



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Desarrollo y evaluación de una cepa de la  
actinobacteria *Streptomyces venezuelae* para la  
expresión de glicoproteínas provenientes de  
*Mycobacterium tuberculosis***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

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

**KEVIN ALEXIS MUÑOZ NAVARRETE**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ  
2016**

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



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

Muñoz  
Navarrete  
Kevin Alexis  
5525311173  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
308287529

### 2.-Datos del Tutor

Dr.  
Luis  
Servín  
González

### 3.-Datos del sinodal 1

Dr.  
Sergio  
Sánchez  
Esquivel

### 4.- Datos del sinodal 2

Dr.  
Jesús  
Ramírez  
Santos

### 5.- Datos del sinodal 3

Dra.  
Laura Elena  
Córdova  
Dávalos

### 6.- Datos del sinodal 4

M. en C.  
Gabriela  
González  
Cerón

### 7.- Datos del trabajo escrito

Desarrollo y evaluación de una cepa de la actinobacteria *Streptomyces venezuelae* para la expresión de glicoproteínas provenientes de *Mycobacterium tuberculosis*

77 p.

2016

*A mi madre, hermana y hermanos por todo lo vivido...*

## Agradecimientos

A la UNAM por abrirme las puertas, fungir como segunda casa y como fuente principal de conocimiento.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y a la Facultad de Ciencias por albergarme y alimentarme intelectualmente todos estos años.

Al Dr. Luis Servín González por haberme permitido ser parte de su laboratorio; por su apoyo y guía a lo largo de este proyecto.

A la M. en C. Gabriela González Cerón por siempre ayudarme a resolver mis dudas, por sus consejos, pláticas y valiosísimas observaciones al presente trabajo.

A la Dra. Laura Córdova Dávalos por su paciencia, amistad y generosas aportaciones.

A la Dra. Gloria Soberón Chávez y a su laboratorio por sus aportes en los seminarios conjuntos y sus estimulantes convivencias.

Al Dr. Sergio Sánchez y al Dr. Jesús Ramírez por sus correcciones a este trabajo.

A la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular a cargo de la Dra. Laura Ongay-Larios y la técnico Guadalupe Codiz, por sus servicios en la secuenciación de DNA, los cuales fueron vitales en el desarrollo de este proyecto.

A CONACyT por haber brindado el apoyo del fondo Ciencia Básica CB2013-01 para la realización del proyecto # 220020.

A todos mis profesores que, de una u otra forma, pusieron su granito de arena en mi formación académica.

A mi madre, Aranza y Hono por su apoyo incondicional y por haberme soportado en mis momentos menos alegres.

A todos mis compañeros del *Streptolab*, por su ayuda, risas, camaradería y enseñanzas.

A Santi, Novel, Sclavito, Anita, Dianita, Panch, Nats, Sharit, Begongo, Paush, Aislinn, Lo, Isa y Malopo, con quienes las reflexiones, risas y muestras de cariño nunca fueron —ni serán— escasas.

A toda mi familia por siempre estar al pendiente del desarrollo de este trabajo.

## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	7
2. INTRODUCCIÓN .....	8
2.1.- Importancia del estudio de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	8
2.1.1 Glicosilación de proteínas y su importancia en <i>M. tuberculosis</i> .....	10
2.1.2.- Proteína Apa .....	12
2.1.3.- Proteína MPT83 .....	12
2.1.4.- Proteína LpqH.....	13
2.2.- Caracterización y ventajas en la manipulación del género <i>Streptomyces</i> .....	13
2.2.1.- Electroporación en el género <i>Streptomyces</i> .....	14
2.3.- <i>S. venezuelae</i> .....	15
2.4.- Promotor $P_{tipA}$ y su inducción con tioestreptón .....	16
2.5.- Genes reporteros.....	17
2.5.1.-Casete reportero <i>xylTE</i> .....	17
3. JUSTIFICACIÓN .....	20
4. OBJETIVOS.....	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
5.1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.....	23
5.2. Construcción de la cepa IB92 de <i>S. venezuelae</i> .....	24
5.2.1. Obtención del gen <i>tipA</i> de <i>S. coelicolor</i> .....	24
5.3. Clonación del casete reportero <i>xylTE</i> y del gen Rv1860 en <i>S. venezuelae</i> y <i>S. lividans</i> .....	25
5.3.1. Obtención del vector <i>pIJ6902</i> , del casete <i>xylTE</i> y del gen Rv1860.....	25
5.3.2. Introducción de los plásmidos a <i>S. venezuelae silvestre</i> e IB92 por conjugación a partir de <i>E. coli</i> .....	25
5.3.3. Transformación por tratamiento de protoplastos de <i>S. lividans</i> con polietilenglicol (PEG).....	26
5.4. Clonación de los genes Rv2873 Y Rv3763 en <i>S. venezuelae</i> . .....	26
5.4.1. Obtención de los plásmidos .....	26
5.4.2. Introducción del <i>pIJ6902+Rv2873</i> y del <i>pIJ6902+Rv3763</i> a <i>S. venezuelae</i> mediante conjugación .....	26
5.5. Obtención de preparaciones densas de esporas .....	27
5.6. Ensayos de funcionalidad del sistema .....	27

5.6.1. Ensayo cualitativo de catecol 2,3 dioxigenasa en <i>S. venezuelae</i> .....	27
5.7 Transformación de <i>S. venezuelae</i> por electroporación .....	29
5.9. Expresión de proteínas .....	31
5.9.1. Crecimiento de los cultivos en <i>S. venezuelae</i> .....	31
5.9.2. Fraccionamiento celular y obtención de proteínas. ....	31
5.9.3. Preparación de muestras de carga y electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida .....	32
5.9.4. Transferencia de proteínas a membranas PVDF (Difluoruro de polivinilideno) .	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
6.1.- Evaluación del sistema <i>tipA-P<sub>tipA</sub></i> en <i>S. venezuelae</i> .....	34
6.1.1.- Determinación cualitativa de la expresión del casete reportero <i>xylTE</i> en <i>S. venezuelae</i> .....	34
6.1.2.- Determinación cuantitativa de la expresión del casete reportero <i>xylTE</i> en <i>S. venezuelae</i> .....	36
6.1.3.- Expresión cuantitativa del casete reportero <i>xylTE</i> en <i>S. lividans</i> .....	36
6.1.4.- Contraste entre la determinación cuantitativa de la expresión del casete reportero <i>xylTE</i> en <i>S. venezuelae</i> y <i>S. lividans</i> .....	37
6.2.- Transformación por electroporación en <i>S. venezuelae</i> .....	38
6.3.- Creación de un vector multicopia compatible con <i>S. venezuelae</i> .....	40
6.4.-Expresión de la proteína Apa en <i>S. venezuelae</i> .....	42
6.5.-Expresión de las proteínas MPT83 y LpqH en <i>S. venezuelae</i> .....	45
7. CONCLUSIONES .....	51
8. PERSPECTIVAS.....	52
9. BIBLIOGRAFIA.....	53
10. ANEXOS .....	60
10.1 Medios de cultivo .....	60
10.2. Soluciones .....	64
10.3 Protocolos.....	66

## 1. RESUMEN

En este trabajo se evaluó, a través de distintas pruebas, a la especie *Streptomyces venezuelae* como modelo para la expresión de genes heterólogos.

Inicialmente se clonó el gen *tipA*, proveniente de la especie *Streptomyces coelicolor*, en el plásmido integrativo pMS81 y se introdujo a la especie *S. venezuelae* silvestre. Posteriormente se clonó el casete *xyITE*, que codifica para la enzima catecol 2,3-dioxigenasa (*xyIE*) y para una enzima que reactiva el sitio activo de la catecol 2,3-dioxigenasa (*xyIT*), bajo el control del promotor inducible  $P_{tipA}$  en el vector de expresión integrativo pIJ6902. La expresión inducible por tioestreptón en *S. venezuelae* fue detectada tanto cualitativamente en medio sólido, como a través de una prueba enzimática cuantitativa de colorimetría, lo cual permitió validar al sistema de expresión inducible.

Una vez validado el sistema de expresión inducible, se clonaron los genes de *Mycobacterium tuberculosis*, Rv1860, que codifica para la proteína Apa; Rv2873, que codifica para la proteína MPT83 y Rv3763, que codifica para la proteína LpqH, en el vector pIJ6902. Dichas construcciones fueron introducidas a *S. venezuelae*. La expresión e integridad de las proteínas Apa, LpqH y MPT83 se analizó mediante ensayos de Western-blot con anticuerpos específicos para cada una de las proteínas.

Además, se intentó construir un vector multicopia con base en el plásmido pB61 (derivado del pJV1) y fragmentos provenientes del vector de expresión pIJ6902; desafortunadamente, no se logró obtener la construcción deseada debido a una aparente inestabilidad del plásmido.

Cabe destacar que en este trabajo también se exploró con éxito la técnica de electroporación en *S. venezuelae*, ya que la transformación de dicha especie mediante protoplastos tratados con polietilenglicol, de gran utilidad en otras especies del mismo género, no se pudo llevar a cabo con éxito.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1.- Importancia del estudio de *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria gram positiva *M. tuberculosis*. Dicha enfermedad es la segunda causa mundial de mortalidad por un agente infeccioso, después del SIDA. (WHO, 2015) Llegó a ser la enfermedad infecciosa más importante en el hombre y representó la séptima parte de todas las muertes registradas a nivel mundial. En la actualidad se presentan cada año 14,000 nuevos casos de tuberculosis en Estados Unidos y más de 700 muertes (Madigan, *et al.*, 2009).

La bacteria *M. tuberculosis* se transmite de una persona a otra a través de pequeñas gotas generadas en el aparato respiratorio de pacientes con enfermedad pulmonar activa. Puede ser contagiada incluso a través de una conversación normal si se inhalan las pequeñas gotas que contienen bacterias viables para colonizar el sistema respiratorio. El entorno altamente oxigenado de los pulmones favorece el crecimiento del aerobio obligado *M. tuberculosis* (Madigan, *et al.*, 2009).

Una de las razones por las cuales la tuberculosis prevalece hasta nuestros días es porque el patógeno que causa dicha enfermedad cuenta con numerosas estrategias para eludir al sistema inmune y a los diferentes tratamientos disponibles actualmente (CDC, 2013). El hospedero actúa con una respuesta inmune que origina una reacción de hipersensibilidad y la formación de agregados de macrófagos activados denominados tubérculos; sin embargo, las micobacterias logran sobrevivir utilizando los glicolípidos de su pared para absorber los compuestos tóxicos liberados por los fagocitos (Madigan, *et al.*, 2009). Además, la composición de la pared de *M. tuberculosis* es reconocida como un factor importante de patogenicidad, ya que es bastante hidrofóbica y funciona como una barrera contra muchas clases de drogas hidrofílicas (Sonawane, *et al.*, 2012).

La vacuna BCG (Bacillus Calmette-Guérin) es la única aprobada y usada desde hace varias décadas. Protege a los niños contra varios tipos de la enfermedad (meningitis y TB miliar), sin embargo suele fallar en la protección de la forma más

recurrente, la tuberculosis pulmonar en los adultos. Además, existe riesgo de infección después de la vacunación en personas seropositivas o con alguna otra inmunodeficiencia (WHO, 2011)

La infección por *M. tuberculosis* suele ser asintomática en personas sanas, dado que su sistema inmunitario actúa formando una barrera alrededor de la bacteria. Los síntomas de la tuberculosis pulmonar activa son tos, a veces con esputo que puede ser sanguinolento, dolor torácico, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudoración nocturna. Un tercio de la población mundial está infectada de tuberculosis (Torres, *et al.*, 2001) y del 5% al 10% de las mismas, desarrollan la forma activa de la enfermedad (WHO, 2011).

En 2011, 8.7 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1.4 millones murieron; más del 95% de las muertes ocurrieron en países de ingresos bajos y medianos; es la causa principal de muerte de las personas infectadas por el VIH, pues causa una cuarta parte de las defunciones en este grupo y la tuberculosis multirresistente se ha encontrado en casi todos los países estudiados.

Dichas cifras son abrumadoras, no obstante, se está disminuyendo el número anual estimado de personas que enferman de tuberculosis; ello quiere decir que el estudio de dicha enfermedad está teniendo efecto positivo en la salud pública.

Por otro lado, La Organización Mundial de la Salud y el Fondo Mundial de lucha contra el SIDA, la tuberculosis y la malaria, han declarado que cepas de tuberculosis multirresistente podrían propagarse extensamente y han subrayado la necesidad de contar con un financiamiento internacional de al menos US\$ 1.600 millones anuales para el tratamiento y la prevención de esta enfermedad (OMS. 2011).

La aparición y desarrollo de técnicas de manipulación genética durante los últimos años han ayudado a obtener información importante que ha facilitado el estudio y comprensión de *M. tuberculosis*. Además, la obtención de la secuencia completa de su genoma, así como su manipulación *in vitro*, han abierto las puertas al desarrollo de numerosas investigaciones enfocadas al estudio de moléculas

antigénicas indispensables durante la infección de la bacteria que podrían utilizarse para crear una vacuna que no solamente proteja a niños con la misma eficacia de la BCG, sino que sea segura para pacientes inmunocomprometidos y eficaz contra la tuberculosis en los adultos (Kaufmann, 2011).

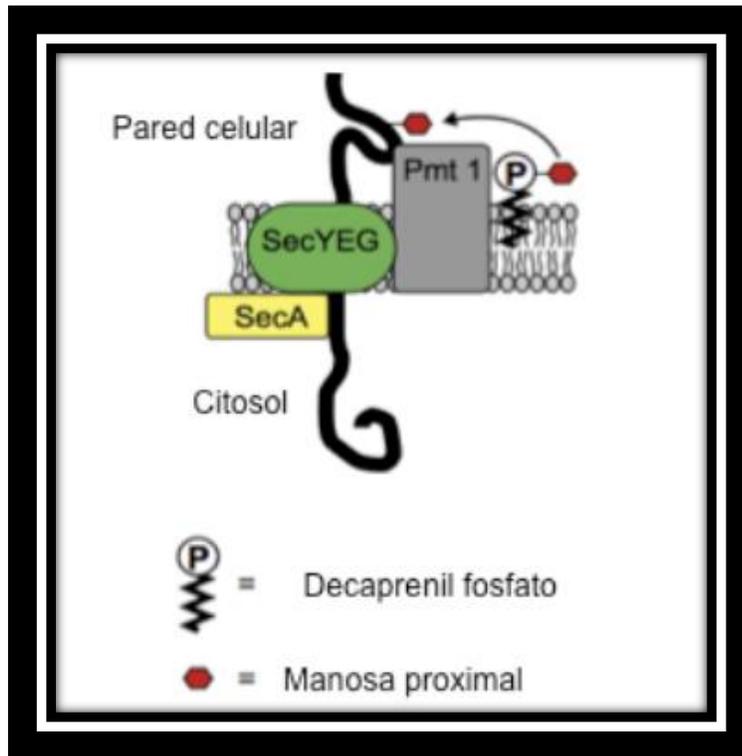
### **2.1.1 Glicosilación de proteínas y su importancia en *M. tuberculosis***

Las glicoproteínas son proteínas que contienen oligosacáridos unidos en forma covalente; dicha modificación se realiza de manera post-traducciona l y es de vital importancia para que algunas proteínas realicen funciones biológicas específicas. La glicosilación es un proceso ampliamente distribuido en la naturaleza, pues se ha reportado en eucariontes, bacterias y arqueas (Lechner, *et al.*, 1989).

La estructura de los glicanos unidos a las glicoproteínas es similar y comparte precursores biológicos en todos los organismos, lo cual sugiere que dicho proceso juega roles semejantes, por ejemplo dar funcionalidad o estructura a la proteína, tanto secretadas, como membranales (Benz, *et al.*, 2002).

La similitud que presentan tanto los precursores como las enzimas involucradas en el proceso de manosilación de proteínas de los tres dominios de la vida, sugiere un mecanismo evolutivo ampliamente conservado. En el caso particular de *Saccharomyces cerevisiae*, comparado con las actinobacterias, encontramos bastantes similitudes en cuanto al mecanismo de la O-manosilación. Se ha postulado la necesidad de que la proteína blanco de la manosilación sea secretada por la vía Sec (Vander Venn, *et al.*, 2005) (Fig. 1).

Las cadenas de oligosacáridos de la mayor parte de las glicoproteínas interaccionan a través de enlaces O-glicosídicos o N-glicosídicos. En los oligosacáridos unidos mediante enlace O-glicosídico, los azúcares se enlazan a la cadena lateral de un residuo de serina o de treonina; mientras que en los oligosacáridos unidos por enlace N-glicosídico, los azúcares están unidos al nitrógeno de la cadena lateral de un residuo de asparagina (Horton, *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Esquema de la propuesta del sistema de O-manosilación de proteínas en *M. tuberculosis*. El complejo SecA-SecYEG es necesario para la translocación de las proteínas no plegadas que serán glicosiladas por la proteína manosiltransferasa (Pmt1) (Vander Ven, *et al.*, 2005).

Se ha reportado que tanto los oligosacáridos como los polisacáridos localizados en la membrana de bacterias son responsables de varias interacciones patógeno-hospedero (Sonawane, *et al.*, 2012). En el caso de micobacterias patógenas, los oligosacáridos han sido asociados con proteínas antigénicas y su importancia radica en el reconocimiento de los mismos por el sistema inmune; esto ha sido demostrado en un decremento de la capacidad de la proteína recombinante 45/47 kDa de *Mycobacterium tuberculosis* para estimular la respuesta de linfocitos T cuando se cambia el patrón de manosilación (Horn, *et al.*, 1999; Romain, *et al.*, 1999).

Al menos 41 glicoproteínas fueron identificadas en filtrados de cultivo de *M. tuberculosis* y la mayoría de ellos al parecer juegan un papel importante en la

infección de dicho organismo y la respuesta inmune del hospedero (González-Zamorano, *et al.*, 2009).

La O-manosilación de las proteínas ha sido reconocida recientemente como una modificación importante de proteínas en actinomicetos y fue descrita por primera vez en *M. tuberculosis*, en la glicoproteína Apa (Espitia, *et al.*, 1989).

### **2.1.2.- Proteína Apa**

La O-glicoproteína Apa (45-47 kDa), codificada por el gen Rv1860, es un antígeno rico en alanina y prolina encontrado en grandes cantidades en sobrenadantes de *M. tuberculosis* y *M. bovis* (Laqueyrie, *et al.*, 1995). A pesar de que su función aún no está completamente definida, se cree que funge como una adhesina inmunodominante (Ragas, *et al.*, 2007), así como inductor en la respuesta linfoproliferativa, productor de citoquinas (Kumar *et al.*, 2003) o parte del sistema de transporte del molibdeno (Lara, *et al.*, 2004).

Se han encontrado proteínas homólogas en *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium leprae*, y *Mycobacterium vaccae* que tienen como función unirse a la fibronectina (Lara, *et al.*, 2004)

La proteína Apa ha sido propuesta como una candidata alternativa para la producción de una nueva vacuna contra la tuberculosis o para un diagnóstico temprano de la enfermedad. (Gamboa-Suasnavart, *et al.*, 2011)

Cabe destacar que la respuesta de las células T inducida por la proteína Apa, es dependiente de la O-manosilación de cuatro de sus treoninas (Horn, *et al.*, 1999)

### **2.1.3.- Proteína MPT83**

Mpt83 es una lipoproteína de 22 kDa proveniente de *M. tuberculosis*; es codificada por el gen de 660 pb, Rv2873. Se ha observado en ella la presencia de un péptido señal de secreción típico para lipoproteínas de procariontes (Hewinson, *et al.*, 1996).

Su papel durante la infección de la bacteria no está claro; sin embargo, la presencia de un antiguo dominio de adhesión celular en la proteína, que también

se encuentra en animales y plantas, sugiere fuertemente un papel de adhesión celular de MPT83 durante la infección (Wiker, 2009).

#### 2.1.4.- Proteína LpqH

LpqH es una lipoproteína de 19 kDa proveniente de *M. tuberculosis*; es codificada por el gen, de 480 pb, Rv3763. Posee un péptido señal de secreción para lipoproteínas y funge como adhesina, interaccionando con el receptor de manosas en macrófagos alveolares, promoviendo la respuesta inmune innata (Sthal, *et al.*, 1998).

### 2.2.- Caracterización y ventajas en la manipulación del género

#### Streptomyces

Los miembros del género *Streptomyces* son bacterias filamentosas Gram positivas con alto contenidos de guanina y citosina en su genoma; poseen un ciclo de vida complejo y se dispersan a través de esporas (Chater, *et al.*, 1993). El género *Streptomyces* ha sido objeto de numerosos estudios durante los últimos 30 años, entre otras cosas, debido a su capacidad para producir una gran cantidad de antibióticos, ya que cerca de los 20,000 antibióticos de origen bacteriano que han sido reportados, el 45% son producidos por los estreptomicetos (Kieser, 2000; Anné J. y Lieve M., 1993). Dichos organismos también son ampliamente usados para la producción de sustancias naturales como enzimas industriales (Marinelli, *et al.*, 2011). Todo lo anterior, aunado al hecho de que ya se han liberado la secuencias de los genomas de varias especies del género, (*S. coelicolor*, *S. avermitilis*, *S. griseus* y *S. scabies*) ha llevado al diseño de numerosos sistemas de expresión constitutiva o inducible (Takano, *et al.*, 1995; Huang, *et al.*, 2005) lo cual ha influido de manera decisiva en la atención dedicada a dicho género.

Las especies del género *Streptomyces* son usadas como hospederos para la producción de proteínas heterólogas; sin embargo, las herramientas para la manipulación genética del género aún están en vías de desarrollo. Si bien *Escherichia coli* es un organismo ampliamente estudiado y con un vasto sistema desarrollado para su manipulación genética, plantea limitaciones en la expresión

de proteínas, dado el incorrecto plegamiento, insolubilidad y citotoxicidad por acumulación de las mismas (Binda, *et al.*, 2013). Además, debido a la presencia de una membrana externa, las proteínas heterólogas son ineficientemente exportadas por la bacteria y son almacenadas en cuerpos de inclusión con una conformación biológica inactiva (Kieser, 2000; Anné J. y Lieve M., 1993).

Dichos problemas son menos marcados o incluso no presentados por especies del género *Streptomyces*. Un claro ejemplo es *S. lividans*, que produce proteínas con un mayor grado de solubilidad y presenta una mayor eficiencia en la secreción de las mismas, con lo cual evita la formación de cuerpos de inclusión y la toxicidad que éstos puedan presentar en las células hospederas.

Por otro lado, *S. venezuelae* presenta una cantidad considerable de biomasa y un crecimiento no tan comprimido en comparación con otras especies del mismo género, lo cual sugiere una mayor cantidad de proteína obtenida.

Además, la expresión de genes heterólogos está ampliamente facilitada cuando el hospedero seleccionado está filogenéticamente emparentado con los productores homólogos, ya que los sistemas de traducción, glicosilación y expresión de proteínas varían muy poco entre las especies cercanamente emparentadas (Binda, *et al.*, 2013) como es el caso de *Streptomyces* y *Mycobacterium*.

Finalmente, cepas de *Streptomyces* son ampliamente conocidas como buenas productoras de proteínas recombinantes a nivel extracelular; dichas cepas también poseen la habilidad de glicosilar tanto sus propias proteínas, como las proteínas heterólogas. Estudios recientes en genética y biología celular han revelado analogías en formas de crecimiento y en estadios de los ciclos de vida entre especies de los géneros *Streptomyces* y *Mycobacterium*, (Scherr, *et al.*, 2009)

### **2.2.1.- Electroporación en el género *Streptomyces***

Usualmente los plásmidos son introducidos dentro de las especies del género *Streptomyces* por medio de una técnica que involucra la formación de protoplastos y su transformación con polietilenglicol (Bibb, *et al.*, 1978). Sin embargo, muchas especies de dicho género no son transformables a través de

dicho método o resulta con una eficiencia muy baja, como es el caso de *S. venezuelae*. La transformación por medio de electroporación ha sido realizada en múltiples especies de bacterias Gram-negativas y las ventajas que presenta dicho método son un ahorro considerable de tiempo y de trabajo; por lo que se presenta como una alternativa sumamente útil en cepas que previamente se consideraban intranformables.

La electroporación de Gram-positivas debe ser facilitada con un tratamiento de lisozima previo a la electroporación para poder debilitar la pared de peptidoglicano, la cual es más gruesa que en bacterias Gram-negativas. No se logran obtener transformantes sin este tratamiento de lisozima previo a la electroporación (Pigac *et al.*, 1995)

### 2.3.- *S. venezuelae*

Al igual que otras bacterias del género, se trata de una especie de bacteria Gram-positiva, filamentosa, con hifas vegetativas ramificadas y embebidas en el sustrato. También posee hifas aéreas, las cuales portan las esporas. La pared celular de las hifas vegetativas ronda los 15 nm, de espesor y es muy similar tanto química como estructuralmente a aquella de las otras Gram positivas (Bradley *et al.*, 1968).

A diferencia de otras especies del género *Streptomyces*, muestra un crecimiento relativamente disperso y capacidad de esporular en medio líquido; así como un menor tiempo de crecimiento y de esporulación en comparación con sus congéneres y relativa facilidad en su manipulación genética, lo cual le confiere ventajas sumamente útiles en el laboratorio (Jung, *et al.*, 2006; Parker *et al.*, 2008).

Una desventaja que presenta *S. venezuelae* es que la mayoría de los plásmidos multicopia para estreptomicetos han sido contruidos a partir del plásmido pIJ101, y este plásmido y sus derivados son incapaces de replicarse eficientemente en esta especie. Si bien es posible transformar a *S. venezuelae* con derivados del pIJ101, esto da como resultado colonias de lento y reducido crecimiento; lo cual

indica que los derivados del pIJ101, como el pIJ6021, a partir de las cuales no se pueden volver a aislar los plásmidos, tienen dificultades para replicarse en *S. venezuelae*. Esto es posiblemente ocasionado por un sistema de control que se expresa con mayor fuerza en *S. venezuelae* que en *S. lividans* (Aido, *et al.*, 1990).

El pJV1 es un plásmido de alto número de copias, de 11 kb, proveniente de *S. phaeochromogenes* (Doull, *et al.*, 1983; Bailey, *et al.*, 1986). Varios vectores se han derivado del pJV1 (Bailey, *et al.*, 1986), como el pB48 y el pB61 (Servin-González *et al.*, 1995).

Es importante resaltar que, a pesar de que la secuencia deducida del replicón del pJV1 es 35% idéntica a la del pIJ101 (Servin-González *et al.*, 1995), los vectores derivados del pJV1 tienen la capacidad de replicarse dentro de *S. venezuelae*, mientras que, como ya se mencionó anteriormente, los derivados del pIJ101 no se replican o las colonias tienen dificultades para desarrollarse.

#### 2.4.- Promotor $P_{tipA}$ y su inducción con tioestreptón

El tioestreptón es un antibiótico (péptido cíclico) aislado como metabolito secundario de *Streptomyces azureus*, el cual se une a la subunidad ribosomal 50S impidiendo la traducción de las proteínas. (Cundliffe, 1971). Sin embargo se ha reportado que en concentraciones sumamente bajas (alrededor de  $10^{-9}$  M) induce la expresión de regulones de funciones no conocidas en *Streptomyces lividans* 1326 (Holmes, *et al.*, 1993). La resistencia a este antibiótico está dada por un gen (*tsr*) que codifica para una metilasa que impide la unión del tioestreptón a la subunidad del RNA ribosomal (Cundliffe, 1978; Thompson, *et al.*, 1982).

La transcripción del gen cromosomal *tipA* de *Streptomyces lividans* 66 es aparentemente inducida al menos 200 veces por medio de bajas concentraciones de tioestreptón en el medio. El promotor del gen *tipA* ( $P_{tipA}$ ) ha sido usado para regular la expresión génica en vectores integrativos (Smokvina, *et al.*, 1990), así como plásmidos de bajo y alto número de copias (Murakami, *et al.*, 1989).

Cabe destacar que el gen *tipA* codifica para un activador transcripcional que está autorregulado, ya que requiere de la proteína TipA para que el promotor pueda ser

inducido por el tioestreptón en bajas cantidades. Además existe una retroalimentación negativa para evitar la transcripción descontrolada mediada por el complejo TipA-tioestreptón. (Holmes, *et al.*, 1993)

## 2.5.- Genes reporteros

Los genes reporteros son aquellos que expresan alguna proteína fácilmente identificable o cuantificable, con lo cual se puede saber la eficiencia de un promotor o la presencia de un gen en un plásmido, a través de la detección o cuantificación del gen reportero (Fig. 2).

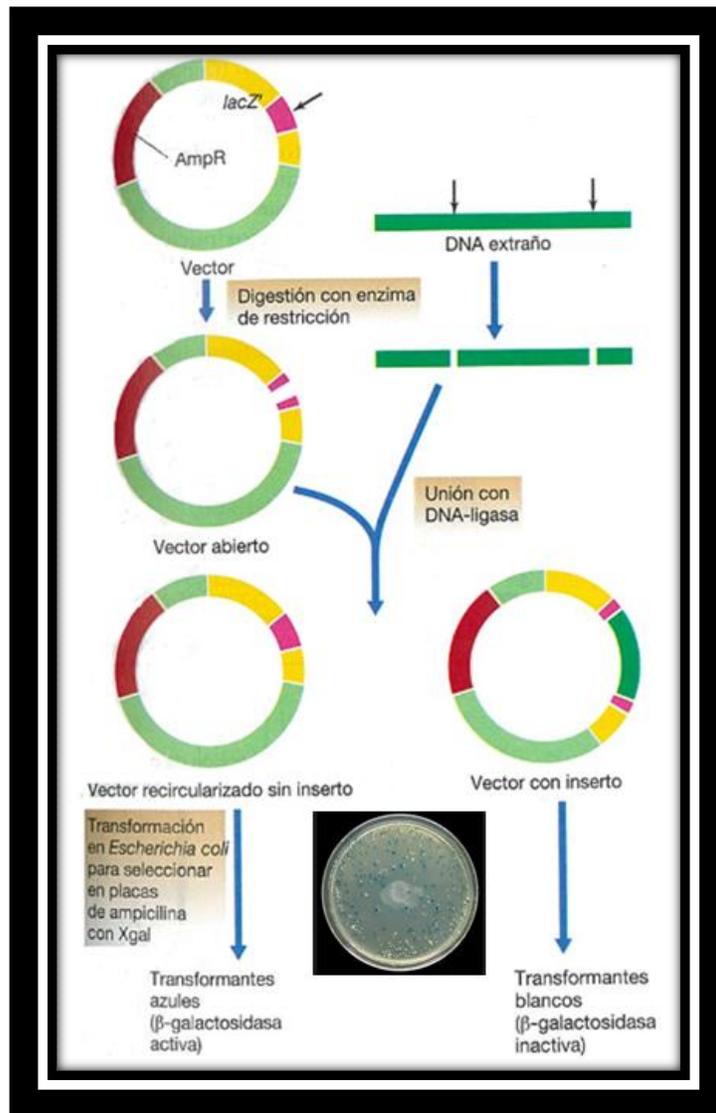
Existen numerosos genes reporteros, por ejemplo la proteína verde fluorescente (GFP) producida por la medusa *Aequorea victoria*; la beta-glucuronidasa (GUS) bacteriana; la luciferasa (Luc) producida por muchos organismos marinos o la beta-galactosidasa.

### 2.5.1.-Casete reportero *xylTE*

El gen *xylE* es parte del operón de *meta*-escisión del tolueno proveniente del plásmido TOL pWW0 de *Pseudomonas putida* mt-2, el cual codifica un conjunto de proteínas que transforman benzoatos (como el catecol) y toluatos en intermediarios del ciclo de Krebs a través de una reacción extradiol de *meta*-escisión (Harayama, *et al.*, 1988).

Particularmente, el gen *xylE* codifica para la enzima catecol 2,3-dioxigenasa (C23O; EC 1.13.11.2), cuya función es oxidar al catecol, el cual cambia de ser incoloro a ser amarillo (ácido 2-hidroxiimucónico) al ser oxidado. Esta reacción puede ser fácilmente cuantificada colorimétricamente y es la base del funcionamiento de *xylE* como gen reportero (González-Cerón, *et al.*, 2001).

La oxidación del átomo de hierro del sitio activo de la catecol 2,3-dioxigenasa inactiva a la proteína, sin embargo, una ferredoxina codificada por el gen *xylT*, reduce el átomo de hierro, reactivando la actividad de la catecol 2,3-dioxigenasa (Polissi, *et al.*, 1993; Hugo, *et al.*, 1998).

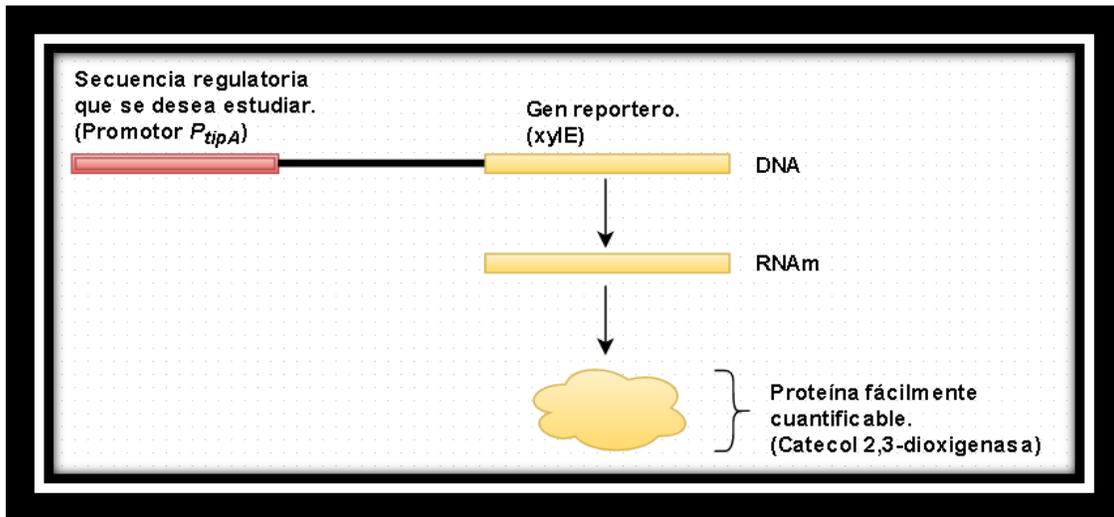


**Figura 2.** Ligación en un vector con identificación a través de un gen reportero: El vector se abre en el sitio múltiple de clonación con una enzima de restricción adecuada. La inserción del DNA inactiva la  $\beta$ -galactosidasa y permite el rastreo colorimétrico por la presencia del inserto. La parte inferior muestra colonias de *E. coli* en una caja Petri con medio con X-gal. La  $\beta$ -galactosidasa puede cortar el X-gal normalmente incoloro para formar un compuesto azul.

Dichos genes se encuentran acoplados traduccionalmente al traslapar el codón de término del gen *xyIT* con el codón de inicio del gen *xyIE*, resultando en el casete *xyITE*. Además, se ha demostrado que la actividad detectada de la catecol 2,3 dioxigenasa es significativamente más alta cuando se utiliza el casete *xyITE* en lugar del gen *xyIE* solo; esto se debe a la actividad de la ferredoxina y a la

presencia de *xyIT*, que contribuye a la estabilidad del RNA mensajero (González-Cerón, *et al.*, 2001).

Al introducir el gen *tipA* en *S. venezuelae* y el casete reportero *xyITE* inmediatamente después del  $P_{tipA}$ , se podrá evaluar la eficiencia del sistema *tipA-P\_{tipA}* en *S. venezuelae* (fig. 3)



**Figura 3.** Ejemplo del funcionamiento del gen reportero *xyIE* regulado por el promotor  $P_{tipA}$ . En rojo tenemos al promotor  $P_{tipA}$  que regula al gen reportero *xyIE*, mismo que codifica para la proteína cuantificable catecol 2,3-dioxigenasa. Al cuantificar la expresión de dicha proteína se puede evaluar la eficiencia del promotor.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa ocasionada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. En 2013, 9 millones de personas enfermaron y 1,5 millones murieron por esta enfermedad, lo cual, la convierte en la segunda causa de mortalidad a nivel mundial provocada por un agente infeccioso. (WHO, 2015)

Se calcula que entre 2000 y 2013 se salvaron 37 millones de vidas mediante el diagnóstico y el tratamiento de la tuberculosis (WHO, 2015), con lo cual se reafirma la importancia en los esfuerzos para combatir dicha enfermedad.

La única vacuna que ha tenido cierto grado de éxito en contra de la tuberculosis es la BCG (Bacillus Calmette-Guérin,) sin embargo, no ha sido efectiva en contra de la infección primaria o de la reactivación de la infección en estado latente dentro de los pulmones, la cual es la principal forma de propagación de la enfermedad. Por tal motivo, un número considerable de áreas como la biotecnología, inmunología y genómica se han enfocado en comprender con mayor profundidad el funcionamiento del agente causal, así como sus interacciones y el papel de las proteínas en dichos procesos. El objetivo principal radica en la generación de nuevas vacunas, medicamentos y pruebas de detección temprana de la infección que disminuyan el avance letal de la enfermedad en el organismo de las personas infectadas.

Un método sumamente útil en el estudio del agente causal de la tuberculosis, es la expresión de proteínas de *M. tuberculosis* en especies emparentadas filogenéticamente, ya que suelen tener maquinarias muy similares para la producción, modificación y exportación de proteínas; con lo que se evita el riesgo de autocontagio, se realiza en un menor tiempo y se puede realizar en laboratorios con niveles de bioseguridad bajos. *S. coelicolor* y *S. lividans* han demostrado ser una alternativa eficiente en la expresión de genes heterólogos provenientes de *M. tuberculosis*; sin embargo, se ha decidido trabajar con *S. venezuelae* debido a que, además de tener un tiempo de crecimiento y esporulación más rápido en comparación con la mayoría de sus congéneres, se presume que por la cantidad

tan alta de biomasa producida mientras crece, podría proporcionar una cantidad mayor de proteína, nuestra molécula de interés.

## 4. OBJETIVOS

### General

- Evaluar en *S. venezuelae*, tanto el correcto funcionamiento del sistema basado en el gen *tipA* y su promotor, como la expresión inducible y la integridad de proteínas provenientes de *Mycobacterium tuberculosis*.

### Particulares

- Construir una cepa de *S. venezuelae* con el gen *tipA* insertado en el cromosoma mediante el vector integrativo pMS81.
- Validación de dicha cepa mediante la clonación y expresión del casete *xyITE* en el vector integrativo pIJ6902 y medición de la expresión inducible de la catecol 2,3 dioxigenasa
- Clonación de los genes Rv1860, Rv3763 y Rv2873 de *M. tuberculosis* en el vector monocopia pIJ6902 y expresión de las proteínas Apa, MPT83 y LpqH en *S. venezuelae*.
- Construir un vector multicopia capaz de replicarse en *S. venezuelae*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

En el presente trabajo se utilizaron cepas de *E. coli* para la clonación de los genes Rv1860, Rv2873, Rv3763 y del casete *xylTE*; así como cepas de *S. lividans* y *S. venezuelae* para la expresión de las proteínas Apa, MPT83, LpqH y catecol 2,3-dioxigenasa. Las cepas utilizadas se describen en la Tabla 1 y los plásmidos utilizados en la Tabla 2.

**Tabla 1.** Cepas utilizadas en este trabajo

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> $\Phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA argF</i> )U169, <i>hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> mK <sup>+</sup> ), $\lambda$ -	Grant, 1990
IBEC58	$\Delta$ <i>dam</i> $\Delta$ <i>dcm</i> $\Delta$ <i>hsdRMS</i> derivada de BW25113 Para obtener DNA plasmídico no metilado	González-Cerón, et al., 2009
ET12567/pUZ8002	Con plásmido "elper" para obtener mutantes con DNA no metilado y transferir plásmidos por conjugación a <i>Streptomyces</i> .	MacNeil et al., 1992
<i>S. lividans</i>		
1326	Silvestre	John Innes Centre
<i>S. venezuelae</i>		
ATCC10712	Silvestre	John Innes Centre
IB92	Con gen <i>tipA</i> clonado en el plásmido integrativo pMS81.	Este trabajo

**Tabla 2.** Plásmidos usados en este trabajo

Plásmido	Descripción	Referencia
pMS81	Hyg <sup>R</sup> , lleva sitio att y gen de la integrasa del fago ΦBT1 de <i>Streptomyces</i>	Gregory <i>et al.</i> , 2003
pSET152	Apra <sup>R</sup> , lleva sitio att y gen de la integrasa del fago ΦC31 de <i>Streptomyces</i>	Bierman <i>et al.</i> , 1992
pB48	Derivado del pJV1, Hyg <sup>R</sup> , Tsr <sup>R</sup> .	Servin <i>et al.</i> , 1995
pIJ6902	Apra <sup>R</sup> Tsr <sup>R</sup> , promotor $P_{tipA}$ , sitio att y gen de la integrasa del fago ΦC31,.	Huang <i>et al.</i> , 2005
pIJ6021	Derivado de pIJ101. Vector de expresión en alto número de copias, Kan <sup>R</sup> Tsr <sup>R</sup> , contiene promotor $P_{tipA}$ inducible con tioestreptón,.	Takano, <i>et al.</i> , 1995
pB61	Derivado del pJV1, Tsr <sup>R</sup> .	Servin <i>et al.</i> , 1995

## 5.2. Construcción de la cepa IB92 de *S. venezuelae*

### 5.2.1. Obtención del gen *tipA* de *S. coelicolor*

Para obtener el gen *tipA* se hizo una amplificación por medio de PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando como templado el DNA total de *S. coelicolor* M145. Los oligonucleótidos utilizados fueron: tipADOWN (5'-GTCTCACCAAGACGCTGGTC-3') y tipAUP (5'-CTGACCGAGGTGGTTCCTC-3') y la enzima empleada fue *Pfu* Ultra AD de Agilent Technologies.

### 5.2.2. Construcción del plásmido pMS81+*tipA*

El plásmido pMS81, que es replicativo en *E. coli* e integrativo en el género *Streptomyces*, fue digerido con la enzima EcoRV. Tanto el plásmido linearizado como el producto de PCR que contenía al gen *tipA* fueron purificados mediante corrimiento en un gel de agarosa LMP (Low Melting Point) al 0.6%. Posteriormente ambos fragmentos fueron ligados con ayuda de la ligasa T4. El DNA ligado fue

extraído con fenol/cloroformo (Anexo 10.3) e introducido por electroporación a la cepa *DH5α* de *E. coli*. Se purificó DNA plasmídico de colonias transformantes seleccionadas, se checó por patrón de digestión con enzimas de restricción y el plásmido con la construcción correcta fue reintroducido mediante electroporación a la cepa *ET12567/pUZ8002* de *E. coli* que tiene la capacidad de conjugarse con bacterias del género *Streptomyces*.

Finalmente, las células de *E. coli ET12567/pUZ8002* con el plásmido pMS81+*tipA* fueron conjugadas (Anexo 10.3) con la cepa silvestre de *S. venezuelae* para introducirle el plásmido. Una transconjugante de *S. venezuelae* resistente a higromicina fue purificada y nombrada como IB92.

### 5.3. Clonación del casete reportero *xyITE* y del gen Rv1860 en *S. venezuelae* y *S. lividans*

#### 5.3.1. Obtención del vector pIJ6902, del casete *xyITE* y del gen Rv1860

Se hicieron digestiones para obtener los fragmentos con las enzimas NdeI y EcoRI. El fragmento correspondiente al vector se obtuvo al digerir una preparación del pIJ6902; por otro lado, el casete reportero *xyITE* se obtuvo del plásmido pIJ6021+*xyITE* (González-Cerón *et al.*, 2001); finalmente, se extrajo el fragmento correspondiente al gen Rv1860 del pRT802+Rv1860 (Córdova-Dávalos, *et al.*, 2013). Cabe destacar que en el laboratorio se contaba con todas las preparaciones mencionadas.

Las digestiones fueron sometidas a electroforesis en un gel de agarosa LMP al 0.6% y se purificaron tanto las bandas que se usarían como insertos, como la banda del vector.

#### 5.3.2. Introducción de los plásmidos a *S. venezuelae* silvestre e IB92 por conjugación a partir de *E. coli*

Se realizaron las ligaciones del pIJ6902+*xyITE* y del pIJ6902+Rv1860 y se introdujeron mediante electroporación a la cepa de *E. coli DH5α*. Se extrajo DNA plasmídico de colonias transformantes seleccionadas, se checó la construcción de

los plásmidos obtenidos por patrón de restricción con la enzima SacI (para pIJ6902+Rv1860) y EcoRI+NdeI (para pIJ6902+xy/ITE) y los plásmidos con la estructura esperada fueron introducidos a la cepa *ET12567/pUZ8002*.

Las células de *E. coli ET12567/pUZ8002* con el plásmido pIJ6902+xy/ITE o con el plásmido pIJ6902+Rv1860 fueron conjugadas (Anexo 10.3) tanto con la cepa silvestre de *S. venezuelae* como con la cepa IB92 para introducir los plásmidos. Se seleccionaron transconjugantes resistentes a apramicina y ácido nalidíxico, las cuales posteriormente se purificaron y esporularon.

### ***5.3.3. Transformación por tratamiento de protoplastos de S. lividans con polietilenglicol (PEG)***

Se decidió transformar a *S. lividans* 1326 mediante tratamiento de protoplastos con PEG (Anexo 10.3); se introdujeron tanto el plásmido pIJ6902+Rv1860 como el plásmido pIJ6902+xy/ITE. En el primer caso para utilizarse como control positivo en la expresión de la proteína Apa; en el segundo, como patrón de referencia en la expresión de la enzima catecol 2,3 dioxigenasa. A dicha cepa no fue necesario introducirle el gen *tipA* ya que lo posee de manera silvestre.

## **5.4. Clonación de los genes Rv2873 Y Rv3763 en *S. venezuelae*.**

### ***5.4.1. Obtención de los plásmidos***

Los plásmidos pIJ6902+Rv2873 (que codifica la proteína LpqH) y pIJ6902+Rv3763 (que codifica la proteína MPT83) ya habían sido construidos en el laboratorio, y fueron proporcionados por la M. en C. Gabriela González Cerón. La construcción correcta de cada plásmido se confirmó mediante restricción con las enzimas EcoRI y NdeI.

### ***5.4.2. Introducción del pIJ6902+Rv2873 y del pIJ6902+Rv3763 a S. venezuelae mediante conjugación***

Se transformó por electroporación la cepa *ET12567/pUZ8002* con los dos plásmidos que llevan clonados los genes Rv2873 y Rv2863 en el vector pIJ6902,

se extrajo DNA plasmídico de colonias transformantes seleccionadas, se checó por patrón de restricción con las enzimas *EcoRI* y *NdeI* que la construcción de los plásmidos fuera la correcta, y se conjugaron (Anexo 10.3) con la cepa IB92 aquellas células de *E. coli* que cumplieron el patrón esperado.

## 5.5. Obtención de preparaciones densas de esporas

Para la obtención de preparaciones densas de esporas de las cepas transformadas de *Streptomyces* con el plásmido pIJ6902 y sus derivados, se tomaron colonias transconjugantes y las cepas se purificaron mediante la realización de estrías con asa bacteriológica en medio R2-S + 50 µg/ml de apramicina (para *S. venezuelae*) o MS + 50 µg/ml de apramicina (para *S. lividans*). Se tomaron colonias aisladas y se resuspendieron en 500 µl de agua. Las esporas en suspensión se sembraron de manera uniforme con una varilla de vidrio en cajas Petri que contenían el mismo medio según la cepa. Las cajas fueron incubadas a 30°C durante 3 días (6 días para *S. lividans*). Posterior a la esporulación, se añadió a las cajas agua estéril para cosechar las esporas con ayuda de un asa bacteriológica, posteriormente fueron maceradas y las esporas fueron filtradas a través de algodón para separarlas de restos de micelio. A continuación fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 10 minutos; después se realizó un lavado con agua y se volvieron a centrifugar. La pastilla de esporas obtenida se resuspendió en glicerol al 20% y se almacenó a -20°C en viales de 3 ml.

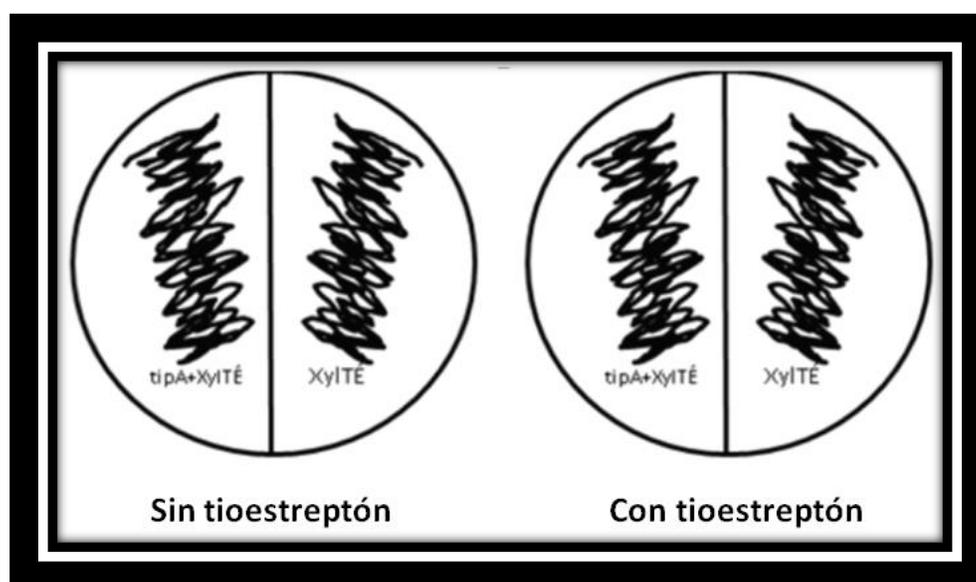
Para la cepa IB92 se plaquearon en medio R2-S + 50 µg/ml de apramicina y 50 µg/ml de higromicina ya que el plásmido pMS81 confiere resistencia a higromicina.

## 5.6. Ensayos de funcionalidad del sistema

### 5.6.1. *Ensayo cualitativo de catecol 2,3 dioxigenasa en S. venezuelae*

Para el ensayo cualitativo de catecol 2,3 dioxigenasa las diferentes cepas se cultivaron en cajas con MS-Maltosa. Se adicionó apramicina 50 µg/ml a las cajas donde crecieron las cepas con las construcciones del pIJ6902, y para ver la inducción con tioestreptón, éste se añadió a una de las dos cajas a una concentración de 10 µg/ml.

Pasadas 24 horas de crecimiento, se prepararon 10 ml de catecol 1M. Posteriormente, con ayuda de un aspersor y aire comprimido, se rociaron las cajas con la solución de catecol y se incubaron a 30°C por 15 minutos. Las cajas con fines comparativos se inocularon como se muestra en la Fig. 4.



**Figura 4.** Sembrado de *S. venezuelae* en cajas con medio MS-Maltosa para ensayo cualitativo de catecol 2,3 dioxigenasa.

### 5.6.2. *Ensayo cuantitativo de catecol 2,3 dioxigenasa en S. venezuelae y S. lividans*

Se inoculó un cultivo de 40 ml de medio YT2X + apramicina 50µg/ml con esporas de IB92/pIJ6902+xy/ITE a una densidad óptica de 0.1 a 600 nm. Posteriormente se dividió en 2 matraces y se puso a incubar a 30°C con agitación constante (200 r.p.m.). Después de cinco horas de incubación (correspondiente a

una densidad óptica de 0.4), se añadió tiorstreptón a uno de los matraces a una concentración final de 5 µg/ml para inducir la expresión del gen *tipA* y se continuó la incubación por otras dos horas.

Una vez alcanzado dicho tiempo, se centrifugó el micelio de ambos matraces, el cual se lavó con el buffer de lavado (revisar anexo 10.2 Soluciones.) y se resuspendió el pellet en 1 ml de buffer de fosfatos (revisar anexo 10.2 Soluciones). Después se transfirió a un tubo Eppendorf y se rompió el micelio mediante ultrasonido con ayuda de un sonicador. Se dieron cuatro pulsos a cada una de las muestras. Una vez roto el micelio se dejó reposar en hielo por 15 minutos, y posteriormente se añadieron 10 µl de Tritón X-100 a cada muestra, las cuales se centrifugaron a 4°C a 14,000 r.p.m por 5 minutos.

Posteriormente el sobrenadante se transfirió a tubos Eppendorf limpios y se mantuvo a 4°C. El ensayo enzimático se realizó como se describe en González-Cerón, *et al* (2001). Cada extracto se hizo por triplicado.

Se repitió el procedimiento pero utilizando esporas de *S. venezuelae* silvestre sin inducir, así como con cultivos de *S. lividans*/pIJ6902+*xylTE* sin inducir e inducidos con tiorstreptón 5µg/ml.

Para determinar la actividad específica de catecol 2,3 dioxigenasa en cada extracto se determinó la cantidad de proteína en los mismos por el método de Bradford (Bradford, 1976)

## 5.7 Transformación de *S. venezuelae* por electroporación

Debido a que la transformación por protoplastos en *S. venezuelae* no pudo llevarse a cabo con éxito, se decidió estandarizar el protocolo de Pigac, *et al.* (1995) (Anexo 10.3). Las únicas modificaciones que se hicieron al protocolo original fueron la utilización de YT2X como medio líquido para el crecimiento de *S. venezuelae*, el incremento del tratamiento con lisozima a 50 minutos y el plaqueo de la misma en medio R2-S.



## 5.9. Expresión de proteínas

### 5.9.1. Crecimiento de los cultivos en *S. venezuelae*

Se germinaron 500  $\mu$ l de una suspensión densa de esporas de IB92 con los diferentes plásmidos (almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  en glicerol al 20%) en 100 ml de medio YT2X con 50  $\mu\text{g/ml}$  de apramicina y 50  $\mu\text{g/ml}$  de higromicina. Los cultivos se incubaron durante 5 horas a  $30^{\circ}\text{C}$  con agitación constante. Posteriormente se añadió tioestreptón a una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  para inducir la expresión del promotor  $P_{tipA}$ . Los cultivos se dejaron crecer hasta completar 15 hrs a  $30^{\circ}\text{C}$  con agitación constante.

### 5.9.2. Fraccionamiento celular y obtención de proteínas.

Debido a que las proteínas MPT83 y LpqH son lipoproteínas y se encuentran ancladas a la membrana, fue necesario separar las células del medio de cultivo, hacer una lisis celular mediante sonicación y un fraccionamiento celular para separar la membrana plasmática de los demás componentes celulares como citoplasma y pared celular.

Los cultivos fueron centrifugados a 6000 r.p.m. por 10 minutos para separar el sobrenadante del micelio. Para precipitar las proteínas de sobrenadante se ocuparon 4 volúmenes de metanol; 1 de cloroformo y 3 de agua. Posteriormente, se centrifugó por 10 minutos a 13,000 r.p.m. y se retiró la fase acuosa. Se agregaron 3 volúmenes de metanol y se volvió a centrifugar por 10 minutos a 13,000 r.p.m y de nuevo se retiró la fase acuosa. Finalmente, la fase sólida fue resuspendida en 10  $\mu\text{L}$  de colorante para proteínas 2X (2-betamerceptoetanol 10%, Tris-HCl [pH 6.8] 0.125 M, SDS 4% y glicerol 20%) por cada mililitro de sobrenadante y fue hervido por 5 minutos. Las muestras fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Por otra parte, el micelio fue lavado 4 veces con 100 ml de buffer Tris-Cl 20mM pH 8 y fue congelado a -70°C por 30 minutos. Posteriormente, el micelio se resuspendió en buffer de lisis para *Streptomyces* (52.56 mL de Tris 25 mM, .22 mL de MgCl<sub>2</sub> 1M, .22 mL de DTT 4mM, 2 pastillas inhibidoras de proteasas [cOmplete de ROCHE] y .5 µL de RNAsa) y fue sonicado 40 veces (20 pulsaciones/15 segundos/pulsador-ON). Lo anterior fue centrifugado a 7500 r.p.m. durante una hora a 4°C y el sobrenadante obtenido fue ultracentrifugado a 38,000 r.p.m. durante 40 minutos para separar la fracción membranal. El pellet resultante fue lavado con Tris-Cl 20 mM con NaCl 50 mM y de nuevo ultracentrifugado a 38,000 r.p.m. durante 30 minutos. Finalmente, el pellet fue resuspendido en el buffer de lisis y precipitado por medio de una extracción metanol-cloroformo. Se resuspendieron 8 µg de membrana en 10 µL de buffer de carga para proteína 2X. Las muestras fueron hervidas por 5 minutos y almacenadas a -20°C.

### ***5.9.3. Preparación de muestras de carga y electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida***

Para la obtención de proteínas del sobrenadante de cultivo, se tomó 1 ml del sobrenadante y se realizó una precipitación por el método de metanol/cloroformo. Las proteínas precipitadas fueron resuspendidas en 10 µl de buffer de carga para proteínas 2X (0.125 M Tris-HCl pH=6.8, SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%) y hervidas por un período de 5 min.

En cada gel se cargó un marcador de peso molecular, un control positivo de la proteína Mpt83 o LpqH purificada de *S. lividans*, control negativo con proteínas de sobrenadante y membrana expresadas por *S. venezuelae* wt, muestra de proteína de sobrenadante y membrana de la proteína Mpt83 o LpqH proveniente de la IB92.

Se realizaron tres ensayos de SDS-PAGE por cada cepa para observar la ubicación de la proteína en geles de poliacrilamida al 12% para la proteína Apa y 14% para MPT83 y LpqH, todos, con un grosor de 1.5 mm. El primer gel fue teñido

con azul brillante de Coomasie R-250, para observar la presencia general de proteínas y ubicar las proteínas de interés. El segundo gel fue usado para ajustar la cantidad de proteína de cada una de las muestras. El tercero fue utilizado para comprobar la expresión de la misma proteína en sobrenadante y extractos de membranas, mediante ensayos de inmuno-blot con el uso de anticuerpos monoclonales para el caso de Apa y policlonales para MPT83 y LpqH.

#### 5.9.4. Transferencia de proteínas a membranas PVDF (Difluoruro de polivinilideno)

Para la transferencia de las proteínas a membranas de PVDF se utilizó tanto una cámara de transferencia húmeda (Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell) como una cámara de transferencia semiseca (Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell) ambas de BioRad.

El procedimiento se realizó siguiendo los pasos descritos en el manual de usuario, utilizando buffer Tris-Glicina (glicina 1.4%, Tris .3% y metanol 20%) y dejando transferir durante 12-16 horas a 12 mA en cámara húmeda y durante 30-45 minutos a 15 mV en cámara semiseca. Las membranas utilizadas para los ensayos de expresión por inmuno-blot fueron bloqueadas con TBS-Tween + leche descremada 5%, incubadas con el anticuerpo primario monoclonal específico de la proteína Apa y policlonal en el caso de MPT83 y LpqH, en una dilución 1:1000 y posteriormente con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón para el caso de la proteína Apa y anticuerpo secundario anti-conejo para el caso de LpqH y MPT83 en una dilución 1:2000. El ensayo se reveló utilizando el Kit de quimioluminiscencia ROCHE (POD) para detección de anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa (ratón/conejo).

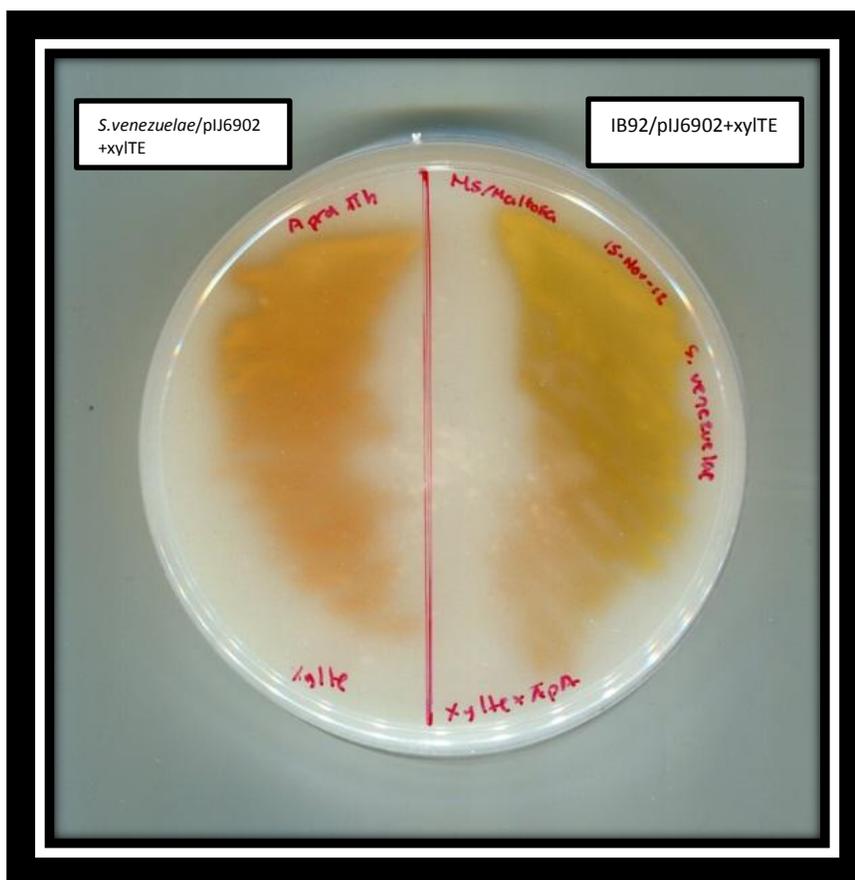
## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1.- Evaluación del sistema *tipA-P<sub>tipA</sub>* en *S. venezuelae*

#### 6.1.1.- Determinación cualitativa de la expresión del casete reportero *xyITE* en *S. venezuelae*

Se llevaron a cabo pruebas de expresión con el casete reportero *xyITE* para corroborar el correcto funcionamiento del gen *tipA* y su promotor en *S. venezuelae*.

#### Expresión del casete reportero *xyITE* en *S. venezuelae*

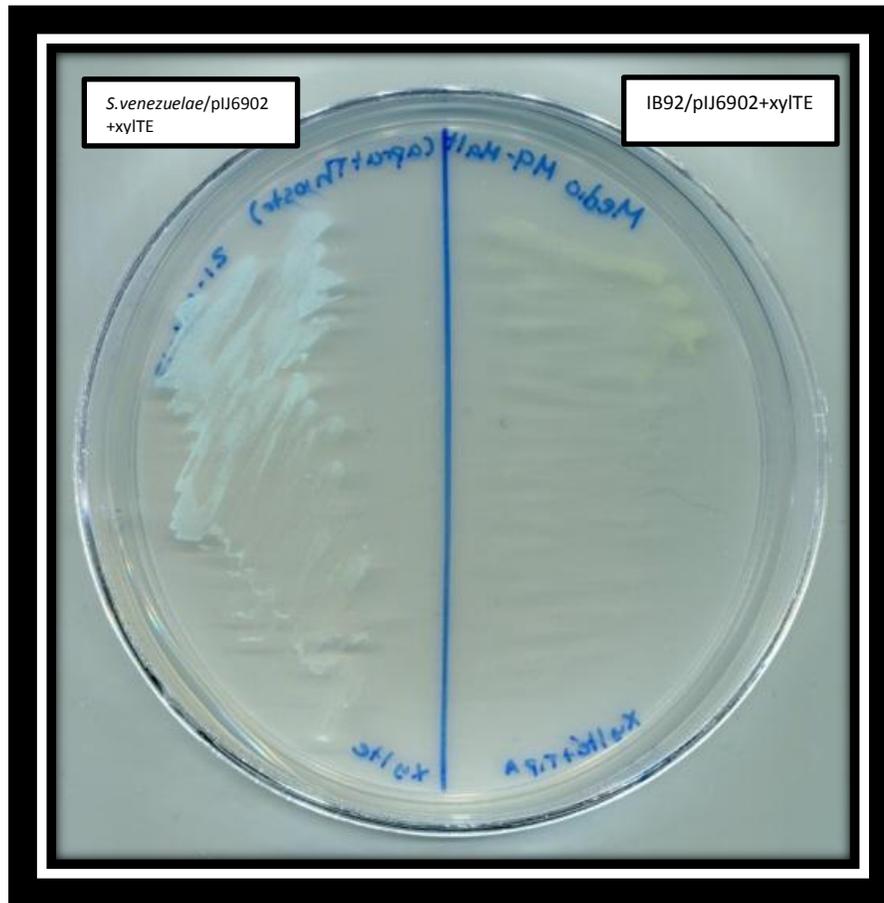


**Figura 6.** Expresión del casete *xyITE* bajo el control del sistema *tipA-P<sub>tipA</sub>* en *S. venezuelae*. Crecimiento en medio sólido MS-maltosa+apramicina e inducida con tioestreptón. Las cajas fueron rociadas con una solución de catecol 1M para revelar la actividad de la catecol 2,3 dioxigenasa. Del lado izquierdo tenemos a *S. venezuelae/pIJ6902+xyITE*; del lado derecho, la cepa *IB92/pIJ6902+xyITE*.

En la Figura 6 se puede apreciar un color amarillo más intenso en el lado derecho en comparación con el izquierdo, producto de la degradación del catecol por la enzima catecol 2,3 dioxigenasa.

Debido a que en un medio rico como el MS-maltosa, *S. venezuelae* produce pigmentos (muy probablemente melanina) que interfieren con los resultados de la prueba colorimétrica, se decidió repetir la prueba en medio mínimo M9 suplementado con maltosa, en el que la producción de pigmentos se encuentra reducida.

### Expresión del casete reportero *xyITE* en *S. venezuelae*



**Figura 7.-** Expresión del casete *xyITE* bajo el control del sistema *tipA-P<sub>tipA</sub>* en *S. venezuelae*. Caja Petri sembrada y tratada de la misma manera que en la figura 6 pero en medio mínimo M9 suplementado con maltosa.

En la figura 7 se puede observar el cambio en la coloración de la cepa, donde en el lado izquierdo *S. venezuelae* se aprecia de color blanco; en contraste con el lado derecho, donde se ve de color amarillo debido a la expresión de la catecol 2,3 dioxigenasa. Es posible observar que la actividad de esta enzima solamente es visible en presencia del gen *tipA*, es decir, en la cepa IB92.

La prueba cualitativa de expresión otorgó un primer acercamiento para corroborar el correcto funcionamiento del gen *tipA* y su promotor; sin embargo, fue necesario realizar una prueba que ratificara esta observación pero de manera cuantitativa.

#### ***6.1.2.- Determinación cuantitativa de la expresión del casete reportero xyITE en S. venezuelae***

Los datos obtenidos a partir de la prueba cuantitativa se ajustaron a absorbancia por minuto por mg. de proteína.

Para *S. venezuelae*, en ausencia de tioestreptón o del gen *tipA*, tenemos expresión de la proteína catecol 2, 3 dioxigenasa pero en cantidades muy bajas, lo cual corresponde a una actividad basal; por lo tanto, en la cepa IB92 inducida con tioestreptón, la expresión del gen reportero es 46 veces mayor que cuando no está inducida (Tabla 3) (Fig. 8)

#### ***6.1.3.- Expresión cuantitativa del casete reportero xyITE en S. lividans***

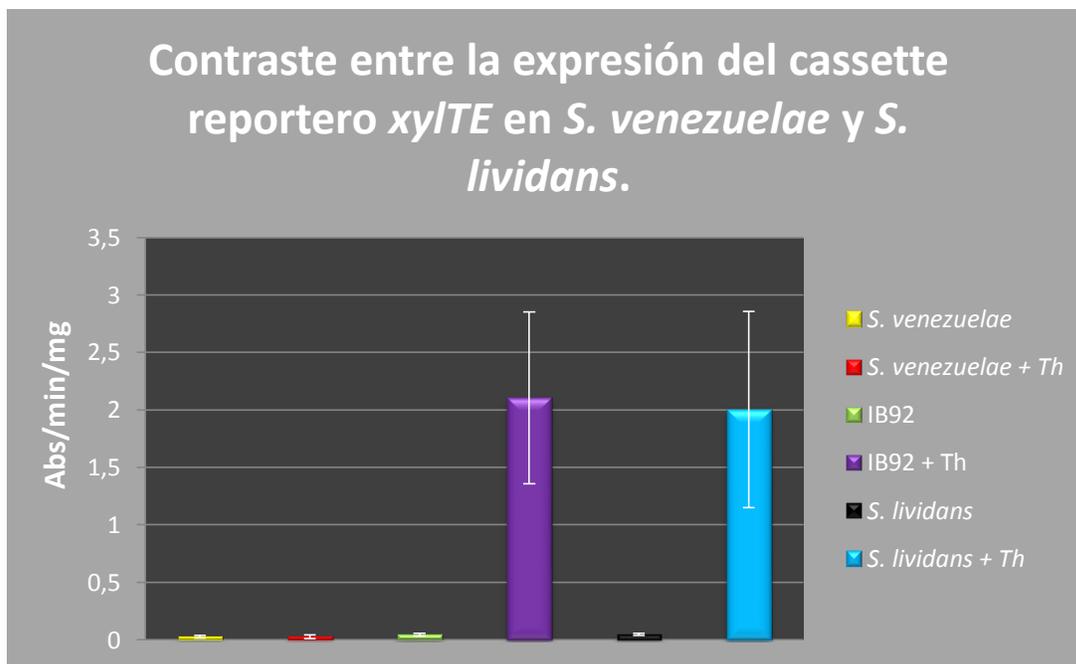
Con los resultados obtenidos pudimos afirmar que el sistema de expresión *tipA* introducido en *S. venezuelae* es eficiente; sin embargo, fue necesario contrastar dichos resultados con un actinomiceto que tuviera el gen *tipA* de manera natural, como es el caso de *S. lividans*.

Al igual que con *S. venezuelae*, los datos se ajustaron a absorbancia por minuto por mg. de proteína (Tabla 3).

**Tabla 3.** Valores de la expresión de la catecol 2,3 dioxigenasa, ajustados a absorbancia por minuto por mg. de proteína.

	<i>S. venezuelae</i>	<i>S. venezuelae</i> +tioestreptón	IB92	IB92 + tioestreptón	<i>S. lividans</i>	<i>S. lividans</i> +tioestreptón
Promedio	.027	.028	.045	2.104	.048	2.003
Desv. Est.	.012	.016	.012	.748	.009	.855

**6.1.4.- Contraste entre la determinación cuantitativa de la expresión del casete reportero *xylTE* en *S. venezuelae* y *S. lividans***



**Figura 8.-** Expresión del casete reportero *xylTE* bajo distintas condiciones. En color amarillo se tiene la cepa de *S. venezuelae* silvestre; en rojo, a *S. venezuelae* inducida con tioestreptón (Th); en verde, la cepa IB92; en morado, la IB92 inducida con tioestreptón; en negro, la cepa de *S. lividans* sin inducir y en azul, a *S. lividans* inducida con tioestreptón.

Se aprecia en la Figura 8 que tanto la cantidad de proteína expresada por *S. venezuelae* como por *S. lividans* nos dan valores muy similares cuando están inducidas con tioestreptón y poseen el sistema *tipA* (Tabla 3); las cantidades obtenidas por aquellas que no están inducidas con tioestreptón o no poseen el gen *tipA* integrado en el cromosoma, son 2 órdenes de magnitud menores que las

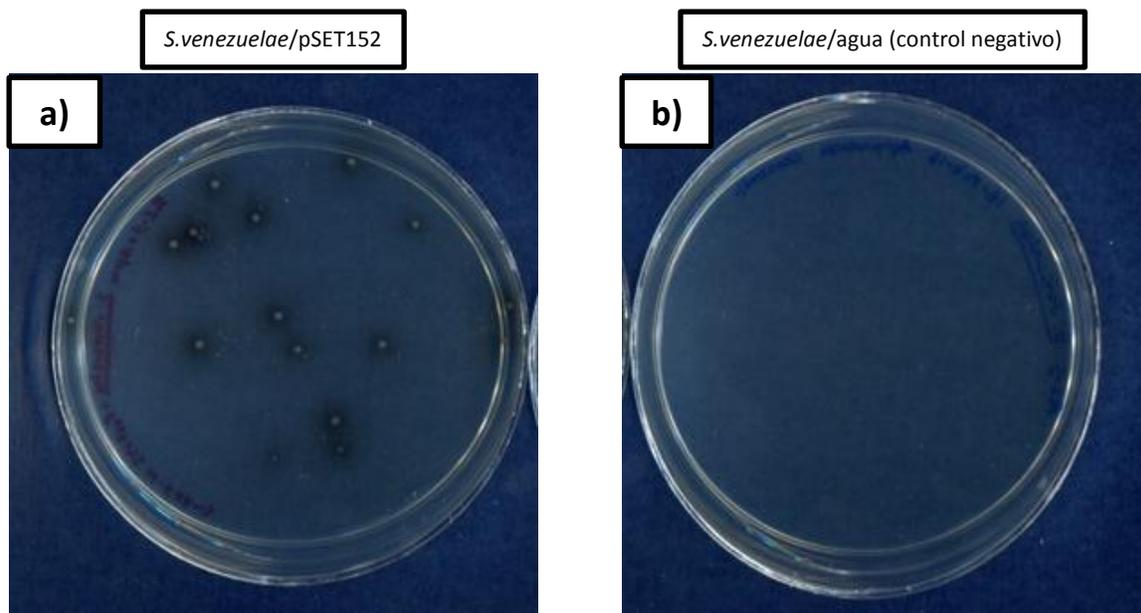
obtenidas cuando sí se tienen los 3 componentes del sistema *tipA-P<sub>tipA</sub>* (*P<sub>tipA</sub>*, gen *tipA* e inducción con tioestreptón) (Tabla 3).

Con los datos recabados anteriormente se puede asegurar que el sistema conformado por el gen *tipA* y el promotor *P<sub>tipA</sub>* introducido de manera artificial en *S. venezuelae* posee un nivel de expresión y una eficiencia de inducción muy similar a la del sistema existente de manera natural en *S. lividans*. Dado que el sistema resultó ser eficiente en la expresión del casete reportero *xyITE*, se decidió analizar su eficiencia en la sobreexpresión de otras proteínas.

## 6.2.- Transformación por electroporación en *S. venezuelae*

Debido a que no se contaba con algún protocolo para llevar a cabo la electroporación de *S. venezuelae*, se siguió, con algunas modificaciones, el método general para electroporación de *Streptomyces*, descrito por Pigac, *et al.*, (1995) (Ver Anexo 10.3). Se electroporó el plásmido integrativo pSET152.

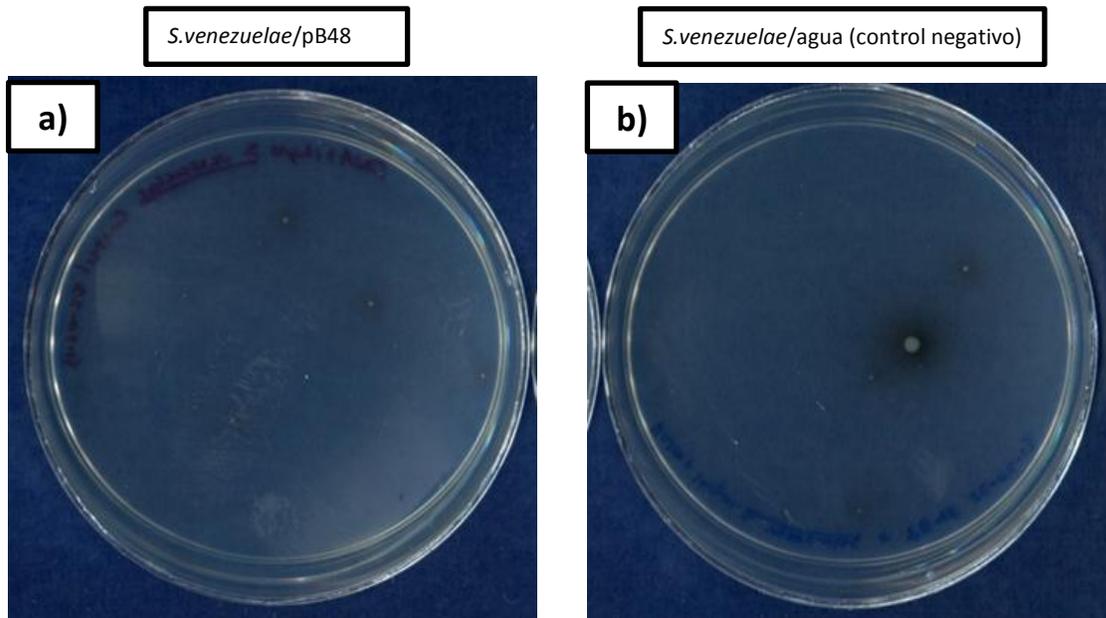
### Electroporación de *S. venezuelae*



**Figura 9.** (a) Caja petri con las posibles transformantes de *S. venezuelae/pSET152* sembradas en medio R2-S+apramicina. (b) Caja petri con la cepa *S. venezuelae* electroporada con agua y sembrada en R2-S+apramicina (control negativo).

Se observó el crecimiento de 16 posibles transformantes en la caja con células electroporadas con el pSET152 (Figura 9. a) en contraste con la caja con células electroporadas con agua (Figura 9. b), donde no hubo colonias. No se pudo comprobar la presencia del pSET152 en las posibles transformantes debido a que éste es un plásmido integrativo en el género *Streptomyces*; sin embargo, para corroborar que las colonias que se obtienen son transformantes y no resistentes espontáneas, es decir, colonias que adquirieron la resistencia al antibiótico no por la presencia del plásmido, sino por procesos evolutivos, se electroporó el plásmido autorreplicativo pB48 y se procedió a extraer DNA plasmídico de las posibles colonias transformantes para su posterior análisis por restricción. (Fig. 11)

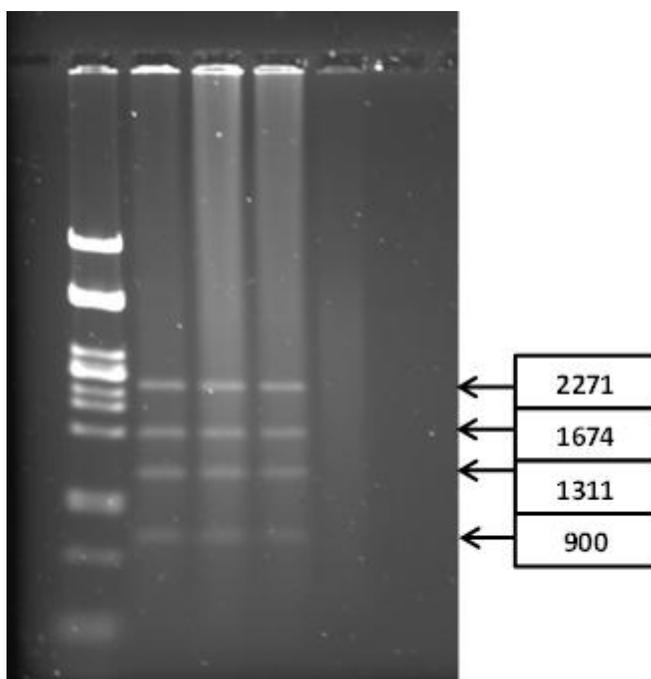
### Electrporación de *S. venezuelae*



**Figura 10.-** (a) Caja petri con las posibles transformantes de *S. venezuelae*+pB48 sembradas en medio R2-S+higromicina. (b) Caja petri con la cepa *S. venezuelae* electroporada con agua y sembrada en R2-S+higromicina (control negativo).

Se observó crecimiento de 4 colonias tanto en la caja de las posibles transformantes (Figura 10. a) como en la de células electroporadas con agua (Figura 10. b)

## Digestión con Sac I del plásmido pB48 purificado de electrotransformantes de *S. venezuelae*



**Figura 11.-** Gel de agarosa 0.8% en el cual se tiene en el primer carril el marcador; en el segundo, tercero, cuarto y quinto, las extracciones de DNA plasmídico de las posibles transformantes del pB48 digeridos con Sac I.

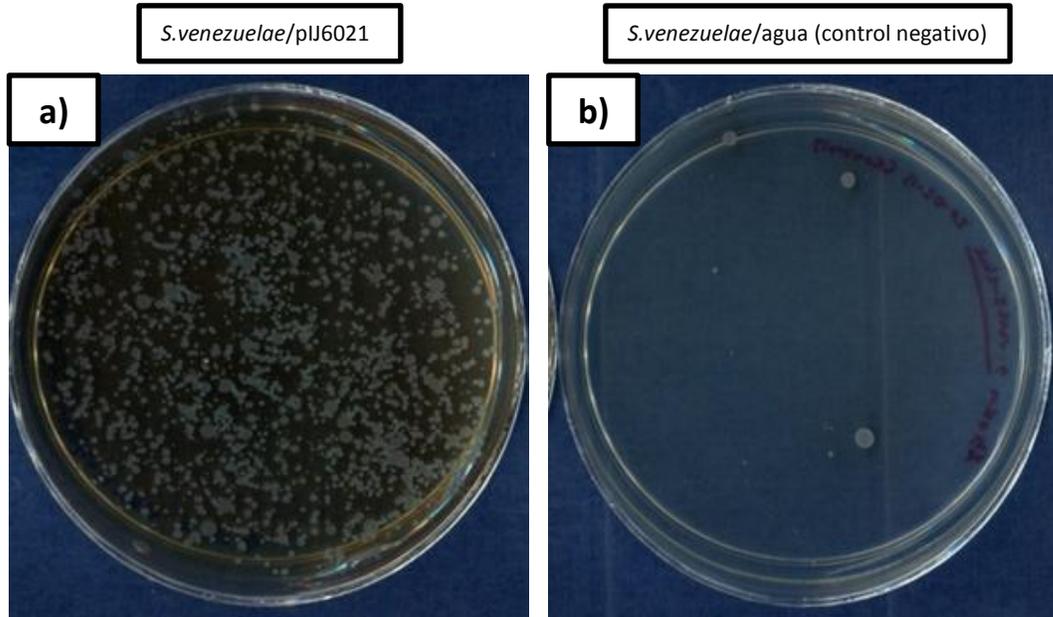
Como se observa en la figura 11, los productos de las digestiones corridas en los carriles 2, 3 y 4 corresponden al pB48, mientras que el carril 5 pertenece a una resistente espontánea; con lo que se confirma que la transformación por electroporación en *S. venezuelae* fue exitosa. Además, se corroboró que el plásmido multicopia pB48 se replica en *S. venezuelae*, lo cual sugiere que los plásmidos derivados del pJV1 son candidatos para la creación de un plásmido multicopia que se replique en *S. venezuelae*.

### 6.3.- Creación de un vector multicopia compatible con *S. venezuelae*

El vector multicopia pIJ6021 es utilizado en la sobreexpresión de proteínas en *S. lividans* y *S. coelicolor*. Dicho plásmido es un derivado del pIJ101 y se ha

demostrado que los derivados del mismo, no se replican en *S. venezuelae*. (Aidoo, *et al.*, 1990)

### Electrporación de *S. venezuelae*



**Figura 12.** (a) Caja petri con las transformantes de *S. venezuelae*/pIJ6021 sembradas en medio R2-S+kanamicina. (b) Caja petri con las células de *S. venezuelae* electroporadas con agua y sembradas en medio R2-S+kanamicina (control negativo).

En la Figura 12 se puede apreciar en (a) que las colonias de la caja de transformantes son muy pequeñas y poseen formas aberrantes; además, produjeron una cantidad considerable de pigmento, lo cual puede ser indicador de estrés en el crecimiento y desarrollo de la misma. En la caja del control negativo (b) crecieron cuatro colonias correspondientes a resistentes espontáneas. Cabe destacar que no se intentó purificar el plásmido pIJ6021 de las colonias debido a que los derivados del pIJ101, al ser transformados en *S. venezuelae*, no se pueden volver a aislar (Aidoo, *et al.*, 1990).

Con lo anterior se confirma que *S. venezuelae* posee un crecimiento lento y reducido cuando es transformada con vectores derivados del pIJ101.

Se planteó como objetivo crear un vector multicopia que fuera estable en *S. venezuelae*, que tuviera el promotor  $P_{tipA}$ , resistencia a tiosstreptón, origen de

replicación en el género *Streptomyces*, resistencia a apramicina y sitios únicos de EcoRI y NdeI para la clonación de genes en dichos sitios.

Como se vio en el apartado 6.2., el pB48 fue electrotransformado y purificado de *S. venezuelae*, con lo que se demuestra su viabilidad en dicha actinobacteria. Por lo tanto, el vector pB61, también derivado del pJV1, se ocupó como base para la creación de un vector multicopia.

El plásmido pB61 fue clonado con un fragmento proveniente del pIJ6902 y transformado tanto en *S. venezuelae* como en *S. lividans*.

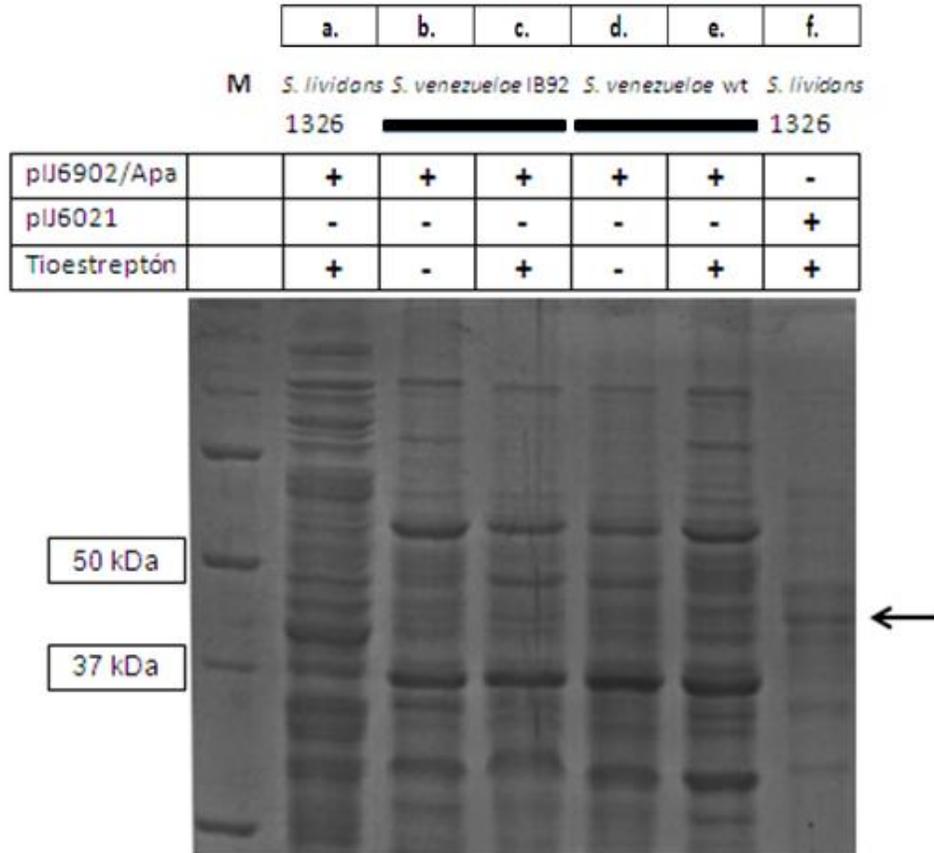
La construcción del pB61+pIJ6902 no se logró conseguir ya que al ser analizados por restricción los productos de las extracciones de DNA, tanto de *S. lividans* como de *S. venezuelae*, mostraron patrones aberrantes. Al parecer existe cierta incompatibilidad entre el fragmento del pB61 y el del pIJ6902 que produce rearrreglos conformacionales del vector, lo cual lo hace inestable.

Debido a que no se logró obtener una construcción estable de un vector multicopia que se replicara en *S. venezuelae*, los esfuerzos fueron enfocados en la expresión de proteínas en el vector monocopia pIJ6902.

#### 6.4.-Expresión de la proteína Apa en *S. venezuelae*

Una vez demostrado que la cepa IB92, a la que se introdujo el sistema *tipA-P<sub>tipA</sub>*, daba buenos resultados en cuanto a expresión, se procedió a introducir a la misma el plásmido pIJ6902+Rv1860, el cual contiene al gen que codifica para la proteína Apa de *M. tuberculosis* clonado bajo el promotor *P<sub>tipA</sub>*. La misma construcción se introdujo en la cepa silvestre de *S. venezuelae* y de *S. lividans* como control; posteriormente, se pusieron cultivos de dicha cepa y se analizaron las proteínas de los sobrenadantes de cultivo mediante geles de poliacrilamida y ensayos de inmuno-blot para la proteína Apa. Adicionalmente se incluyó en el experimento a *S. lividans* con el gen Rv1860 clonado bajo el control del promotor *P<sub>tipA</sub>* en un vector de alto número de copias (pIJ6021).

## Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie de sobrenadantes con la proteína Apa



**Figura 13.-** Expresión de la proteína Apa en *S. lividans* y *S. venezuelae*. Gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de coomassie con muestras de sobrenadantes de cultivo. En el primer carril tenemos el marcador de peso molecular, en **a)** *S. lividans* con pIJ6902+Rv1860 inducida con tioestreptón; **b)** Cepa IB92/pIJ6902+Rv1860 sin inducir; **c)** Cepa IB92/pIJ6902+Rv1860 inducida con tioestreptón; **d)** Cepa silvestre de *S. venezuelae* con pIJ6902+Rv1860 sin inducir; **e)** Cepa silvestre de *S. venezuelae* con pIJ6902+Rv1860 inducida con tioestreptón y **f)** *S. lividans* con pIJ6021+Rv1860 inducida con tioestreptón. La banda correspondiente a la proteína Apa se aprecia señalada con una flecha a una altura de 45 kDa.

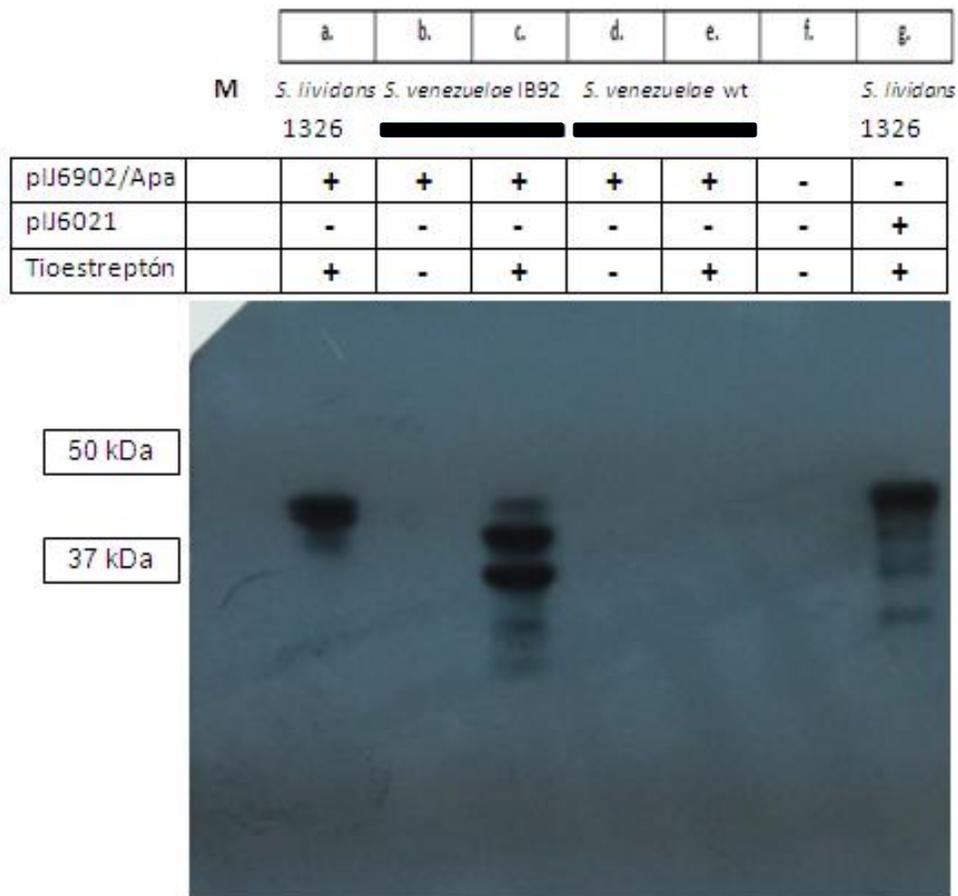
En la Figura 13 es posible apreciar la banda correspondiente a la proteína Apa (con un peso aproximado de 45 kDa) en el sobrenadante proveniente de *S. lividans* con el vector multicopia (carril g). En los demás carriles no se logra

observar la banda de la proteína debido a que la expresión en vector monocopia es muy baja como para ser apreciada en un gel teñido con azul de Coomassie.

Para corroborar la presencia de la proteína Apa en los sobrenadantes, se realizó un ensayo de inmuno-blot de las mismas muestras de la fig. 13 revelado con anticuerpo para la proteína Apa.

Se dejó un carril vacío antes de la expresión en *S. lividans* con el vector multicopia debido a que suele ser muy intensa al ser detectada en el ensayo inmuno-blot.

### Inmuno-blot revelado con anticuerpo para la proteína Apa



**Figura 14.** Identificación por inmuno-blot de la proteína Apa en sobrenadantes de cultivo. En el primer carril tenemos el marcador de peso molecular. En **a)** *S. lividans* con pIJ6902+Rv1860 inducida con tioestreptón; **b)** Cepa IB92/pIJ6902+Rv1860 sin inducir; **c)** Cepa IB92/pIJ6902+Rv1860 inducida con tioestreptón; **d)** Cepa silvestre de *S. venezuelae* con pIJ6902+Rv1860 sin inducir; **e)** Cepa silvestre de *S. venezuelae* con pIJ6902+Rv1860

inducida con tioestreptón; f) carril vacío y g) *S. lividans* con pIJ6021+Rv1860 inducida con tioestreptón.

Es posible observar en la Figura 14 que el anticuerpo reconoció a la proteína Apa tanto en los carriles correspondientes a *S. lividans* como en el de la cepa IB92 inducida con tioestreptón (carril d); sin embargo, en este último se observan cuatro bandas por debajo de la correspondiente a la proteína Apa, incluso más marcadas que la banda original de la proteína, lo cual indica que está siendo degradada en el sobrenadante de *S. venezuelae*. Con lo anterior se podría sugerir la presencia de una proteasa secretada por *S. venezuelae* que posee afinidad por la proteína Apa, por tal motivo se aprecia tan degradada a pesar de haber sido detectada en el inmunoblot sólo dos días después de haber sido purificada del sobrenadante de *S. venezuelae*.

También se observa degradación de la proteína Apa en el carril de *S. lividans* con vector multicopia, aunque menos en comparación con la observada en la cepa IB92; no obstante, dicha degradación se explica debido a que la muestra de *S. lividans* que se utilizó no era fresca y estuvo guardada a  $-70^{\circ}\text{C}$ , circunstancia en la cual se ha observado que las proteínas comienzan a degradarse.

Cabe destacar que en los carriles correspondientes a *S. venezuelae* silvestre y de la cepa IB92 sin inducir con tioestreptón, no se observa la presencia de la proteína Apa, con lo cual se confirma una vez más el correcto funcionamiento del sistema *tipA-P<sub>tipA</sub>* en *S. venezuelae* cuando están presentes el gen *tipA*, el promotor *P<sub>tipA</sub>* y se ha inducido con tioestreptón.

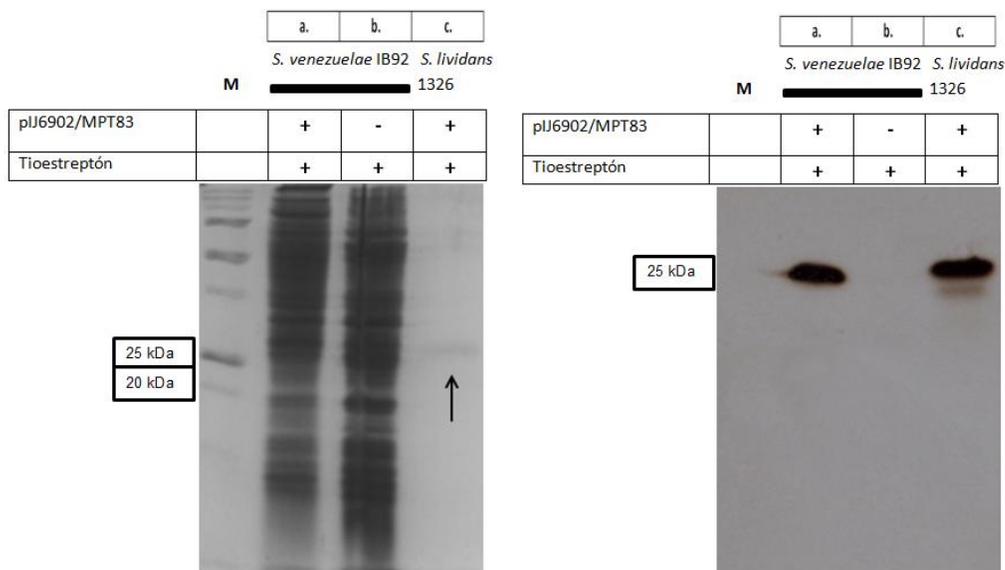
### 6.5.-Expresión de las proteínas MPT83 y LpqH en *S. venezuelae*

La glicoproteína Apa, a pesar de ser expresada en cantidades considerables por *S. venezuelae*, se apreció degradada en los ensayos de inmunoblot; por tal motivo, y para seguir evaluando a la cepa de *S. venezuelae* que construimos, se expresaron dos lipoglicoproteínas provenientes de *M. tuberculosis*: MPT83 y LpqH.

El peso molecular de la proteína MPT83 madura y glicosilada, expresada en *M. tuberculosis*, es de 22 kDa; mientras que el peso de LpqH, bajo las mismas condiciones, es de 16.7 kDa. Ambas proteínas, a pesar de estar ancladas a la membrana, en algunos casos son "rasuradas" al sobrenadante, es decir, son proteolizadas por enzimas secretadas al medio por la misma actinobacteria.

Se realizaron geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie y ensayos de inmunoblot para ambas proteínas.

**(I) Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie de membranas con la proteína MPT83. (D) Inmuno-blot de membrana revelado con anticuerpo para la proteína MPT83**



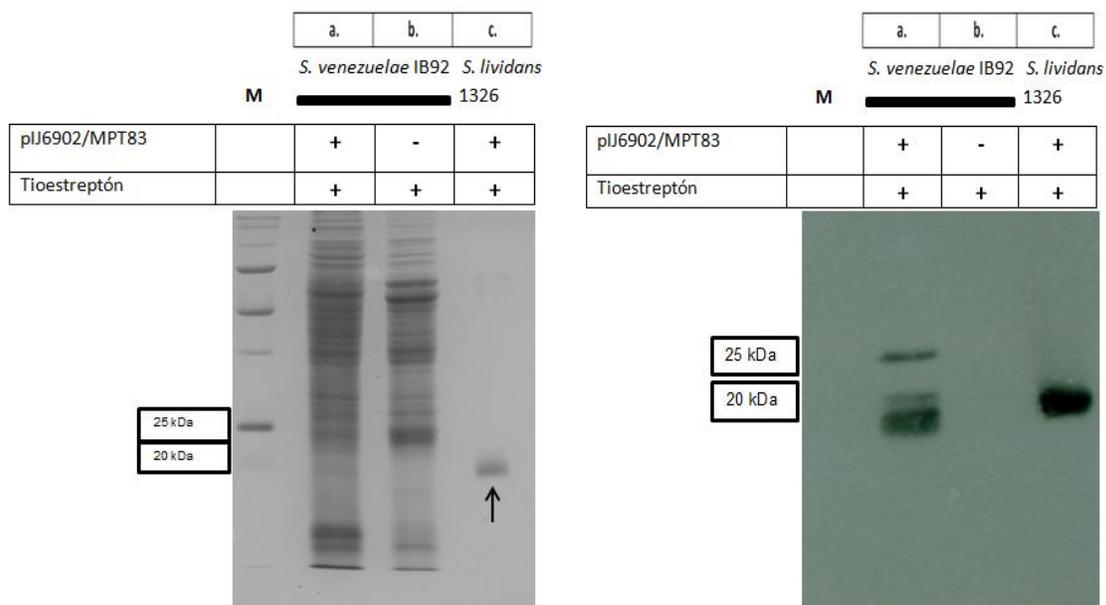
**Figura 15. I)** Tinción con azul de Coomassie de muestras provenientes de fracciones de membrana. En el primer carril tenemos el marcador de peso molecular, en **a)** IB92/pIJ6902+MPT83 inducida con tioestreptón; **b)** IB92 inducida con tioestreptón y **c)** MPT83 purificada de *S. lividans*. La banda señalada con la flecha corresponde a la proteína MPT83. **D)** Ensayo de Inmuno-blot teñido con 3,3-diaminobenzoidina para identificar la presencia de la proteína en las fracciones de membrana. En el primer carril tenemos el marcador de peso molecular, en **a)** IB92/pIJ6902+MPT83 inducida con tioestreptón; **b)** IB92 inducida con tioestreptón y **c)** MPT83 purificada de *S. lividans*.

Como se puede apreciar en la Figura 15 del lado izquierdo, el corrimiento de la proteína MPT83 observado en la muestra purificada de membrana de *S. lividans* corresponde a una masa molecular de aproximadamente 25 kDa, lo cual es mayor al peso teórico calculado de la proteína. Lo anterior aparentemente se debe a un corrimiento aberrante que se ha reportado en la literatura y que pudiera deberse al tipo de plegamiento de esta proteína, así como a la adición de la parte lipídica y de los azúcares.

En el western blot de la Figura 15 se logra apreciar tanto la muestra proveniente de *S. venezuelae* como la de *S. lividans* a una altura de 25 kDa. En el caso de la primera se aprecia ligeramente abajo; no obstante, puede ser producto de un empalme levemente inclinado al momento de revelar el western blot. En el carril de *S. lividans* hay degradación de la proteína debido a que las muestras de proteína purificada que se utilizaron no eran frescas.

Una vez observada la proteína MPT83 en muestras de membrana, se procedió a analizar extractos de sobrenadante.

**I) Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie de sobrenadante con la proteína MPT83. (D) Inmuno-blot de sobrenadante revelado con anticuerpo para la proteína MPT83**



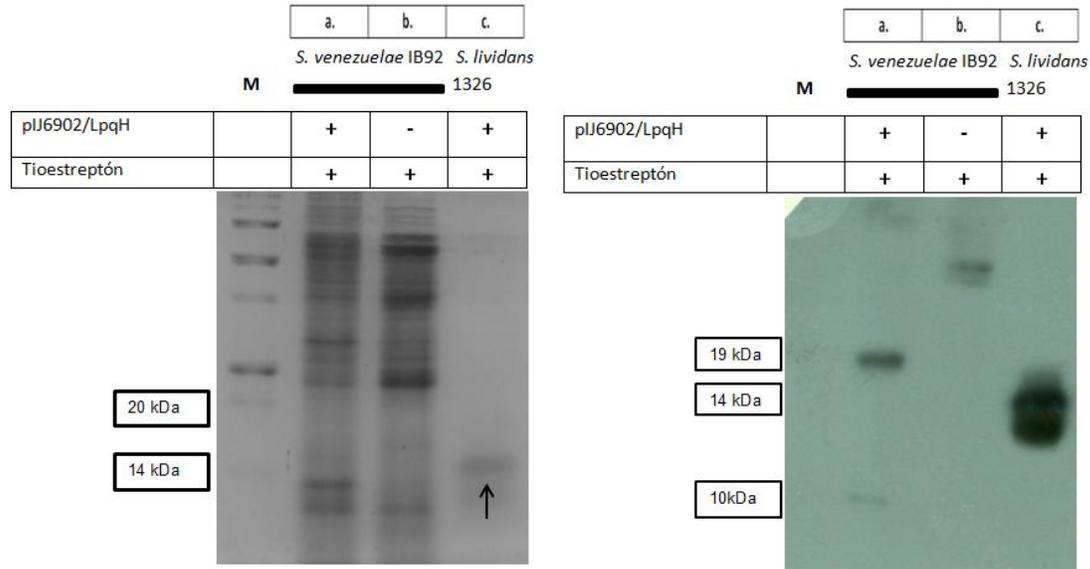
**Figura 16. I)** Tinción con azul de Coomassie de muestras provenientes de sobrenadante. En el primer carril tenemos el marcador de peso molecular, en **a)** IB92/pIJ6902+MPT83 inducida con tioestreptón; **b)** IB92 inducida con tioestreptón y **c)** MPT83 purificada de *S. lividans*. La banda señalada con la flecha corresponde a la proteína MPT83. **D)** Ensayo de inmuno-blot teñido con 3,3- diaminobencidina para identificar la presencia de la proteína en las fracciones de sobrenadante. En el primer carril tenemos al marcador de peso molecular, en **a)** IB92/pIJ6902+MPT83 inducida con tioestreptón; **b)** IB92 inducida con tioestreptón y **c)** MPT83 purificada de *S. lividans*.

El peso molecular de MPT83 observado en la Figura 16 (izquierda) es menor al esperado, sin embargo, esto es debido a que la proteína ha sido “~~su~~surada” de la membrana hacia el sobrenadante, con lo cual se pierde el péptido señal de la proteína y un pedazo de la misma. En cuanto al western blot de la Figura 16, el peso observado para la proteína proveniente de *S. lividans* es entre 19 y 20 kDa, mientras que en el carril de *S. venezuelae* se pueden apreciar varias bandas: una de aproximadamente 24 kDa, una de entre 19 y 20 kDa y una de 18 kDa.

La banda más tenue es la de 19 a 20 kDa que se localiza a la misma altura que la presentada por *S. lividans*; posteriormente está la banda de 24 kDa, la cual tiene un peso mayor a la purificada de *S. lividans*; sin embargo, ya que las proteasas cortan en distintos sitios, se podría sugerir que, en *S. venezuelae*, alguna proteasa cortó a la proteína en un residuo de aminoácido muy pegado a la membrana, por tal motivo se conservó prácticamente completa. Finalmente, la banda que presentó mayor intensidad fue la de 18 a 19 kDa, que corresponde a la de mayor degradación, lo cual se podría explicar por una intensa actividad de una proteasa secretada por *S. venezuelae*.

Debido a que la expresión de MPT83 en *S. venezuelae* se realizó en vector monocopia, la cantidad de proteína expresada (tanto en membrana como en sobrenadante) no fue suficiente para apreciarse en el gel teñido con azul de Coomassie, en contraste con la purificada de vector multicopia en *S. lividans*.

**I) Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie de sobrenadante con la proteína LpqH. (D) Inmuno-blot de sobrenadante revelado con anticuerpo para la proteína LpqH**



**Figura 17: I)** Tinción con azul de Coomassie de muestras provenientes de sobrenadante. En el primer carril tenemos al marcador de peso molecular, en **a)** IB92/pIJ6902+LpqH inducida con tioestreptón; **b)** IB92 inducida con tioestreptón y **c)** LpqH purificada de *S. lividans*. La banda marcada con una flecha corresponde a la proteína LpqH. **D)** Ensayo de Inmuno-blot teñido con 3,3-diaminobencidina para identificar la presencia de la proteína en las fracciones de sobrenadante. En el primer carril tenemos al marcador de peso molecular, en **a)** IB92/pIJ6902+LpqH inducida con tioestreptón; **b)** IB92 inducida con tioestreptón y **c)** LpqH purificada de *S. lividans*.

Para el caso de LpqH en el gel teñido con azul de Coomassie, el peso de la proteína purificada de sobrenadante de *S. lividans* se aprecia a 14 kDa, peso menor al descrito en la literatura; lo cual se explica porque se rasuró de la membrana hacia el sobrenadante. Por otro lado, ya que la expresión de LpqH en *S. venezuelae* se realizó en vector monocopia, no se logra apreciar en el gel.

En el inmuno-blot de la Figura 17, en el carril correspondiente a IB92 inducida con tioestreptón, se puede apreciar una banda de 19 kDa y otra de menor intensidad a

10 kDa, mientras que la proteína purificada de *S. lividans* se aprecia a una altura de 14 kDa. Al considerar que el peso molecular de LpqH es 19 kDa, se puede sugerir que en el extracto de IB92 la proteína fue rasurada de la membrana en un residuo de aminoácido próximo al sitio de anclaje de la proteína; además, no se encuentra bajo una actividad tan intensa de proteólisis ya que la banda de 10 kDa es muy tenue.

A pesar de ser el control negativo, se puede apreciar una banda en el carril b; sin embargo, esto se podría explicar debido a que el anticuerpo utilizado para LpqH fue policlonal, por lo tanto puede presentar cierta inespecificidad en el reconocimiento de la proteína. Por otro lado, al sobreexpresar proteínas bajo un promotor fuerte (como lo es el promotor  $P_{tipA}$ ) la expresión de otras proteínas se ve afectada, por eso no apreciamos esa banda en el carril a.

Para LpqH, los inmuno-blots realizados con muestras de membrana fueron inespecíficos a pesar de que se aumentó el tiempo de bloqueo con leche y se diluyó tanto el anticuerpo primario como el secundario. Por tal motivo no se muestran las imágenes en este trabajo.

## 7. CONCLUSIONES

El sistema *tipA-P<sub>tipA</sub>*, nativo en *S. coelicolor* y *S. lividans*, es funcional en *S. venezuelae* si se introduce a la misma el gen *tipA*.

La transformación mediante electroporación en *S. venezuelae* es un método adecuado para la introducción de DNA en esta especie.

La cepa modificada de *S. venezuelae* mediante la introducción del sistema *tipA-P<sub>tipA</sub>* es eficiente para la expresión de glicoproteínas provenientes de *M. tuberculosis*; sin embargo, en el caso de la proteína Apa se observó una mayor degradación de la misma en comparación con la purificada de *S. lividans*.

Las proteínas MPT83 y LpqH fueron expresadas correctamente en *S. venezuelae*, aunque en el caso de MPT83 se aprecia más degradada que la expresada por *S. lividans*.

Se comprobó que los plásmidos derivados del pJV1 se replican adecuadamente en *S. venezuelae*.

## 8. PERSPECTIVAS

Será necesario continuar evaluando a *S. venezuelae* como modelo en la expresión de genes heterólogos, a través de la expresión de una proteína citoplasmática que no se exporte al sobrenadante; un buen candidato es la proteína SCO5330 de *S. coelicolor*.

Mediante pruebas con la lectina Concanavalina A, determinar si el sistema de glicosilación en *S. venezuelae* reconoce y manosa de forma correcta las glicoproteínas heterólogas Apa, MPT83 y LpqH

Será importante explorar alternativas en la construcción de un vector multicopia compatible con *S. venezuelae*.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- ❖ **Aidoo D., Barrett C. and Vining L.**, 1990, Plasmid transformation of *Streptomyces venezuelae*: modified procedures used to introduce gene(s) for p-aminobenzoate synthase, *Journal of General Microbiology*, Vol. 136, p. 657-662.
- ❖ **Anné J. and Van Mellaert L.**, 1993, *Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 114, p. 121 – 128.
- ❖ **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.
- ❖ **Bailey C., Bruton C., Butler M., Chater K., Harris J. and Hopwood D.**, 1986, Properties of *in vitro* derivatives of pJV1, a multi-copy plasmid from *Streptomyces phaeochromogenes*, *Journal of Microbiology*, Vol. 132, p. 2071-2078.
- ❖ **Benz I. and Schmidt M.**, 2002, Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria, *Molecular Microbiology*, Vol 45, p. 267–276.
- ❖ **Bibb M., Ward J. and Hopwood D.**, 1978, Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency, *Nature*, Vol. 274, p. 398–400
- ❖ **Bierman M., Logan R., Obrien K., Seno E., Rao R. and Schoner B.**, 1992, Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp., *Gene*, Vol. 116, p. 43–49.
- ❖ **Binda E., Marcone G., Berini F., Pollegioni L. and Marinelli F.**, 2013, *Streptomyces* spp. as efficient expression system for a D,D-peptidase/D,D-carboxypeptidase involved in glycopeptide antibiotic resistance, *BMC Biotechnology*, p.1-12.
- ❖ **Bradford M.**, 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Analytical Biochemistry*, Vol. 72, p. 248-254.
- ❖ **Bradley S. and Ritzi D.**, 1968, Composition and ultrastructure of *Streptomyces venezuelae*, *Journal of Bacteriology*, Vol. 95, No. 6, p. 2358-2364.

- ❖ **Chater K.**, 1993, Genetics differentiation in *Streptomyces*, Annual Review of Microbiology, Vol. 47, p. 685-713.
- ❖ Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2013, en línea: <http://www.cdc.gov/tb/topic/basics/default.htm>
- ❖ **Córdova-Dávalos L., Espitia C., González-Cerón G., Arreguín-Espinosa R., Soberón-Chávez G. and Servín-González L.**, 2013, Lipoprotein N-acyl transferase (Lnt1) is dispensable for protein O-mannosylation by *Streptomyces coelicolor*, FEMS Microbiology Letters, Vol. 350, p. 72-82.
- ❖ **Cundliffe E.**, 1971, The mode of action of thiostrepton *in vivo*, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 44, No. 4, p. 912-917.
- ❖ **Cundliffe E.**, 1978, Mechanism of resistance to thiostrepton in the producing-organism *Streptomyces azureus*, Nature, Vol. 272, p. 792-795.
- ❖ **Doull J., Vining L. and Stuttard C.**, 1983, A cryptic plasmid in the chloramphenicol-producing actinomycete, *Streptomyces phaeochromogenes*, FEMS Microbiology Letters, Vol. 16, p. 349 – 352.
- ❖ **Espitia C., Servín González L. and Mancilla R.**, 2010, New insights into protein O-mannosylation in actinomycetes, Molecular BioSystems, Vol. 6, p. 775-781.
- ❖ **Espitia C. and Mancilla R.**, 1989, Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens, Clinical and Experimental Immunology, Vol. 77, p. 378–383.
- ❖ **Gamboa-Suasnavart R., Valdez N., Cordova L., Martínez J., Servin L., Espitia C. and Trujillo M.**, 2011, The O-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 KDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flasks, Microbial Cell Factories, Vol. 10, p. 1-11.
- ❖ **González Cerón G., Olivares O.J. and Servín-González L.**, 2009, Characterization of the methyl-specific restriction system of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and of the role played by laterally acquired nucleases, FEMS Microbiology Letters, Vol. 301, No. 1, p. 35-43.

- ❖ **González-Cerón G., Licona P. and Servín-González L.,** 2001, Modified *xyIE* and *xyITE* reporter genes for use in *Streptomyces*: analysis of the effect of *xyIT*, FEMS Microbiology Letters, Vol. 196, p. 229-234.
- ❖ **González Zamorano M., Mendoza-Hernández G., Xolalpa W., Parada C., Vallecillo A., Bigi F. and Espitia C.,** 2009, *Mycobacterium tuberculosis* glycoproteomics based on ConA-Lectin affinity capture of mannosylated proteins, Journal of proteome research, Vol. 8, p. 721 – 733.
- ❖ **Gregory M., Till R. and Smith C.,** 2003, Integration site for *Streptomyces* phage ΦBT1 and development of site-specific integrating vectors, Journal of Bacteriology, Vol. 185, No. 17, p. 5320-5323.
- ❖ **Grant S.G., Jeseo J., Bloom F.R. and Douglas H.,** 1990, Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants, Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 87, p.4645-4649.
- ❖ **Harayama S. and Timmis K.,** 1988, Catabolism of aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas*, Genetics of Bacterial Diversity, Academic Press, London, p.151-174.
- ❖ **Hewinson R., Michel S., Rusell W., McAdam R. and Jacobs W.,** 1996, Molecular characterization of MPT83: a seroactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPT70, Scandinavian Journal of Immunology, Vol. 43, p. 490 – 499.
- ❖ **Holmes D., Caso J. and Thompson C.,** 1993, Autogenous transcriptional activation of a thiostrepton-induced gene in *Streptomyces lividans*, The EMBO Journal, Vol. 12, No. 8, p. 3183-3191.
- ❖ **Horn C., Namane A., Pescher P., Riviere M., Romain F., Puzo G., Barzu O. and Marchal G.,** 1999, Decreased capacity of recombinant 45/47-kDa molecules (Apa) of *Mycobacterium tuberculosis* to stimulate T lymphocyte responses related to changes in their mannosylation pattern, Journal of Biological Chemistry, Vol. 274, p. 32023-32030.
- ❖ **Horton R., Perry J., Moran L., Rawn D. and Scrimgeour K.,** 2008, Principios de Bioquímica , Prentice Hall, 4ª ed., USA, p. 274-278 y 241-243.

- ❖ **Huang J., Shi J., Molle V., Sohlberg B., Weaver D., Bibb M., Karoonuthaisiri N., Lih C., Kao C., Buttner M. and Cohen S., 2005,** Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*, *Molecular Microbiology*, Vol. 58, No. 5, p. 1276 – 1287.
- ❖ **Hugo N., Armengaud J., Gaillard J., Timmis K. and Jouanneau Y., 1998,** A novel [2Fe-2S] ferredoxin from *Pseudomonas putida* mt-2 promotes the reductive reactivation of catechol 2,3 dioxygenase, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 273, p. 9622-9629.
- ❖ **Jung W., Lee S., Hong J., Park S., Jeong S., Han A., Sohng J., Kim B., Choi C., Sherman D. and Yoon Y., 2006,** Heterologous expression of tylosin polyketide synthase and production of a hybrid bioactive macrolide in *Streptomyces venezuelae*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 72, p. 763–769.
- ❖ **Kaufmann, S., 2011,** Fact and fiction in tuberculosis vaccine research: 10 years later, *Lancet Infectious Diseases*, Vol. 11, p. 633-40.
- ❖ **Kieser T., Bibb M., Buttner M., Chater K. and Hopwood D., 2000,** *Practical Streptomyces genetics*, Norwich, England: John Innes Foundation.
- ❖ **Kumar P., Amara R., Challu V., Chadda V. and Satchidanandam V., 2003,** The Apa protein of *Mycobacterium tuberculosis* stimulates gamma interferon-secreting CD4+ and CD8+ T cells from purified protein derivative positive individuals and affords protection in a guinea pig model, *Infection and Immunity*, Vol. 71, p. 1929-1937.
- ❖ **Laqueyrie A., Miltzer P., Romain F., Eiglmeier K., Cole S. and Marchal G., 1995,** Cloning, sequencing and expression of the apa gene coding for the *Mycobacterium tuberculosis* 45/47-kilodalton secreted antigen complex, *Infection and Immunity*, Vol. 63, p. 4003-4010.
- ❖ **Lara M., Servin-González L., Singh M., Moreno C., Cohen I., Nimitz M. and Espitia C., 2004,** Expression, secretion and glycosylation of the 45- and 47-kDa glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans*, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, No. 2, p.679-685.

- ❖ **Lechner J. and Wieland F.**, 1989, Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins, Annual Review of Biochemistry, Vol. 58, p. 173-94.
- ❖ **Madigan M., Martinko J., Dunlap P. and Clark D.**, 2009, Brock, Biología de los Microorganismos. Madrid, Pearson, 12a. edición, p. 1083
- ❖ **Marinelli F. and Marcone G.**, 2011, Small molecules, microbial secondary metabolites. In Comprehensive Biotechnology 2<sup>nd</sup> Edition volume 3. Edited by Moo-Young M. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier; 285-297.
- ❖ **McNeil D., Gewain K., Occi J. and Foor F.**, 1992, Vectors for generating nested deletion and facilitating subcloning G+C-rich DNA between *Escherichia coli* and *Streptomyces* sp. Gene, Vol. 119, No.1, p. 149-150.
- ❖ **Murakami T., Holt T. and Thompson C.**, 1989, Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*, Journal of Bacteriology, Vol.171, No. 3, p. 1459-1466.
- ❖ **Park S., Park J., Jung W., Han A., Ban Y., Kim E., Sohng J., Sim S. and Yoon Y.**, 2008, Heterologous production of epothilones B and D in *Streptomyces venezuelae*, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 81, p. 109–117.
- ❖ **Pigac J. and Schrempf H.**, 1995, A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other *Streptomyces* by electroporation, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 61, No. 1, p. 352-356.
- ❖ **Polissi A. and Harayama S.**, 1993, *In vivo* reactivation of catechol 2,3-dioxygenase mediated by a chloroplast-type ferredoxin: a bacterial strategy to expand the substrate specificity of aromatic degradative pathways, The EMBO Journal, Vol. 12, p. 3339-3347.
- ❖ **Ragas A., Roussel L., Puzo G. and Riviere M.**, 2007, The *Mycobacterium tuberculosis* cell surface glycoprotein Apa as a potential adhesin to colonize target cells via the innate immune system pulmonary C-type lectin surfactant protein, Journal of Biological Chemistry, Vol. 282, p. 5133-5142.
- ❖ **Romain F., Horn C., Pescher P., Namane A., Riviere M., Puzo G., Barzu O. and Marchal G.** 1999, Deglycosylation of the 45/47 kilodalton antigen complex

- of *Mycobacterium tuberculosis* decreases its capacity to elicit *in vivo* or *in vitro* cellular immune responses, *Infection and Immunity*, Vol. 67, p.5567-5572.
- ❖ **Scherr N. and Nguyen L.**, 2009, *Mycobacterium* versus *Streptomyces* —we are different, we are the same, *Current opinion in Microbiology*, Vol. 12, p. 699-707.
  - ❖ **Servin-González L.**, 1993, Relationship between the replication functions of *Streptomyces* plasmids pJV1 and pJ101, *Plasmid*, Vol. 30, p. 131-140.
  - ❖ **Servin-González L., Sampieri A., Cabello J., Galván L., Juárez V. and Castro C.**, 1995, Sequence and functional analysis of the *Streptomyces phaeochromogenes* plasmid pJV1 reveals a modular organization of *Streptomyces* plasmids that replicate by rolling circle, *Microbiology*, Vol.141, p. 2499-2510.
  - ❖ **Smokvina T., Mazodier P., Boccard F., Thomson C. and Guerineau M.**, 1990, Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes, *Gene*, Vol. 94, p. 53-59.
  - ❖ **Sonawane A., Mohantray S., Jagannathan L., Bekolay A. and Banerjee S.**, 2012, Role of glycans and glycoproteins in disease development by *Mycobacterium tuberculosis*, *Critical Reviews in Microbiology*, p. 1-17.
  - ❖ **Sthal P. and Ezekowitz R.**, 1998, The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense, *Current opinion in Microbiology*, Vol. 10, p. 50-55.
  - ❖ **Takano E., White J., Thompson C. and Bibb M.**, 1995, Construction of thiostrepton-inducible, high copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp., *Gene*, Vol.166, No.1, p. 133 – 137.
  - ❖ **Thompson C., Kieser T., Ward J. and Hopwood D.**, 1982, Physical analysis of antibiotic-resistance genes from *Streptomyces* and their use in vector construction, *Gene*, Vol. 20, p. 51-62.
  - ❖ **Torres A., Juárez M., Cervantes R. and Espitia C.**, 2001, Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* phosphate specific transport system in *Mycobacterium smegmatis*. Characterization of recombinant 38 KDa (PstS-1), *Microbial pathogenesis*, Vol. 30, p. 289-297.

- ❖ **VanderVen B., Harder D., Crick D. and Belisle J.**, 2005, Export-mediated assembly of mycobacterial glycoproteins parallels eukaryotic pathways, *Science*, Vol. 309, p. 941-943.
- ❖ **WHO**, 2011, WHO report 2011: Global tuberculosis control, p. 5-25. En línea: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2011/gtbr11\\_full.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf)
- ❖ World Health Organization (WHO), 2015, en línea: <http://www.who.int/topics/tuberculosis/es/>
- ❖ **Wiker H.**, 2009, MPB70 and MPB83 – Major antigens of *Mycobacterium bovis*, *Scandinavian Journal of Immunology*, Vol. 69, p. 492-499.

## 10. ANEXOS

### 10.1 Medios de cultivo

#### LB + Sacarosa

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

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

#### R2

-Sacarosa	10.3 g
-K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.025 g
-MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	1.0 g
-Glucosa	1.0 g

Aforar con agua Milli-Q a 80 ml

Posterior a la esterilización en autoclave añadir:

-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.5%)	1.0 ml
-CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O(3.68%)	8.0 ml
-L-Prolina	1.5 ml
-Tris-Cl(3%, pH=7.2)	10.0 ml

-Trazas R5*	0.2 ml
-CuSO <sub>4</sub>	0.2 ml
-NaOH (1N)	0.2 ml
-Extracto de levadura (10%)	5.0 ml

\*Trazas R5: ZnCl<sub>2</sub> 40 mg, FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O 200 mg, Cu Cl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 10 mg, MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O 10 mg, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 10H<sub>2</sub>O 10 mg, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 4H<sub>2</sub>O 10 mg.

### **YEME**

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

Aforar a 100 ml con agua Milli-Q, pH=7

Posterior a esterilización en autoclave añadir:

-MgCl <sub>2</sub> (1M)	0.5 ml
-Glicina 10%	5.0 ml

### **YT2X**

-Bactotripton	1.6 g
-Extracto de levadura	1.0 g

-NaCl 0.5 g

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

### **Preparación de Agar**

-Agar 1.5 g

Disolver en 50 ml de agua Milli-Q.

### **MS**

-Manitol 2.0 g

-Harina de soya 2.0 g

-Agar 0.2 g

Aforar a 100 ml con agua de la llave.

### **MS-Maltosa**

-Harina de soya 4.0 g

-Maltosa 2.0 g

Aforar a 100 ml con agua de la llave y autoclavar 2 veces en un matraz de 1 litro.  
Posteriormente, dividir en 2 botellas de 100 ml.

Fundir en un horno de microondas y mezclar con una preparación de agar.

### **M9-maltosa**

-Medio M9	1.0 g
-Maltosa 20%	2.5 ml

Aforar a 50 ml. con agua Milli-Q y posteriormente mezclar con una preparación de agar.

### **Agar suave para transformaciones**

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

Aforar a 100ml en agua Milli-Q

### **R2-S**

-K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.125 g
-MgCl <sub>2</sub>	5.06 g
-Maltosa	5.0 g
-Elementos Traza (R2)	1.0 ml
-Extracto de Levadura	2.5 g

-Trizma 1.5 g

Ajustar a pH 7.2 con HCl y Aforar a 500 ml con agua Milli-Q. Añadir 1.5 gramos de Agar a cada botella y esterilizarlas.

Posterior a esterilización en autoclave añadir:

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (.5%) 1.0 ml

-NaOH 0.2 ml

- $\text{CaCl}_2$  (1M) 2.0 ml

## 10.2. Soluciones

### **Sal difosfato**

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  8.7 g

Agua Milli-Q 100 ml

### **Sal Monofosfato**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.8 g

Agua Milli-Q 100 ml

### **Buffer fosfatos**

Agregar la Solución de la sal monofosfato a la sal difosfato hasta que llegue a un pH de 7.5.

### **Buffer para lavar**

-Buffer fosfatos 2.0 ml

-Agua 48 ml

### **Solución PEG**

-Sacarosa	0.65 g
-Glicerol	1.0 ml
-PEG 1000	3.0 g

Aforar a 100 ml con agua Milli-Q

## 10.3 Protocolos

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

- 1.- Correr el gel al 0.6% y teñir con Bromuro de etidio 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Iluminar el gel con luz UV de onda larga y cortar las bandas deseadas, procurando cortar la agarosa lo más cerca del DNA para reducir el volumen de la rebanada.
- 2.- Fundir la rebanada de agarosa que contiene el DNA en un tubo Eppendorf a 65-70°C, durante 10 minutos. Añadir 1/10 del volumen de NaCl 5 M, mezclar y dejar otros 5 minutos a 65-70°C.
- 3.- Saturar un poco de fenol con NaCl de la siguiente forma: en un tubo Eppendorf mezclar 100  $\mu\text{l}$  de NaCl 5 M, 400  $\mu\text{l}$  de agua y 500  $\mu\text{l}$  de fenol. Centrifugar 1 minuto, retirar la fase acuosa y mantener a 37°C.
- 4.- Mantener la agarosa fundida a 37°C, posteriormente añadir al tubo 2/3 de volumen del fenol saturado e inmediatamente agitar en vórtex durante 30 segundos. Centrifugar 5 minutos en la microfuga y transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
- 5.- Añadir al fenol 45  $\mu\text{l}$  de TE y 5  $\mu\text{l}$  de NaCl 5 M y agitar en vórtex, centrifugar por 2 minutos y mezclar la fase acuosa con la anterior.
- 6.- Agregar 1 volumen de fenol/cloroformo a la fase acuosa, agitar 15 segundos en vórtex y centrifugar por 2 minutos.
- 7.- Transferir la fase acuosa a un tubo limpio repetir el paso 6 pero sólo con cloroformo.
- 8.- Transferir a un tubo limpio la fase acuosa y añadir 1 volumen de isopropanol. Para aumentar la cantidad de DNA recuperado añadir 1  $\mu\text{g}$  de glicógeno. Mantener a -20°C al menos dos horas.
- 9.- Centrifugar todo el DNA durante 10 minutos a 14,000 r.p.m. en la microfuga, asegurándose de eliminar todo el alcohol con una micropipeta. Posteriormente secar el pellet y resuspenderlo en un volumen adecuado de TE.

## MINIPREPARACIONES DE DNA PLASMÍDICO

- 1.- Resuspender el paquete de células o el micelio en 200  $\mu$ l de Tris 25 mM, EDTA 25 mM, pH=8. En el caso de *Streptomyces*, el TE 25 mM debe contener lisozima 2 mg/ml.
- 2.- Para *E.coli* incubar 5 minutos en hielo. Para *Streptomyces* al menos de 1 a 3 horas a 37°C o hasta que el micelio este visiblemente lisado (debe ponerse translúcido y viscoso).
- 3.- Añadir 400  $\mu$ l de una solución fresca de NaOH 0.2 N, SDS 1%. Mezclar por inversión vigorosa los tubos, hasta que el contenido se vea transparente, homogéneo y muy viscoso. Cuesta más trabajo mezclar bien las preparaciones de *Streptomyces*, por lo tanto, los tubos deben mezclarse de manera invertida en vórtex durante varios segundos, hasta que no se vea rastro de micelio. Incubar 10 minutos en hielo.
- 4.- Añadir 300  $\mu$ l de acetato de potasio 3 M, pH=4.8, mezclar bien por inversión hasta que se pierda la viscosidad y se vea un precipitado blanco. Incubar 15 minutos en hielo. En el caso de *Streptomyces*, centrifugar a 13'000 rpm durante 10 minutos y pasar la fase acuosa a un tubo nuevo.
- 5.- Añadir al tubo 400  $\mu$ l de fenol/cloroformo, agitar 30 segundos en vórtex y centrifugar 2 minutos en la microfuga.
- 6.- Pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir 600  $\mu$ l de etanol absoluto frío. Dejar precipitando 5 minutos a temperatura ambiente.
- 7.- Centrifugar 10 minutos en la microfuga, retirar el sobrenadante con una punta y dar un segundo pulso en la microfuga; eliminar todo el sobrenadante.
- 8.- Resuspender el pellet en 50  $\mu$ l de TE (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH=8). Añadir 150  $\mu$ l de acetato de sodio 4 M, pH=6. Mezclar bien e incubar una hora a -20°C.
- 9.- Centrifugar 10 minutos en la microfuga. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio y añadir 200  $\mu$ l de isopropanol, mezclar muy bien y precipitar 10 minutos en hielo.
- 10.- Centrifugar 10 minutos en la microfuga. Eliminar todo el sobrenadante. Resuspender en 45  $\mu$ l de TE, mezclar bien, dar un pulso en la microfuga y añadir

5µl de acetato de sodio 3 M pH=6 y 125µl de etanol frío. Precipitar 10 minutos en hielo.

11.- Centrifugar 10 minutos en la microfuga y eliminar todo el sobrenadante.

12.-Secar el pellet y resuspenderlo en 20-25 µl de TE.

### **EXTRACCIÓN CON FENOL/CLOROFORMO DE LIGACIONES DE DNA**

1.- Agregar 100 µl de TE<sub>10</sub> y 100 µl de Fenol-Cloroformo a la ligación y mezclar en vórtex por 30 segundos.

2.- Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad.

3.- Pasar la fase acuosa a un tubo limpio y precipitar con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y un volumen de isopropanol (agregar 1 µl de glucógeno si la cantidad de DNA es escasa).

4.- Enfriar 2 horas a -20°C.

5.- Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad, eliminar el sobrenadante y agregar 1 mililitro de etanol 70%

6.- Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad, eliminar el sobrenadante y secar muy bien en la campana de extracción

7.- Resuspender en 5 µl de agua estéril.

### **TRANSFORMACIÓN DE *S. lividans* POR PROTOPLASTOS**

1.- Inocular 100 µl de una preparación densa de esporas en 25 ml de medio YEME suplementado con 125 µl de MgCl<sub>2</sub> 1M y 1.25 ml de glicina al 10% e incubar a 30°C con agitación de 36 a 40 horas en un matraz con resorte.

2.- Pasar el cultivo a un tubo de centrifuga, enjuagar el matraz con 10 ml de sacarosa al 10.3% y agregar esto último al tubo. Mezclar y centrifugar a 3500 r.p.m. por 10 minutos y a 27°C.

3.- Resuspender el pellet en 20 ml de sacarosa 10.3% y centrifugar a 3500 r.p.m. durante 10 minutos a 27°C. Repetir 2 veces y almacenar el pellet de micelio a -20°C.

4.- Pesar 7.5 mg de lisozima y agregar 5 ml de Buffer P, disolver y filtrar a través de un filtro Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro. Agregar al micelio la solución de lisozima en buffer P. Mezclar e incubar a 30°C durante 1 hora con agitación suave cada 15 minutos. Tomar muestra para observar al microscopio y asegurarse que los protoplastos estén bien formados.

5.- Filtrar los protoplastos a través de algodón estéril y después agregar al filtro 5 ml de buffer P para lavar. Pasar el filtrado a un tubo con rosca y centrifugar a 3500 r.p.m., por 10 minutos a 27°C.

6.- Eliminar el sobrenadante y resuspender suavemente en la gota de buffer P que haya quedado en el tubo. Agregar 3  $\mu\text{l}$  de plásmido purificado (dependiendo de la concentración de plásmido). Inmediatamente agregar 0.6 ml de Polietilenglicol (PEG1450) al 25% en buffer P con ayuda de una pipeta Pasteur y mezclar subiendo y bajando los protoplastos de la pipeta dos o tres veces. Agregar 5 ml de Buffer P y centrifugar a 3500 r.p.m. durante 10 minutos.

7.- Eliminar el sobrenadante y resuspender en 0.3 ml de buffer P.

8.- Hacer diluciones y poner 100  $\mu\text{l}$  en cada caja de medio R2 suplementado. Posteriormente, agregar 2.5 ml de agar suave hipertónico a cada caja y procurar que éste cubra toda la superficie. Incubar a 30°C durante 15-20 horas.

9.-Después de pasado el tiempo, agregar antibiótico (variable dependiendo del plásmido) y dejar incubando a 30°C durante 1 semana o hasta que esporulen las colonias.

### ***Suplementación de buffer P***

1.- Agregar a 40 ml de buffer P: 100  $\mu\text{l}$  de Trazas R5, 0.5 ml de fosfato monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) al 0.5%, 5 ml de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.25M y 5 ml de Tris-Cl 0.25 M pH=7.2.

2.- Dejar reposar durante 30 minutos y después pasar por un filtro Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro.

### ***Preparación de Polietilenglicol (PEG)***

1.- Pesar 0.5 mg de PEG y disolverlo en 1.5 ml de buffer P previamente filtrado

### **TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* POR ELECTROPORACIÓN**

1.- Inocular 20 ml de medio YT2X sin magnesio con 0.1 ml de un precultivo de toda la noche. Incubar a 37°C con agitación constante hasta llegar a una densidad óptica de 0.6 a 600 nm (aproximadamente de 2-3 horas.)

2.- Centrifugar a 6000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C.

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

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

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

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

7.- Pasar a un tubo Eppendorf y centrifugar a 6000 r.p.m. durante 10 minutos.

Resuspender el pellet en medio YT2X sin magnesio y hacer diluciones.

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

9.- Tomar una colonia aislada y resuspenderla en 100 µl de medio YT2X.

10.-Poner un cultivo de 10 ml de medio YT2X + antibióticos inoculando con las células resuspendidas e incubando a 37°C durante 8 horas. Realizar minipreparaciones de plásmidos.

### **TRANSFORMACIÓN DE *S. venezuelae* POR ELECTROPORACIÓN**

1.- Poner en un agitador rotatorio, a 250 r.p.m. por 16 horas y a 30°C, 30 µl de *S. venezuelae* en 30 ml de YT2X.

2.- Pasadas las 16 horas observar al microscopio para corroborar que no haya esporulado, de no haber esporulado, cosecharlo por centrifugación durante 5 minutos a 4°C y a 10,000 r.p.m. Posteriormente resuspender en 30 ml de glicerol al 15% frío.

3.- De nuevo centrifugar y resuspender pero ahora en 15 ml de glicerol al 15% frío.

4.- Posteriormente suspender el micelio en 3 ml de glicerol al 15% que contenga lisozima (100 µg/ml). Cabe destacar que en este paso se debe filtrar la lisozima a través de una pequeña membrana millipore para que esté estéril.

5.- Incubar la suspensión a 37°C por 50 minutos. Revisarla constantemente hasta que se vea traslucida y un poco viscosa.

6.-Pasados los 50 minutos lavar un par de ocasiones con 8 ml de glicerol al 15% frío.

7. - Preparar un Buffer que contenga 30 gramos de PEG1000, 6.5 gramos de sacarosa y 10 ml de glicerol y finalmente aforarlo a 100 ml con agua desionizada. Suspender el pellet en 3 ml de este Buffer.

8.-Dividir lo obtenido en alícuotas de 70µl y colocarlas en tubos Eppendorf perfectamente marcados e inmediatamente congelarlas en hielo seco previamente triturado. Almacenar las alícuotas a -70 ° C.

9.-Tomar una de las alícuotas y descongelarla en un cuarto a temperatura ambiente (pero manteniendo en hielo) y agregarle un 1 µl de plásmido.

10.- Colocar la mezcla anterior en una cubeta para electroporar y darle un pulso eléctrico de 1.80 kV, es decir, el programa predeterminado como Ec1. De ser necesario, realizar este procedimiento una vez más, pero electroporar sin plásmido (como nuestro control negativo).

11.-Diluir la mezcla anterior en .75 mL de YT2X y ponerlo a incubar con agitación constante por 2 horas y media a 30°C.

12.-Ya pasadas las 2 horas y media, plaquear en cajas de Petri con medio R2-S y el antibiótico necesario (50 µg/ml).

13.-Poner a incubar a 30°C entre 48 y 72 horas.

### **TRANSFORMACIÓN POR CONJUGACIÓN ENTRE *E.coli* Y *S. lividans***

1.- Hacer un precultivo de *E. coli* ET12567/pUZ8002 con el plásmido de interés en 3 ml de YT2X con 50 µg/ml del antibiótico de interés, 25 µg/ml de cloranfenicol y 50 µg/ml de kanamicina e incubar a 37°C en agitación constante durante toda la noche.

2.- Inocular con el precultivo de *E. coli* un matraz con 20 ml de medio YT2X con los mismos antibióticos e incubar a 37°C con agitación constante durante 6-7 horas hasta llegar a una densidad óptica de 0.6 a 600 nm.

3.- Centrifugar a 6000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente y eliminar el sobrenadante.

4.- Resuspender el pellet en 20 ml de medio YT2X y centrifugar a 6000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente. Repetir 3 veces y resuspender en 300 µl de medio YT2X.

5.- Por otro lado, tomar 50 µl de una preparación densa de esporas de *S. lividans* en un tubo Eppendorf y centrifugar a 6000 r.p.m. durante 10 minutos.

6.- Resuspender el paquete de esporas en 100 µl de agua y volver a centrifugar para eliminar residuos de glicerol.

7.- Resuspender las esporas en 100 µl de medio YT2X y dar un choque térmico a 50°C durante 10 minutos.

8.- En un tubo Eppendorf juntar las esporas de *S. lividans* con las células de *E. coli*.

9.- Hacer diluciones, plaquear en cajas de Petri con medio MS + MgCl<sub>2</sub> 10 mM sin antibióticos e incubar a 30°C por 18-20 horas.

10.- Diluir en 5 ml de agua, 0.1 ml de una solución de ácido nalidíxico 50 mg/ml y 0.1 ml del antibiótico de interés 50 mg/ml.

11.- Inundar cada caja con 1ml de la dilución previa, procurando que cubra toda la superficie e incubar a 30°C hasta obtener colonias aisladas.

12.- Purificar las colonias exconjugantes de *S. lividans* mediante estrías en medio sólido MS + el antibiótico de interés (50 µg/ml) y ácido nalidíxico (50 µg/ml) para eliminar las células de *E. coli*.

13.- Incubar a 30°C hasta obtener colonias aisladas.

14.- Tomar una colonia aislada, de preferencia bien esporulada, resuspenderla en 0.5 ml de agua y colocar 0.1 ml de esta suspensión en cajas de medio MS + extracto de levadura 0.1% + el antibiótico de interés (50 µg/ml).

15.-Hacer confluentes e incubar a 30°C durante una semana para la obtención de esporas.

### **TRANSFORMACIÓN POR CONJUGACIÓN ENTRE *E. coli* Y *S. venezuelae***

1.- Hacer un precultivo de *E. coli* ET12567/pUZ8002 con el plásmido de interés en 3 ml de YT2X con 50 µg/ml del antibiótico de interés, 25 µg/ml de cloranfenicol y 50 µg/ml de kanamicina e incubar a 37°C en agitación constante durante toda la noche.

2.- Poner un cultivo de *S. venezuelae* en 20 ml de YT2X con los antibióticos de interés (50 µg/ml) y dejar crecer por 15 horas.

3.- Inocular con el precultivo de *E. coli* un matraz con 20 ml de medio YT2X con los mismos antibióticos e incubar a 37°C con agitación constante durante 6-7 horas hasta llegar a una densidad óptica de 0.6 a 600 nm.

4.- Centrifugar a 6000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente y eliminar el sobrenadante.

5.- Resuspender el pellet en 20 ml de medio YT2X y centrifugar a 6000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente. Repetir 2 veces y en la tercera centrifugación resuspender junto con el cultivo de *S. venezuelae*.

6.- Eliminar el sobrenadante y resuspender en 500 µl de medio YT2X.

7.- Hacer diluciones, plaquear en cajas de Petri con medio R2-S + MgCl<sub>2</sub> 10 mM sin antibióticos e incubar a 30°C por 6 horas.

- 8.- Diluir en 5 ml de agua, 0.1 ml de una solución de ácido nalidíxico 50 mg/ml y 0.1 ml del antibiótico de interés 50 mg/ml.
- 10.- Inundar cada caja con 1ml de la dilución previa, procurando que cubra toda la superficie e incubar a 30°C hasta obtener colonias aisladas.
- 11.- Purificar las colonias exconjugantes de *S. venezuelae* mediante estrías en medio sólido R2-S + el antibiótico de interés (50 µg/ml) y ácido nalidíxico (50 µg/ml) para eliminar las células de *E. coli*.
- 12.- Incubar a 30°C hasta obtener colonias aisladas
- 13.- Tomar una colonia aislada (de preferencia bien esporulada) y resuspenderla en 0.5 ml de agua, colocar 0.1 ml de esta suspensión en cajas de medio R2-S + el antibiótico de interés (50 µg/ml).
- 14.-Hacer confluentes e incubar a 30°C durante una semana para la obtención de esporas.

### **OBTENCIÓN DE PREPARACIONES DENSAS DE ESPORAS**

- 1.- Inocular cajas de Petri en forma *confluente* en medio R2-S e incubar hasta obtener esporulación (verde claro)
- 2.-Agregar a cada caja 10 ml de agua estéril y con ayuda de un asa bacteriológica raspar la superficie para separar las esporas del micelio.
- 3.- Recuperar los 10 ml de agua y homogenizar el micelio para que se liberen las esporas. Posteriormente, pasar a través de un filtro para esporas.
- 4.- Agregar 5 ml de agua al filtro para recuperar la mayor cantidad de esporas.
- 5.- Centrifugar el filtrado de esporas a 3500 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C.
- 6.- Eliminar el sobrenadante y lavar una vez con 10 ml de agua estéril para eliminar los restos del medio. Centrifugar a 3500 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C.
- 7.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el paquete de esporas en 1 ml de glicerol al 20%. Colocar en viales pequeños y almacenar a -20°C.

## **CRECIMIENTO DE ESPORAS DE *Streptomyces lividans* Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS**

Es necesario pregerminar las esporas antes de iniciar los cultivos.

- 1.- Tomar 500  $\mu$ l de una preparación densa de esporas en glicerol al 20% y pasarlas a un tubo Eppendorf. Centrifugar a 6000 r.p.m. durante 10 minutos y retirar el sobrenadante con una micropipeta.
- 2.- Añadir 500  $\mu$ l de agua para eliminar todo el glicerol, mezclar y centrifugar a 6000 r.p.m. durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y resuspender las esporas en 0.1 ml de medio YT2X. Añadir la suspensión de esporas a un matraz de 250-ml con 10 ml de medio YT2X. Incubar a 37°C durante 5-6 horas.
- 3.- Después de pasado el tiempo, observar una muestra al microscopio para asegurar que hubo buena germinación. Centrifugar todo el medio a 6000 r.p.m. durante 10 minutos. Eliminar rápidamente el sobrenadante.
- 4.- Añadir 10 ml de agua, resuspender el pellet y centrifugar a 6000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Resuspender el pellet en 10 ml de medio LB+sacarosa 25%. Pasar a un matraz de 500 ml con 100 ml del mismo medio con los antibióticos adecuados. Incubar a 30°C durante 16 horas con agitación constante.
- 6.- Posterior a las 16 horas inducir la expresión mediante la adición de 5  $\mu$ g/ml de tioestreptón. Incubar a 30°C hasta completar 36-40 horas con agitación constante.
- 7.- Posteriormente, centrifugar todo el cultivo a 7500 r.p.m. durante 10 minutos a 10°C. Guardar muestra de sobrenadante para el aislamiento de proteínas, y el micelio someterlo a fraccionamiento celular.

## **CRECIMIENTO DE ESPORAS DE *Streptomyces venezuelae* Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS**

- 1.- Tomar 500  $\mu$ l de una preparación densa de esporas en glicerol al 20% y colocarlas en 100 ml de medio YT2X con los antibióticos de interés.
- 2.-Poner a crecer en un matraz de 250 ml con agitación constante a 30°C.
- 3.-Pasadas 4 horas, inducir la expresión mediante la adición de 10  $\mu$ l de tioestreptón. Poner a crecer por otras 12 horas.

4.- Centrifugar todo el cultivo a 7500 r.p.m. durante 10 minutos a 10°C. Guardar muestra de sobrenadante para el aislamiento de proteínas, y el micelio someterlo a fraccionamiento celular.

### **FRACCIONAMIENTO CELULAR**

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

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

3.- Resuspender el pellet en 25 ml de buffer para sonicar. Sonicar las muestras con 30 pulsos de 20 segundos cada uno. En el caso de *S. venezuelae*, 50 pulsos de 20 segundos cada uno.

4.- Centrifugar el extracto a 7000 r.p.m. durante una hora a 4°C.

5.- Colectar el sobrenadante y pasarlo a un tubo para ultracentrífuga. Centrifugar a 33000 r.p.m. durante 1 hora a 4°C. Terminado el tiempo, colectar el sobrenadante para determinar las proteínas del citoplasma.

6.- Lavar el pellet con 50 mM de NaCl (1.1 ml de NaCl 5 M, 109 ml de Tris 20 mM pH=8) y volver a centrifugar a 33000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C.

7.- Resuspender el pellet en 100 µl de buffer para sonicar con ayuda de una micropipeta y almacenar a -70°C para determinación de proteínas de membrana.

8.- Cuantificar la cantidad de proteína en las diferentes fracciones por el método de Bradford (Bradford, 1976).

### **PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON METANOL/CLOROFORMO**

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

2.- Eliminar la fase superior cuidando no tocar la interfase. Posteriormente agregar 3 ml de metanol y mezclar con vórtex.

3.- Pasar 1.5 ml de la suspensión a un tubo Eppendorf y centrifugar a 14000 r.p.m. durante 10 minutos en la microfuga. Eliminar el sobrenadante cuidando de no llevarse el pellet. Centrifugar todo en el mismo tubo.

4.- Eliminar el sobrenadante y dejar evaporar el metanol durante 10 minutos en la campana de extracción.

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

Respetando las proporciones, se puede llevar a cabo el mismo procedimiento precipitando 10 ml de sobrenadante o más.

### **DETECCIÓN DE PROTEÍNAS CON ANTICUERPOS (INMUNO-BLOT)**

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

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

3.- En un tubo de ensayo con 10 ml de TBS –Tween 20 al 0.005% + leche 5%, agregar el anticuerpo primario a una dilución 1:1000 e incubar la membrana durante 12-16 horas a 4°C con agitación constante.

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

5.- Incubar la membrana con 5 ml de anticuerpo secundario (anti IgG de conejo o de ratón) diluido 1:2000 en TBS-Tween 20 al 0.005% + leche 5% durante 2 horas a temperatura ambiente.

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