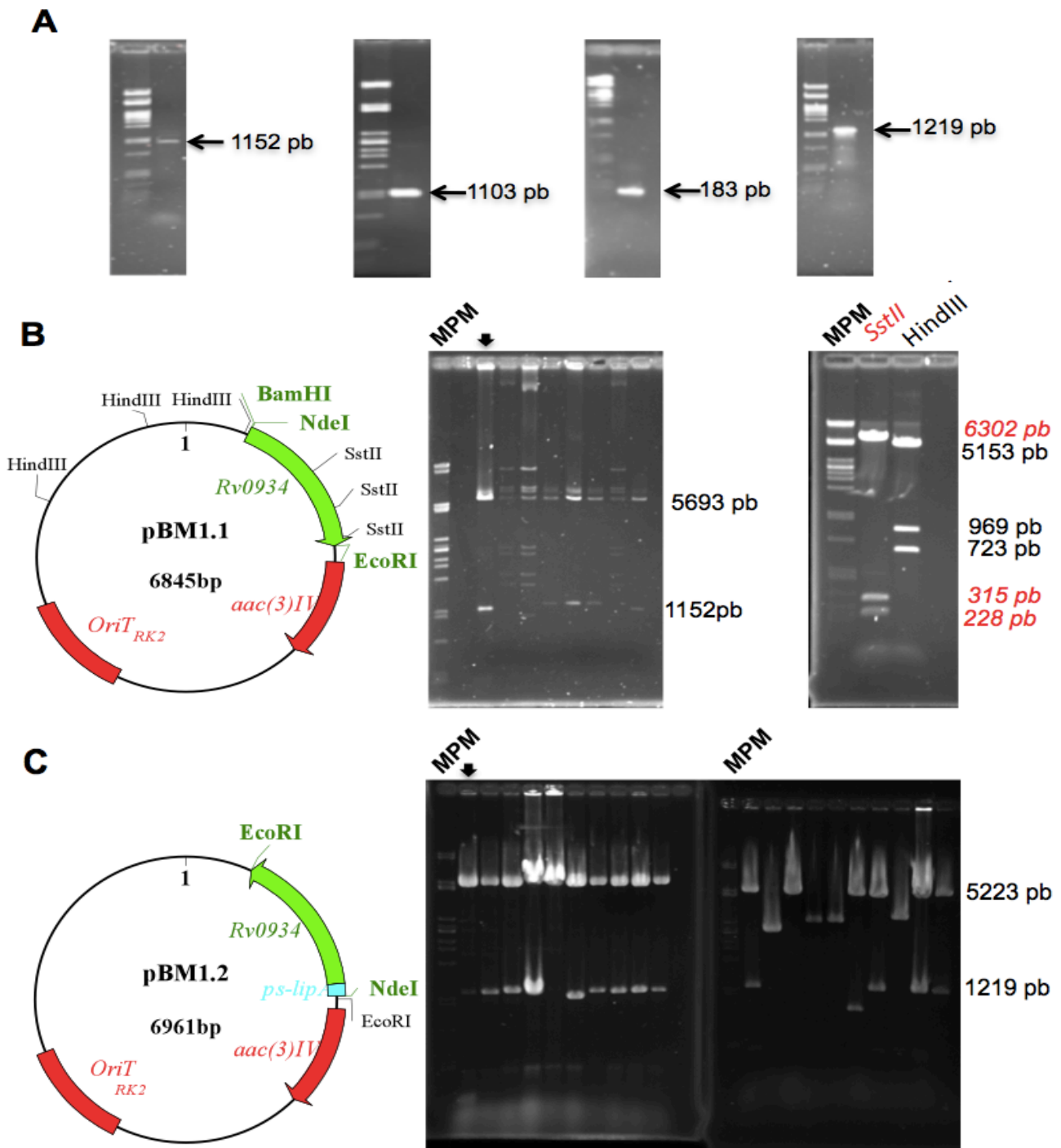


Figura 8. Amplificación de los fragmentos génicos y revisión por digestión enzimática de su clonación en pSET152. (A) Productos amplificados gen *Rv0934* (1152 pb), gen *Rv0934* modificado (1103 pb), fragmento del gen *lipA* codificante del péptido señal de la lipasa de *S. exfoliatus* (183 pb) y producto de la fusión de los dos anteriores (1219 pb). (B) Mapa de pBM1.1, doble digestión con las enzimas BamHI-EcoRI de las minipreps para revisar el tamaño del gen *Rv0934* clonado (centro) y digestiones simples con las enzimas SstII (rojo) y HindIII para revisar su estado (derecha). (C) Mapa de pBM1.2 y digestión con la enzima *EcoRI* para revisar el tamaño y el sentido de las secuencias fusionadas que codificarán a la proteína quimérica. Se usó como marcador de peso molecular DNA del fago λ digerido con la enzima *PstI*. Las flechas negras en los geles de electroforesis con las digestiones enzimáticas muestran a las minipreparaciones de DNA que se utilizaron en posteriores estudios.

Mediante todos los análisis anteriores, se pudo establecer que los fragmentos clonados para sobreexpresar ambas proteínas cumplían con las características para satisfacer nuestros objetivos planteados: contaban con sitios de glicosilación, tenían péptidos señales que aseguraban su translocación/secreción y probablemente mantendrían la configuración tridimensional de ambas proteínas, debido a que el único cambio realizado era la eliminación de la cisteína de anclaje en la proteína quimérica madura. Se procedió entonces a subclonar cada uno de los insertos de los plásmidos pBM1.1 y pBM1.2, en los vectores de expresión pIJ6902 y pIJ6021.

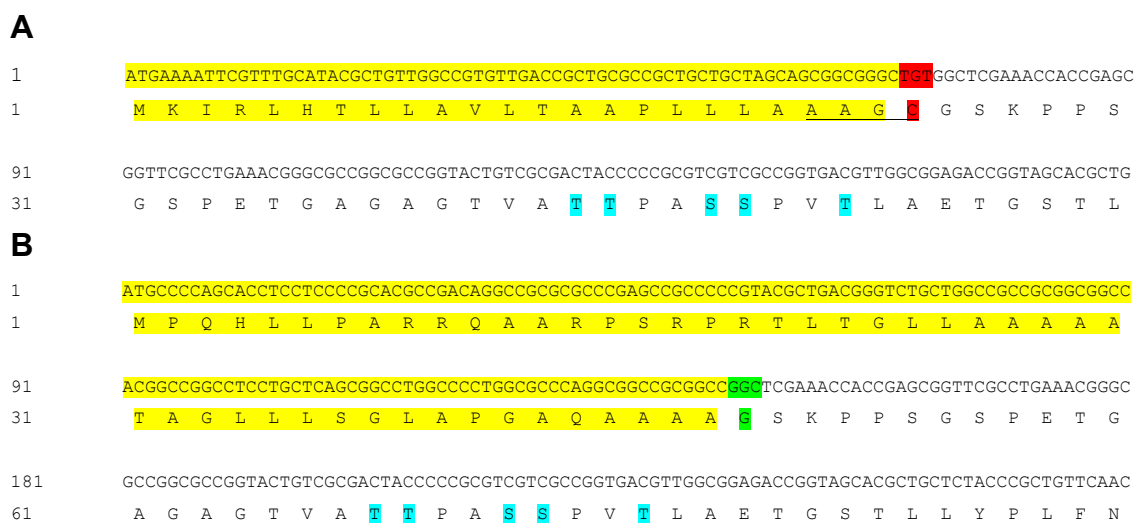


Figura 9. Comparación y análisis de las secuencias de DNA y aminoácidos de las regiones amino-terminal de las proteínas PstS-1 (**A**) y lipA/PstS-1 (**B**). Se pueden observar los péptidos señales (amarillo), los sitios predichos en donde ocurre la glicosilación (azul claro), la cisteína de anclaje (rojo,**A**) en el *lipobox* (subrayado) de la PstS-1, el residuo amino-terminal de la proteína quimérica madura (verde, **B**).

7.1.2) Subclonación de los genes que codifican a la PstS-1 y la proteína quimérica en vectores de expresión monocopia y multicopia

En este punto, ya se tenía la certeza de que los fragmentos para subclonar en los vectores de expresión contenidos en pSET152 eran los correctos, debido a su secuenciación y las diferentes digestiones enzimáticas que se llevaron a cabo. A pesar de lo anterior, antes de transformar o conjuguar a la cepa *S. coelicolor* IB69 con el producto de ligación, de los vectores multicopia y monocopia respectivamente, se decidió revisar las minipreparaciones de

pBM2.1 y pBM2.2 de *E. coli*, al igual que las de los vectores pBM3.1 y pBM3.2 obtenidos de *S. lividans*.

Como se vio anteriormente, ambos insertos cuentan con varios sitios de corte de *Sst*II, por lo que se optó por usar la misma enzima para revisar las cuatro construcciones en los vectores de expresión. Para pBM2.1 (Fig. 10A), pBM2.2 (Fig. 10B) y pBM3.1 (Fig. 10C) se obtuvieron fragmentos fácilmente reconocibles y que coincidían con los fragmentos predichos según la secuencia teórica analizada. Por otro lado, el pBM3.2 contaba con muchos más sitios de corte por la enzima *Sst*II, lo que dificultaba el establecer si se trataba de una clonación exitosa. Por lo anterior se decidió comprobar haciendo otra digestión con la enzima *Bgl*II, obteniendo así el patrón esperado (Fig. 10D).

Una vez verificadas las estructuras de las construcciones de los vectores de expresión, se prosiguió a introducirlos a la cepa *S. coelicolor* IB69, ya sea mediante transformación (pBM3.1 y pBM3.2) o conjugación (pBM2.1 y pBM2.2).

7.2) Expresión y localización de la proteína PstS-1 en *S. coelicolor* IB69.

7.2.1) Control de la cepa *S. coelicolor* IB69

La PstS-1 de *M. tuberculosis* cuenta con un homólogo en *S. coelicolor* que lleva a cabo la misma función (transporte de alta afinidad de fosfato) y que también es una lipoglicoproteína (Wehmeier et. al., 2009). El grado de identidad presente entre estas proteínas de aproximadamente 45% (Lefrève et al., 1997), aunado a la cercanía filogenética entre ambas especies (Bentley et al., 2002) y que tienen la misma maquinaria de O-manosilación (Espitia et. al., 2010), sugería que el anticuerpo anti-PstS-1 dirigido contra la proteína de *M. tuberculosis* pudiera reconocer a la proteína endógena del hospedero, *S. coelicolor*. Por lo anterior, se generó la cepa *S. coelicolor* IB69, a la cual mediante el método *Redirect*[®] se le mutó al gen que codifica a PstS (SCO4142) de *S. coelicolor* M145, dejando en vez de éste una secuencia “cicatriz” que se comprobó mediante PCR (Cadena-Sandoval, datos no publicados).

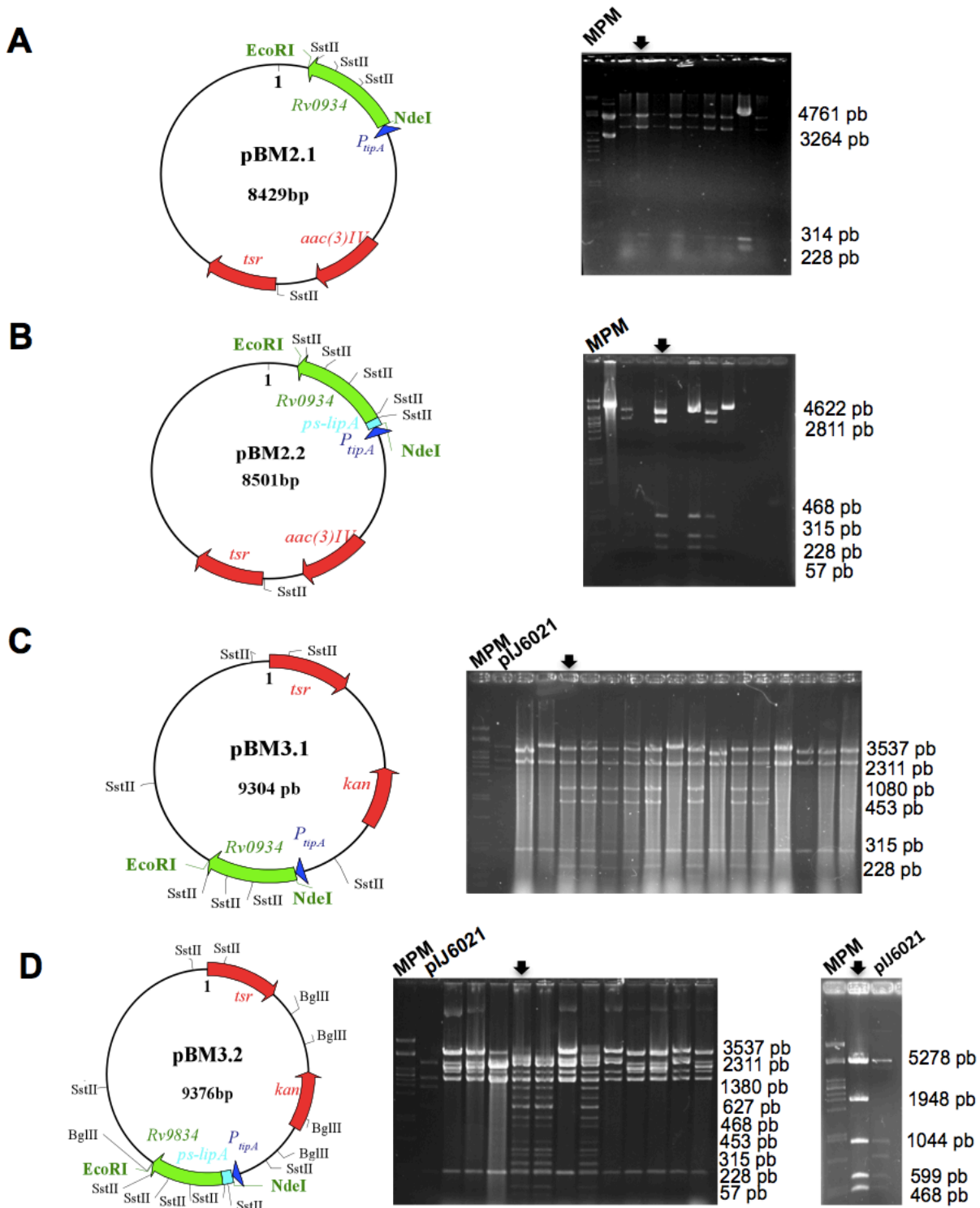


Figura 10. Revisión de las construcciones en los vectores de expresión pLJ6902 y pLJ6021 y sus mapas teóricos. Los vectores de expresión monocopia que contienen el gen *Rv0934* (**A**) y la secuencia que codifica para la proteína quimérica (**B**) fueron digeridos con la enzima *SstII*. El vector de expresión multicopia que contiene el gen *Rv0934* (**C**) se digirió solamente con la enzima *SstII*, mientras que el mismo vector con la secuencia que codifica para la proteína quimérica clonada (**D**) fue digerido con *SstII* (centro), y con *BglII* (derecha). Se usó como marcador de peso molecular DNA del fago L digerido con la enzima *PstI*. Las flechas negras en los geles de electroforesis con las digestiones enzimáticas muestran a las minipreparaciones de DNA que se utilizaron para posteriores estudios.

Para corroborar la eliminación de la proteína y así asegurar que no hubiera interferencia en el reconocimiento de la PstS-1 de *M. tuberculosis*, se precipitaron las proteínas del sobrenadante de cultivos de las cepas *S. lividans* 66, *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* IB69. Estos sobrenadantes fueron sometidos a Western Blot, usando el anticuerpo anti-PstS-1 y a la concanavalina-A para la detección de manosas.

Como en este trabajo el objetivo principal era el obtener una proteína secretable para facilitar su recuperación, sólo se estudió el sobrenadante del cultivo en este control de las cepas. De igual forma, como la proteína endógena de *S. coelicolor* es también una lipoglicoproteína con manosas, se verificó que hubiera un cambio en las proteínas manosiladas secretadas entre las tres cepas, ya que se ha visto que la PstS puede acumularse en el sobrenadante del cultivo en presencia de un medio enriquecido con fuentes de carbono en *S. lividans* (Díaz et al, 2005).

Como control positivo para el Western blot con anticuerpo, se utilizó a la proteína sobreexpresada en *E. coli* con la cual se generó el anticuerpo anti-PstS-1. Esta proteína cuenta con una cola de 6 histidinas unida a una secuencia bisagra en vez del péptido señal endógeno. La secuencia de la proteína madura es idéntica a la de *M. tuberculosis* sin la cisteína de anclaje, y tiene un peso molecular de 38.096 kDa (González-Zamorano et al., 2009). Por otra parte, la reactividad de la concanavalina-A en el Western blot fue comprobada gracias al marcador de peso molecular “*SDS-PAGE Low Standards*” de Bio-Rad®, el cual cuenta con ovoalbúmina con un peso de 45 kDa que se encuentra manosilada.

Se puede observar que utilizando el anticuerpo anti-PstS-1 no hay reconocimiento de ninguna proteína en los sobrenadantes de las tres cepas. De igual forma, no hay diferencias importantes entre la cepa silvestre de *S. coelicolor* y la cepa mutante IB69 cuando se utiliza a la concanavalina-A (**Fig. 11**).

La falta de reconocimiento con el anticuerpo y de diferencia entre las cepas silvestre y mutante observada con la concanavalina-A, puede ser debido a que no hubo acumulación suficiente de la proteína PstS en el sobrenadante del cultivo de la cepa silvestre de *S. coelicolor*. Aunque ya se había registrado grandes cantidades de esta proteína acumuladas en el sobrenadante de

cultivos de *S. lividans* en medio YE enriquecido con glucosa o fructosa (Díaz et. al., 2005), en este trabajo se utilizó un medio de cultivo diferente para los ensayos de expresión de proteína (LB con sacarosa al 25%), lo cual pudo ocasionar diferencias metabólicas que evitaran la acumulación de la PstS en el sobrenadante. De igual forma, puede ser que las proteínas sean estructuralmente diferentes, lo que ocasionaría que otros epítopes sean los que se expongan en la proteína PstS de *S. coelicolor*, haciendo imposible que el anticuerpo producido contra la proteína PstS-1 de tuberculosis expresada en *E. coli* la reconozca.

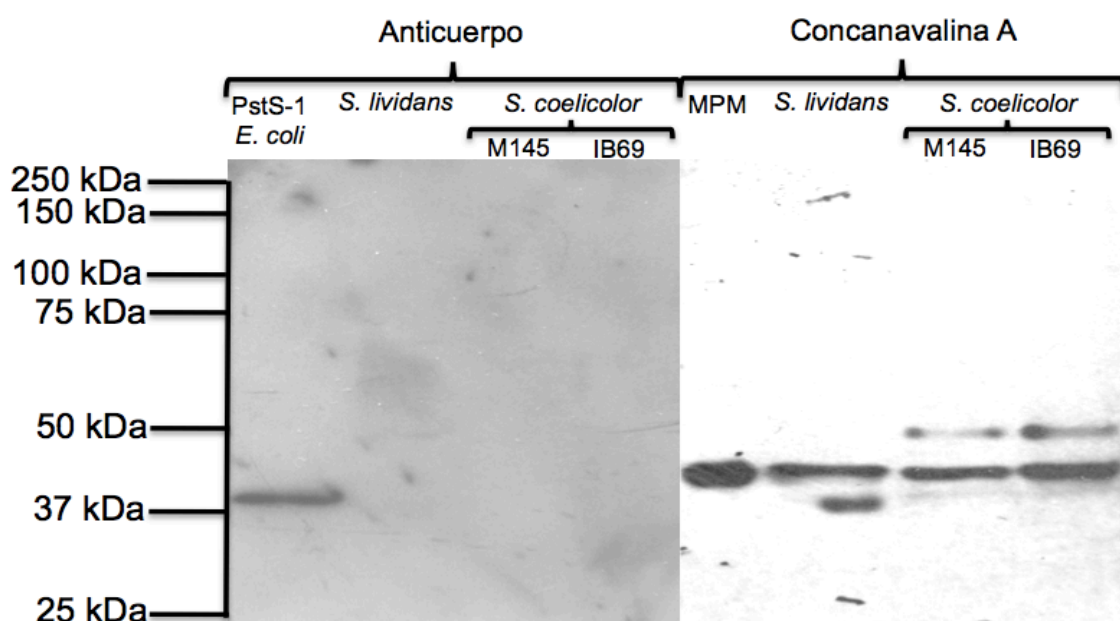


Figura 11. Western blot de sobrenadantes de *S. lividans* y *S. coelicolor* con anticuerpo anti-PstS-1 y con concanavalina A.

Lo anterior nos aseguró que no podría haber falsos positivos en las muestras obtenidas a partir de cultivos de la cepa mutante, por lo que se prosiguió con los ensayos de expresión con los diferentes vectores.

7.2.2) Expresión de PstS-1 y de la proteína quimérica PS-LipA/PstS-1 en *S. coelicolor* IB69 a partir de los plásmidos pBM2.1 y pBM2.2

Las muestras de los cultivos de *S. coelicolor* con los plásmidos integrativos, pBM2.1 y pBM2.2, se separaron en un gel SDS-PAGE para ser analizadas mediante tinción con azul de Coomasie. Las dos fracciones del cultivo (Pellet y

sobrenadante) fueron corridas a la par con los controles de las mismas fracciones, pero de un cultivo de *S. coelicolor* IB69 con el vector pIJ6902 vacío, de tal forma que se descartaran diferencias generadas por el vector mismo.

En ninguna de las fracciones de los dos cultivos de *S. coelicolor* IB69 se observaron bandas que pudieran estar relacionadas con la producción de las proteínas PstS-1 y PS-LipA/PstS-1 (**Fig. 12**).

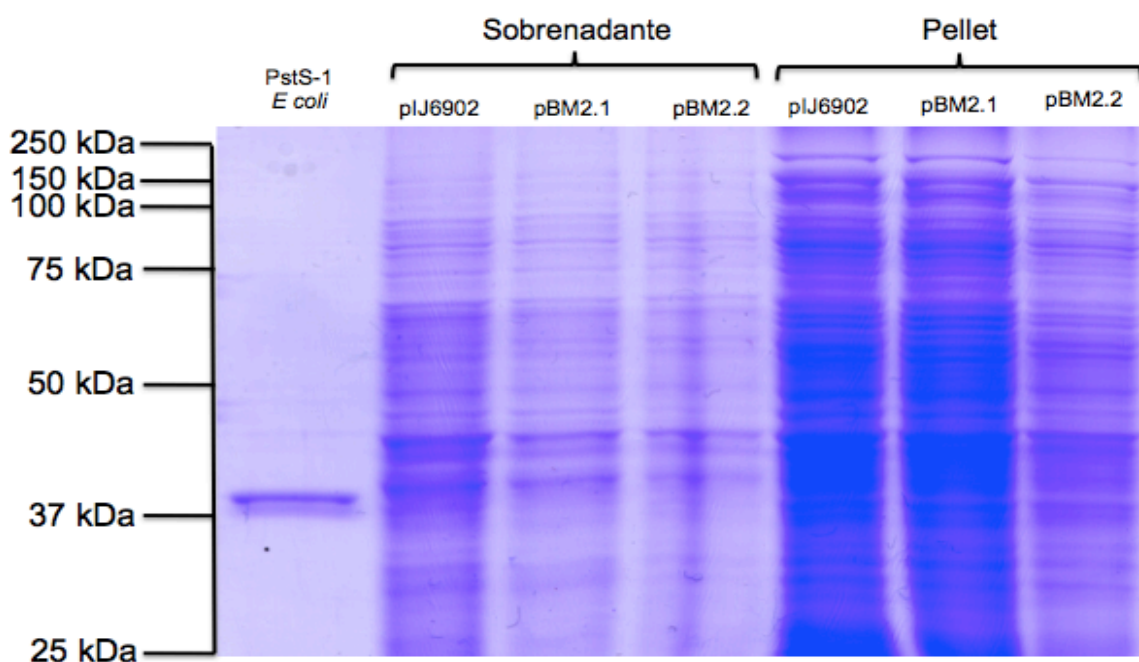


Figura 12. Expresión de PstS-1 y PS-LipA/PstS-1 en *S. coelicolor* IB69. Muestras de precipitación de proteínas del sobrenadante y del micelio de la cepa IB69 con el vector monocopia y los plásmidos pBM2.1 y pBM2.2. Se corrieron en un gel SDS-PAGE, que posteriormente se tiñó con azul de Coomasie.

El vector pIJ6902 está diseñado para expresar eficazmente cualquiera que sea su producto clonado, gracias a que cuenta con un promotor inducible considerado como fuerte y que numerosas veces se ha probado su funcionalidad (*tipA*) (Medema et al., 2011). Con la finalidad de aumentar la estabilidad del plásmido y asegurar tanto una correcta expresión como las modificaciones post-traduccionales de la proteína, ya que este vector se integra al cromosoma de *S. coelicolor*, se decidió clonar ambos fragmentos en el vector monocopia. La ausencia de bandas que pudieran ser las proteínas de interés probablemente se deba a que la producción de ambas no sea la suficiente como para apreciarse, lo cual concuerda con el hecho de que se trata de un vector con una sola copia y su capacidad de expresión se considera

baja en comparación con vectores con un mayor número de copias, como el pIJ6021.

7.2.3) Expresión de PstS-1 de *M. tuberculosis* en *S. coelicolor* IB69 a partir del plásmido pBM3.1

Para analizar las muestras obtenidas a partir de los cultivos de *S. coelicolor* IB69 con pBM3.1, éstas se corrieron en geles SDS-PAGE. Las tres fracciones (citoplasma, membrana y sobrenadante), al igual que en el ensayo anterior, fueron corridas a la par con los controles de las mismas fracciones de un cultivo de *S. coelicolor* IB69 con el vector pIJ6021 vacío.

En las fracciones citoplásmica y membranal no se ven diferencias importantes en los patrones de expresión de proteínas, es decir, no se ve una diferencia en el bandeo entre los carriles en los que se cargaron muestras de *S. coelicolor* IB69 con pBM3.1 y los carriles con las muestras control. A pesar de lo anterior, en el carril del sobrenadante hay una banda tenue con un peso de aproximadamente 35 kDa que no este presente en la muestra control (**Fig. 13A**). El tamaño de la posible proteína no concordaba con lo reportado anteriormente, ya que se había observado que la PstS-1 recuperada de filtrados de cultivos de *M. tuberculosis* y de *M. smegmatis* presentaban pesos de 38-40 kDa (Torres et. al., 2001; González-Zamorano et. al., 2009). Lo anterior llevó a comprobar la naturaleza de esta banda mediante un Western blot con el anticuerpo dirigido contra la proteína sobre expresada en *E. coli*.

Para hacer el Western blot con anticuerpo se corrieron las muestras de las tres fracciones de la cepa *S. coelicolor* IB69 con los dos plásmidos, pIJ6021 y pBM3.1, en el mismo orden que en el gel teñido con Azul de Coomasie. Se observó que en dos carriles (sobrenadante y membrana) había reconocimiento por parte del anticuerpo, pero que estas bandas eran de igual o menor tamaño que la proteína control PstS-1 producida en *E. coli* (**Fig. 13B**). Lo anterior, sumado al hecho de que se presentaba un triple bandeo en el sobrenadante del cultivo, llevo a conjeturar que se debía a la actividad de alguna proteasa presente en los cultivos de *S. coelicolor* lo que estaba haciendo que la proteína fuera de un menor tamaño al esperado. De igual forma, también podía deberse

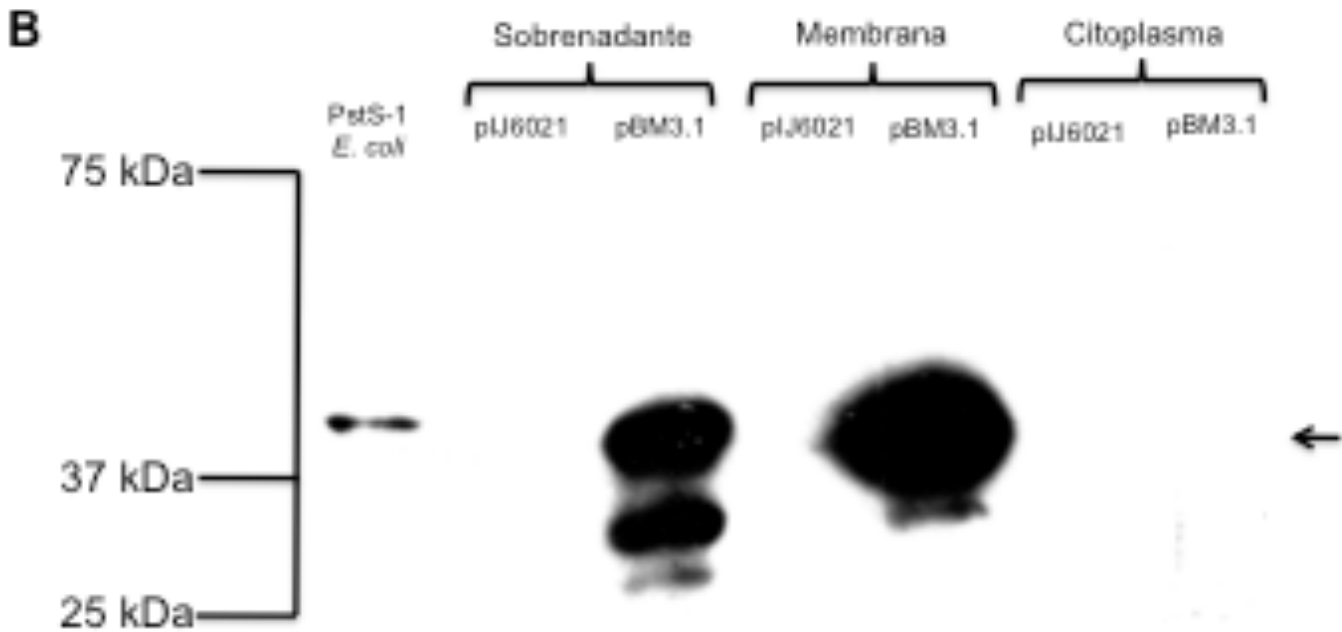
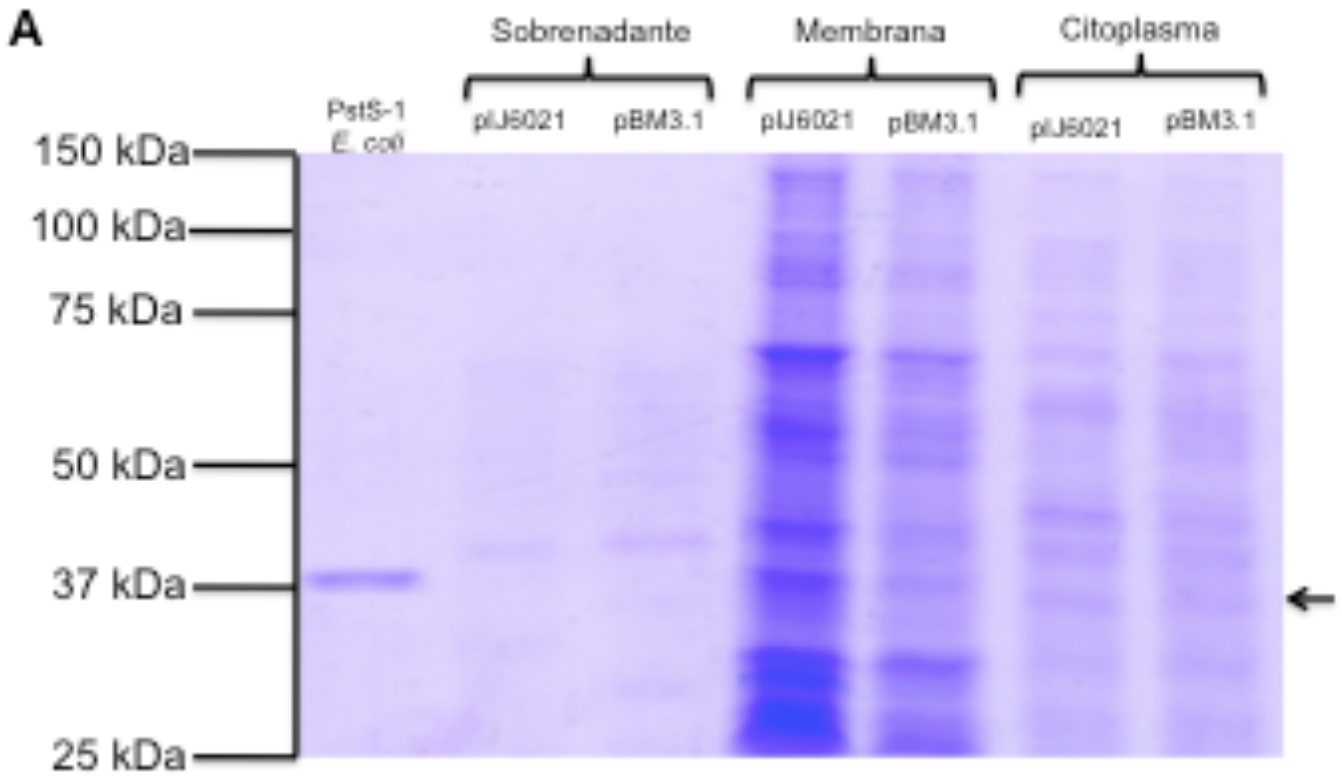


Figura 13. Expresión de PstS-1 en *S. coelicolor* IB69. **(A)** Muestras de precipitación de proteínas de las tres fracciones de la cepa IB69 con el vector y con pBM3.1, corridas en un gel SDS-PAGE posteriormente teñido con azul de Coomassie. **(B)** Membrana de PVDF revelada por quimioluminiscencia con las muestras de proteína precipitada de las tres fracciones de la cepa IB69 con el vector vacío y con pBM3.1 transferidas de un gel SDS-PAGE, incubada con el anticuerpo anti-PstS-1 producido en *E. coli*.

a que la proteína no estaba siendo manosilada, y que su peso era solamente el resultado de que no había tenido modificaciones post-traduccionales.

Finalmente, la ausencia de la proteína en el citoplasma aseguraba que el péptido señal endógeno de PstS-1 era reconocido por *S. coelicolor*, y que era suficiente para que la proteína fuera translocada a la membrana y que posteriormente esta se liberara al sobrenadante.

Debido a que había proteínas que fueron reconocidas por el anticuerpo, lo cual aseguraba que eran el producto de la sobreexpresión de la proteína PstS-1 de *M. tuberculosis*, se reforzó el objetivo de revisar si éstas eran blanco de la maquinaria de O-manosilación en *S. coelicolor* IB69, lo cual se llevaría a cabo estableciendo su reactividad a la concanavalina-A.

7.2.4) Expresión de la proteína quimérica, PS-LipA/Rv0934, en *S. coelicolor* IB69

Las muestras para este ensayo se corrieron en el mismo orden que en el anterior, es decir, para cada fracción de muestra recuperada del cultivo de *S. coelicolor* IB69 con pBM3.2 se corrió la misma fracción pero de la cepa con el vector, pIJ6021. Al igual que en el ensayo anterior, no se observaron diferencias importantes de expresión entre el control y pBM3.2 en las fracciones membranal y citoplásmica. A pesar de esto, se logró ver una banda en la muestra recuperada del sobrenadante del cultivo del gel teñido con azul de Coomassie ausente en el control, con un peso de alrededor de 30 kDa, (**Fig. 14A**). El peso observado resulta menor a lo esperado, ya que se diseñó a la proteína de tal forma que el péptido señal de lipasa dejara una proteína madura de un peso cercano al de la proteína con su péptido señal nativo. Esta proteína no se esperaba en la fracción membranal ni en la fracción citoplásmica ya que no cuenta con la cisteína de anclaje y tiene un péptido señal de secreción de un estreptomiceto, haciéndolo reconocible por la maquinaria de secreción de *S. coelicolor* IB69.

Para poder corroborar que la banda observada en la fracción del sobrenadante era la PstS-1 madura, que gracias a que se le añadió el péptido señal de lipasa estreptomiceto podía ser translocada por la vía Sec, se llevó a cabo un Western blot utilizando el anticuerpo anti-PstS-1 sobre muestras que se corrieron en el mismo orden que en el gel teñido con azul de Coomassie. Se

observó solamente una banda en el sobrenadante del cultivo a la misma altura que la ya observada, es decir, a un tamaño considerablemente menor que la proteína control producida en *E. coli*, y no se registró proteína alguna en las fracciones membranal y citoplásmica (**Fig. 14B**).

Se corroboró entonces que el péptido señal de la lipasa de *S. exfoliatus* M11 sumado a la remoción de todo el *lipobox*, incluida la cisteína que permite el anclaje a la membrana, fue suficiente para que la proteína no se quedara anclada en la membrana y que fuera secretada. Una de las posibles explicaciones del menor tamaño de la proteína secretada es que sea blanco de alguna proteasa, lo cual es muy probable debido al alto contenido de proteasas en *S. coelicolor*, o incluso que no cuenta con estructuras O-manosiladas, por lo que se prosiguió a establecer si ésta era reconocida por la concanavalina-A.

7.3)Glicosilación de PstS-1 en *S. coelicolor* IB69

7.3.1) Glicosilación de la PstS-1 presente en el sobrenadante del cultivo y en la fracción membranal

Cada una de las fracciones de *S. coelicolor* IB69 se corrieron en geles SDS-PAGE, cada uno con juegos de muestras duplicadas. Esto permitiría que las diferencias inherentes entre geles se eliminaran, permitiendo establecer con más precisión si una banda presente en los dos Western blot, tanto con anticuerpo como por concanavalina-A, era la misma proteína debido a su peso.

En el Western blot con concanavalina-A, además de contar con los marcadores de peso molecular de Bio-Rad® arriba descritos como control de la reactividad de la lectina, se usó como control de peso una fracción de un filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv, la cual está enriquecida con la proteína PstS-1 que migra a aproximadamente 38 kDa y que fue donada por la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón (Depto. de Inmunología, Instituto de Inv. Biomédicas).

Del juego de proteínas que fueron sometidas a Western blot con el anticuerpo, se obtuvieron los mismos resultados arriba descritos: un doble bandeo en la fracción del sobrenadante del cultivo (**Fig. 15A**) y una sola banda en la fracción membranal (**Fig. 15B**). Comparado con lo obtenido en el Western Blot revelado con anticuerpo y lo obtenido con la concanavalina-A, se puede

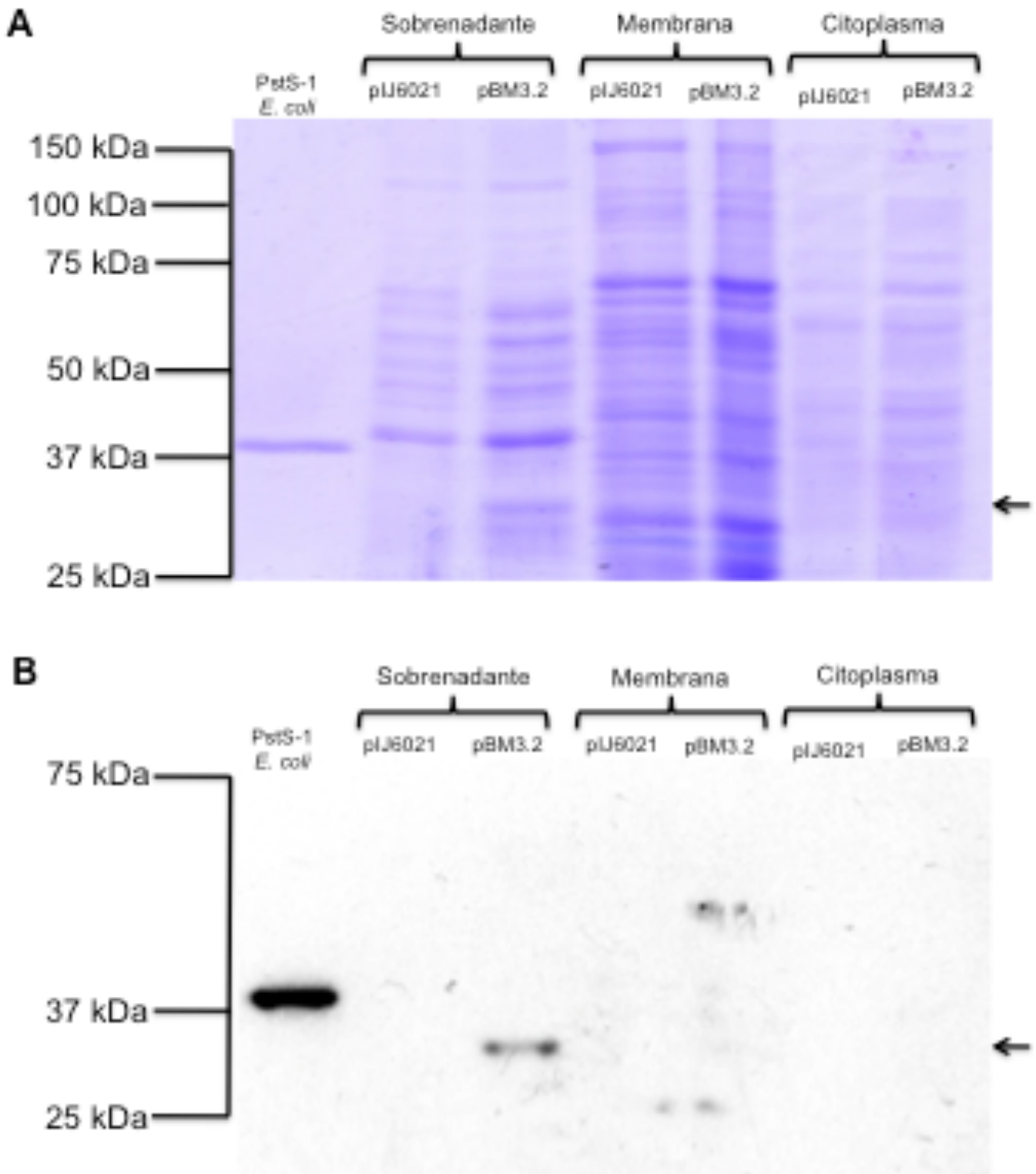


Figura 14. Expresión de la proteína fusión PS-LipA/PstS-1 en *S. coelicolor* IB69 (**A**) Gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomasie, en el que se corrieron las muestras de proteínas precipitada de las tres fracciones de la cepa IB69 con el vector vacío y con pBM3.2. (**B**) Membrana de PVDF revelada por quimioluminiscencia con las muestras de proteína precipitada de las tres fracciones de la cepa IB69 con el vector vacío y con pBM3.2 transferidas de un gel SDS-PAGE, incubada con el anticuerpo anti-PstS-1 producido en *E. coli*.

ver que en el sobrenadante recuperado hay una banda que muy probablemente corresponda a la banda de mayor peso observada con el anticuerpo, ya que ambas tienen un peso aproximado de 35-36 kDa y no se encuentran en sus respectivos controles del vector pIJ6021 vacío. De la banda de menor tamaño observada en el anticuerpo, de alrededor de 30 kDa, no se ve una banda que le corresponda a la muestra en el Western Blot con concanavalina-A, que no se encuentre en el control de la fracción.

La diferencia de pesos entre las dos bandas presentes en el sobrenadante, aunado a la falta de reactividad con la concanavalina-A de la más pequeña, puede deberse a varias razones. Una de las posibles explicaciones es que la de mayor tamaño pudiera haber sido blanco de proteasas presentes en el sobrenadante del cultivo, las cuales hayan quitado el sitio en donde se encontraban los aminoácidos con los glicanos, lo cual daría lugar a la banda de menor tamaño. Otra posibilidad es que esta proteína no tenga modificación post-traducciona alguna y que esta sea la razón del tamaño que presenta (**Fig. 15A**).

Por otra parte, se ve claramente que la banda reconocida por el anticuerpo en la fracción membranal es reconocida también por la concanavalina-A, lo que establece que se encuentra manosiada (**Fig. 15B**). Esto era de esperarse, ya que el programa LipoP indica que la PstS-1 de *M. tuberculosis* cuenta con un péptido señal que contiene un *lipobox* con una cisteína que sirve de anclaje a la membrana, además de tener sitios de posible O-manosilación (Espitia et al., 2010).

La proteína de mayor tamaño en la fracción del sobrenadante de *S. coelicolor* es de aproximadamente el mismo tamaño a la que se presenta en la fracción membranal y ambas se encuentran manosiladas. Esto apunta a que la primera pudiera ser producto de la liberación de la proteína PstS-1 que se encuentra anclada a la membrana, la cual se lleva a cabo de tal forma que no afecta a la cadena polipeptídica, en particular a los residuos de aminoácidos que se encuentran manosilados, ya que la proteína secretada mantiene la O-manosilación y su tamaño. Esto no resulta raro, ya que generalmente se obtiene a la PstS-1 de filtrados de cultivos de *M. tuberculosis* con el mismo tamaño al que teóricamente se encuentra en membrana (González-Zamorano et al., 2009).

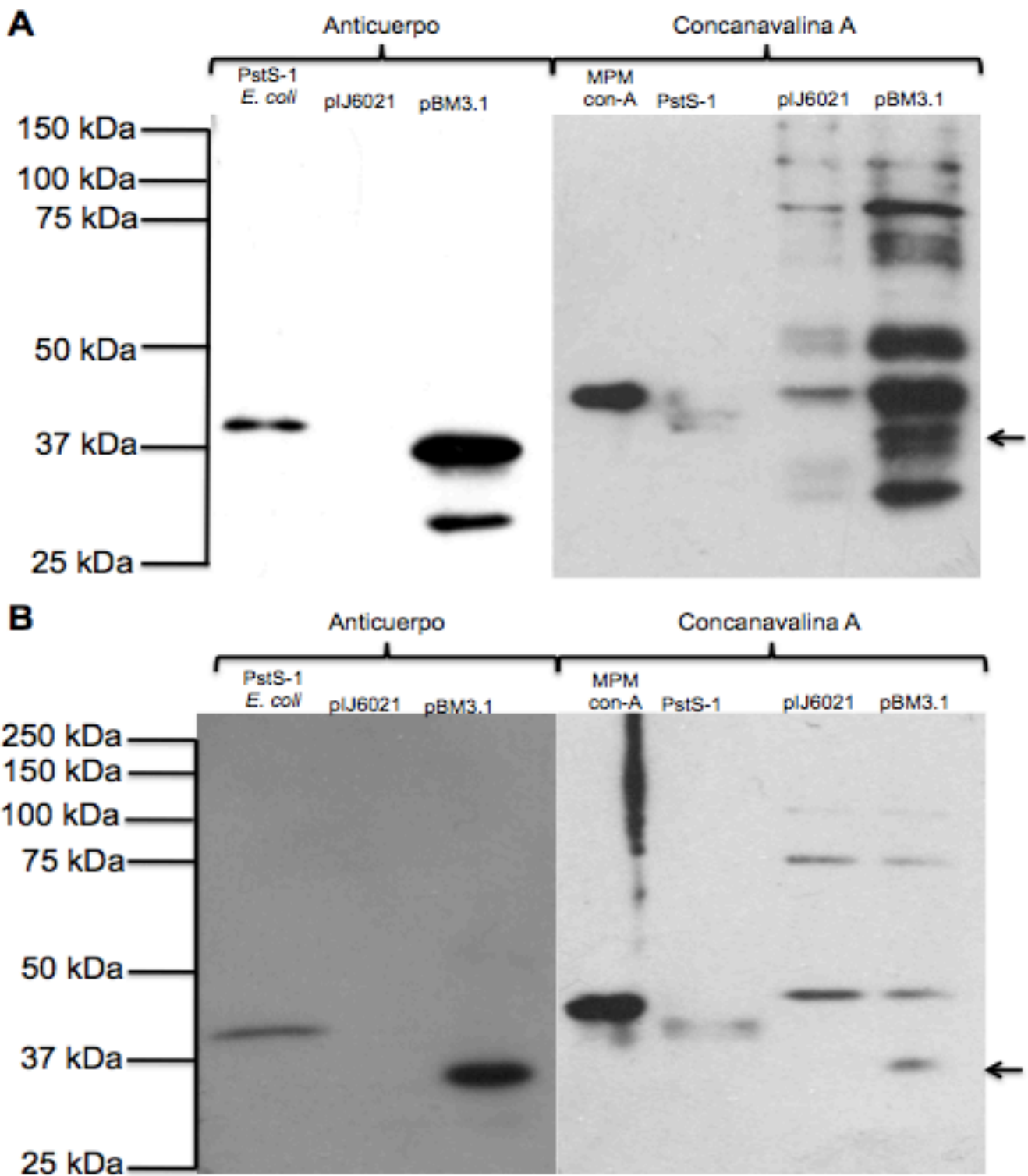


Figura 15. Glicosilación de la PstS-1 observada en las fracciones extracelular y membranal. Membranas de PVDF con las muestras de proteína precipitadas duplicadas de las fracciones del sobrenadante del cultivo (**A**) y membranal (**B**) de la cepa IB69 con el vector y con pBM3.1 transferidas de un gel SDS-PAGE. Las membranas que contienen los juegos de muestras par revisar la presencia de la proteína fueron incubadas con el anticuerpo anti-PstS-1 producido en *E. coli*, mientras que los juegos de muestras para comprobar el estado de glicosilación fueron incubadas con la lectina concanavalina A. Todo fue revelado todo por quimioluminiscencia.

La doble localización que presenta la PstS-1 con el péptido señal propio podría deberse a que ambas están sujetas a diferentes tipos de secreción ajenos entre sí, por ejemplo Tat y Sec, lo cual permitiría que la proteína fuera tanto anclada a la membrana como secretada, sin la necesidad de ser producto de la proteólisis de la PstS-1 que se encuentra en la membrana. Aunque se ha descrito que las pre-lipoproteínas pueden ser translocadas por la vía Tat (MacDonough et al., 2005) y la O-manosilación hasta ahora sólo se había descrito como dependiente de la vía Sec (Lara et al., 2004; VanderVen et al., 2005), esto podría estar sugiriendo un sistema de O-manosilación que también puede modificar a proteínas que se translocan por la vía Tat.

7.3.2) Glicosilación de la proteína quimérica PS-LipA/PstS-1

Para este estudio se analizó solamente el sobrenadante del cultivo de *S. coelicolor* IB69 con el plásmido pBM3.2, usando los mismos controles, las mismas condiciones y el mismo orden de las muestras que en la sección anterior. Se puede ver que la banda reconocida por el anticuerpo no se encuentra en el Western Blot con concanavalina-A. Esto muy probablemente se deba a que no tiene manosilación alguna (**Fig. 16**).

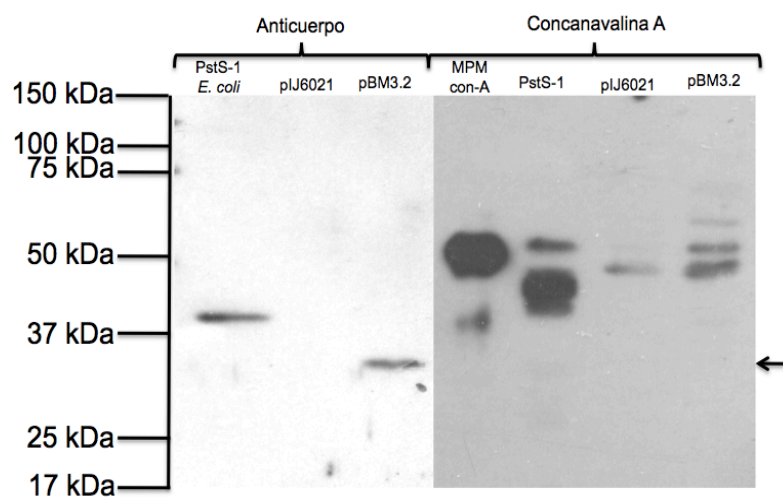


Figura 16. Glicosilación de la proteína quimérica PS-LipA/PstS-1 observada en el sobrenadante del cultivo. Membranas de PVDF con las muestras de proteína precipitadas duplicadas del sobrenadante del cultivo de la cepa IB69 con el vector vacío y con pBM3.1 transferidas de un gel SDS-PAGE. La membrana que contiene los juegos de muestras para revisar la presencia de la proteína fue incubada con el anticuerpo anti-PstS-1 producido en *E. coli*, mientras que la membrana con el juego de muestras para comprobar el estado de glicosilación fue incubada con la lectina concanavalina. Ambas fueron reveladas por quimioluminiscencia.

Aunque ya se ha probado la funcionalidad del péptido señal de la lipasa A en *S. lividans* (Perez et al., 1993; Valdez et al., 1999), también es funcional en *S. coelicolor* seguramente debido a la cercanía filogenética de ambas especies. De igual forma, muy probablemente la falta de los elementos del péptido señal endógeno de la PstS-1, que fueron removidos al añadirle el péptido señal de LipA, en específico el motivo *lipobox*, no permite que esta proteína sea O-manosilada. Aun así, la proteína es muy pequeña para ser la proteína madura completa, en comparación con la proteína de *E. coli* que tiene aproximadamente el mismo peso, por lo que esto refuerza la idea de que sea blanco de alguna proteasa.

7.4) Análisis bioinformático de los péptidos señales

Debido a que el tamaño de las proteínas que fueron reconocidas por el anticuerpo policlonal anti-38 kDa en la fracción membranal y en el sobrenadante contaban con pesos menores a lo reportado anteriormente y que ambas estaban manosiadas, se prosiguió a analizar bioinformáticamente a las proteínas, en particular sus péptidos señales. Esto se llevó cabo gracias a los programas de predicción de péptidos señales reconocibles por las vías de secreción Sec y Tat, contenidos en los sistemas de predicción del “*Centre of Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark*” (<http://www.cbs.dtu.dk/>).

Cuando se sometió tanto a PstS-1 como a PS-LipA/ PstS-1 al análisis de ambos programas, se obtuvo que los dos péptidos señales eran reconocidos por la vía Sec, ya que contaban con el motivo A-X-A antes del sitio de corte (**Fig. 16**). Curiosamente, solo la proteína quimérica daba un reconocimiento positivo cuando se analizaron las secuencias en el programa de predicción para la vía Tat. El péptido señal de la lipasa, a pesar de que cuenta con un par de argininas en tándem en los residuos de aminoácidos 9 y 10, el reconocimiento del péptido señal y su posterior corte no se da hasta los residuos 45-46 (**Fig. 17**).

Con estos resultados se estableció que tal vez lo más importante para el reconocimiento de la proteína por la maquinaria de O-manosilación es un elemento presente en los péptidos señales, en este caso la secuencia *Lipobox*, o que incluso ambas maquinarias, la de O-manosilación y de lipidilación, se

encuentren estrechamente relacionadas. Aunque se tiene registro de proteínas manosiladas que no son lipoproteínas, siendo el caso más estudiado el antígeno Apa que es fácilmente secretado (VanderVen et al., 2005), pareciera ser que esto último es una excepción más que una regla, ya que la mayoría de las glicoproteínas reportadas son también lipoproteínas (González-Zamorano et al., 2009; Espitia et al., 2010).

Esto concuerda con resultados previamente obtenidos en el laboratorio, en los cuales se expresaron a los antígenos de *M. tuberculosis*, MPT83 y Plc, en *S. lividans*. Cuando se reemplazaron los péptidos señales nativos de ambos por el de LipA, no hubo manosilación de las proteínas y presentaban un menor tamaño que lo esperado. Por otro lado, cuando mantenían su péptido señal nativo, la proteínas eran manosiladas y se encontraban tanto en la membrana de *S. lividans*, como en el sobrenadante de los cultivos (Arista-Carrera, 2012; Torres-Rodríguez, 2012).

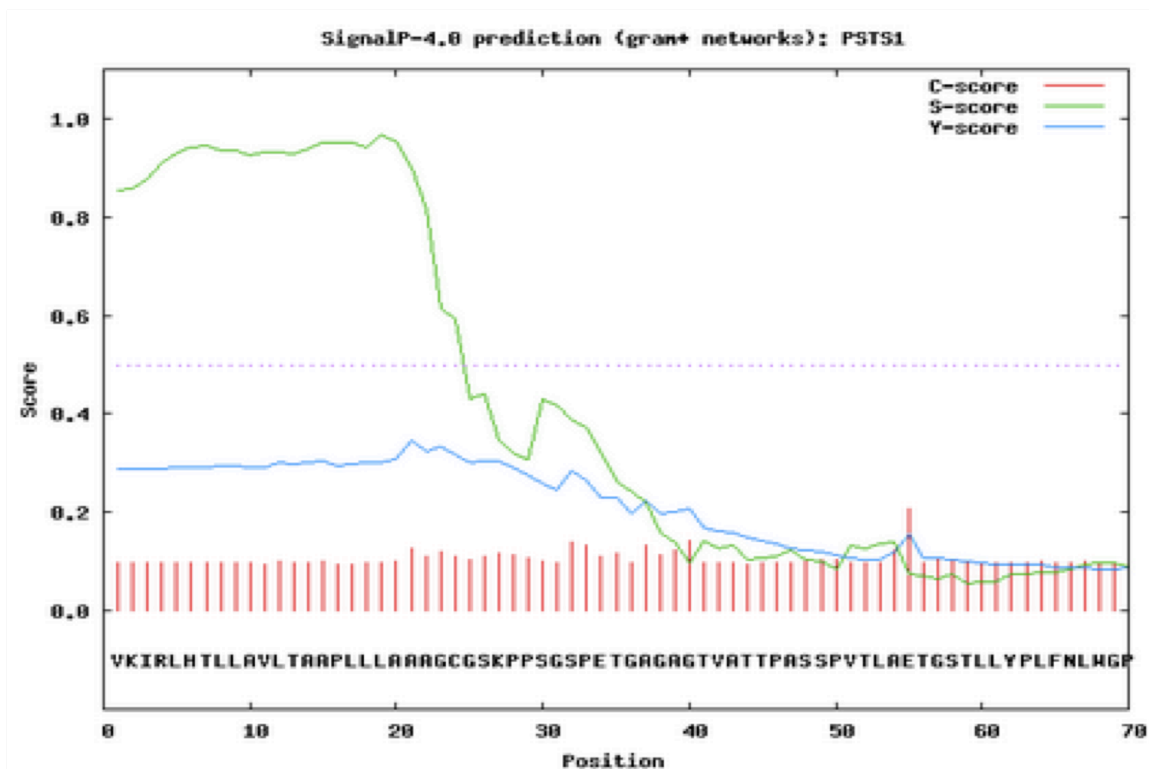
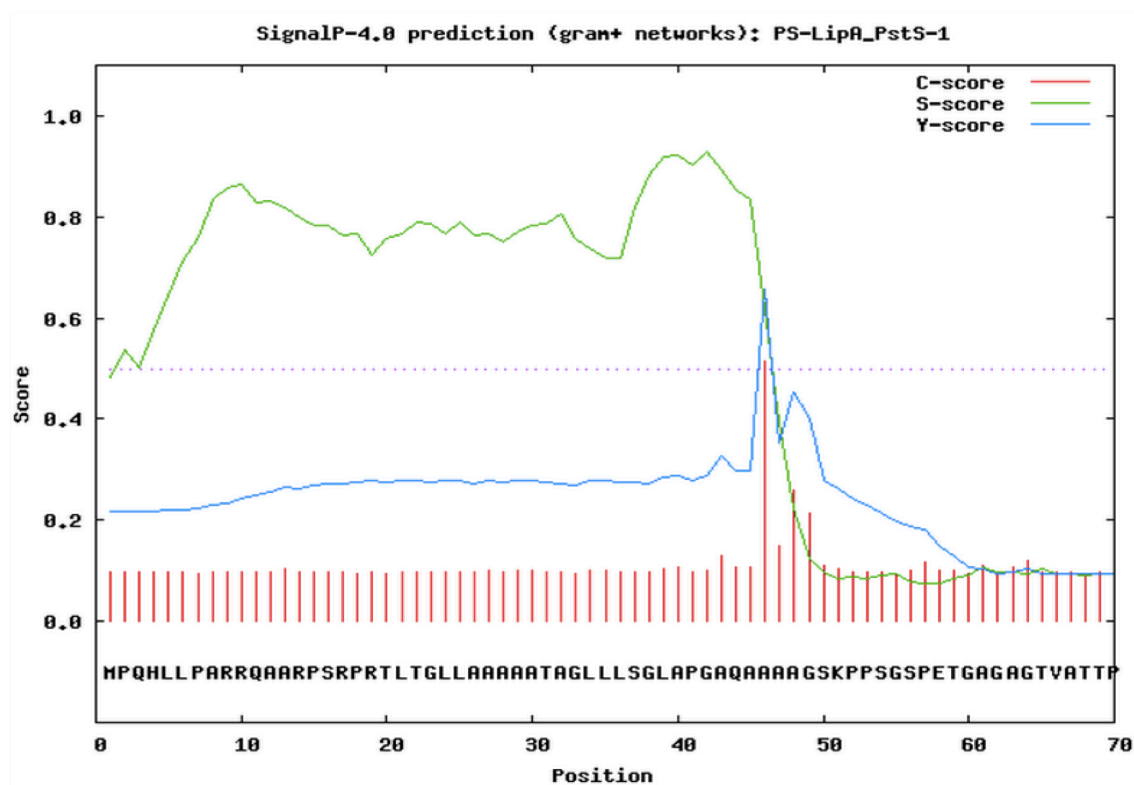
A**B**

Figura 17. Análisis de las secuencias de los péptidos señales con el programa SignalP. Para la proteína PstS-1 se encontró un sitio de corte entre los residuos 20 y 21 (LLA-AA) (**A**), mientras que para la proteína quimérica PS-LipA/PstS-1 se describió uno entre los residuos 45 y 46 (AQA-AA) (**B**). El valor S indica si un aminoácido pertenece a un péptido señal reconocible por la vía Sec. Por otra parte, los valores C y Y indican la posición de un sitio de corte.

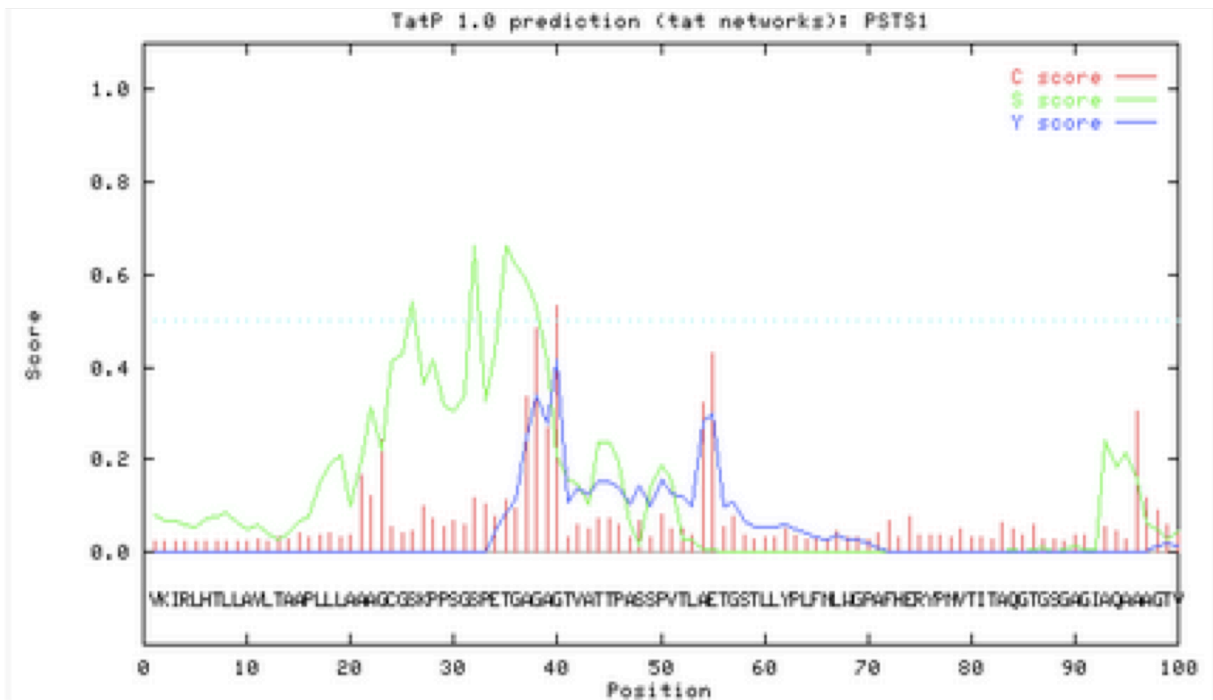
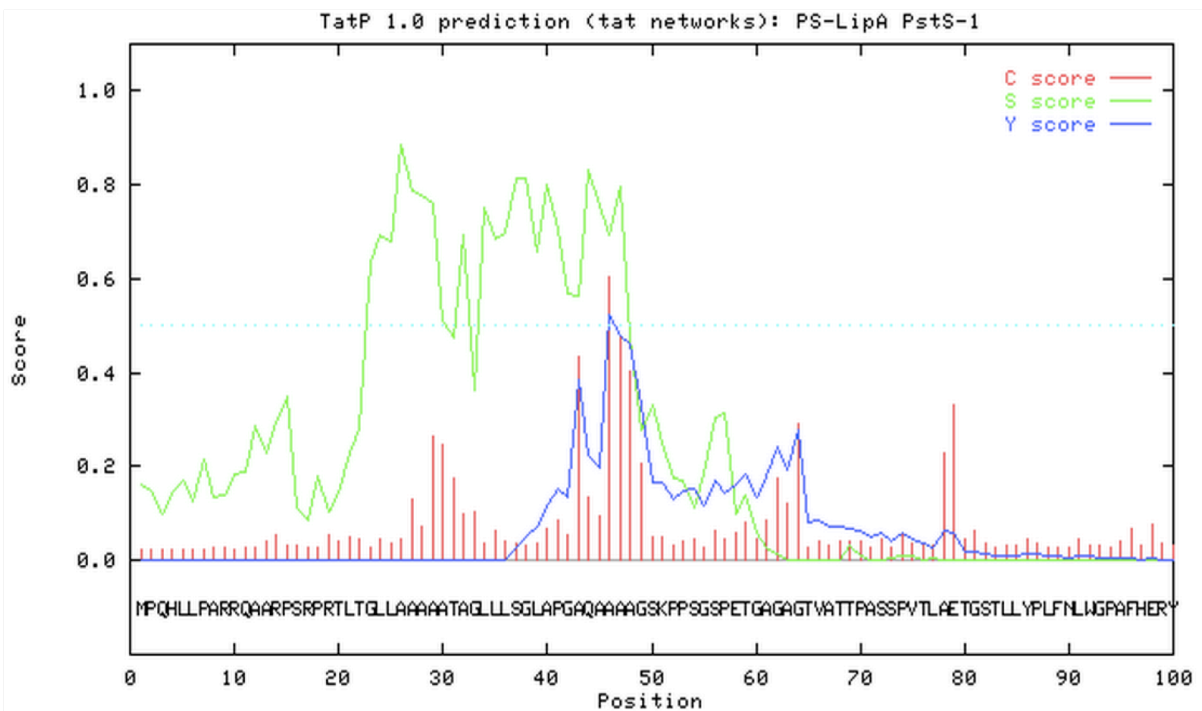
A**B**

Figura 18. Análisis de las secuencias de los péptidos señales con el programa TatP. El péptido señal de la proteína PstS-1 no fue reconocido como dependiente de la vía Tat (**A**). El péptido señal de la proteína quimérica PS-LipA/PstS-1 tiene un par de argininas en tándem en los aminoácidos 9 y 10. Sin embargo, se reconoció como sitio de corte los residuos 45-46 (AQA-AA) (**B**). El valor S indica si un aminoácido pertenece a un péptido señal reconocible por Tat. Por otra parte, los valores C y indican la posición de un sitio de corte.

8) Conclusiones

La proteína PstS-1 de *M. tuberculosis* se sobreexpresó en la cepa mutante *S. coelicolor* IB69. Cuando se expresó con su péptido señal nativo, esta proteína se localizaba tanto en la membrana como en el sobrenadante de los cultivos, en ambos casos modificada postraduccionalmente por O-manosilación, lo que sugiere que el péptido señal es reconocido por las vías de secreción presentes en *S. coelicolor* y por su maquinaria de O-manosilación.

En contraste con lo anterior, cuando se expresó la proteína quimérica PS-LipA/PstS-1 en *S. coelicolor* IB69, ésta se localizaba solamente en el sobrenadante del cultivo y presentaba un menor tamaño al esperado, posiblemente debido al procesamiento proteolítico por proteasas presentes en esta fracción del cultivo. De igual forma, la proteína madura no fue reconocida por la concanavalina-A, lo cual se debe probablemente a que no estaba modificada postraduccionalmente por una manosa, tal vez porque no contaba con el motivo *lipobox*, lo que sugiere que el anclaje a la membrana es necesario para la glicosilación.

Gracias al análisis de los péptidos señales, se estableció que la O-manosilación probablemente no dependa solamente de la translocación por la vía Sec, sino también por la presencia del motivo *lipobox* y del anclaje de las proteínas a la membrana celular, en lo que a producción de proteínas de *M. tuberculosis* en *S. coelicolor* se refiere.

9) Perspectivas

Con el fin de comprobar que las proteínas PstS-1 observadas tanto en membrana como en el sobrenadante de los cultivos de *S. coelicolor* mantienen las características bioquímicas presentes en la de *M. tuberculosis*, en primera instancia se hará un gel de doble dimensión con ambas proteínas. Posteriormente, para lograr una caracterización estructural más detallada de éstas, en específico sobre la conformación de los glicanos y su localización en la proteína, se llevará a cabo una espectrometría de masas con ambas proteínas purificadas. Esto último nos ayudaría también a determinar el sitio que es blanco de las proteasas .

Finalmente, mediante el uso de suero de pacientes que hayan sido infectados por *M. tuberculosis*, se determinará si los anticuerpos contenidos en éstos son capaces de reconocer a la proteína PstS-1 expresada por *S. coelicolor*, tanto la presente en la fracción membranal como la que se encuentra en los sobrenadantes del cultivo. De ser reactivas, esto representaría un avance en la generación de productos biotecnológicos, ya sea para la producción de vacunas como para la determinación de biomarcadores, para la tuberculosis.

Anexo #1: Medios

LB (Luria-Bertani) (Sambrook & Russell, 2001)

Por litro:

a 950 mL de agua destilada agregar:

- Triptona 10g
- Extracto de levadura 5g
- NaCl 10g

Mezclar hasta que los solutos se hayan disuelto. Ajustar el pH a 7 con una solución 1 N NaOH y ajustar el volumen de la solución a 1 L con agua destilada. Dividir en 10 botellas el contenido y agregar 1.5g de agar por botella. Esterilizar las 10 botellas mediante autoclave a 20 minutos con una presión de 15 psi en ciclo líquido.

SOB (Sambrook & Russell, 2001)

Para 10 alícuotas de 100mL :

a 800 mL de agua destilada agregar:

- Triptona 20g
- Extracto de levadura 5g
- NaCl 0.5g

Mezclar hasta que los solutos se hayan disuelto. Agregar 10 mL de una solución de KCl 250 mM (esta solución se hace disolviendo 1.86g de KCl en 10 mL de agua destilada). Ajustar el pH a 7 con una solución 1 N NaOH y ajustar el volumen a 1 L con agua destilada. Esterilizar mediante autoclave a 20 minutos con una presión de 15 psi en ciclo líquido

YT 2X (Sambrook & Russell, 2001)

Para 10 alícuotas de 100 mL:

a 800 mL de agua destilada agregar:

- Triptona 16g
- Extracto de levadura 10g
- NaCl 0.5g

Mezclar hasta que los solutos se hayan disuelto. Ajustar el pH a 7.2 con una solución 1 N NaOH y ajustar el volumen a 1 L con agua destilada. Esterilizar mediante autoclave a 20 minutos con una presión de 15 psi en ciclo líquido

R2YE (Kieser et al, 2000)

Para 10 alícuotas de 80 mL:

a 700 mL de agua destilada agregar:

- Sucrosa 103g
- K_2SO_4 0.25g
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 10.12g
- Glucosa 10g
- Casaminoácidos Difco 0.1g

Mezclar hasta que los solutos se hayan disuelto. Ajustar el volumen a 800 mL con agua destilada y dividir en 10 alícuotas de 80 mL en frascos con 2.2 g de Agar. Esterilizar mediante autoclave a 20 minutos con una presión de 15 psi en ciclo líquido. Una vez que se vaya a usar, se funde y se suplementa de la siguiente manera:

- KH_2PO_4 (0.5%) 1 mL
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (3.68%) 8 mL
- L-prolina (20%) 10 mL
- Tris Cl 3.7% pH = 7.2 10 mL
- Solución de elementos traza* 0.2 mL
- NaOH 1N 0.5 mL

*La solución de elementos traza se prepara añadiendo lo siguiente en 1L:

- $ZnCl_2$ 40 mg
- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 200 mg
- $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 10 mg
- $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 10 mg
- $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 10 mg
- $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 10 mg

MS (Kieser et al, 2000)

Para 10 alícuotas de 100 mL:

a 700 mL de agua destilada agregar:

- Agar 20 g
- Manitol 20 g
- Harina de Soya 20 g

Mezclar hasta que los solutos se hayan disuelto. Ajustar el volumen a 1 L con agua destilada y dividir en 10 alícuotas de 100 mL en. Esterilizar mediante autoclave a 20 minutos con una presión de 15 psi en ciclo líquido.

YEME (Kieser et al, 2000)

Para 10 alícuotas de 100 mL :

a 700 mL de agua destilada agregar:

- Extracto de levadura 3g
- Peptona 5g
- Extracto de malta 3g
- Glucosa 10g
- Sucrosa 340g

Mezclar hasta que los soluto se hayan disuelto. Se ajusta el volumen a 1 L con agua destilada y se divide en 10 alícuotas y se esterilizar mediante autoclave a 20 minutos con una presión de 15 psi en ciclo líquido.

DNA (según especificaciones del producto)

Para 10 alícuotas, agregar 9.2 g de Difco Nutriente Agar a 500 mL de agua destilada y mezclar hasta que se haya disuelto. Una vez disuelto se agrega 200 mL de agua destilada y se divide en 10 alícuotas. Esterilizar mediante autoclave 20 minutos con una presión de 15 psi en ciclo líquido.

Agar suave (Veltz et al, 1981)

Para 1 alícuota de 100 mL :

a 50 mL de agua destilada agregar:

- | | |
|------------------------|---------|
| • Sacarosa | 10.3 g |
| • $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 1.012 g |
| • Tris HCl 3% pH7.2 | 10 mL |
| • $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.4 mL |
| • Agar | 0.65 |

Mezclar hasta que los solutos se hayan disueltos. Se ajusta el volumen a 100 mL con agua destilada y se esteriliza mediante autoclave a 20 minutos con una presión de 15 psi en ciclo líquido.

Anexo #2: Protocolos

Protocolo #1: PCR (Polymerase Chain Reaction) (según especificaciones del producto)

- 1) En este trabajo se utilizarán las siguientes cantidades de reactivos para una reacción de PCR:

• Buffer Pfu ultra 10X (Agilent Technologies)	5 μ L
• DMSO	5 μ L
• Mezcla de oligonucleótidos (10 mM c/u)	1 μ L
• Mezcla dNTP's 10X	1 μ L
• DNA templado	<i>según la concentración de la alícuota, para 5-20 ng por reacción</i>
• H ₂ O estéril	Cuanto baste para 50 μ L
<hr/>	
Volumen final	50 μ L

- 2) Al volumen final se le agrega 0.5 μ L de Pfu Ultra de Agilent Technologies®.
- 3) Posteriormente se realiza la PCR, utilizando el siguiente programa, a menos que se indique lo contrario:

1) 4 minutos	95°C
2) 30 ciclos	
a) 1 minuto	95°C
b) 1 minuto	<i>Depende de la temperatura de alineamiento de cada uno de los oligonucleótidos</i>
c) <i>Depende del tamaño del producto a amplificar (1 minuto por kb)</i>	72°C
3) 5 minutos	72°C

Protocolo #2: Reacción de Ligación (según especificaciones del producto)

• según concentración de la alícuota	Vector
• según concentración de la alícuota	Inserto
• 2 µL	Buffer Ligasa T4 5X (Invitrogen)
• 1 µL	Ligasa T4 HC (Invitrogen)
• Cuanto baste para volumen final	H ₂ O estéril
• 10 µL	Volumen final

*Para transformar *Streptomyces* con producto de ligación, simplemente se agrega el producto de la ligación como establece el protocolo de **Transformación por protoplastos de *S. lividans* y *S. coelicolor***

*Para transformar a *E. coli* con producto de ligación:

- a. Se deja toda la noche a temperatura ambiente y al día siguiente se precipita agregando 0.5 µL de glucógeno, 1/10 volumen de acetato Na 3M y 1 volumen de isopropanol (en ese orden y mezclando bien).
- b. Se centrifuga 5 minutos a 6,000 rpm en microcentrífuga y se descarta el sobrenadante
- c. Se deja secando 5 minutos en la parrilla a 55°C con la tapa abierta
- d. Se resuspende en 6 µL de H₂O estéril (suficiente para 2 intentos)
- e. Se lleva a cabo la **Transformación de *E. coli* por electroporación.**

Protocolo # 3: Células de *E. coli* electrocompetentes (Sambrook & Russell, 2001)

Toda manipulación se hace con material estéril.

- 1) Para hacer células de *E. coli* que sean transformables por electroporación, se inocula con 20-50 μL , dependiendo de la densidad celular del glicerol, un tubo de ensaye estéril con 3 mL de YT2X (puede llevar antibiótico o no, dependiendo de la cepa) y se deja incubando toda la noche (precultivo).
- 2) Al día siguiente, se toman 0.3 mL o más, si es que no creció bien, y se inocula un matraz Erlenmeyer con 20 mL de SOB para tener el cultivo, el cual puede o no llevar antibiótico, dependiendo de las características de la cepa con la que se trabaja. Se deja crecer hasta alcanzar una $\text{DO}_{600} = 0.6$.
- 3) Una vez que alcanza la DO adecuada, se centrifuga todo el volumen en la centrífuga con el rotor J20 a 7,000 rpm por 10 minutos.
- 4) Se descarta el sobrenadante y se le agrega 10 mL de glicerol 10%. Se mezcla bien con vórtex y se vuelve a centrifugar como se explicó anteriormente, eliminando después el sobrenadante.
- 5) Se repite una vez más el lavado con glicerol, y al quitar el sobrenadante, se resuspende en la gota de glicerol restante. Se pasan 50 μL a un tubo Eppendorf estéril, quedando las células capaces de transformarse mediante electroporación

Protocolo # 4: Transformación de *E. coli* por electroporación (Sambrook & Russell, 2001)

Toda manipulación se realiza con material estéril.

- 1) Antes de utilizar la celda para electroporación Biolabs, esta se deja reposar en hielo cerca de 10 minutos.
- 2) A las células electrocompetentes (50 mL) se les agrega la cantidad que se crea necesaria para tener suficientes células transformantes y se mezcla pegándole al Eppendorf con el dedo.
- 3) Una vez que la celda se encuentra fría, se le agrega a ésta las células electrocompetentes y se le da un pulso con el programa Ec1 previamente establecido en el electroporador de Biolabs.
- 4) Ya que se dio el pulso, a la celda se le agrega 1 mL de YT2X, subiendo y bajando el volumen con una pipeta estéril para asegurarse que todas las células electroporadas se encuentren resuspendidas. Una vez bien resuspendidas, estas se pasan a un tubo de ensaye estéril, el cual se incuba 1 hora, a 37 °C y con una agitación de 200 rpm para que las células se recuperen.
- 5) Una vez acabada la hora, el medio con las células es pasado a un tubo Eppendorf estéril y se centrifuga en una microcentrífuga a 6,000 rpm por 10 minutos. Ya formado el pellet se descarta el sobrenadante decantándolo y se resuspende el pellet en la gota residual de medio.
- 6) Al pellet resuspendido se le agrega generalmente 0.3 mL de YT2X, de tal forma que se puedan plaquear 2 cajas de medio con una dilución de células 10^0 , 2 cajas con una dilución 10^{-1} y una caja con una dilución de 10^{-2} .

*Para hacer las cajas con el medio sólido, una vez que la alícuota de 100 mL está fundida se deja enfriar en baño maría a 50°C por aproximadamente 5 minutos, y después se les agrega el marcador (antibiótico, inductor, ...).

Protocolo #5: Mini-preparaciones de DNA plasmídico de *E. coli* (Kieser et al., 2000; modificado por Servín-González)

- 1) De un cultivo de 3 mL de YT2X incubado toda la noche a 37°C, se centrifuga todo el volumen a 14,000 rpm por 10 minutos en microcentrífuga. Se tira el sobrenadante y se resuspende en la gota residual del medio, mezclando en vórtex.
- 2) Al pellet resuspendido se le agregan 200 µL de TE 20 mM pH = 8 y se deja reposar 13 minutos en hielo. Para *Streptomyces*, el TE debe contener lisozima 2 mg/mL y se deja 30 minutos a 37°C.
- 3) Mientras pasan los 13 minutos, se prepara una solución de SDS 1% y NaOH 0.2N para poder llevar a cabo la lisis alcalina (IMPORTANTE: esta solución tiene que ser realizada al momento para poder llevar a cabo una buena lisis alcalina).
- 4) Una vez pasado el tiempo se le agregan 400 µL de la solución SDS1% y NaOH 0.2N. Se agita suavemente haciendo movimientos circulares por el tubo, abarcando toda la pared, sin formar burbujas. Se mezcla hasta observar un aumento de la viscosidad. Se deja reposando 10 minutos en hielo. Para *Streptomyces* se deja con la solución de lisis alcalina por 20 minutos a 37°C.
- 5) Concluido el tiempo de lisis, se agregan 300 µL de acetato de potasio 3M pH=4.8, y de igual forma se agita suavemente. Se deja 15 minutos exactos, no más, en hielo.
- 6) Se centrifuga a 14,000 rpm por 10 minutos, se recupera el sobrenadante y se pasa a un tubo Eppendorf esterilizado. Al sobrenadante se le agregan 400 µL de fenol-cloroformo y se mezcla manualmente haciendo movimientos circulares.
- 7) Se centrifuga con las mismas condiciones y se toma la parte acuosa, sin tomar parte de la interfase, y se pasa a otro tubo Eppendorf esterilizado. A la fase acuosa se le agrega 1mL de etanol absoluto frío, o menos según la capacidad del tubo, y se mezcla haciendo movimientos circulares y sobre la pared. Se deja reposando 10 minutos a temperatura ambiente.

- 8) Se vuelve a centrifugar con las mismas condiciones, y se quita el sobrenadante con pipeta (no debe quedar residuo alguno de etanol). Se deja secando en una parrilla por 5 minutos a 55°C. Una vez seco el pellet, se resuspende en 50 µL de TE 10 mM pH = 8.
- 9) Al pellet resuspendido se le agrega 3150 µL de acetato de sodio 4M pH = 6. Se mezcla por inversión y se incuba 1 hora a -20°C.
- 10) Se centrifuga con las mismas condiciones, y se pasa el sobrenadante a un tubo Eppendorf esterilizado. Se le agrega 200 µL de isopropanol y se agita manualmente por inversión. Una vez bien mezclado se deja precipitando por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 11) Una vez más se centrifuga con las mismas condiciones, se elimina todo el sobrenadante y se resuspende en 45 µL de TE 10 mM pH = 8. Se agregan 5 µL de acetato de sodio 3M pH = 6, se agita en vórtex y se le da un pulso en la microcentrífuga. Se agregan 125 µL de etanol absoluto frío se deja precipitando 10 minutos a temperatura ambiente.
- 12) Se centrifuga con las mismas condiciones y se elimina todo el sobrenadante, igual que en el paso 8). Una vez seco el pellet, se resuspende en aproximadamente 20-25 µL de TE mM pH = 8 (dependiendo del pellet, puede ser más o menos)

Protocolo #6: Purificación de DNA en agarosa de bajo punto de fusión (LMP)

- 1) Para poder extraer correctamente el DNA del LMP, se satura fenol:
 - a. En un tubo Eppendorf se agregan (en ese orden): 100 μ L de NaCl 5M, 400 μ L de H₂O y 500 μ L de fenol.
 - b. Se centrifuga 1 minuto a 14,000 rpm en microcentrífuga y se elimina la fase acuosa.
 - c. Se pone el fenol saturado a 37°C en baño maría
- 2) Una vez que se ha localizado y cortado la banda requerida en el LMP, esta se pasa a un tubo Eppendorf y se funde en un baño maría a 65°C-70°C por 10 minutos
- 3) Se le añade 1/10 de volumen de NaCl 5M. Se mezcla bien con vórtex y se deja otros 5 minutos a 65°C -70°C.
- 4) Concluidos los 5 minutos se pasa la agarosa fundida a 37°C en baño maría. Después se le agregan 2/3 v de fenol saturado y se mezcla por vórtex por 30 segundos.
- 5) Se centrifuga 5 minutos a 14000 rpm y se pasa la fase acuosa a un tubo limpio.
- 6) Se le añaden 90 μ L de TE 10 mM y 10 μ L de NaCl 5M, al fenol saturado del paso anterior y se mezcla por vórtex y se centrifuga 2 minutos a 14000 rpm.
- 7) Se juntan las dos fases acuosas y se le añade 1 volumen de fenol/cloroformo. Se mezcla con vórtex por 15 segundos y se centrifuga 2 minutos a 14000 rpm.
- 8) Se pasa la fase acuosa a un tubo limpio y se repite el paso anterior, pero solamente con cloroformo.
- 9) Se pasa la fase acuosa a un tubo limpio y se le añade 1 μ L (10 μ g) de glucógeno, se mezcla bien por inversión, y después se le añade un volumen de isopropanol. Se mantiene a -20 °C por lo menos 2 horas.
- 10) Se centrifuga por 10 minutos a máxima velocidad y se tira el sobrenadante. Se vuelve a centrifugar por 5 minutos y se retira todo el sobrenadante.

11) Se deja secar el tubo 5 minutos a 50°C destapado y se resuspende en un volumen de TE 10 mM adecuado (10 μ L o menos, dependiendo del tamaño del pellet observado).

Protocolo #7: Conjugación con *E. coli* para transformar *S. coelicolor*

(Kieser et al, 2000)

- 1) Se inocula un pre-cultivo de 3 mL de 2XYT con los antibióticos especificados con *E. coli* ET con el vector a transferir (10-50 μ L, dependiendo de la densidad del glicerol). Se deja toda la noche a 37°C / 200 rpm.
- 2) Con todo el volumen del precultivo (3 mL) se inoculan 20 mL de 2XYT en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con los antibióticos especificados
- 3) Una vez que el cultivo alcance $DO_{600} = 0.6$, se centrifuga todo el volumen en un rotor J20, 10 minutos a 8000 rpm. Se tira el sobrenadante y se hacen 3 lavados con 20 mL de 2XYT.
- 4) Mientras se hacen los lavados de las células, se toman esporas (50-100 μ L, dependiendo de la densidad del glicerol), se colocan en tubos Eppendorf y se les da un choque térmico en baño maría a 50°C por 10 minutos.
- 5) Después del último lavado de las células de ET, el pellet se resuspende en 0.3 mL de 2XYT. Todo el volumen se agrega a las esporas, se revuelve bien pegándole con el dedo.
- 6) Se hacen diluciones (10^{-1} y 10^{-2}) y se plaquean en cajas de MS. Se ponen a crecer a 30°C por 20 horas y se les agrega ácido nalidíxico (100 μ L), además del antibiótico específico, mezclándolos con 5 mL de agua estéril. Después se toma 1 mL de los antibióticos mezclados con el agua, y se agrega a cada caja 1 mL, procurando que esté homogéneamente distribuido por toda la caja.

Protocolo #8: Transformación por protoplastos de *S. lividans* y *S. coelicolor* (Kieser et al, 2000; modificado por Servín-González)

Toda manipulación se realiza con material estéril

- 1) Se inoculan 25 mL de YEME suplementado con 125 μ L $MgCl_2$ 1M y 1.25 mL de glicina 10% con 50-100 μ L de esporas previamente sometidas a shock térmico de 50°C por 5 minutos, en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con resorte.
- 2) Se incuba el cultivo por 2 días a 30°C y 200 rpm, agitando periódicamente el medio para jalar hacia el cultivo pedazos de micelio que se queden en la pared del matraz.
- 3) Una vez transcurridos los dos días, se pasa todo el volumen del matraz a un tubo de centrifuga J20 de plástico. Una vez vaciado todo el volumen, se le agregan al matraz 10 mL de sacarosa 10.3%, procurando recuperar lo más posible de micelio que no haya sido recuperado en la primera vaciada del matraz, y se vacía en el mismo tubo de J20. Se centrifuga a 7,000 rpm, 10 minutos y a 10°C en un rotor J20.
- 4) Se elimina todo el sobrenadante y se resuspende el micelio en 10-20 mL de sacarosa 10.3%, dependiendo del crecimiento observado.
- 5) Una vez bien resuspendido mediante vórtex, se toman 5 mL del micelio resuspendido y se pasa a un tubo de vidrio para la centrifuga J20. En otro tubo de vidrio se repite, y así sucesivamente hasta acabar con todo el volumen.
- 6) Posteriormente, se toman los tubos con 5 mL de micelio resuspendido y se centrifugan por 10 minutos a 3,500 rpm y 10°C. Se tira el sobrenadante y se puede congelar el micelio.
- 7) Antes de generar los protoplastos, se revisa que el buffer P* tenga 40mL utilizando una probeta. Si se encuentra evaporado parte del buffer P, se le agrega agua miliQ. Posteriormente se suplementa con lo siguiente:

I. Trazas R2	100 μ L
II. KH_2PO_4 (0.8%)	0.5 mL
III. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (3.68%)	5 mL
IV. Tris Cl (3%)	5 mL

- 8) Una vez que se terminó de suplementar, el buffer P se filtra utilizando un filtro Milipore de 0.45 μm , y se coloca en un recipiente estéril.
- 9) Se toma entonces 5 mL de buffer P y se les agrega 7.5 μg de lisozima. Se disuelve bien agitando con vórtex, y de igual forma, se filtra mediante un filtro arriba descrito, y se le agrega a uno de los tubos de vidrio con micelio.
- 10) Se mezcla mediante inversión suave, y se deja incubando a 30°C, por máximo 1 hora. Cada 15 minutos de esa hora se vuelve a mezclar mediante inversión suave y se revisa el estado del micelio, si es que ya se convirtió totalmente o no en protoplastos, mediante observación con un microscopio.
- 11) Ya que se formaron completamente los protoplastos, se centrifuga todo el volumen a por 10 minutos 3,500 rpm y 25°C, utilizando el rotor J20. Se tira el sobrenadante, se resuspende con mucho cuidado pegándole solamente con el dedo y se le agregan 5 mL de buffer P. Se vuelve a centrifugar con las mismas condiciones.
 - a. Mientras se hace el lavado con buffer P, se prepara una solución de PEG, agregando 0.5 g de PEG a 1.5 mL de buffer P. Esta se mezcla y se filtra del mismo modo que la solución de lisozima.
- 12) Una vez que se descarta el sobrenadante del lavado con buffer P, se le agrega el DNA para transformar, e inmediatamente después se le agregan 0.6 mL de la solución de PEG con una pipeta Pasteur. Con un bulbo se succiona en la Pipeta Pasteur todo el volumen, y se vuelve a depositar lentamente en el tubo, procurando no generar burbujas. Se repite esto tres veces.
- 13) Se le agregan 5 mL de buffer P a los protoplastos con el DNA, se mezcla por inversión suave y se pasa por un filtro para protoplastos.
- 14) Cuando todo el volumen pasa por el filtro para protoplastos, se transfiere a un tubo de vidrio para rotor J20, y se centrifuga por 10 minutos a 3500 rpm y 25°C. Se elimina todo el sobrenadante y se resuspende el pellet (debe de verse lechoso y fluido).
- 15) Al pellet resuspendido se le agrega 0.3 mL de buffer P, se mezcla bien con el dedo y se hacen diluciones con buffer P, no con agua. Se agrega 0.1 mL a cada caja de R2 con la dilución correspondiente.

- 16) Para dispersar los protoplastos se utilizan 3 mL de agar suave (a una temperatura de 37-50°C) por caja. Una vez que se agrega, se mueve rápidamente la caja hasta observar que se haya cubierto en su totalidad.
- 17) Después de que pasen 18-20 horas desde la transformación, se les agrega el antibiótico específico para la construcción transformada, usando 2.5 mL de agar suave (sin sacarosa) con el antibiótico, dispersando de igual forma que en el paso 16).

*Buffer P (Hopwood & Wright, 1978):

A 300 mL de agua Mili-Q se le agrega:

- | | |
|-------------------------|---------|
| a) Sacarosa | 51.5 g |
| b) $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 1.01 g |
| c) $K_2S_2O_8$ | 0.125 g |

Se afora a 400 mL con agua Mili-Q y se esteriliza mediante autoclave.

Protocolo #9: Obtención de preparaciones densas de esporas de *S. coelicolor* y *S. lividans* (Kieser et al, 2000)

- 1) Se inoculan cajas de Petri con medio MS, con el antibiótico especificado si es el caso, en forma confluyente y se incuba cerca de una semana (hasta que se vea esporulación).
- 2) A cada caja se le agregan 10 mL de agua estéril, y con una asa bacteriológica se raspa la superficie para separar las esporas del micelio.
- 3) Se recupera el agua y se pasa por un filtro de algodón de esporas.
- 4) Se agrega 5 mL de agua al filtro para recuperar la mayor cantidad de esporas.
- 5) Se centrifuga el filtrado de esporas a 3,500 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- 6) Se elimina el sobrenadante y se lava una vez con 10 mL de agua estéril para eliminar los restos del medio. Se centrifuga de forma igual.
- 7) Se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet de esporas en un volumen de glicerol al 20% acorde a la cantidad de esporas recuperadas (aproximadamente 0.5 mL por 10 cajas de confluentes), se colocan en viales pequeños y se almacenan a -20°C.

Protocolo #10: Expresión de proteínas en *S. coelicolor*

Toda manipulación se realiza con material estéril

- 1) Se toman aproximadamente 0.5-1 mL de esporas de *S. coelicolor* (dependiendo de qué tan concentradas se encuentren), se centrifugan en microcentrifuga por 5 minutos a 8,000 rpm.
- 2) Se remueve el sobrenadante y se agrega 0.5 mL de agua estéril, se mezcla por vórtex y se centrifuga con las mismas condiciones.
- 3) Se le quita el sobrenadante y se resuspende el pellet en 1 mL de 2XYT.
- 4) Se les incuba por 10 minutos a 50°C en baño maría (choque térmico)
- 5) Una vez dado el choque térmico, se inocula un matraz Erlenmeyer con 9mL de 2XYT sin antibiótico que servirá como precultivo, y se deja crecer de 3 a 6 h a 37°C con agitación de 200 rpm
- 6) Una vez terminado este tiempo, se centrifuga todo el volumen del matraz utilizando tubos de rotor J20 a 7,000 rpm, 10 minutos a 20°C.
- 7) Se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet en 0.5 mL de agua estéril.
- 8) Se inocula un matraz con 100 mL de LB con azúcar al 25% a una $DO_{\lambda=450} = 0.1$. Se incuba a 30°C a 200 rpm.
- 9) Como se utilizan solamente vectores con el promotor *tipA* (pIJ6021 y pIJ6902), se induce la expresión de los genes mediante la adición de tioestreptón (5 µg/mL) a 12-16 horas.
- 10) Después de por lo menos 36 horas, se detiene el cultivo cuando llega a una $DO_{\lambda=450} = 0.7-1.3$ aproximadamente, se coloca en hielo y se ajusta el volumen a 100 mL con agua miliQ. **(A partir de este paso ya no es necesario mantener la esterilidad)**
- 11) Se centrifuga utilizando el Rotor 14 a 7,000 rpm /15 min./10°C y se recupera el sobrenadante. En él se encuentran las proteínas que fueron secretadas.

Protocolo #11: Fraccionamiento celular

- 1) Del último paso de “**ensayo de expresión de proteínas en S. coelicolor**”, Se vuelve a centrifugar con las mismas condiciones el pellet, y se elimina el exceso de medio en la pared del tubo.
- 2) Se lava con un volumen (100 mL) de PBS 1X pH= 7.4 tres veces.
Resuspender en 25 mL de buffer para sonicar:
 - a. MgCl₂ 1 M 0.22 mL
 - b. DTT 0.5 M 0.22 mL
 - c. Inhibidor de proteasas Roche 2 pastillas
 - d. Tris pH=8 20 mM 52.56 mL
- 3) Se sonica el micelio con 25 pulsos de 20 segundos cada uno, enfriando dos minutos cada 5 pulsos.
- 4) Una vez sonicado el micelio se centrifuga en tubos J20 a 7,500 rpm/1 hora / 4°C.
- 5) Se toma el sobrenadante y se pasa a tubos de ultra-centrífuga Beckman®, y se les somete a 33,000 rpm / 1 hora / 4°C /máxima aceleración.
- 6) Una vez que termina la ultra-centrífuga, se pasa la fase acuosa, que en este caso es la **fracción citoplásmica**, a tubos Eppendorf y se almacenan a -70°C.
- 7) Al pellet restante se le da un lavado con 25 mL de solución salina (NaCl 50 mM), y se vuelve a ultracentrifugar, pero por media hora.
- 8) Se retira el sobrenadante, y el pellet se resuspende en 100 µL de Solución para Sonicar, obteniendo así la **fracción membranal**.
- 9) Se cuantifica por Bradford, midiendo su DO a 595 nm y utilizando una curva estándar con albúmina 0.5mg/mL
- 10) Se le agrega el volumen necesario de buffer, dependiendo de la concentración de la muestra, para muestras de proteínas 2X a las **fracciones citoplásmicas y membranal** y se hierve por 5 minutos.
- 11) Una vez terminado el tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente y se congela a -20 °C

Protocolo #12: Precipitación de proteínas de sobrenadante por metanol-Cloroformo (Wessel & Flugge, 1983)

- 1) Del sobrenadante se toma el volumen deseado para precipitar proteínas y se le agregan los siguientes elementos en la cantidad establecida:

Volumen a precipitar	Metanol	Cloroformo	Agua
0.5 mL	2 mL	0.5 mL	1.5 mL
1 mL	4 mL	1 mL	3 mL
1.5 mL	6 mL	1.5 mL	4.5 mL

- 2) Se mezclan bien en vórtex cada vez que se le agrega un elemento, y finalmente se centrifugan a 3,500 rpm en rotor J20 por 10 minutos.
- 3) Se retira la fase acuosa, intentando no tocar la interfase, y se elimina.
- 4) Se agrega metanol de la siguiente forma:

Volumen precipitado	Metanol
0.5 mL	1.5 mL
1 mL	3 mL
1.5 mL	4.5 mL

- 5) Se mezcla bien mediante vórtex y se pasa a un tubo Eppendorf. Se centrifuga a 14,000 rpm por tres minutos y se elimina el sobrenadante, procurando que el pellet no se desprege.
- 6) Se repite hasta que se acabe todo el volumen, y finalmente se deja secando en una parrilla a 50 °C por 5 minutos.
- 7) Se le agrega 15 mL de buffer para muestras de proteínas 2X a cada una de las muestras y se hierve por 5 minutos.
- 8) Una vez terminado el tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente y se congela a -20 °C

Protocolo # 13: Tinción con Coomassie

- 1) Se preparan las siguientes soluciones:
 - a. Solución stock Coomassie (1 %)
 - i. Azul de Coomassie R-250 2 g
 - ii. H₂O aforar a 200 mLMezclar bien y filtrar.
 - b. Solución de tinción (0.125% Azul de Coomassie R-250, 50 % metanol, 10% ácido acético)
 - i. Solución stock azul de Coomassie 62.5 mL
 - ii. Metanol 250 mL
 - iii. Ácido acético 50 mL
 - iv. H₂O aforar a 500 mL
 - c. Solución para desteñir 1 (50% metanol, 10% ácido acético)
 - i. Metanol 500 mL
 - ii. Ácido acético 100 mL
 - iii. H₂O aforar a 1 L
 - d. Solución para desteñir 2 (7% ácido acético, 5% metanol)
 - i. Ácido acético 700 mL
 - ii. Metanol 500 mL
 - iii. H₂O aforar a 10 L
- 2) Una vez que se haya corrido el gel SDS-PAGE, se le agrega la solución de tinción, y se deja incubar por media hora.
- 3) Después se hace un lavado con agua destilada, se le agrega la solución para desteñir 1 y se incuba por media hora.
- 4) Finalmente se hace un lavado con agua destilada, se le agrega la solución para desteñir 2 y se incuba hasta que sean diferenciables las bandas (se pueden hacer varios lavados).

Bibliografía

1. Anné J, Maldonado B, Impeb J, Mellaert L, Bernaerts K. 2012. **Recombinant protein production and streptomycetes.** *Journal of Biotechnology*, **158**. 159-167
2. Arista-Carrera I. 2012. **Clonación, expresión y glicosilación de la lipoproteína antigénica MPT83 (Rv2873) de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*.** Tesis de Biología. Facultad de Ciencias. UNAM
3. Baltz RH, Matsushima P. 1981. **Protoplast fusion in *Streptomyces*: conditions for efficient genetic recombination and cell regeneration.** *Journal of general Microbiology*, **127** (1). 137-146.
4. Bendtsen JD, Nielsen H, Widdick D, Palmer T, Brunak S. 2005. **Prediction of twin – arginine signal peptides.** *BMC bioinformatics*. **6**, 167.
5. Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL, Thomsom NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser G, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. 2002. **Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2).** *Nature*. **417**:141-147.
6. Bendtsen JD, Nielsen H, Widdick D, Palmer T, Brunak S. 2005. **Prediction of twin-arginine signal peptides.** *BMC bioinformatics*. **6**: 167.
7. Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Rao RN. 1992. **Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.** *Gene*. **116**: 43-49.
8. Brosch R, Pym AS, Gordon SV, Cole ST. 2001. **The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics.** *Trends in Microbiology*. **9**(9):452-458
9. Brülle JK, Grau T, Tschumi A, Auchli Y, Burri R, Polsfuss S, Keller PM, Hunziker P, Sander P. 2010. **Cloning, expression and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* lipoprotein LprF.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **391**: 679-684
10. Datsenko K.A. & Wanner BL. 2000. **One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**: 6640-6645
11. Dell A, Galadari A, Sastre F, Hitchen P. 2010. **Similarities and Differences in the Glycosylation Mechanisms in Prokaryotes and Eukaryotes.** *International Journal of Microbiology*. Volume 2010, Article ID 148178
12. Díaz M, Esteban A, Fernández-Abalos JM, Santamaría R. 2005. **The high affinity phosphate-binding protein PstS is accumulated under high fructose concentrations and mutation of the corresponding gene affects differentiation in**

- Streptomyces lividans***. *Microbiology*. **151**: 2583-2592
13. Emmanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2007. **Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related Tools**. *Nature Protocols*. **2**: 953-971
 14. Espitia C, Servin L, Mancilla R. 2010. **New insights into protein O-mannosylation in actinomycetes**. *Mol. BioSyst*. **6**: 775–781
 15. Fornwald J, Donovan MJ, Gerber R, Keller J, Taylor D, Arcuri E, Brawner M. 1993. **Soluble forms of the human T Cell Receptor CD4 are efficiently expressed by *Streptomyces lividans***. *Nature Biotechnology*. **11**: 1031-1035
 16. González-Cerón G., Miranda-Olivares O.J., Servín-González. 2009. **Characterization of the methyl-specific restriction system of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and of the role played by laterally acquired nucleases**. *FEMS Microbiology*. **301**: 35-43
 17. González-Zamorano M, Mendoza-Hernández G, Xolalpa W, Parada C, Vallecillo A, Bigi F, Espitia C. J. 2009. ***Mycobacterium tuberculosis* Glycoproteomics Based on ConA-Lectin Affinity Capture of Mannosylated Proteins**. *Proteome Res*. **8** (2): 721–733
 18. Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hannahan D. 1990. **Differential plasmid rescue from transgenic Mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **87**: 4645-4649.
 19. Gust B, Kieser T, Chater KF. 2002. **REDIRECT technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor***. John Innes Centre.
 20. Herrmann JL, Delahay R, Gallagher A, Robertson B, Young D. 2000. **Analysis of post-translational modification of mycobacterial proteins using a cassette expression system**. *FEBS Letters*. **573**: 358-362
 21. Hopwood DA, Wright HM. 1978. **Bacterial protoplast fusion: recombination in fused proto-plasts of *Streptomyces coelicolor***. *Molecular and General Genetics*. **162** 137-143.
 22. Huang J, Shi J, Molle V, Sohlberg B, Weaver D, Bibb M, Karoonuthaisiri, Lih CJ, Kao C, Buttner M, Cohen S. 2005. **Cross-regulation disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor***. *Molecular Microbiology*. **58**(5): 1276-1287
 23. Jayapal K, Lian W, Glod F, Sherman DH, Hu WS. 2007. **Comparative genomic hybridizations reveal absence of large *Streptomyces coelicolor* genomic islands in *Streptomyces lividans***. *BMC Genomics*. **8**: 229
 24. Kaufmann S. 2011. **Fact and fiction in tuberculosis vaccine research: 10 years later**. *Lancet Infect Dis*; **11**: 633–40
 25. Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood D. 2000. **Practical *Streptomyces* genetics**. Norwich: The John Innes Foundation.
 26. Kovacs-Simon A, Titball R, Michell S. 2011. **Lipoproteins of Bacterial Pathogens**. *Infection and Immunity*. 548–561

27. Lai JS, Cheng CW, Sung TY, Hsu WL. 2012. **Computational Comparative Study of Tuberculosis Proteomes Using a Model Learned from Signal Peptide Structures.** *Plos One.* 7 (4). e35018
28. Lamrabet O, Drancourt M. 2012. **Genetic engineering of Mycobacterium tuberculosis: A review.** *Tuberculosis.* 92: 365-376
29. Lara M, Servín-González L, Singh M, Moreno C, Cohen I, Nimtz M, Espitia C. 2004. **Expression, Secretion, and Glycosylation of the 45- and 47-kDa Glycoprotein of Mycobacterium tuberculosis in Streptomyces lividans.** *Appl. Environ. Microbiol.* 70(2):679.
30. Lee P, Tullman-Ercek D, Geogiou G. 2006. **The Bacterial Twin-Arginine Translocation Pathway.** *Annu. Rev. Microbiol.* 60:373-95
31. Lefèvre P, Braibant M, de Wit L, Kalai M, Roeper D, Grötzinger J, Delvielle JP, Peirs P, Ooms J, Huygen K, Content J. 1997. **Three Different Putative Phosphate Transport Receptors Are Encoded by the Mycobacterium tuberculosis Genome and Are Present at the Surface of Mycobacterium bovis BCG.** *Journal of Bacteriology,* 179 (9): 2900-2906
32. Lewis R, Laing E, Allenby N, Bucca G, Brenner V, Harrison M, Kierzek AM, Smith CP. 2010. **Metabolic and evolutionary insights into the closely-related species Streptomyces coelicolor and Streptomyces of Mycobacterium tuberculosis.** *Tuberculosis.* 90: 338-345
33. McDonough J, Hacker K, Flores A, Pavelka M, Braunstein M. 2005. **The Twin-Arginine Translocation Pathway of Mycobacterium smegmatis Is Functional and Required for the Export of Mycobacterial β -Lactamases** *Journal of Bacteriology.* 187(22): 7667-7679.
34. McNeil DJ, Gewain KM, Ruby CL, Dezeny G, Gibbons PH, McNeil T. 1992. **Analysis of Streptomyces avermitilis genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector.** *Gene.* 111: 61-68
35. Medema M, Breitling R, Takano E. 2011. **Methods in Enzymology: Synthetic Biology in Streptomyces Bacteria.** *Methods in Enzymology* 497. 485-502
36. Nakashima N, Mitani Y, Tamura T. 2005. **Actinomycetes as host cells for production of recombinant proteins.** *Microbial Cell Factories,* 4:7
37. Palmer T, Hutchings MI. 2011. **Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology, Protein secretion in Streptomyces.** *Caister Academic Press.* 87-96
38. Peirs P, Lefèvre P, Boarbi S, Wang X, Denis O, Braibant M, Pethe K, Loch C, Huygen K, Content J. 2005. **Mycobacterium tuberculosis with Disruption in Genes Encoding the Phosphate Binding Proteins PstS1 and PstS2 Is Deficient in Phosphate Uptake and Demonstrates Reduced In Vivo Virulence** *Infection and Immunity.* 1898–1902

39. Perez C, Juárez K, García-Castells, Soberón G, Servín-González L. 1993. **Cloning, characterization and expresion in *Streptomyces lividans* 66 of an extracellular lipase-encoding gene from *Streptomyces* sp. M11.** *Gene*. 123: 109-114.
40. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011 **SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane region.** *Nature Methods*, 8:785-786, 2011
41. Pozidis C, Lammertyn E, Politou AS, Anne J, Tsiftoglou AS, Sianidis G, Economou A. 2001. **Protein secretion biotechnology using *Streptomyces lividans* : large-scale production of functional trimeric tumor necrosis factor alpha.** *Biotechnol Bioeng*, 72:611-9.
42. Rezwani M, Grau T, Tschumi A, Sander P. 2007. **Lipoprotein synthesis in mycobacteria.** *Microbiology*. 153: 652–658
43. Sambrook J, Russell DW. 2001. **Molecular Cloning: a laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press.
44. Scherr N, Nguyen L. 2009. ***Mycobacterium* versus *Streptomyces* —we are different, we are the same.** *Current Opinion in Microbiology*. 12: 699–707
45. Sonawane A, Mohanty S, Jagannathan L, Bekolay A, Banerjee S. 2012. **Role of glycans and glycoproteins in disease development by *Mycobacterium tuberculosis*.** *Critical Reviews in Microbiology*. 1–17
46. Symanski CM, Wren B. 2005. **Protein glycosilation in bacterial mucosal pathogens.** *Nature Reviews Microbiology*. 3: 225-237
47. Takano E, White J, Thompson CJ, Bibb MJ. 1995. **Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expresión vectors for use in *Streptomyces* spp.** *Gene*. 166: 133-137
48. Torres A, Juárez M, Cervantes R, Espitia C. 2001. **Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* phosphate specific transport system in *Mycobacterium smegmatis*.** Characterization of recombinant 38 kDa (PstS-1). *Microbial Pathogenesis*. 30: 289–297
49. Torres-Rodríguez MD. 2012. **Clonación y expresión de la glicoproteína de 19 kDa de *Mycobacterium tuberculosis* (Gen Rv3763) en *Streptomyces lividans*.** Tesis de Biología. Facultad de Ciencias. UNAM
50. Tschumi A, Nai C, Auchli Y, Hunziker P, Gehrig P, Keller P, Grau T, Sander P. 2009. **Identification of Apolipoprotein N-Acyltransferase (Lnt) in Mycobacteria.** *J Bio. Chem*. 284 (40): 27146-27156
51. Valdez F, González-Cerón G, Kieser H, Servín-González L. 1999. **The *Streptomyces coelicolor* A3(2) lipAR operon encodes an extracellular lipase and a new type of transcriptional regulador.** *Microbiology*. 145: 2365-2374
52. VanderVen BC, Harder JD, Crick DC, Belisle JT. 2005. **Export-Mediated Assembly of Mycobacterial Glycoproteins Parallels Eukaryotic Pathways.** *Science*. 309. 941-943.

53. Vanzembergh F, Peirs P, Lefevre P, Celio N, Mathys V, Content J, Kalai M. 2010. **Effect of PstS sub-units or PknD deficiency on the survival of Mycobacterium tuberculosis.** *Tuberculosis.* **90:** 338-345
54. Vyas N, Vyas M, Quiococho F. 2003. **Crystal Structure of *M. tuberculosis* ABC Phosphate Transport Receptor: Specificity and Charge Compensation Dominated by Ion-Dipole Interactions.** *Structure.* **11:** 765-774
55. Wehmeier S, Varghese A, Gurcha S, Tissot B, Panico M, Hitchen P, Morris H, Besra G, Dell A, Smith M. 2009. **Glycosylation of the phosphate binding protein, PstS, in *Streptomyces coelicolor* by a pathway that resembles protein O-mannosylation in eukaryotes.** *Molecular Microbiology.* **71(2):** 421–433
56. Wessel D, Flügge UI. 1984. **A method for quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids.** *Analytical Biochemistry.* **138 (1).** 141-143
57. World Health Organization (WHO). Report 2011. **Global Tuberculosis Control, Ruveillance and Planning**
58. Zakham F, Aouane O, Ussery D, Benjouad A, Ennaji M. 2012. **Computational genomics-proteomics and Phylogeny analysis of twenty one mycobacterial genomes (Tuberculosis & non Tuberculosis strains).** *Microbial Informatics and Experimentation.* **2:7**
59. Zhang Y, Wang WC, Li Y. 2004. **Cloning, expression, and purification of soluble human interleukin-4 receptor in *Streptomyces*.** *Protein Expr Purif.* **36:**139-45.
60. Zhou X, He X, Li A, Lei F, Kieser T, Deng Z. 2004. ***Streptomyces coelicolor* A3(2) lacks a genomic island present in the chromosome of *Streptomyces lividans*** **66.** *Appl. and Env. Microbiol.* 7110-7118