



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Predicción y expresión de lipoproteínas glicosiladas de
Streptomyces coelicolor, incluyendo una peptidil-prolil
isomerasa de la familia FKBP.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MAURICIO LÓPEZ PORTILLO MASSON



DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Luis Servín González

2016

Ciudad Universitaria, CDMX



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

- I. Datos del Alumno
Mauricio
López Portillo
Masson
Universidad Nacional Autónoma de México
Biología
308564932

- II. Datos del Tutor
Dr.
Luis
Servín
González

- III. Datos del Sinodal 1
Dr.
Sergio
Sánchez
Esquivel

- IV. Datos del Sinodal 2
M. en C.
Gabriela
González
Cerón

- V. Datos del Sinodal 3
Dr.
Javier Andrés
Juárez
Díaz

- VI. Datos del Sinodal 4
Dra.
Gloria
Soberón
Chávez.

Datos del trabajo escrito

Predicción y expresión de lipoproteínas glicosiladas de *Streptomyces coelicolor*, incluyendo una peptidil-prolil isomerasa de la familia FKBP

93 páginas

2016

A mis padres...

Agradecimientos

A la UNAM y en especial a la Facultad de Ciencias por la educación brindada y por la gran cantidad de recursos destinados para la formación de científicos en el país.

Al proyecto del fondo mixto SEP-CONACyT 220020 de la convocatoria CB-2013-01 por el apoyo necesario para la realización de este proyecto.

Al Dr. Luis Servín González porque en su laboratorio aprendí lo que significa ser investigador. También por su paciencia apoyo y comprensión.

A la M. en C. Gabriela Cerón por su importante asesoría y apoyo en las diversas técnicas que necesité aprender para completar este proyecto.

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por las correcciones realizadas a este trabajo.

Al Dr. Javier Andrés Juárez Díaz por su amistad, por sus consejos y por las copiosas correcciones de gramática, forma y estilo a este trabajo.

A la Dra. Gloria Soberón por su apoyo y por las correcciones realizadas a este trabajo. También a su laboratorio por transmitirnos tanto conocimiento a través de los muchos seminarios que tuvimos.

A la M. en C. Cristina Parada por su apoyo técnico en la generación de anticuerpos monoclonales y por su asesoría en diversos experimentos.

A la Biól. María Guadalupe Códiz Huerta y en general a la Unidad de Biología Molecular del Instituto Fisiología Celular UNAM a cargo de la Dra. Laura Ongay-Larios por su apoyo en las varias secuenciaciones que se llevaron a cabo en este trabajo.

Al Dr. Víctor Daniel Garzón Cortés, al MVZ. Jorge Omar García Rebollar, a la MVZ Georgina Díaz Herrera y a en general a la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

A todos mis compañeros de laboratorio y en especial a Kevin, Isaí y Eduardo por su orientación, consejo y ayuda en la comprensión de distintos protocolos. También por hacer de mi estancia en el laboratorio algo más que solo trabajo.

A mi familia y amigos por brindarme su apoyo incondicional

En especial a Daniela Sclavo Castillo por compartir mi felicidad, mantener mi cabeza las nubes y los pies en la tierra.

Índice	Página
1. Resumen	8
2. Introducción	9
2.1 Biogénesis de lipoproteínas	9
2.2 Glicosilación de proteínas en eucariontes	12
2.3 Glicosilación de proteínas en bacterias	14
2.4 Manosilación en levaduras y homología con bacterias	15
2.5 Motivos de Glicosilación	18
2.6 <i>Streptomyces</i> y <i>Mycobacterium</i> . Características en común	19
2.7 El género <i>Streptomyces</i>	21
2.8 Peptidil-prolil cis-trans isomerasas	22
3 Justificación	25
4 Hipótesis	26
5 Objetivos de la tesis	26
6 Materiales y métodos	27
6.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos usados	27
6.2 Predicción de lipoproteínas glicosiladas	28
6.3 Diseño de oligonucleótidos	29
6.4 Amplificación por PCR de los genes <i>sco1639</i> , <i>sco4289</i> , <i>sco5702</i> , <i>sco5786</i> y <i>sco5113</i>	31
6.5 Clonación de los genes <i>sco1639</i> , <i>sco4289</i> y <i>sco5702</i> en <i>E.coli</i> DH5a utilizando el vector pBluescriptII	31
6.6 Clonación en vector multicopia pIJ6021 y transformación en <i>Streptomyces lividans</i>	32
6.7 Obtención de esporas	33
6.8 Experimentos de expresión	33
6.9 Fraccionamiento celular por centrifugación diferencial	33
6.10 Análisis de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)	34
6.11 Transferencia de proteínas a membrana PVDF	35
6.12 Clonación del gen <i>sco1639</i> , generación de anticuerpos policlonales anti- <i>sco1639</i> y purificación de la proteína <i>sco1639a</i>	35
6.13 Obtención de anticuerpos	36
6.14 Ensayos de inmunodetección	37
6.15 Ensayo enzimático para la proteína 1639 y 1639a	38
7 Resultados y discusión	39
7.1 Selección de probables glicoproteínas de <i>S. coelicolor</i>	39
7.2 Clonación de los genes <i>sco1639</i> , <i>sco4289</i> , <i>sco5702</i> y <i>sco5786</i> en <i>S. lividans</i>	41
7.3 Revisión de secuencias clonadas	43
7.4 Expresión de las proteínas SCO1639, SCO4289 y SCO5702	43
7.5 Detección de las proteínas expresadas mediante blot con Mab anti-6His	44
7.6 Expresión y purificación de la proteína SCO1639a en <i>E. coli</i>	47
7.7 Detección de la proteína SCO1639 por Inmunodetección	50
7.8 La proteína SCO1639 es una peptidil-prolil cis-trans isomerasa funcional	51
7.9 Predicción de la estructura terciaria de la proteína SCO1639	54
7.10 La glicoproteína PstS de <i>S. coelicolor</i> sí conserva la etiqueta de histidinas	56
8 Conclusiones	58
9 Perspectivas	58
10 Referencias	59
11 Anexos	68
11.1 Protocolos	68
11.2 Medios y soluciones	68
11.3 Información Complementaria	91

1. Resumen

Es posible predecir los sitios de glicosilación de lipoproteínas en *Mycobacterium tuberculosis* mediante secuencias consenso localizadas alrededor de serinas o treoninas; sin embargo al intentar predecir estos mismos sitios de glicosilación en lipoproteínas identificadas en el genoma de *Streptomyces coelicolor*, no se obtuvieron resultados. A pesar de esto, una secuencia consenso acertada permite encontrar lipoproteínas posiblemente glicosiladas en el genoma de *S. coelicolor*. Con el fin de probar si la predicción de sitios de glicosilación para proteínas de *S. coelicolor* era viable, se clonaron cuatro de sus genes en *S. lividans*, a los que se les añadió una etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo para su posterior detección y purificación. Sin embargo, dicha etiqueta no fue útil ni para la purificación ni para la detección de las proteínas debido a que posiblemente se procesó.

Anticuerpos generados contra una de las proteínas analizadas demostraron que la proteína recombinante se localizó en la membrana de *S. lividans*, por lo cual se concluyó que la etiqueta de histidinas había sido procesada. Esta pérdida de la etiqueta se había reportado anteriormente, aunque no sucede en todas las proteínas clonadas de manera similar.

De igual forma se observó que el producto del gen *sco1639* de *S. coelicolor* codifica una enzima encargada de la isomerización de péptidos en sitios definidos. Esta proteína presenta actividad enzimática la cual se observó mediante un ensayo monitoreado espectrofotométricamente.

2. Introducción

2.1 Biogénesis de lipoproteínas

Las lipoproteínas son un tipo de proteínas asociadas a la membrana. Estas proteínas en bacterias Gram-positivas participan de manera importante en la transducción de señales, en la captación y en la absorción de nutrientes, ya que participan como proteínas de unión a sustrato para varios tipos de transportadores de casétes de unión a ATP (transportadores ABC) (Bertram *et al.*, 2004; Hutchings *et al.*, 2008). La modificación lipídica de las proteínas bacterianas facilita el anclaje de proteínas hidrofílicas a las superficies hidrofóbicas (en la membrana) a través de la interacción hidrofóbica de los grupos acilo unidos a los fosfolípidos de la membrana celular. La adición de residuos de acilo facilita un anclaje a la membrana permitiendo que la proteína funcione eficazmente en un entorno acuoso (Kamalakkannan *et al.*, 2004). Las lipoproteínas también están involucradas en procesos extracitoplásmicos, tales como la biogénesis de la envoltura celular y el plegamiento de proteínas (Hutchings *et al.*, 2009). Así como en bacterias Gram-negativas existen proteínas periplásmicas, en Gram-positivas existen lipoproteínas; esto se debe a que ambas tienen papeles muy importantes como proteínas de unión a sustrato (Nielsen y Lampen, 1982). El proceso de lipidación de proteínas se encuentra rigurosamente controlado y consiste en una serie de reacciones que se llevan a cabo después de la translocación a través de la membrana citoplásmica.

En ambas bacterias, Gram-negativas y Gram-positivas, las lipoproteínas se traducen inicialmente como prelipoproteínas, las cuales contienen un péptido señal de alrededor de 20 residuos de aminoácidos en el N-terminal. Esta señal sigue una secuencia consenso conocida como lipobox, de la forma [LVI] [ASTVI] [GAS] [C]. Aunado al lipobox, se encuentran 5 a 7 residuos del extremo amino que comúnmente contienen 2 lisinas (aminoácidos positivamente cargados) y una secuencia de 7 a 22 residuos hidrofóbicos y no cargados, los cuales son importantes para identificar lipoproteínas en una base de datos (Inouye *et al.*, 1977; Young, 2005). En internet se encuentran disponibles diversos algoritmos que permiten su identificación, como lo es ExpASY <http://www.expasy.org/> (Gasteiger *et al.*, 2003).

Por mucho tiempo se aceptó que las lipoproteínas bacterianas se translocaban por la vía de secreción Sec, pero actualmente se sabe que existen lipoproteínas que también se translocan por la vía Tat, que es por la que se secretan las proteínas plegadas (Berks *et al.* 2000). Como se muestra en la Fig. 1, una vez que las lipoproteínas se translocan, la diacilglicerol transferasa (Lgt) añade un lípido por medio de un enlace tioéster al grupo sulfhidril de la cisteína +1 presente en el lipobox. Posteriormente, la prolipoproteína señal peptidasa (Lsp), una proteína transmembranal, corta el péptido señal, lo que deja a la cisteína previamente modificada en el extremo amino (Hutchings *et al.* 2009). En bacterias Gram-negativas pueden ocurrir pasos adicionales tales como la adición de un ácido graso más al amino terminal de la cisteína por acción de una *N*-aciltransferasa (Lnt) (Gupta *et al.* 1993). La vía de biogénesis de lipoproteínas es esencial para la supervivencia en las Gram-negativas y se lleva a cabo en el orden Lgt-Lsp-Lnt (Hutchings *et al.* 2009) (Fig. 1). En *Streptomyces*, este proceso es un poco más complicado, pues en todo el género se han identificado dos genes que codifican Lnt y en *Streptomyces coelicolor*, se han identificado además, dos genes homólogos de Lgt (Thompson *et al.* 2010).

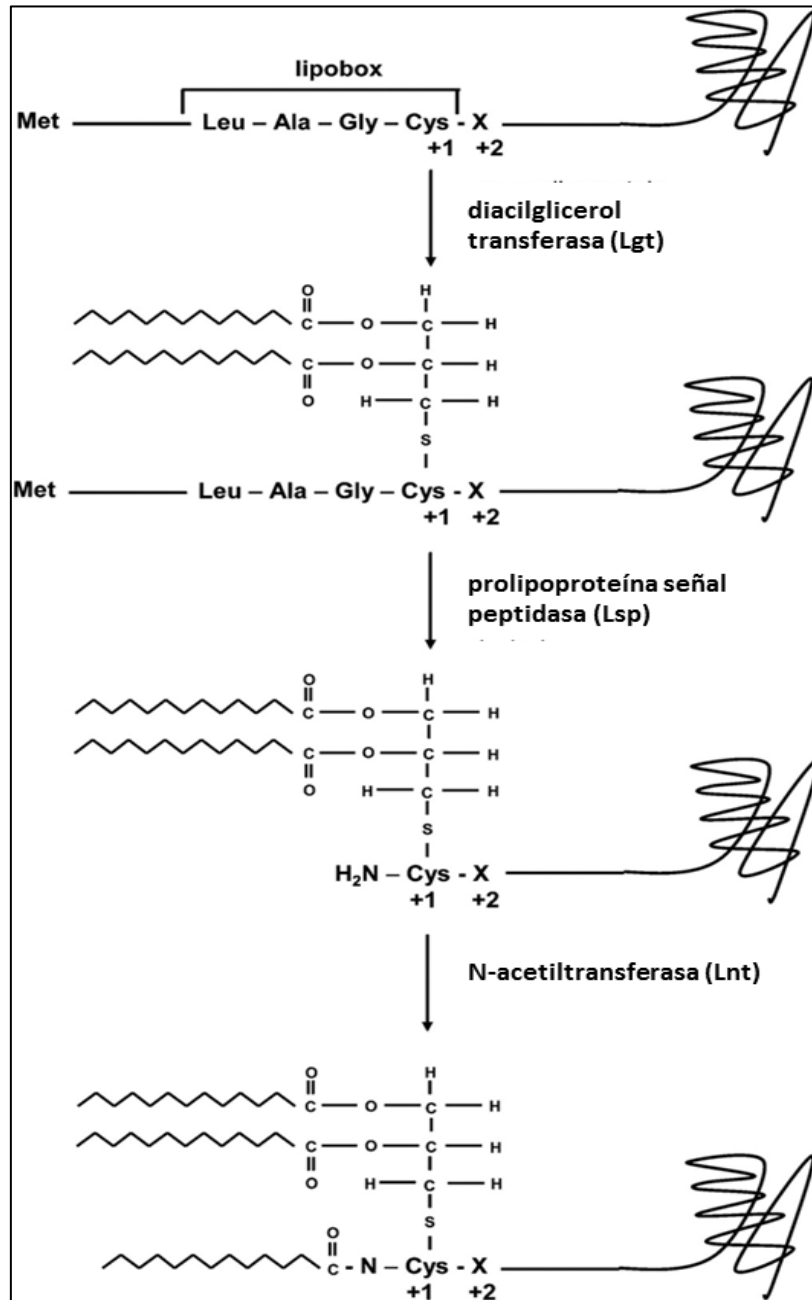


Figura 1. Biosíntesis de lipoproteínas bacterianas. Los precursores de lipoproteínas son modificados postraduccionalmente por las enzimas Lgt y Lsp. Posteriormente en bacterias Gram-negativas las lipoproteínas son procesadas por la Lnt, ausente en la mayoría de las bacterias Gram-positivas, excepto actinobacterias que también poseen una (*Mycobacterium*) o dos (*Streptomyces*) enzimas Lnt. Modificado de Rezwan, *et al.*, 2007.

El caso de *Mycobacterium* también es particular. La pared celular de *Mycobacterium tuberculosis* contiene una capa exterior atípica de lípidos, conformada predominantemente por ácidos micólicos que sirven como un punto de anclaje potencial de las lipoproteínas. Se sabe que una gran cantidad de lipoproteínas en la pared celular de *Mycobacterium* están glicosiladas (Sabio y García *et al.*, 2010). Aunque el papel de la glicosilación no está completamente claro, se sugiere que contribuye al mantenimiento de la asociación proteína-membrana o a la protección contra la escisión proteolítica (Langsford *et al.*, 1987).

2.2 Glicosilación de proteínas en eucariontes

Muchas de las proteínas están sujetas a modificaciones postraduccionales adquiriendo así distintas propiedades. Una modificación postraducciona l puede consistir en la unión covalente de diferentes moléculas por medio de enzimas encargadas de dicha modificación. Entre las modificaciones más importantes se encuentran la acilación, la fosforilación y la metilación. Sin embargo, existen muchas otras modificaciones. Una que es también muy importante es la glicosilación, la cual consiste en la adición covalente de carbohidratos a las proteínas mediante enlaces a un grupo hidroxilo o un grupo tiol (Lehle *et al.*, 2006). Este proceso da como resultado una glicoproteína. Las glicoproteínas se encuentran generalmente asociadas a las membranas así como en la matriz extracelular como plasma sanguíneo y otros sueros, por mencionar algunos ejemplos.

La glicosilación de proteínas sirve varios propósitos. Algunas proteínas necesitan ser glicosiladas para adoptar una estructura terciaria funcional (Shental-Bechor, & Levy, 2008). Los polisacáridos adheridos a las proteínas actúan también como estabilizadores de la proteína blanco, confieren protección contra la degradación y en algunos casos fungen como proteínas de adhesión entre células y permiten el reconocimiento inmunológico específico. Los polisacáridos también tienen la capacidad para acoplarse a otra clase de

moléculas como lo son los lípidos, lo que da como resultado un tipo de polisacárido complejo nombrado glicolípido (Charuk *et al.*, 1995).

Se conocen dos tipos principales de glicosilación, cada una determinada por el aminoácido al cual se unen los azúcares: (1) la glicosilación de tipo *N* (*N*-glicosilación) es aquella en la cual los azúcares se unen al grupo γ -amido de la asparagina; y (2) la glicosilación de tipo *O* (*O*-glicosilación), en la cual los azúcares se unen al grupo hidroxilo de las cadenas laterales de residuos tales como serina, treonina, hidroxiprolina, hidroxilisina y tirosina (Muir, 2006).

En eucariontes, la *N*-glicosilación se lleva a cabo en la membrana del retículo endoplásmico (RE) rugoso. La síntesis de oligosacáridos comienza con la transferencia de una unidad *N*-acetil-glucosamina-fosfato al dolicol-fosfato para así formar *N*-acetilglucosamina-dolicolpirofosfato. Una vez sintetizado este compuesto, se une otra *N*-acetil-glucosamina además de 5 manosas. Esta parte de la síntesis del oligosacárido depende de azúcares unidos a nucleótidos y ocurre del lado citosólico del RE (Mormann *et al.*, 2005). Posteriormente, el oligosacárido nascente es transportado a la otra cara de la membrana del retículo, es decir, la que se encuentra orientada hacia el lumen, y es en ese lado donde se continúa con la adición de azúcares para conformar el oligosacárido que se unirá a la proteína. Dichas transferencias de azúcares, las cuales dependen de glicosiltransferasas específicas para cada adición, utilizan como precursores azúcares activados en dolicol fosfato. Las glicosiltransferasas específicas normalmente se conocen como glicosiltransferasas ALG (Asparagine Linked Glycosylation). Una vez que el oligosacárido se modifica, se transfiere del dolicol pirofosfato a una asparagina específica en la proteína nascente mediante una oligosacariltransferasa (OST).

Con respecto a la *O*-glicosilación, ésta es el resultado del acoplamiento del tetrasacárido NeuAc2-3Gal-4GlcNAc-2Man a un α -dístroglicano. La proteína POMGnT1 (*O*-manosa β -1, 2-*N*-acetilglucosaminiltransferasa) lleva a cabo la transferencia de un residuo *N*-acetilglucosamina a la proteína manosilada. Para este proceso es necesaria la acción de dos *O*-manosiltransferasas, POMT1 y POMT2, las cuales unen los tetrasacáridos al α -dístroglicano (Kornfeld, 1985; Charuk *et al.*, 1995).

En organismos eucariontes los organelos importantes involucrados en la glicosilación de proteínas son: el retículo endoplásmico rugoso y el complejo del aparato de Golgi. La *O*-glicosilación no comienza con la transferencia de

un oligosacárido proveniente de un precursor dolicol, sino con la adición de un único monosacárido, en este caso de la N-acetilgalactosamina (GalNAc). Este último se transfiere de la UDP-GalNAc al grupo hidroxilo de los residuos de Ser o Thr de la proteína ya plegada y ensamblada. Todo esto sucede dentro de un complejo de tres componentes formado entre la proteína en cuestión, la enzima UDP-GalNAc transferasa (GalNAc –T) y la GalNAc. La ubicación del compartimento celular donde la glicosilación de tipo O inicia es todavía controvertida y puede depender del tipo de GalNAc T. Se ha propuesto que el sitio de glicosilación puede variar entre subregiones del RE, un compartimento próximo al Golgi, un compartimento intermediario entre el RE-Golgi (ERGIC), y en otras ocasiones se ha propuesto en el aparato de Golgi (Pérez- Vilar *et al*, 1991; Roth *et al*, 1995)

2.3 Glicosilación de proteínas en bacterias

En un principio se pensó que la glicosilación de proteínas era posible solamente en eucariontes debido a la necesidad de organelos como el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Posteriormente, a principios de la última década del s. XX, se contó con información suficiente para argumentar que las bacterias tenían la capacidad de glicosilar sus proteínas, es decir, que pueden acoplar covalentemente carbohidratos a sus proteínas (Virji *et al.*, 1993). Tanto las glicoproteínas como los glicolípidos llevan a cabo funciones muy específicas en las membranas celulares de las bacterias, uno de los más importantes es su acción como moléculas receptoras en la cara externa de la membrana. Estas modificaciones proteicas confieren propiedades a los organismos como la fijación de los microorganismos a superficies sólidas para la formación de biopelículas y la habilidad de formar cápsulas, lo que entorpece la habilidad del sistema inmune a fagocitar a bacterias patógenas, asegurando la efectiva infección del hospedero. Otra ventaja que confiere la formación de una cápsula es la posibilidad de retener agua, sugiriendo una función de resistencia a la desecación (Mormann, 2005).

Otro punto importante en el descubrimiento de la glicosilación en bacterias fue el hecho de que muchos patógenos procariontes tienen la capacidad de glicosilar sus proteínas, entre los más importantes se encontraron *Neisseria*, *Campylobacter*, *Mycobacteria* y *Streptococci*, (Szymanski *et al.*, 2003; Tan *et*

al., 2015). Dichos descubrimientos sugirieron la importancia de la glicosilación y su relación con la patogenicidad (Szymanski *et al.*, 2003).

La vía de biosíntesis de los glicanos *O*-manosilo en actinomicetos se caracterizó inicialmente en micobacterias mediante un ensayo libre de células. En este caso, se incubó una fracción de membrana de *M. smegmatis* con GDP-^[14C] manosa, resultando en la obtención de proteínas glicosiladas (Schultz y Takayama, 1975). En un ensayo similar, utilizando péptidos sintéticos derivados de la proteína Apa, llevaron a la síntesis de poliprenil monofosfato-^[14C] manosa y posteriormente, a péptidos ^[14C] manosilados, demostrando que al igual que en levaduras, la manosa debe activarse en un lípido fosforilado de membrana para que se lleve a cabo la manosilación (Cooper *et al.*, 2002).

2.4 Manosilación en levaduras y homología con bacterias

La *O*-manosilación es una de las glicosilaciones más importantes y se observó por primera vez en la pared celular de la levadura común, *Saccharomyces cerevisiae*. Los *O*-manosil glicanos son cadenas cortas de manosa que constituyen uno de los elementos cruciales en la glicosilación de tipo *O* (Gemmill y Trimble, 1999). Se sabe que estas cadenas son unidas por enlaces glicosídicos al grupo hidroxilo de residuos de serina o de treonina (Bause y Lehle, 1979). Este glucósido proviene de un intermediario de la glicólisis: la fructosa-6-fosfato. En *S. cerevisiae*, la fuente de manosa en las reacciones de glicosilación es la GDP-manosa. Ésta deriva del intermediario fructosa-6-fosfato de la glicólisis por la acción sucesiva de la fosfomanosa isomerasa (PMI) que produce la manosa-6-fosfato, que es sustrato de la fosfomanomutasa (PMM) para producir manosa-1-fosfato y ésta a su vez es transformada a GDP manosa-1-fosfato por la catálisis de la pirofosforilasa GDP-manosa (GMPP) (Espitia *et al.*, 2010)

La *O*-glicosilación en levaduras, así como en otros hongos, es catalizada por la *O*-manosil transferasa, las cuales son responsables de la transferencia del primer residuo manosilo de dolicol fosfato manosa (DPM) al grupo OH de serina o treonina de la proteína blanco. La enzima responsable de la síntesis de

DPM es la dolicol fosfato manosa sintasa (Dpms), la cual es un miembro de la familia 2 de las glicosil hidrolasas. La Dpms utiliza como sustrato al dolicol fosfato (Dol-P) y a la GDP-Man. En *S. cerevisiae* esta enzima está codificada por *DPM1*. Su síntesis se lleva a cabo en dos etapas: (a) la guanosina difosfato manosa (PIB-manosa) reacciona con el dolicolfosfato expuesto en la cara citosólica de la membrana del RE para formar DPM, el cual tiene un residuo de manosa orientada hacia el citosol. La molécula de DPM es entonces girada en la membrana del RE, por lo que su residuo de manosa queda accesible a las enzimas que catalizan su transferencia a los glicolípidos y glicoproteínas que están siendo sintetizadas (Kinoshita e Inoue, 2000); (b) posteriormente, el DPM es transportado al lumen del RE y es cuando el dolicol-fosfato, ahora manosilado, se utiliza para transferir su manosa al grupo OH de las serinas o de las treoninas. La transferencia de la manosa es catalizada por un grupo de enzimas integrales de membrana llamadas dolicol-fosfato-manosa-manosiltransferasas (PMT) (Lommel y Strahl, 2009). En *S. cerevisiae* se han identificado siete genes *PMT* que codifican estas enzimas, de los cuales, existe evidencia de su participación en la *O*-manosilación de seis de estos. Estas enzimas se nombran (PMT1 a 6) (Gentzsch y Tanner, 1995) Las proteínas PMT se agrupan en tres subfamilias: PMT1, PMT2 y PMT4. Las subfamilias PMT1 y PMT2 incluyen dos *O* manosiltransferasas cada una, PMT1 y PMT5 en la primera y PMT2 y PMT3 en la segunda. La subfamilia PMT4 tiene una, la PMT4 (Gentzsch y Tanner, 1996). Después, la proteína es trasladada a las vesículas trans-Golgi, donde se añade un residuo de galactosa a la N-acetilgalactosamina por acción de una galactosil transferasa específica de la región trans del aparato de Golgi.

Para la supervivencia de la levadura es indispensable que se lleve a cabo una correcta glicosilación. Los *O*-manosil glicanos son importantes para la estabilidad, la localización y/o la función de varias proteínas de secreción y de membrana. Las mutaciones en genes involucrados en la *O*-manosilación afectan diversos procesos celulares, tales como la polaridad celular, la integridad de la pared celular, el apareamiento y la filamentación. Deleciones en estos genes afectan gravemente a las células y en otros casos pueden ser letales (Immervoll *et al.*, 1995; Gentzsch y Tanner, 1996).

Se han encontrado una gran variedad de PMTs distribuidas en distintos phyla. En el caso de *Drosophila melanogaster* se tienen identificados dos genes, *DmPOMT1* y *DmPOMT2*, los cuales codifican enzimas muy parecidas a la PMT4 y la PMT2, respectivamente (Jurado *et al.* 1999; Martín-Blanco y García-Bellido 1996). En mamíferos también se han identificado la *POMT1* y *POMT2*, ambos participan en el desarrollo embrionario de cerebro, músculo y ojo en ratones (Jurado *et al.*, 1999). En el caso de bacterias sucede algo muy parecido: la O-manosil transferasa de *M. tuberculosis* es homóloga a la PMT de *S. cerevisiae* (VanderVen *et al.*, 2005) (Fig. 2). En el caso de *S. coelicolor* hay una proteína importante involucrada en la glicosilación de proteínas, la Ppm, codificada por el gen *sco1421*, la cual se encarga de transferir GDP manosa al poliprenol (Wehmeier *et al.*, 2009).

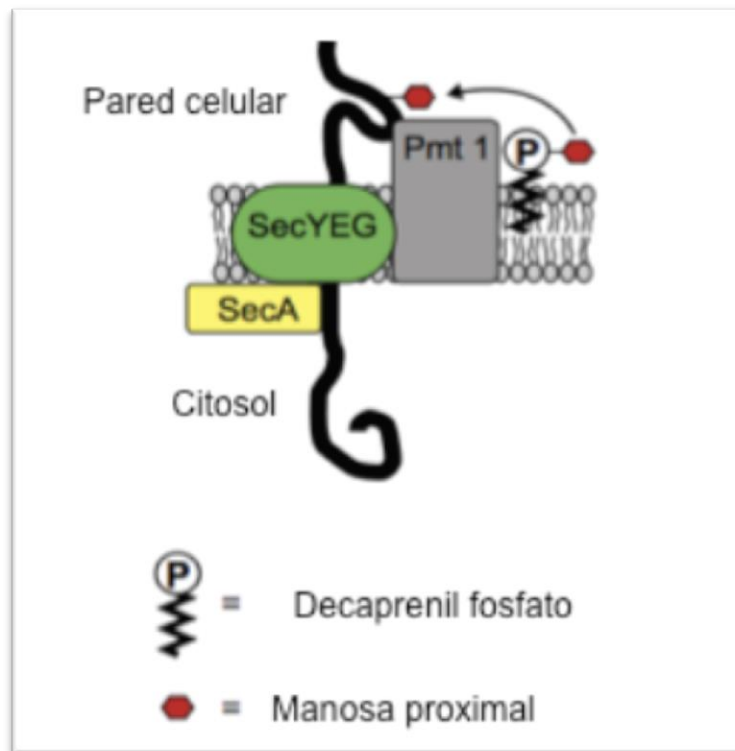


Figura 2. Mecanismo de glicosilación de proteínas en actinobacterias. Esquema de del sistema propuesto de O-manosilación de proteínas en *M. tuberculosis*. El complejo SecA-SecYEG es necesario para la translocación de las proteínas no plegadas posteriormente serán glicosiladas por la proteína manosiltransferasa (Pmt1) modificado de Vander Ven, *et al.*, 2005.

2.5 Motivos de glicosilación

Una diferencia importante entre la *N*-glicosilación y la *O*-glicosilación es que mientras que la *N*-glicosilación se lleva a cabo en residuos de asparagina que se encuentran en un motivo definido, esto no ocurre en el caso de la *O*-glicosilación, donde se glicosilan las serinas y las treoninas pero el motivo no se encuentra definido del todo. Esto quiere decir que las asparaginas que serán glicosiladas son fáciles de predecir, no así las serinas y las treoninas que serán glicosiladas. Existen herramientas disponibles para la predicción de los sitios de glicosilación en proteínas eucariontes. Estas herramientas, como NetNGlyc (Gupta y Brunak, 2002) y NetOglyc (Steentoft *et al.*, 2013), se basan en secuencias consenso de la forma Asn-Xaa-Ser/Thr (donde Xaa no es una prolina). En el caso de la *O*-glicosilación se puede utilizar algoritmos que se basan en utilizar sitios conocidos de glicosilación. Estas herramientas permiten predecir sitios de glicosilación en una amplia variedad de proteínas principalmente de humano (Steentoft *et al.*, 2013). Recientemente, se han desarrollado programas que permiten la predicción de glicosilación en células procariontes como GlycoPP (Chauhan *et al.*, 2012). El sitio de *N*-glicosilación es en un residuo de Asn y el de la *O*-glicosilación es en un residuo de serina o de treonina que mantiene un glicano unido covalentemente por acción enzimática a una amida o a un grupo hidroxilo, respectivamente (Chauhan *et al.*, 2012). Aunado a algoritmos, en un estudio se investigó por filtración de proteínas mediante espectrometría de masas en cromatografía líquida para identificar sitios de glicosilación en cultivos filtrados de micobacterias, esto con el fin de entender la fisiología de la bacteria y la patofisiología de las glicoproteínas de *Mycobacterium tuberculosis* y así identificar potenciales componentes para el desarrollo de una vacuna específica. El resultado fue un motivo potencial predictor de glicosilación de tipo *O* en micobacterias (Smith *et al.*, 2014) (Fig. 3). Este reporte fue de interés para nuestro grupo, ya que abría la posibilidad de que existiera una paridad entre el motivo de glicosilación que reportan y sitios hipotéticos para glicoproteínas de *Streptomyces*.

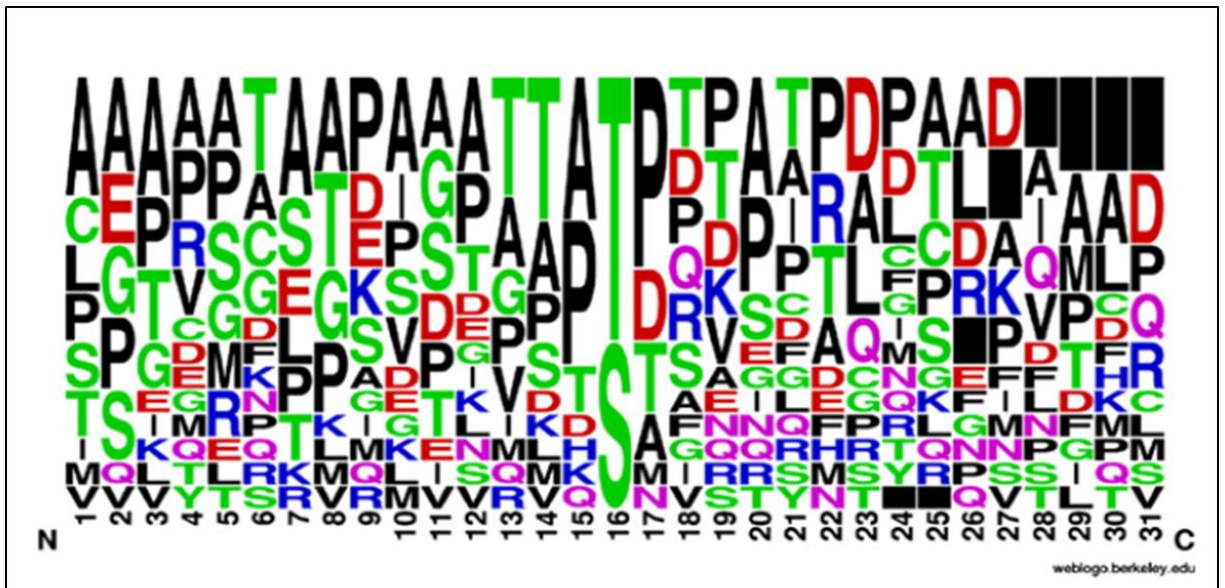


Figura 3. Motivo de glicosilación en *M. tuberculosis*. Secuencia consenso localizada alrededor de las treoninas y serinas glicosiladas, determinadas mediante el análisis por espectrometría de masas del glicoproteoma presente en filtrados de cultivo de *M. tuberculosis* (Smith *et al.* 2014).

2.6 *Streptomyces* y *Mycobacterium*. Características en común

Dentro del grupo de las bacterias Gram-positivas con un alto contenido de G+C en su DNA clasificadas por Margulis como actinobacterias (Battistuzzi *et al.*, 2008) se encuentran dos géneros importantes: *Streptomyces* y *Mycobacterium*. Mientras que *Mycobacterium* es conocido por ser el responsable de producir tuberculosis y lepra, *Streptomyces* es mejor conocido por su gran capacidad para producir antibióticos. La pared celular del taxón de las Actinobacterias se utiliza generalmente como una característica filogenética; la pared de las especies de *Streptomyces* está compuesta por una malla simple de peptidoglicanos que engloba a la membrana citoplásmica y la de *Mycobacterium* es muy diferente, pues está compuesta por capas externas de arabinogalactanos y ácidos micólicos de largas cadenas erigidas en la capa de peptidoglicanos. Dicha pared celular, compuesta por muchas capas, está relacionada con la patogenicidad de la bacteria así como a su resistencia a antibióticos (Collins, 1998). De igual manera, es importante tener en cuenta que a pesar de sus distintas morfologías (*Streptomyces*: filamentos y *Mycobacterium*: bacilos), ambos géneros mantienen estrategias de crecimiento muy parecidas. Ambas presentan crecimiento apical caracterizado por la inserción de precursores de peptidoglicanos, ya sea en los ápices hifales de *Streptomyces* o en ambos polos como en el caso de *Mycobacterium* (Brennan

et al., 2003; Daniel y Errington, 2003). Dicho crecimiento apical es orquestado en ambos géneros por una proteína llamada DivIVA, también conocida como antígeno 84 (Ag84) en *Mycobacterium* y su expresión lleva a la formación de ramas o extensiones celulares a partir de los polos (Flärdh, 2003). El género *Streptomyces* se caracteriza por su capacidad de formar esporas. A la par de la producción de metabolitos secundarios en etapas tardías de crecimiento, el micelio vegetativo comienza a crecer hacia arriba lejos del sustrato. Las hifas aéreas contienen hasta 50 copias del genoma y con el tiempo llevan a cabo divisiones celulares que culminan en la formación de esporas con un solo genoma, una pared celular gruesa, hidrofóbica y resistente a estrés climático. Tradicionalmente, se considera que *Mycobacterium* no es formadora de esporas; sin embargo, en los últimos años se han asociado algunos estados metabólicos y fisiológicos como análogos a la formación de esporas, tal como la presencia de la proteína WhiB-like, específica de Actinobacterias y también identificada como un factor importante en la esporulación de *Streptomyces* (Feng *et al.*, 2016).

Otra característica importante de ambos géneros de bacterias es su capacidad para glicosilar algunas de sus proteínas. Se ha demostrado que un gran número de glicolipoproteínas tienen funciones importantes en la infección y en el reconocimiento de la bacteria por parte del sistema inmune de su hospedero (González-Zamorano *et al.*, 2009). Por ejemplo, la proteína Apa de *M. tuberculosis*, demostró tener la capacidad de estimular los linfocitos T acorde en función de su patrón de glicosilación (Horn *et al.*, 1999). Esta es la razón por la que muchos antígenos glicosilados podrían utilizarse en algún futuro no muy lejano para el desarrollo de una vacuna con proteínas específicas en lugar de contener bacilos vivos e incluso poseer una mayor especificidad que la BCG (Sable *et al.*, 2011).

Debido a las dificultades en el cultivo de *Mycobacterium* y gracias a su gran cercanía filogenética con *Streptomyces*, se ha demostrado la posibilidad de expresar genes de *M. tuberculosis* en *S. lividans*; por su parte, se ha demostrado que las proteínas expresadas no solo se pliegan correctamente y se secretan, sino también se glicosilan adecuadamente, lo que permite la expresión de glicoproteínas como la de 45/47 kDa con potencial médico (Lara *et al.*, 2004; Arista Carrera, 2012; Tavares Cornejo, 2012).

2.7 El género *Streptomyces*

Streptomyces es un género de Actinobacterias formadoras de largas cadenas de células similar al crecimiento hifal de muchos hongos (Worthen, 2007). Una característica muy importante es su capacidad de formar esporas como estructuras de latencia y de diseminación. Las esporas tienen su origen en hifas aéreas diferenciadas del resto del micelio (Flärdh, 2003). Se presume que dichas características son el resultado de la ecología aerobia estricta, terrestre y saprófita de la bacteria, aunque es capaz de vivir en medio líquido y en algunos casos especiales, lo hace como patógena (Worthen, 2007). Derivado del ambiente en el que habita y su capacidad saprófita, *Streptomyces* tiene una gran capacidad de producir metabolitos secundarios, tales como los antibióticos, que le permiten competir activamente contra otros organismos competidores (Omura *et al.*, 2001).

Se han descrito más de 576 especies dentro de este género, generalmente usando características morfológicas tales como el color de las hifas, las esporas y el tipo de crecimiento (Labeda, 2010).

El genoma del modelo más estudiado de *Streptomyces*, *S. coelicolor*, fue completado a finales de 2001 en Inglaterra en el Instituto Sanger. La cepa con la que se trabajó fue la M145 (una cepa prototrófica y carente de plásmidos) derivada de la cepa A3 (2). El gran esfuerzo que se invirtió en la secuenciación del primer genoma de *Streptomyces* se debió a su alta adaptabilidad al estrés ambiental, por ser una fuente de moléculas bioactivas para la medicina y la industria, además de su relación con patógenos humanos (Bentley *et al.*, 2002).

El genoma de *S. coelicolor* consiste de 8,667,507 pb, siendo así uno de los genomas bacterianos más grandes que se han secuenciado hasta la fecha. Su genoma contiene 7,825 genes, de los cuales se predice que 55 son pseudogenes, siendo casi el doble de genes que los identificados en *E. coli* (alrededor de 4,000) (Grenier *et al.*, 2014; Redenbach *et al.*, 1996).

Un porcentaje importante de proteínas codificadas en el genoma de *S. coelicolor* están involucradas en la regulación, el transporte y en la degradación de nutrientes extracelulares. También, una gran parte del genoma

se encuentra compuesto por genes que codifican 965 proteínas (poco más del 12% del genoma) con una función regulatoria. Otras características del genoma de *S. coelicolor* son la linealidad de su cromosoma, el alto contenido de G+C (72%) en su DNA, más de 6200 ORF, así como una gran cantidad de proteínas de secreción (812), de entre las cuales se encuentran 60 peptidasas, 13 quitinasas, 8 celulasas y 3 amilasas, que se encuentran relacionadas con la actividad saprófita de esta bacteria (Bentley *et al.*, 2002).

Otros genomas de especies importantes de *Streptomyces* son los correspondientes a *S. griseus*, *S. avermitilis* y *S. lividans* (Kawamoto y Ochi, 1998). Una de las especies de *Streptomyces* más importante en términos científicos es *S. lividans*, la cual es muy parecida a *S. coelicolor* (Ochi, 1995) salvo que posee una isla genómica de 93 kB y no posee el plásmido de fertilidad de *S. coelicolor* A2. Generalmente se utiliza a *S. lividans* en experimentos de clonación de DNA y producción heteróloga de proteínas porque carece de un sistema de restricción dependiente de metilación y, por lo tanto, no degrada DNA metilado proveniente de otras bacterias como lo hace *S. coelicolor*. También posee baja actividad proteolítica endógena, lo que permite una mayor producción de proteínas recombinantes (González-Cerón *et al.*, 2009).

2.8 Peptidil-prolil *cis-trans* isomerasas

Por mucho tiempo se pensó que el correcto plegamiento en las proteínas ocurría mayoritariamente de manera espontánea y que estaba orquestada únicamente por la secuencia de aminoácidos de la proteína. En muchos casos efectivamente es así y el plegamiento ocurre en cuestión de milisegundos; sin embargo, hay cambios estructurales que ocurren mucho más lento, uno de estos es el cambio de conformación *cis-trans* en los enlaces peptídicos (Anfinsen, 1973) (Fig. 4)

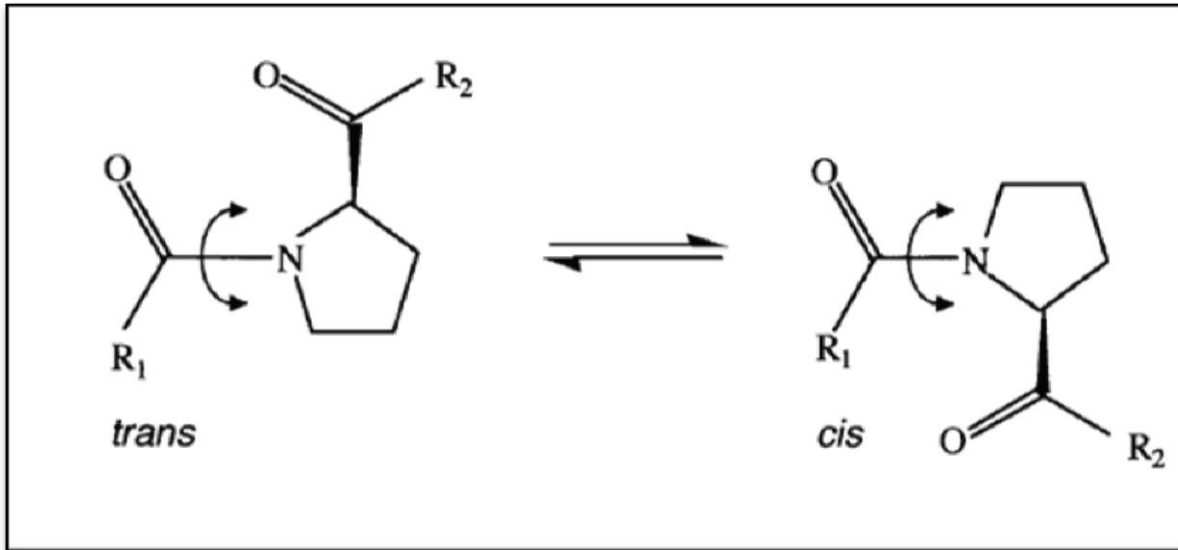


Figura 4. Isomerización llevada a cabo por la peptidil-prolil cis-trans isomerasa. Se muestra el intercambio entre las forma *cis* y *trans* del enlace peptídico de la prolina. R1 representa la cadena polipeptídica del lado amino de la prolina y R2 del lado carboxilo (Gothel y Marahiel, 1999).

Se sabe que varias proteínas participan en el correcto plegamiento de proteínas; algunas de estas proteínas llevan como nombre general el de peptidil-prolil cis-trans isomerasas, pero se les ha nombrado de muchas otras formas y es común abreviarlas como PPIasas. Las PPIasas son receptores proteicos para fármacos inmunosupresores tales como la ciclosporina A (CsA), FK506 y rapamicina que se usan comercial y médicamente para prevenir el rechazo de implantes y tratar enfermedades autoinmunes (Moparthi *et al.*, 2009). Las PPIasas se clasifican en dos grandes grupos (Moparthi *et al.*, 2009): (1) las que se unen a CsA, denominadas ciclofilinas; y (2) las proteínas que se unen a FK506 o a rapamicina, denominadas FKBP. Ambos grupos de receptores proteicos catalizan la transición molecular entre las conformaciones *cis* y *trans* en los enlaces peptídicos de la secuencia X-Pro (X siendo cualquier aminoácido) (Shevach, 1985). Estos receptores también funcionan como chaperonas independientes de ATP. Se ha encontrado que dichas proteínas están conservadas en muchas especies, pues se han identificado desde procariontes hasta plantas, hongos y animales, incluyendo al humano (Compton *et al.*, 1992). Las FKBP divergen evolutivamente mucho más que las ciclofilinas y no se encuentran relacionadas a nivel de secuencia,

aunque sí tienen la misma actividad de prolil-isomerasa (Siekierka *et al.*, 1989). La familia de FKBP engloba a una gran cantidad de enzimas muy parecidas entre sí y con actividades muy similares. El tamaño de las proteínas dentro de esta familia varían normalmente entre 12 y 52 kDa (Galat, 2003).

3 Justificación

Las proteínas bacterianas glicosiladas han recibido mucha atención en los últimos años ya que se les atribuyen muchas propiedades, una de las más importantes es su participación en la infección inmune por parte de bacterias patógenas como *M. tuberculosis* y reconocimiento inmune por parte de su hospedero. La expresión de proteínas heterólogas en organismos no patógenos como *S. coelicolor* y *S. lividans* permite la producción masiva de proteínas de interés médico, aumentando la velocidad de producción y minimizando riesgos. Las proteínas heterólogas glicosiladas producidas en organismos como *S. lividans* presentan patrones de glicosilación muy parecidos a las proteínas producidas en el organismo original. Con el fin de intentar conocer si una proteína va a ser glicosilada, en *M.tuberculosis* se generó un motivo que permite predecir si las proteínas sufrirán esta modificación postraducciona. Debido al gran parentesco entre *M. tuberculosis* y *S. coelicolor* dicho motivo podría usarse también para predecir proteínas glicosiladas en este organismo

4 Hipótesis

Si es posible expresar genes que codifican para proteínas glicosiladas de *M. tuberculosis* en *S. coelicolor*, entonces la secuencia consenso generada para la predicción de proteínas glicosiladas de *M. tuberculosis* podría también predecir proteínas glicosiladas de *S.coelicolor*.

5 Objetivos de la tesis

Generales

- Utilizando la secuencia consenso para proteínas de *M. tuberculosis* buscar en la base de datos de *S. coelicolor* posibles lipoproteínas que se encuentren glicosiladas.

Particulares

- Realizar las construcciones correspondientes de cada gen predicho en el vector multicopia pIJ6021 en *S. lividans*.
- Obtención de muestra para cada proteína seleccionada y su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel.
- Realizar un ensayo de inmunodetección con concanavalina A con el fin de detectar si se encuentra glicosilación en las proteínas predichas.

6 Materiales y Métodos

6.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos

Se utilizaron diversas cepas de *E. coli* y de *Streptomyces* (*lividans* y *coelicolor*) En la tabla 1 se muestran las cepas utilizadas para clonar y expresar los genes a estudiar.

Los plásmidos que se utilizaron para clonar los genes en las cepas se muestran en la Tabla 2 y los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes en la Tabla 3.

Tabla 1. Cepas utilizadas

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E.coli</i>		
DH5 α	F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1	Woodcock, <i>et al.</i> , 1889
BL21(DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]), plásmido Rosetta	Studier FW, <i>et al.</i> , 1986 (Novagen)
IBEC58	Δ dam Δ dcm Δ hsdRMS derivado de BW25113. No metila DNA .	González-Cerón, <i>et al.</i> , 2009
<i>Streptomyces</i>		
<i>S.lividans</i> 1326	Silvestre	John Innes Centre, cepa 1326
<i>S.coelicolor</i> M145	Wild-type SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ derivativo de <i>S. coelicolor</i> A3(2)	John Innes Centre

Tabla 2. Plásmidos utilizados para clonar los genes estudiados

Plásmido	Descripción	Referencia
pSEt152	Sitio attP y gen de la integrasa del fago ϕ C31. Resistencia a Apramicina	Bierman <i>et al.</i> , 1995
pSEt152+5702	Gen 5702+6His clonado en pSEt152	Este trabajo
pSEt152+5786	Gen 5786+6His clonado en pSEt152	Este trabajo
pET28a	Vector de expresión, 6His, Kan ^R	Novagen
pET28a+1639a	Gen 1639a clonado en pET28a para expresión en <i>E. coli</i> (anticuerpos)	Este trabajo
pIJ6902	Apra ^R , promotor tipA, sitio att del fago Φ C31	Huang <i>et al.</i> , 2005
pIJ6902+1639	Gen 1639+6His clonado en pIJ6902	Este trabajo
pIJ6902+4289	Gen 4289+6His clonado en pIJ6902	Este trabajo
pIJ6021	Vector de expresión Kan ^R inducible con Thioestrepton, alto número de copias	Takano, <i>et al.</i> , 1995
pIJ6021+1639	Gen 1639+6His clonado en pIJ6902	Este trabajo
pIJ6021+4289	Gen 4289+6His clonado en pIJ6902	Este trabajo
pBluescript	KS+/- vector de clonación en <i>E. coli</i>	Sambrook, <i>et al.</i> , 1989
pBluescript+1639	Gen 1639+6His clonado en pBluescript	Este trabajo
pBluescript+4289	Gen 4289+6His clonado en pBluescript	Este trabajo
pBluescript+5702	Gen 5702+6His clonado en pBluescript	Este trabajo
pBluescript+5786	Gen 5786+6His clonado en pBluescript	Este trabajo
pBluescript+5113	Gen 5113+6His clonado en pBluescript	Este trabajo

6.2 Predicción de lipoproteínas glicosiladas

La predicción de lipoproteínas con probabilidad de glicosilación comenzó con una búsqueda por anotación en el genoma de *Streptomyces coelicolor* disponible en <http://strepdb.streptomyces.org.uk/> con la palabra clave “lipoprotein”. Posteriormente, los genes arrojados fueron sometidos al software de predicción de glicosilación *NetOGlyc 4.0 model for prediction of O-glycosylation* (Steentoft *et al.*, 2013) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) así como en el programa de predicción de glicosilación en procariontes GLYCOPP v.1.0 (Chauhan *et al.*, 2012) en la modalidad de *O-linked Glycosylation Prediction* y *Prediction based on Binary Profile of Patterns* (BPP) (<http://www.imtech.res.in/raghava/glycopp/submit.html>).

La selección de proteínas filtradas mediante los programas anteriores se sometieron a una búsqueda de motivos con el programa MOTIF (<http://www.genome.jp/tools/motif/>) utilizando el motivo [AIPSVDEGKLM]-[AGSDPTEIV]-[APTDEGIKLSNV]-[TAGPVIMQR]-[TAPSDKLMV]-[APTDHKQ]-[TS]-[PDTAMN]-[TDPQRS AFGIV]-[PTDKVAENQRS]-[APSEGINQRT]-[TAIPCDFGLQRSY]-[PRTADEFHMN] generado a partir del consenso de glicoproteínas de *M. tuberculosis* (Smith *et al.*, 2014). Este motivo es más corto con respecto al original porque al utilizar el motivo completo no se logró la predicción de ninguna glicoproteína. La elección final de probables lipoproteínas glicosiladas se realizó mediante la descripción hipotética de la función de cada una en la base de datos StrepDB (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>) así como en el puntaje arrojado por los diferentes programas.

6.3 Diseño de oligonucleótidos

Con el fin de clonar los genes a estudiar, se diseñaron diversos oligonucleótidos (Tabla 3); estos se diseñaron para amplificar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cada gen con la adición de sitios de restricción BamHI y NdeI en el extremo 5', de manera que los últimos tres nucleótidos del sitio NdeI (CATATG) correspondieran al codón de inicio. En el extremo 3' se agregó una secuencia que codificara seis histidinas (tag 6xHis) seguida de un codón de terminación de la traducción y de un sitio de restricción EcoRI.

Para optimizar las condiciones de PCR se revisó la temperatura de fusión (T_m) de cada oligonucleótido mediante los programas MBCF Oligo Calculator (<http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligocalc.html>) y OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Se procuró que la T_m de cada par de oligonucleótidos que se utilizaría en una reacción de PCR no difiriera en más de 0.5°C y que fueran lo más cercana a 61°C.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes

Templado	Oligonucleótido	Producto de PCR
DNA cromosomal M145	FWD 5'-CTCGGATCCATATGCGCCGACGCTCACTCC-3' REV 5'- GCAGAATTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCATCTTCGCGAGGATGTCCAC-3'	Gen 1639+6His
DNA cromosomal M145	FWD 5'-CTgggATCCATATgTCCgCTCggAAgACCC-3' REV 5'-gCAgAATTCAgTggTggTggTggTggTgCTTgTCCTggACCggCgg-3'	Gen 4289+6His
DNA cromosomal M145	FWD 5'-CTCGGATCCATATGTCGCTTTCCCCATCGCC-3' REV 5'-GACGAATTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCCCTCCGTCAGCAGAAAC-3'	Gen 5702+6His
DNA cromosomal M145	FWD 5'-CAGGGATCCATATGCGCACCCGAGTCCTTC-3' REV 5'-GCAGAATTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCAGCCGATCGGTGCCG-3'	Gen 5786+6His
DNA cromosomal M145	FWD 5'-CTCAAGCTTCATATGGGTGACAGCGACGACTCC-3' REV 5'-GCTGAATTCACATCTTCGCGAGGATGTC-3'	Gen 1639a
DNA cromosomal M145	FWD 5'-CTCGGATCCATATGAGCATTCTCCGTAACCGCACC'-3' REV 5'- GCAGAATTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCTTCTTGAGGAAGACCCGGGTCA-3'	Gen 5113+6His
Para secuenciar genes clonados en pIJ6021	FWD 5'-GCTTGCACCTCACGTAC-3' REV 5'-CACTCCGCTGAAACTGTTGA-3'	

6.4 Amplificación por PCR de los genes *sco1639*, *sco4289*, *sco5702*, *sco5786* y *sco5113*

Para amplificar por PCR los genes *sco1639*, *sco4289*, *sco5702*, *sco5786* y *sco5113* se utilizó como molde el DNA genómico de *S. coelicolor* M145 y se añadió la mezcla de cada par de oligonucleótidos. Debido a que se presentaron dificultades para obtener productos de amplificación, se utilizó la técnica *Touchdown PCR* (Don R *et al.* 1991), la cual consiste en disminuir gradualmente la temperatura de hibridación a lo largo del progreso de la PCR con el fin de reducir la amplificación inespecífica. y así se logró amplificar cada gen. Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% comparando el resultado con la longitud predicha para cada gen.

6.5 Clonación de los genes *sco1639*, *sco4289* y *sco5702* en *E.coli* DH5 α utilizando el vector *pBluescript II*

El plásmido *pBluescript II* y cada producto de amplificación se digirieron por separado con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI* dejando la reacción por 2 h a 37°C. Los productos de la digestión se separaron por electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) a 0.6% para purificar el DNA a partir del gel. Posteriormente, se realizó la reacción de ligado del producto de amplificación digerido y del vector linealizado mediante el uso de la T4 DNA ligasa incubando a temperatura ambiente por 12 h. Los plásmidos resultantes se utilizaron para transformar células competentes de *E.coli* DH5 α por electroporación a 1.6 kV. La selección de las células transformantes se hizo por su capacidad de crecer en un medio con kanamicina (50 ug/ml).

Para corroborar que se habían clonado los genes, se purificó el DNA plasmídico de cada construcción y se revisó su patrón de restricción con el uso de distintas enzimas de corte contra el patrón hipotético. A partir de los plásmidos que presentaron un patrón de restricción adecuado, se secuenciaron los genes clonados en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Posteriormente, los plásmidos que contenían la secuencia correcta se clonaron en células de *E. coli* IBEC58 con el fin de obtener material genético no metilado para su posterior transformación en *Streptomyces lividans*.

6.6 Clonación en vector multicopia pIJ6021 y transformación en *Streptomyces lividans*

Los plásmidos no metilados, así como también el vector multicopia pIJ6021, fueron digeridos con las enzimas NdeI y EcoRI por 2 h a 37°C. Los fragmentos resultantes separaron por electroforesis en un gel de agarosa LMP al 0.6%, a partir del cual se purificaron. Los insertos digeridos y el plásmido linealizado se ligaron por reacción de la T4 DNA ligasa.

Las reacciones de ligado se utilizaron para la transformación de transformación de protoplastos de *S. lividans* 1326. Las colonias resultantes, resistentes a kanamicina (50µg/ml), se resuspendieron en 100µl de agua y se sembraron en forma de sectores en cajas con medio MS + kanamicina (50µg/ml) (ver anexo). Una vez esporuladas las cepas, se tomaron esporas de cada sector y se realizaron minipreparaciones de DNA plasmídico de cada uno de los sectores correspondientes.

Las minipreparaciones se digirieron con distintas enzimas de restricción para revisar los patrones predichos. De las colonias positivas resultantes de la digestión, se tomaron esporas y se purificaron los plásmidos, a partir de los cuales se secuenció el fragmento clonado utilizando los oligonucleótidos correspondientes al vector pIJ6021 y así confirmar la presencia de cada gen en cada cepa transformante. Posteriormente, los vectores confirmados fueron nuevamente introducidos por medio de protoplastos en *S. lividans*. Se tomaron colonias que fueron resuspendidas en agua y posteriormente sembradas de manera confluyente en cajas de MS+kanamicina (50µg/ml) con el fin de producir esporas.

6.7 Obtención de esporas

Una vez esporulados los cultivos en medio sólido, se añadió agua a cada caja y con la ayuda de un asa bacteriológica se raspó la superficie del micelio para liberar las esporas. Las esporas fueron filtradas en algodón para separarlas de fragmentos de micelio y agar. El filtrado se centrifugó a 3500 rpm por 10 min, resuspendido en agua y vuelto a centrifugar. El botón de esporas resultante se resuspendió en glicerol estéril al 20% y se almacenó en viales a -20°C hasta su uso.

6.8 Experimentos de expresión

Se tomaron entre 200 y 500 µl de la preparación de esporas, dependiendo de la concentración determinada visualmente, se centrifugaron a 3500 rpm por 5 min y se resuspendieron en agua estéril. Se volvieron a centrifugar y las muestras se resuspendieron en 10 ml de medio YT2X (ver anexo) donde se pregerminaron a 37°C por 5 h. Las esporas germinadas se centrifugaron, resuspendieron y finalmente dispersaron en un homogeneizador, en 100 ml de medio LB+sacarosa al 25% con 50µg/ml de kanamicina en matraces de 500 ml. El cultivo se incubó a 30°C con agitación constante por 16 h y posteriormente, se añadió thioestrepton a una concentración final de 5µg/ml para inducir la expresión de la proteína correspondiente. El cultivo se incubó por otras 36 – 40 h a 30°C.

6.9 Fraccionamiento celular por centrifugación diferencial

Después de la incubación para la inducción de la expresión de los genes correspondientes, el cultivo se centrifugó a 8000 rpm por 10 min y el sobrenadante se recuperó en un recipiente para almacenarse a -20°C; el botón de micelio se lavó con 100 ml de Tris 20 mM, pH 8.0. El botón se incubó a -70°C por 2 h y después se lisó por sonicación a 200 W en amortiguador para sonicar (Tris·HCl 50mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5mM e inhibidores de proteasas, pH 8) hasta que el micelio fue lisado.

El sonicado se centrifugó a 8000 rpm por 1 h a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 33,000 rpm por 60 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante, correspondiente a la fracción citoplásmica, se almacenó a -20°C. El botón se resuspendió con 20 ml de Tris-HCl X mM, NaCl 50mM, pH8 y se centrifugó por 30 min a 33,000 rpm. El botón resultante (fracción membranal) se resuspendió en 1 ml de amortiguador para sonicar.

La concentración de proteína de cada fracción se determinó por la técnica de Bradford (Bradford, 1976) y se concentraron por precipitación con metanol 60%: cloroformo 15%(Friedman y Lilley, 2009). Se tomó el equivalente a 10 µg de proteína de cada fracción, se le añadió buffer de tratamiento de proteínas 2x (ver anexo) hasta llegar a un volumen de 10µl. Cada muestra se sumergió en agua hirviendo por 5 min para desnaturar la proteína y posteriormente se guardó a -20°C.

6.10 Análisis de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Las proteínas de cada fracción celular se separaron por electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12 o al 14% dependiendo de la masa predicha para cada proteína de interés. En cada caso se utilizó un marcador de masa molecular con el fin de identificar el peso de las proteínas obtenidas además de muestra de proteínas de cultivos de *S. lividans* con el vector pIJ6021 vacío (control negativo) y los extractos totales de las fracciones correspondientes a membrana, citoplasma y sobrenadante de cultivos que llevaban clonado cada uno de los genes en cuestión. Las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250. En algunos casos, los geles se utilizaron para transferir a las proteínas a una membrana de Fluoruro de polivinilideno (PVDF) por Western-blot para posteriormente inmunodetectar las proteínas de interés mediante.

6.11 Transferencia de proteínas a membrana PVDF

Para los ensayos de inmunodetección de proteínas mediante la técnica de Inmunodetección, se separaron las proteínas por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon P) con la ayuda de cámaras de transferencia húmeda (Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell; BioRad) siguiendo las instrucciones del proveedor, utilizando el amortiguador Tris-Glicina (ver anexo) y un tiempo de transferencia de 12 h a 12mA o 2 h a 200mA manteniendo la temperatura de la cámara con agitación constante (Gordon, 1979).

6.12 Clonación del gen *sco1639*, generación de anticuerpos policlonales anti-*sco1639* y purificación de la proteína *sco1639a*

Para inmunodetectar la proteína codificada en el gen *sco1639*, se generaron anticuerpos policlonales específicos contra dicha proteína. La secuencia codificante del gen se amplificó por PCR Touchdown usando como molde el DNA genómico de *S. coelicolor* M145 y los oligonucleótidos correspondientes con los sitios de restricción HindIII, EcoRI y NdeI (Tabla 3). El producto de la amplificación es el gen sin la secuencia correspondiente al péptido señal ni el codón que codifica la cisteína a la cual se unen los lípidos de anclaje a la membrana. Posteriormente, el producto de amplificación fue ligado al vector de expresión pET28a, el cual adiciona a la proteína recombinante una etiqueta de 6 histidinas en su extremo carboxilo (6xHis), con el uso de las enzimas de restricción NdeI y EcoRI. El plásmido resultante se analizó por restricción y se usó para transformar células de *E. coli* 2BL21 (DE3) con el plásmido Rosetta, que codifica varios tRNAs para codones raramente utilizados por *E. coli*). Las células se crecieron en medio YT2X con kanamicina (50µg/ml) (ver anexo) a 37°C con agitación constante hasta llegar a una DO₆₀₀ de 0.6. La expresión se indujo adicionando 1 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y continuando la incubación a 18 °C por 5 h. Debido a que la proteína 1639a contiene la etiqueta 6xHis proporcionada por el vector pET28a, fue posible purificar la proteína mediante cromatografía de afinidad en una columna de níquel. Se utilizó un equipo de FPLC ÄktaPrime Plus y una columna His-Trap (HiTrapTMCaptoTM IEX

Selection Kit de GE Healthcare). Para dicho protocolo, un cultivo de 100 ml de *E. coli* Rosetta 2 con el plásmido pET28a+:1639a fue crecido durante 30-60 min hasta alcanzar una DO_{600} de 0.6. Se indujo la expresión mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó el cultivo por 4 h. Después, se colectaron las células por centrifugación y el botón resultante se resuspendió en amortiguador de lisis para purificación nativa. La muestra se sonicó a 300w 6 veces por 10 s con pausas de 20 s. El cultivo posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm. La fracción soluble se filtró e inyectó al equipo FPLC y la muestra se purificó mediante el programa “His trap purification His Trap” lo que resultó en fracciones que se cuantificaron con el método de Bradford y se analizaron por SDS-PAGE, teñidas con azul de Coomassie.

6.13 Obtención de anticuerpos

La proteína purificada se analizó en geles preparativos de poliacrilamida al 12% (50 µg de la proteína 1639a purificada por cada gel). Los geles resultantes se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, la cuales se tiñeron con Rojo de Ponceau con el fin de marcar la zona donde se encontraba la proteína. Estas membranas se enviaron al laboratorio de la Dra. Clara Espitia y (Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) y con ayuda de su técnico la M. en C. Cristina Parada Colín se llevó a cabo el protocolo de inmunización (ver anexo). Posteriormente los anticuerpos fueron utilizados para la inmunización de dos conejas de la variedad New Zealand de 8 semanas de edad. La vía de inmunización en un principio fue de manera subcutánea con una dosis de 100 µg del antígeno (particulado o soluble) en adyuvante incompleto de Freund. A las 4 semanas se aplicó una segunda dosis subcutánea y 4 semanas después se dio una tercera aplicación de 100 µg de antígeno vía intramuscular. Después de 14 días se tomó una muestra de 5ml de sangre de las conejas y se evaluó el título de los anticuerpos. Las conejas fueron sangradas a blanco y se obtuvo la totalidad del suero. La sangre se dejó coagular de 30 a 60 minutos a 37°C, se separó el coágulo de las paredes del tubo y se dejó reposar 12 h a 4 °C para retrasar la formación del coágulo. Posteriormente, se retiró el coágulo y el suero se centrifugó a 10000 Xg por 10 min a 4°C. Se prepararon alícuotas y el suero se

almacenó a -70 °C hasta su utilización. El protocolo de inmunización fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

6.14 Ensayos de inmunodetección

Las membranas que se utilizaron para los ensayos de inmunodetección con anticuerpos monoclonales de ratón anti-histidinas (Immobilon®-P Millipore) y con los policlonales de conejo anti-1639a primero se bloquearon con TBS-Tween 20 al 0.05% en leche descremada al 5% e incubadas con el anticuerpo primario correspondiente. Posteriormente, se lavó la membrana con el amortiguador de bloqueo y después se adicionó el mismo amortiguador pero con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo, según el caso, acoplados a peroxidasa.

Con el fin de detectar y así corroborar experimentalmente la glicosilación predicha de las proteínas en cuestión, a la membrana se le agregó concanavalina A de *Canavalia ensiformis* [Jack bean] (SIGMA), acoplada con peroxidasa (ConA-peroxidasa). La concanavalina A posee la propiedad de unirse a proteínas glicosiladas. Por lo tanto, las membranas de PVDF se bloquearon por 1 h con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% a temperatura ambiente, y posteriormente, se incubaron con 10 ml de TBS y ConA-peroxidasa (Concanavalin A from *Canavalia ensiformis* (Jack bean) SIGMA)

a una dilución 1:1000. Las membranas se revelaron utilizando el Kit de quimioluminiscencia (BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) de Roche®).

6.15 Ensayo enzimático para la proteína 1639 y 1639a

Para probar la actividad de las proteínas 1639 y 1639a expresadas en *S. lividans* y en *E. coli*, respectivamente, se llevó a cabo un ensayo de actividad de peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa (Kofron *et al.*, 1991). En el caso de la proteína 1639, se utilizó para dicho ensayo la fracción membranal purificada a partir de un cultivo de *S. lividans* con el plásmido pIJ6021:sco1639 equivalente a 10 µg de proteína total; en el caso de la proteína 1639a, se tomaron 5 µg de proteína purificada por FPLC. Para el ensayo de actividad se utilizó el péptido Succ-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA a una concentración de 6 mM el disuelto en ácido trifluoroacético superseco recién tratado con malla molecular (Molecular sieve 0.3 nm, Merck) y LiCl 400 mM. La quimiotripsina se disolvió en HCl 1 mM y se utilizó un amortiguador de reacción (HEPES 50 mM con NaCl 100 mM, pH8.0). El ensayo se realizó a 4° C y se leyó la A₃₉₀ cada 10 s durante 3 min.

7 Resultados y discusión

7.1 Selección de posibles glicoproteínas de *S. coelicolor*

La búsqueda inicial en la base de datos StrepDB (<http://streptomyces.org.uk>) mediante la palabra clave “lipoprotein”, arrojó 211 posibles lipoproteínas codificadas en el genoma de *S. coelicolor*. Dichas secuencias se analizaron posteriormente mediante los algoritmos en línea para predicción de proteínas glicosilables NetOglyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) y GlycoPP (<http://www.imtech.res.in/raghava/glycopp/>), buscando en concreto sitios de probable *O*-glicosilación. Lo anterior redujo la lista de candidatos a cerca de 50 proteínas. Posteriormente, las proteínas candidatas se sometieron a una búsqueda de motivo en el software “MOTIF search” utilizando el motivo: [AIPSVDEGKLM]-[AGSDPTEIV]-[APTDEGIKLNLSV]-[TAGPVIMQR]-[TAPSDKLMV]-[APTDHKQ]-[TS]-[PDTAMN]-[TDPQRSFAFGIV]-[PTDKVAENQRS]-[APSEGINQRT]-[TAIPCDFGLQRSY]-[PRTADEFHNM] (Fig. 5).

Cabe mencionar que el motivo original derivado del análisis de los sitios de manosilación de glicoproteínas de *M. tuberculosis* (Smith *et al.*, 2014) fue acertado debido a que con el motivo completo no se encontraron coincidencias. Al menos 10 proteínas resultaron ser fuertes candidatas, y se eligieron cuatro con base en mejor puntuación de predicción, tener una función predicha interesante y homología con proteínas de *M. tuberculosis*. Todo esto se realizó con ayuda de la anotación del genoma de *S. coelicolor* en la base de datos StrepDB. (Fig. 6 y Tabla 4)

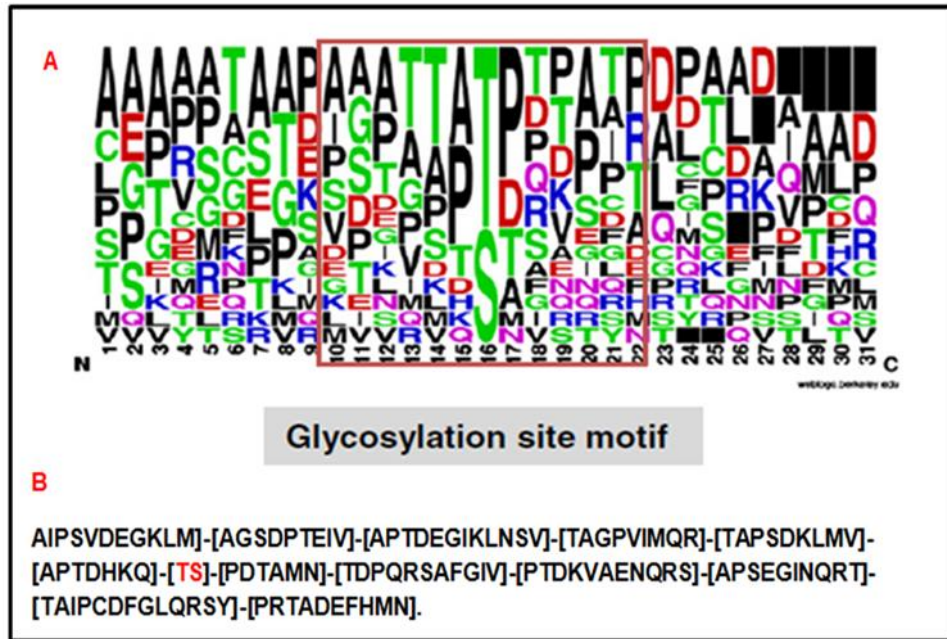


Figura 5. Predicción de sitios de glicosilación A) Secuencia de aminoácidos que rodea sitios de *O*-glicosilación en proteínas del filtrado de cultivo de *M.tuberculosis*. Modificado de (Smith et al., 2014) En el cuadro rojo se encierran las 13 posiciones utilizadas para generar el motivo usado. (B) Motivo utilizado para la detectar posibles sitios de glicosilación en lipoproteínas predichas de *S. coelicolor*. Las letras en rojo muestran la posición central del motivo correspondiente a los aminoácidos serina y treonina glicosilados. Este motivo fue utilizado en el programa MOTIF (<http://www.genome.jp/tools/motif/>).

Nombre	Tamaño (AA)	Motivo de predicción	Posición	NetOGlyc		
				0.9	0.8	0.7
SCO1639	335	SPSPDASATSAAP	35-47	7	1	2
SCO4289	160	GAAPAAATATATST	37-49	8	4	3
		ATATATSTAQPPT	42-54			
		ATATATSTAQPPT	48-60			
SCO5702	187	GGVRAASPTASGT	94-106	5	5	2
		GTAASPSASVRAA	109-121			
SCO5786	400	GGTPTATPTTSPT	141-153	13	1	0
		SPTAPPTTPPTTP	151-163			
		PTAPPTTPPTTP	152-164			
		PPTTPPTTPPTTP	155-167			
		PTTPPTTPPTTP	156-168			
		PTTPPTTPPTTP	160-172			

Figura 6. Proteínas de interés seleccionadas. Se muestra el nombre, el tamaño del gen, algunos motivos predichos como posiblemente glicosilados, la posición de la glicosilación hipotética y el número de motivos con alta probabilidad de glicosilación.

Tabla 4. Función predicha de los genes elegidos

Gen	Anotación
<i>sco1639</i>	Probable proteína secretada del tipo de las peptidil-prolil cis-trans isomerasa de tipo FKBP.
<i>sco4289</i>	Posible proteína secretada. Alta puntuación.
<i>sco5702</i>	Proteína hipotética de 17,7 kD homologa a la proteína de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTCY24A1.14c).
<i>sco5786</i>	Posible hidrolasa secretada. Alta puntuación.

7.2 Clonación de los genes *sco1639*, *sco4289*, *sco5702* y *sco5786* en *S. lividans*

Los genes *sco1639*, *sco4289*, *sco5702* y *sco5786* codifican las proteínas seleccionadas fueron amplificadas por PCR touchdown directamente del DNA genómico de *S. coelicolor* utilizando los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 3. El oligonucleótido en sentido contiene los sitios de restricción BamHI y NdeI, de forma que el codón de inicio correspondiera a las últimas tres bases del sitio NdeI (5'-CATATG-3') y el oligonucleótido en antisentido con el sitio de restricción EcoRI. En todos los casos, los genes contendrían codones para 6 Histidinas precediendo al codón de término de la traducción, esto con el fin de etiquetar a las proteínas para su posterior identificación y purificación. Una alícuota del DNA resultante de cada reacción de amplificación se analizó en un gel de agarosa al 1% para verificar que los productos fueran del tamaño esperado y, posteriormente, el resto de la reacción se digirió con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI (Fig.7). Los fragmentos resultantes se separaron por electroforesis en un gel de agarosa LMP a partir del cual se purificaron los insertos correspondientes.

Cada uno de los genes se clonó por separado en el vector pBluescript II SK para su selección y secuenciación. En el caso de la secuencia del *sco5786*, todos los intentos de amplificación y clonación resultaron en fragmentos que contenían mutaciones por lo que se decidió no continuar con este gen. Con los plásmidos que contenían los tres genes restantes se transformaron células de *E. coli* IBEC58, ya que son incapaces de metilar el DNA y así se asegura la aceptación por parte de *S. lividans*. Finalmente, los genes fueron subclonados

mediante el empleo de las enzimas NdeI y EcoRI en el vector de expresión inducible pIJ6021 para la producción de las proteínas heterólogas de *S. lividans*.

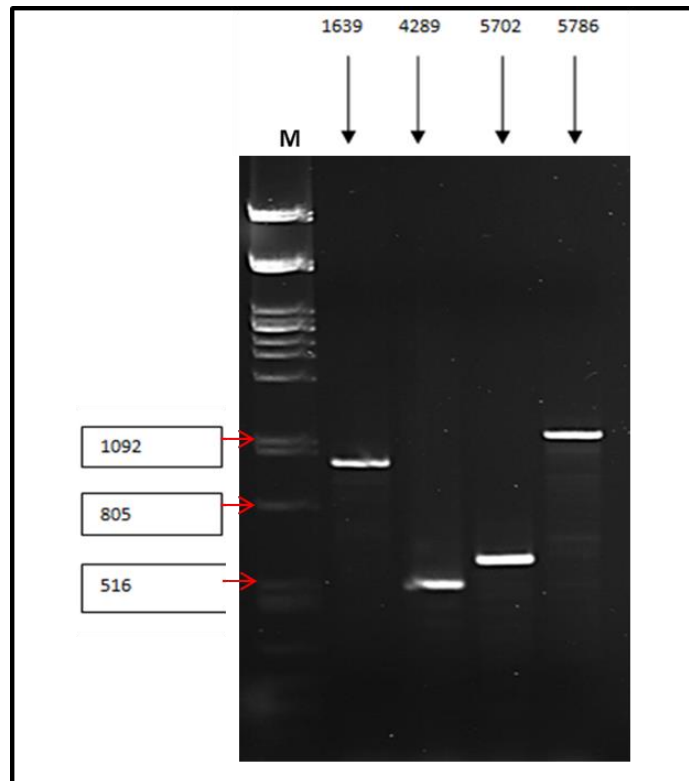


Figura 7. Amplificación por PCR de los genes seleccionados. Fragmentos obtenidos mediante PCR “touchdown” a partir de DNA genómico de *S. coelicolor*. El número correspondiente al gen amplificado se muestra sobre cada carril. Todos los fragmentos obtenidos fueron del tamaño esperado. El carril marcado como M corresponde a DNA del bacteriófago λ digerido con la enzima PstI, utilizado como marcador; se muestra el tamaño (en pares de bases) de tres fragmentos relevantes del mismo. Añadir en la figura una M sobre el carril del marcador.

7.3 Revisión de secuencias clonadas

Con el fin de asegurar que la secuencia de los genes clonados en el vector de expresión no contuviera mutaciones, se optó por secuenciar directamente los insertos en el vector pIJ6021 en el Instituto De Fisiología Celular, UNAM, para lo que se diseñaron oligonucleótidos que sirvieran para secuenciar dicho material. Las tres secuencias (*sco1639*, *sco4289* y *sco5702*) fueron correctas, mantuvieron los sitios de restricción, el codón de inicio, la secuencia codificante de cada gen, incluyendo las seis histidinas adicionales y el codón de término; se optó también por revisar por restricción los plásmidos resultantes de cada construcción.

Expresión de las proteínas SCO1639, SCO4289 y SCO5702

Se transformó a *S. lividans* con los plásmidos recombinantes y se realizaron cultivos de esta cepa con cada uno de estos. El micelio resultante de cada cultivo se cosechó y se realizó fraccionamiento celular. Posteriormente, las proteínas se analizaron por SDS-PAGE.

En los ensayos de expresión se incluyó un cultivo de *S. lividans* que contenía al vector pIJ6021 vacío con el fin de utilizar este cultivo como control (Fig. 9). Como se muestra en la Figura 9, no fue posible identificar a las proteínas de interés de acuerdo a la masa esperada: SCO1639 (33kDa), SCO4289 (13kDa), 5702 (15kDa). Es posible que en el gel de poliacrilamida se observa una zona alrededor de los 20 kDa en la que los lípidos presentes en la muestra interfieren con la tinción con azul de Coomassie, por lo que las muestras se precipitaron con metanol:cloroformo con el fin de disminuir los niveles de lípidos presentes; sin embargo, no fue posible limpiar completamente las muestras. No obstante, los lípidos únicamente interfieren con la tinción, por lo que se puede encontrar proteína a esa altura pero no teñida. Lo anterior podría explicar por qué no fue posible observar a las proteína SCO4289 de 13 kDa y a la proteína SCO4289 de 15 kDa, ya que si se encuentran glicosiladas el peso predicho puede aumentar; por el contrario, esto no puede explicar la razón por la cual no se observó a la proteína de 33 kDa. Este resultado fue inesperado, ya que el sistema que utiliza el vector pIJ6021 para la expresión de las

proteínas recombinantes incluye al promotor *PtipA*, el cual es muy fuerte bajo las condiciones que aquí se utilizaron (i. e. 1 mM IPTG) (Murakami *et al.* 1989). Adicionalmente, en el caso de otros genes clonados en este vector sí ha sido posible observar una banda correspondiente a las lipoproteínas expresadas (Arista-Carrera, 2012).

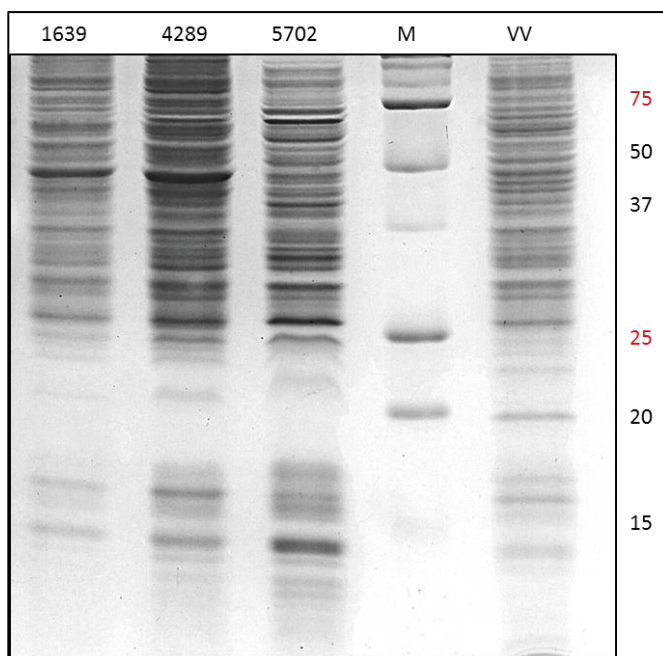


Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE de fracciones de membrana de *S. lividans* con los diferentes genes clonados. A partir de cultivos de *S. lividans* que acarrean al vector pIJ6021 con los diferentes genes clonados se obtuvieron preparaciones de membrana, y se corrieron dichas fracciones en geles de poliacrilamida al 14% con SDS. Arriba de cada carril se muestra el nombre del gen clonado o una “W” que corresponde a la cepa con el vector pIJ6021 vacío. M corresponde a los marcadores de peso molecular, cuyos tamaños se muestran del lado derecho.

7.5 Detección de las proteínas expresadas mediante Inmunodetección con Mab anti-6His

Los genes clonados fueron diseñados de tal manera que en la proteína recombinante se adicionó una etiqueta de 6 histidinas (6xHis) en su extremo carboxilo con el fin de identificarlas mediante inmunodetección. Por lo tanto, a pesar de no haber observado claramente las bandas correspondientes en un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomasie, sugiriendo una baja o nula

expresión de las proteínas, se procedió a realizar ensayos de inmunodetección, para los que se utilizó un anticuerpo monoclonal comercial capaz de reconocer la etiqueta 6xHis (Fig. 9). Como se observa en la Figura 10, no fue posible identificar a ninguna de las proteínas, solamente se observó la banda correspondiente al control positivo, la cual corresponde a una proteína (~75 kDa) presente en el marcador de peso molecular utilizado, la cual reacciona con el anticuerpo anti-6His. Este ensayo fue repetido en cinco ocasiones con muestras de fracciones membranales procedentes de diferentes cultivos, por lo que se sugirió la posibilidad de que las proteínas no mantuvieron la cola de histidinas aun cuando al revisar las secuencias en los plásmidos ésta estaba presente. Sin embargo, también existía la posibilidad de que las proteínas no se expresaban en absoluto en este sistema.

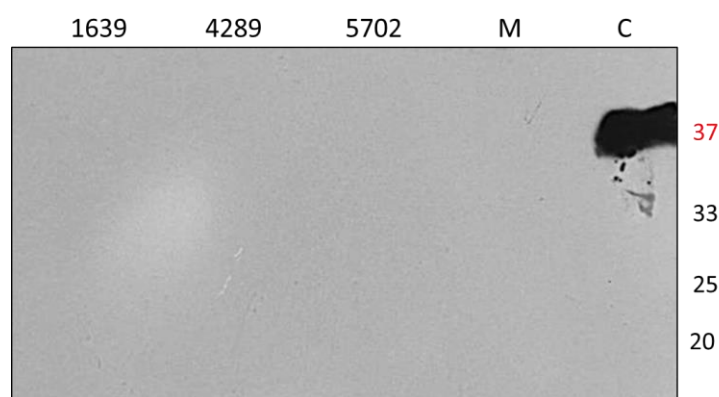


Figura 9. Inmunodetección de fracciones de membranas con anticuerpo anti-6His. Las fracciones membranales mostradas en le Fig. 8 fueron separadas en un gel de policarilamida-SDS y transferidas a una membrana de PVDF. Posteriormente se realizó una inmunodetección utilizando anticuerpos comerciales anti-6His. Los carriles están marcados como en le Fig. 9, excepto por el control positivo (C) que corresponde a la proteína APA+6His

Debido a que las secuencias no presentaron ningún problema que pudiese explicar estos resultados, no se pudo identificar a las proteínas de interés mediante la inmunodetección. Se intentó llevar a cabo una purificación de las mismas basada también en la presencia de la etiqueta 6xHis; dicho intento de purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad a níquel en un equipo de FPLC, empleando la columna HisTrap™ HP.

Dicho ensayo no arrojó ningún resultado, puesto que en las fracciones eluidas con imidazol no se encontró ninguna proteína al analizarlas por SDS-PAGE (Fig. 10).

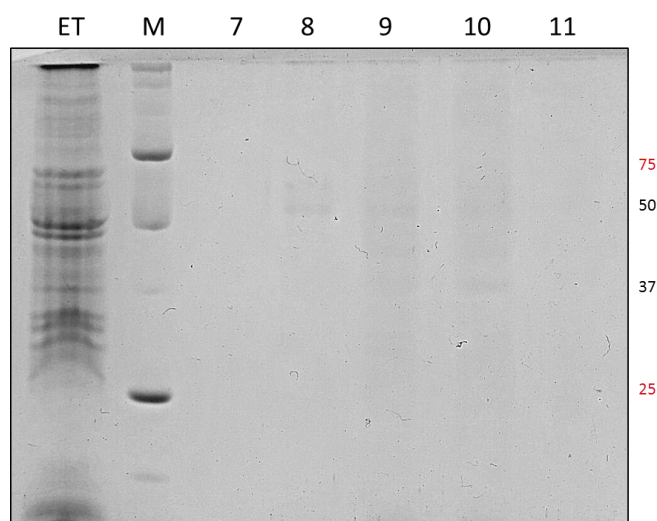


Figura 10. Purificación mediante FPLC de la proteína SCO1639 a partir de fracciones de membrana de *S. lividans*. Las proteínas de la fracción de membrana de *S. lividans* que lleva el plásmido pIJ6021 con el gen *sco1639* clonado adicionando seis histidinas, se cargaron en una columna de afinidad a níquel, y posteriormente eluidas con un gradiente de imidazol; las diferentes fracciones de la elución se corrieron en un gel de poliacrilamida, el cual se tiñó con azul brillante de Coomassie. (ET) indica el extracto total de proteínas de membrana, (M) indica el marcador de peso molecular y los diferentes números muestran las fracciones analizadas, que son las únicas que mostraron algo de absorbancia a 280nm.

La imposibilidad de detectar a las proteínas clonadas mediante la columna de afinidad se podría atribuir al hecho de que el extremo carboxilo (donde se encuentran las histidinas) pudiera no estar expuesto al solvente. Sin embargo, esta explicación se puede descartar debido a que los ensayos mostrados anteriormente (inmuno-blot) se realizaron en geles desnaturizantes y, por lo tanto, es improbable que la cola no se expusiera en estos ensayos.

Otra posible explicación para la incapacidad de detectar las proteínas recombinantes mediante la etiqueta 6xHis ubicada en el carboxilo terminal es que dicho extremo de la proteína se procese de alguna forma. Al revisar información al respecto, se encontró que el extremo carboxilo de algunas

proteínas de secreción se elimina cuando éstas son sustrato de las enzimas llamadas sortasas. Las sortasas son cisteín-transpeptidasas utilizadas por una gran variedad de bacterias, tanto Gram-negativas como Gram-positivas, para unir covalentemente proteínas a la pared celular. Estas proteínas se encuentran ancladas a la membrana a través de una reacción de transpeptidación y eliminan la región del carboxilo terminal de las proteínas blanco que siguen un motivo específico cerca del extremo carboxilo del tipo (LPXTG) para las sortasas del tipo SrtA y (NPQTN) para la sortasa SrtB (Dramsí y Bierne, 2016). Además, en el caso de *S. coelicolor*, el motivo específico es del tipo (LAXTG) para la sortasa SrtA (Duong *et al.*, 2012). Por lo tanto, se analizaron las secuencias de los genes clonados, y en ningún caso se encontró coincidencia entre los motivos nombrados anteriormente y las secuencias de las proteínas SCO1639, SCO4289, SCO5702 y SCO5786. Esto indica que aunque es posible que alguna proteasa haya intervenido en la pérdida de la etiqueta de histidinas dicha proteasa no es una sortasa puesto que estas tienen un motivo definido

7.6 Expresión y purificación de la proteína SCO1639a en *E. coli*

Existe un reporte en el que por medio de qRT-PCR se encontró que el gen homólogo a *sco1639* de *S. lividans* no solamente se expresa, sino que además parece ser esencial, ya que intentos para obtener una cepa con dicho gen deletado fueron infructuosos (Gullón *et al.*, 2013).

Lo anterior implica que el gen *sco1639* de *S. coelicolor* se debe expresar y además debe ser esencial. Por lo tanto, se pensó que el gen estuviera efectivamente sobre expresado a partir del plásmido generado pero que de alguna manera la proteína perdiera la etiqueta 6xHis en el carboxilo terminal, ya que no se detectó con anticuerpos anti-6xHis ni se logró obtener a partir de la purificación por medio de la columna de afinidad de Ni. Para probar esta hipótesis se decidió generar anticuerpos policlonales específicos contra la proteína del gen *sco1639*.

Para la generación de anticuerpos se inmunizaron conejos con proteína soluble obtenida en *E. coli*, para lo cual se utilizó el vector pET28a, el cual

contiene una secuencia 6xHis fusionada al N-terminal de la proteína recombinante, por lo que no fue necesario diseñar los oligonucleótidos con dicha etiqueta. Adicionalmente, el fragmento clonado en el pET28a correspondía solamente a la parte del gen que codifica la proteína madura, sin péptido señal ni la cisteína que se utiliza para unir lípidos a las lipoproteínas. Esta proteína fue llamada SCO1639a para diferenciarla del producto del gen *sco1639* silvestre.

Inicialmente se hicieron experimentos para determinar si la proteína expresada a partir del pET28a en *E. coli* se encontraba en la fracción soluble o en cuerpos de inclusión (Fig. 11). En la Figura 11 se muestra que la proteína se encuentra mayoritariamente en la fracción soluble (sobrenadante: SN).

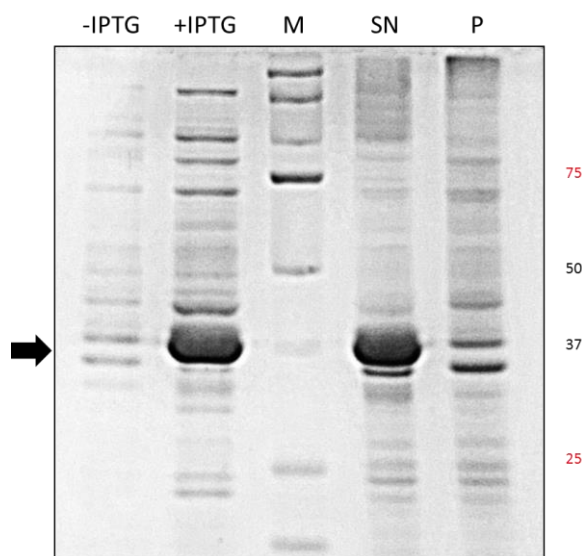


Figura 11. Inducción de la proteína SCO1639a en *E. coli*. La porción del gen *sco1639* que codifica la proteína SCO1639 madura (sin la cisteína de anclaje) fue clonada en el vector pET28a. La inducción de la proteína fue analizada tanto en ausencia del 1mM de IPTG como inductor (-IPTG) como en su presencia (+IPTG). Es posible observar la inducción de una proteína del tamaño esperado (indicada por una flecha). Una fracción de 1 ml del cultivo después de inducir fue sometida a lisis celular por sonicación, y centrifugada, para determinar si la proteína se encuentra en el sobrenadante (SN) correspondiente a las proteínas solubles o en el precipitado (P). Es posible observar que la mayor parte de la proteína está soluble. El carril M corresponde a los marcadores de peso molecular.

A continuación se purificó la proteína obtenida mediante el uso de la columna de afinidad a Ni. En esta ocasión la purificación se observó (Figura12) y la proteína purificada fue utilizada para la obtención de anticuerpos policlonales en conejo anti-SCO1639a, como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

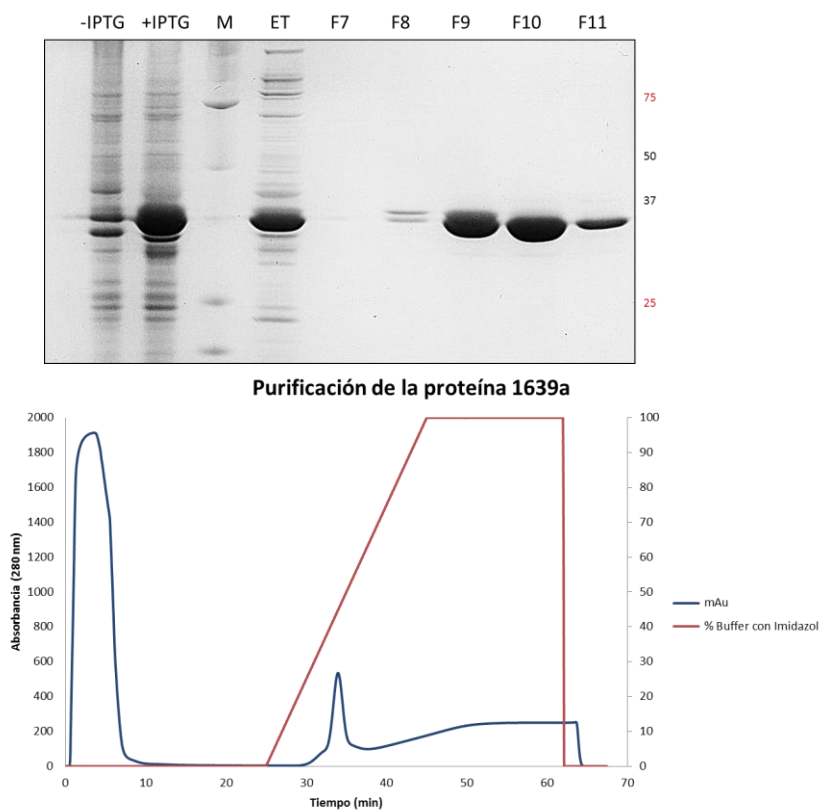


Figura 12. Purificación de la proteína SCO1639a. Los carriles marcados -IPTG y +IPTG corresponden al control de proteína total antes de inducir y después de inducir con 1 mM IPTG. El extracto soluble total (ET) fue cargado en una columna His-Trap FF montada en un equipo ÄktaPrime Plus y procesado de acuerdo al programa HisTrap Purification precargado en el equipo. Se colectaron 20 fracciones de 1 ml, y la proteína eluyó entre las fracciones 7 y 11 (carriles F7 a F11). También se presenta la gráfica generada por el equipo ÄktaPrime donde se observa la fracción purificada

7.7 Detección de la proteína SCO1639 por Inmunodetección

Los anticuerpos policlonales anti-SCO1639a se analizaron para detectar a la proteína SCO1639 en las fracciones de membrana de *S. lividans*, en las que anteriormente no pudo ser identificada por medio de la etiqueta 6xHis. Para dichos ensayos de inmunodetección se utilizaron distintas concentraciones de la fracción de membrana, tanto de *S. lividans* con el plásmido pIJ6021+*sco1639* como de *S. lividans* con el vector pIJ6021 vacío. (figura 13)

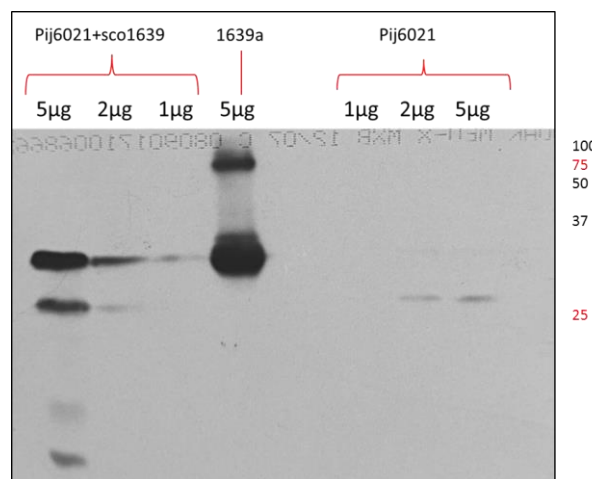


Figura 13. Inmunodetección de la proteína SCO1639 en fracciones de membrana utilizando anticuerpo policlonal anti 1639a. Se obtuvo la fracción de membrana a partir de micelio de *S. lividans* que lleva el gen *sco1639* clonado en el vector pIJ6021 como de *S. lividans* que lleva solamente el vector pIJ6021 vacío. Se cargaron diferentes volúmenes de fracción de membrana, correspondientes a la cantidad de proteína mostrada. Como control positivo se cargaron 5 µg de proteína SCO1639a pura (carril 1639a). La inmunodetección se realizó con los sueros de conejos inmunizados con proteína SCO1639a obtenidos en este trabajo, diluidos 1:8,000.

En la figura 13 se puede observar que la proteína SCO1639 sí se localiza en las fracciones revisadas anteriormente, aunque no fuera posible detectarla en los ensayos con anticuerpos anti-6xHis. Lo anterior podría deberse a que el extremo carboxilo de la proteína haya sufrido algún procesamiento que removiera la etiqueta 6xHis. También se puede ver que la proteína SCO1639a,

incluida como control positivo, corre ligeramente más abajo que la banda de SCO1639; esto muy posiblemente se debe a que, aunque la proteína SCO1639a se expresó a partir del pET28a, donde la secuencia del vector le añade 20 aminoácidos en el extremo amino-terminal (~2kDa, incluyendo las seis histidinas), la proteína SCO1639 presente en la fracción membranal se encuentra triacilada en la cisteína correspondiente al amino-terminal de la proteína madura, ya que se trata de una lipoproteína. Además, existe una alta probabilidad de que la proteína se glicosile, lo cual contribuiría también a una menor migración en el gel. Como se puede observar, los anticuerpos detectan una proteína a la misma altura, aunque en mucho menor cantidad en las fracciones de membrana correspondientes a *S. lividans* con el vector vacío, lo cual se explica por la expresión del gen cromosomal homólogo a *sco1639* en *S. lividans*. Además, indica que la proteína que se observa en cultivos con el gen clonado en el vector de expresión sí se debe a la presencia del gen clonado en el plásmido, ya que la cantidad es significativamente mayor. En el inmunoblot con anticuerpo anti-SCO1639a se puede observar que la proteína SCO1639 presenta cierto grado de degradación, ya que hay bandas de menor tamaño que reaccionan con los anticuerpos policlonales aunque la mayor parte de la proteína se encuentra íntegra. En el caso de la proteína de *S. lividans* con el vector vacío ésta se encuentra mayormente en una forma degradada de alrededor de 28 kDa.

7.8 La proteína SCO1639 es una peptidil-prolil cis-trans isomerasa funcional

Como se mencionó anteriormente, una de las razones para elegir a la proteína SCO1639 se debió a su posible función. Según la anotación del gen *sco1639* en la base de datos StrepDB, la proteína hipotética resulta ser una peptidil-prolil cis-trans isomerasa, de la familia de las FKBP.

Una vez que se determinó que la proteína SCO1639 sí se expresa y se encuentra en la membrana, se procedió a determinar si ésta posee la actividad enzimática predicha, para lo cual se realizó un protocolo de actividad utilizado para las peptidil-prolil cis-trans isomerasas. El protocolo se basa en la capacidad de la α -quimotripsina de liberar *p*-nitroanilida a partir del corte en el péptido succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida, lo cual sólo ocurre si el

enlace en el lado N-terminal del residuo de prolina está en la conformación trans. Es aquí cuando la enzima cataliza el cambio de conformación correspondiente para permitir que el péptido pueda ser atacado por la quimiotripsina (Fischer et al., 1984). Lo anterior resulta en un incremento en la velocidad de hidrólisis del péptido por la quimiotripsina, la cual ocurre también espontáneamente, como se ejemplifica en la Figura 14, donde se muestran los resultados típicos de una; nótese que aunque ambas curvas tienen un destino similar a lo largo del tiempo, aquella que se realiza en presencia de la isomerasa tiene una pendiente inicial mucho más pronunciada que aquella que carece de la enzima.

EL ensayo se realizó tanto con la proteína SCO1639a purificada de *E. coli* como con la fracción de membrana de *S. lividans* que contiene a la proteína SCO1639 sobrepresada. Los resultados obtenidos muestran que ambas proteínas (SCO1639a y SCO1639) tienen actividad enzimática que puede ser detectada mediante este ensayo de isomerización del péptido blanco. Es importante señalar que la proteína SCO1639a, obtenida de *E. coli*, no se encuentra glicosilada puesto que *E. coli* no cuenta con la maquinaria enzimática para glicosilar proteínas. Esto significa que la glicosilación de dicha proteína no es esencial para su función enzimática regular *in vitro*. (Figura14)

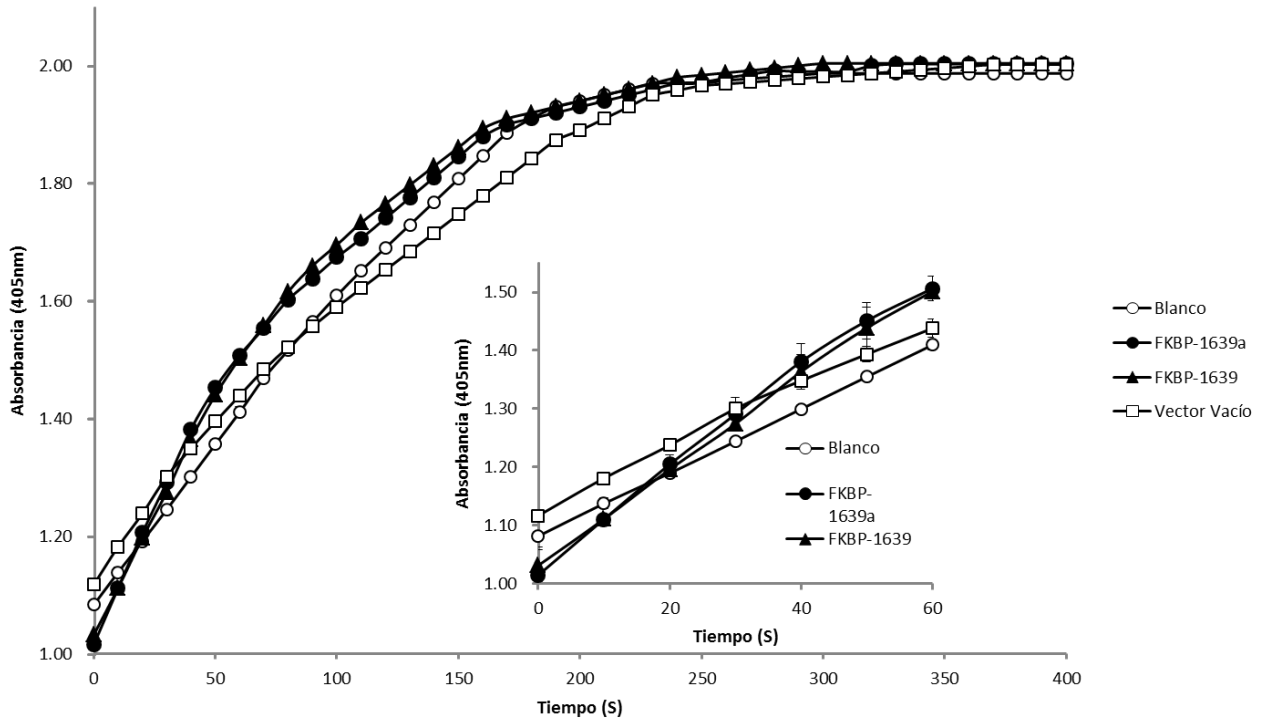


Figura 14. Determinación de actividad enzimática de FKBP. La actividad se determinó utilizando como blanco todos los componentes de la mezcla de reacción excepto enzima o extracto de membrana (círculos vacíos). Se determinó la actividad con fracciones de membrana correspondientes a 5 μ g de proteína de *S. lividans* con el vector pIJ6021 vacío (cuadros vacíos) y de *S. lividans* con el gen *sco1639* clonado (triángulos rellenos). También se determinó actividad con proteína SCO1639a (5 μ g) purificada a partir de *E. coli*. En la parte interna de la gráfica se muestra un acercamiento de la parte inicial de la curva, donde es más clara la identificación de las diferentes pendientes. Cada curva se realizó por triplicado.

7.9 Predicción de la estructura terciaria de la proteína SCO1639.

Con la finalidad de conocer un poco a la proteína SCO1639, se optó por recurrir a un algoritmo de predicción de estructura y función de proteínas llamado I-TASSER (Yang *et al.*, 2014, Roy *et al.*, 2010) La proteína cuenta con una estructura predicha que consiste de siete α hélices y trece hojas β plegadas (Figura 15).



Figura 15. Predicción de la estructura de la proteína SCO1639. Se muestra el mejor modelo tridimensional obtenido empleando como molde la estructura cristalográfica de la FKPB humana (PDB 1Q1C). El extremo amino se muestra en tonalidad azul y el extremo carboxilo en tonalidad roja. Encerrado en un círculo blanco se encuentra la etiqueta de seis histidinas expuesta.

El resultado mostrado se realizó con ayuda del programa I-TASSER, con estimaciones globales y locales de precisión utilizaron como molde una FKBP_C cristalizada de humano (seq.ref. 1q1c: A). Es evidente que la etiqueta 6xHis se encuentra altamente expuesta, lo que podría significar que

dichos residuos son muy susceptibles a actividad de proteasas y por lo tanto, esto podría explicar la facilidad con la que se perdió dicha etiqueta tanto en la proteína en cuestión como en las otras proteínas cuyos genes fueron clonados

El experimento arrojó diez proteínas resultantes para generar la estructura tridimensional, pero debido al alto grado de homología entre varias secuencias, se resumieron en tres proteínas principales. La puntuación normalizada z (3.52 en el mejor resultado) analiza la calidad de los alineamientos con otras proteínas. Los alineamientos con un valor z mayor a 1 prestan un alineamiento confiable y es posible que tengan el mismo plegamiento a la proteína de interés (Fig. 16). En cuanto a la identidad de secuencia en los diferentes alineamientos, es un indicador de parentesco evolutivo entre la proteína de interés y las demás proteínas alineadas. Es importante mencionar que la estructura que se predice se realizó con base en tres estructuras cristalizadas de humano.

```

H.salinarum          DFVELSYTAYTVDSEELVDTTDEEIAESEGVDTDEQEFSPRTIVLGEEHIFAAVEDDIVG
S.coelicolor1639    dfvsanylgqvwsakvfd-----nsydrktpiviqlaagsiidgwryaltg
G.max                kkvsvkyigklqkdgkifd-----snv-grapfkfrlgvgqvikgwevging
E.coli               dtvvvnykgtli-dgkefd-----nsytrgeplsfri--dgvipgwteglkn
H.sapiens            dfmryhyngslm-dgtlfd-----ssysrnhtyntyigqgyiipgmdqglqg
C.elegans            dqlhmhytgtil-dgtefd-----ssrtrneeftftlgqgnvikgwdqglln
. : * . . . *                ..                : :: . :

H.salinarum          QSVGDDGTVLVEEAFGEYDEDEVRTVSANKIPEDDRYPGAHVVDVGEHGHVEAIIIGRAR
S.coelicolor1639    kktgsrvqfsvpptwgygeq-gne---qagikg-----
G.max                mrigdkrritippsmgyadk-rvg----sipp-----
E.coli               ikkggkiklvippelaygka-gvp----gipp-----
H.sapiens            acmgerrritipphlaygen-gtg---dkipg-----
C.elegans            mcvgerrritipphlgyger-gap----pkipg-----
* . : . .                *

H.salinarum          VDFNHPLAGEDIEYEYELVDEITDREQQAVGFLEMMFDVELDVLDV-TETVEE-----
S.coelicolor1639    -----ddtlvfvdvqdtfnakssaqqkvaqdd
G.max                -----sswlvfdvelvdvgr-----
E.coli               -----nstlvfdvelldvkpackad-----
H.sapiens            -----savlifnvhvidfhnpadvv-----
C.elegans            -----nsvlkfdvelmkidrdgeel-----
: * *.:

```

Figura 16. Se muestra el alineamiento obtenido por medio del programa CLUSTAL W de la secuencias de FKBP de *S. coelicolor* (SCO1639), con las de la arquea *Halobacterium salinarum*, la proteobacteria *E. coli*, la soya *Glycine max*, el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, y el humano *Homo sapiens*. Los aminoácidos conservados se encuentran marcados con (*), los cambios conservativos (:) y los cambios semiconservativos

Es evidente que las secuencias conservadas en diversas proteínas podrían corresponder a una relación evolutiva y fue por esta razón que se realizó un alineamiento de secuencias para poder conocer si dicha secuencia se encuentra conservada a lo largo de la evolución.

7.10 La glicoproteína PstS de *S. coelicolor* sí conserva la etiqueta de histidinas

La proteína SCO1639, cuyo gen se clonó y se expresó en el presente trabajo, de alguna forma perdió la etiqueta de histidinas que se pretendía usar como método de detección y de purificación; es posible sugerir que lo mismo ocurrió con las otras proteínas a las cuales se añadió la etiqueta, pero que tampoco se pudieron identificar mediante la misma metodología (SCO4289 y SCO5702). Como se mencionó anteriormente, los genes clonados fueron secuenciados y se confirmó la existencia de los genes clonados con dicha etiqueta, por lo que se descartó la posibilidad de que las secuencias hayan sido de alguna manera modificadas. Es importante mencionar que proteínas de *M. tuberculosis* expresadas en *S. lividans* con una etiqueta de histidinas añadida en el extremo carboxilo como son Apa, LpqH, Mpt83 (Arista, 2016, comunicación personal) y PstS-1 (González-Cerón, comunicación personal) no presentaron este problema, y fue posible detectarlas y purificarlas mediante el uso de la etiqueta, es decir, la pérdida de la etiqueta pareció ocurrir solamente en proteínas propias de *Streptomyces*. Es también importante mencionar que *S. lividans* tiene muchas proteasas (59 proteasas predichas en la base de datos, muchas de ellas extracelulares) y de éstas se conocen muy pocas. Lo anterior podría suponer que *S. lividans* presenta proteasas que cortan el extremo carboxilo de las proteínas en secuencias específicas, lo que podría explicar que no siempre se pierda la etiqueta. Como se presentó anteriormente, los anticuerpos anti-1639a lograron identificar a la proteína SCO1639 en la fracción membranal con una masa muy cercana a la esperada. (Figura 17). Sin embargo, en al menos un caso sí se logró detectar a una lipoproteína de *S. coelicolor* mediante una etiqueta de histidinas colocada en el extremo carboxilo. Se trata de la proteína PstS (codificada en el gen *sco4142*), la cual es homóloga a PstS-1 de *M. tuberculosis* y se describe como

una glicoproteína (Wehmeier *et al.*, 2009). En este caso se logró su purificación por columna de afinidad a níquel, lo que demuestra que la eliminación de la etiqueta no es general para todas las lipoproteínas de *S. coelicolor*. La pérdida de histidinas no es algo reciente, puesto que en 2002 se obtuvieron resultados similares en los que la proteína estudiada había perdido los últimos 19-20 residuos de aminoácidos, incluyendo a la etiqueta de histidinas (Tremblay *et al.*, 2002). Pero en este caso, la ausencia de una metodología completa y la omisión de información vital en el artículo, como lo son los oligonucleótidos utilizados, no permitió obtener resultados concluyentes, ya que se sabe que las proteínas glicosiladas son más resistentes a proteasas podría ser que dicha degradación se llevara a cabo muy temprano en la traducción.

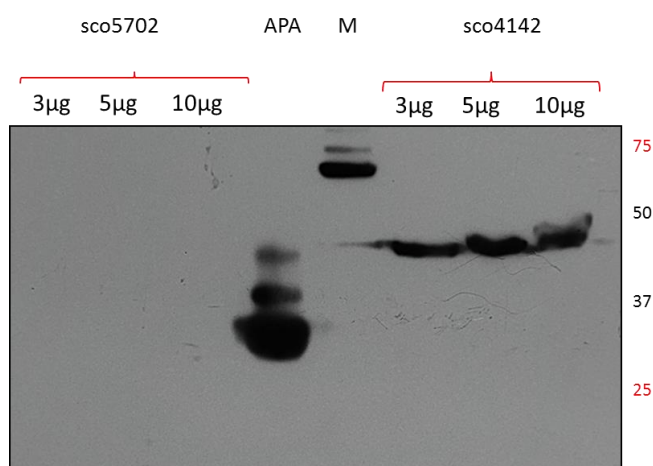


Figura 17. Inmunodetección con anticuerpo antihistidinas. De izquierda a derecha: 3 Fracciones membranales de la cepa que sobreexpresa el gen sco5702 con distintas cantidades de proteína 3,5 y 10µg, Proteína Apa purificada 5µg, Marcador y sco4142 (40kDa) purificada 3,5 y 10µg respectivamente.

8 Conclusiones

- No existe ninguna lipoproteína codificada en el genoma de *S. coelicolor* que posea el motivo de glicosilación completo derivado del glicoproteoma de *M. tuberculosis*.
- Una versión reducida del motivo sí permite la predicción de glicoproteínas en coincidencia con otros algoritmos de predicción.
- La etiqueta 6xHis ubicada en el carboxilo-terminal de la lipoproteína SCO1639 (FKBP) no resultó útil para su detección ni para su purificación, a diferencia de lipoproteínas de *M. tuberculosis* y de la lipoproteína SCO4142 (PstS) de *S.coelicolor*.
- El gen *sco1639* de *S. coelicolor* codifica una peptidil prolil cis-trans isomerasa de la familia FKBP, la cual es funcional y no requiere glicosilación ni anclaje a la membrana para ser funcional por los resultados observados con la proteína obtenida de *E. coli*.

9 Perspectivas

- Probar otros tipos de etiqueta para proteínas de *S. coelicolor* expresadas en *S.lividans*.
- Secuenciar las proteínas que perdieron la etiqueta de histidinas mediante espectrometría de masas con el fin de conocer el sitio de corte.
- Probar otras proteínas que hayan perdido la etiqueta de histidinas con el fin de observar si existe alguna relación entre la secuencia y la pérdida de la etiqueta.

10 Referencias

- Anfinsen, C. (1973). Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science*, 181(4096), pp.223-230.
- 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.
- Arista Carrera, I. (2016). Caracterización De Lipoproteínas De *Mycobacterium Tuberculosis* Producidas En *Streptomyces Lividans* (M. en. C). UNAM.
- Battistuzzi, F. and Hedges, S. (2008). A Major Clade of Prokaryotes with Ancient Adaptations to Life on Land. *Molecular Biology and Evolution*, 26(2), pp.335-343.
- Bause, E. & Lehle, L. (1979). Enzymatic N-Glycosylation and O-Glycosylation of Synthetic Peptide Acceptors by Dolichol-Linked Sugar Derivatives in Yeast. *Eur J Biochem*, 101(2), 531-540.
- Bentley, S., Chater, K., A., Challis, G., Thomson, N., James, K., Harris, D., Quail, M., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B., Parkhill, J. and Hopwood, D. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417(6885), pp.141-147.
- Berks, B. (2000). The bacterial Tat protein export pathway. *Biochim. Soc. Trans.*, 28(3), A58.2-A58.
- Bertram, R., Schlicht, M., Mahr, K., Nothhaft, H., Saier, M., & Titgemeyer, F. (2004). In Silico and Transcriptional Analysis of Carbohydrate Uptake Systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal Of Bacteriology*, 186(5), 1362-1373.
- 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*, 72(1-2), 248-254.

- Brennan, P. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 83(1-3), pp.91-97.
- Charuk, J.H.M., Tan, J., Bernardini, M., Hadelad, S., Reitheimer, R.A.F., Jaeken, J., Schachter, H. (1995) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type II – an autosomal recessive N-acetylglucosaminyltransferase II deficiency different from typical hereditary erythroblastic multinuclearity, with a positive acidified-serum lysis test (HEMPAS). *European Journal of Biochemistry*, **230**, 797–799
- Chauhan, J., Bhat, A., Raghava, G. and Rao, A. (2012). GlycoPP: A Webserver for Prediction of N- and O-Glycosites in Prokaryotic Protein Sequences. *PLoS ONE*, 7(7), p.e40155.
- Chauhan, J., Bhat, A., Raghava, G., & Rao, A. (2012). GlycoPP: A Webserver for Prediction of N- and O-Glycosites in Prokaryotic Protein Sequences. *PLoS ONE*, 7(7), e40155.
- Compton, L., Davis, J., Macdonald, J. And Bachinger, H. (1992). Structural and functional characterization of *Escherichia coli* peptidyl-prolyl cis-trans isomerases. *Eur J Biochem*, 206(3), pp.927-934.
- Cooper, H., Gurcha, S., Nigou, J., Brennan, P., Belisle, J., Besra, G., & Young, D. (2002). Characterization of mycobacterial protein glycosyltransferase activity using synthetic peptide acceptors in a cell-free assay. *Glycobiology*, 12(7), 427-434.
- Daniel, R. and Errington, J. (2003). Control of Cell Morphogenesis in Bacteria. *Cell*, 113(6), pp.767-776.
- Don, R., Cox, P., Wainwright, B., Baker, K. and Mattick, J. (1991). ‘Touchdown’ PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl Acids Res*, 19(14), pp.4008-4008.
- Duong, A., Capstick, D., Di Berardo, C., Findlay, K., Hesketh, A., Hong, H., & Elliot, M. (2012). Aerial development in *Streptomyces coelicolor* requires sortase activity. *Molecular Microbiology*, 83(5), 992-1005.
- Espitia, C., Servín-González, L., & Mancilla, R. (2010). New insights into protein O-mannosylation in actinomycetes. *Mol. Biosyst.*, 6(5), 775.

- Expasy.org, (n.d.). ExPASy: SIB Bioinformatics Resource Portal - Categories. [online] Available at: <http://www.expasy.org/proteomics> [Acceso 19 Agosto 2015].
- Feng, L., Chen, Z., Hu, Y., Wang, Z., & Chen, S. (2016). Genome-wide characterization of monomeric transcriptional regulators in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*.
- Fischer G, Bang H, Mech C.. Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed Biochim Acta* 43: 1101-1111
- Flårdh, K. (2003). Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*, 6(6), pp.564-571.
- Friedman, D.B. and Lilley K.S. “Quantitative proteomics for two-dimensional gels using difference gel electrophoresis (DIGE) technology” in John M Walker, *Protein Protocols*, 3rd Edition, Humana Press, 2009.
- Galat, A. (2003). Peptidylprolyl Cis / Trans Isomerases (Immunophilins): Biological Diversity - Targets - Functions. *CTMC*, 3(12), 1315-1347.
- Gasteiger, E. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3784-3788.
- Gemmill, T. & Trimble, R. (1999). Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1426(2), 227-237.
- Gentzsch, M., Immervoll, T., & Tanner, W. (1995). Protein O -glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*: the protein O -mannosyltransferases Pmt1p and Pmt2p function as heterodimer. *FEBS Letters*, 377(2), 128-130.
- González-Cerón, G., Miranda-Olivares, O. 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*, 301(1), pp.35-43.

- 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. *J. Proteome Res.*, 8(2), pp.721-733.
- Grenier, F., Matteau, D., Baby, V. and Rodrigue, S. (2014). Complete Genome Sequence of Escherichia coli BW25113. *Genome Announcements*, 2(5), pp.e01038-14-e01038-14.
- Gullón, S., Arranz, E. and Mellado, R. (2013). Transcriptional characterisation of the negative effect exerted by a deficiency in type II signal peptidase on extracellular protein secretion in *Streptomyces lividans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(23), pp.10069-10080.
- Gupta, S. D., Gan, K., Schmid, M. B., and Wu, H. C. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 16551-16556 Gupta,R. and Brunak,S. (2002) Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac. Symp. Biocomput.*, 310–322.
- Hiraishi, Y., Nandakumar, S., Choi, S., Lee, J., Kim, Y., & Posey, J. et al. (2011). Bacillus Calmette-Guérin vaccination using a microneedle patch. *Vaccine*, 29(14),
- 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*, 274(45), pp.32023-32030.
- Hutchings, M., Hong, H., Leibovitz, E., Sutcliffe, I., & Buttner, M. (2008). The E Cell Envelope Stress Response of *Streptomyces coelicolor* Is Influenced by a Novel Lipoprotein, CseA. *Journal Of Bacteriology*, 190(17), 6037-6037.
- Hutchings, M., Palmer, T., Harrington, D., & Sutcliffe, I. (2009). Lipoprotein biogenesis in Gram-positive bacteria: knowing when to hold ‘em, knowing when to fold ‘em. *Trends In Microbiology*, 17(1), 13-21.

- Inouye, S., Wang, S., Sekizawa, J., Halegoua, S. and Inouye, M. (1977). Amino acid sequence for the peptide extension on the prolipoprotein of the Escherichia coli outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(3), pp.1004-1008.
- Jurado, L., Coloma, A., & Cruces, J. (1999). Identification of a Human Homolog of the Drosophila rotated abdomen Gene (POMT1) Encoding a Putative Protein O-Mannosyl-Transferase, and Assignment to Human Chromosome 9q34.1. *Genomics*, 58(2), 171-180.
- Kamalakkannan, S., Murugan, V., Jagannadham, M., Nagaraj, R., & Sankaran, K. (2004). Bacterial lipid modification of proteins for novel protein engineering applications. *Protein Engineering Design And Selection*, 17(10)
- Kawamoto, S. and Ochi, K. (1998). NOTE: Comparative ribosomal protein (L11 and L30) sequence analyses of several Streptomyces spp. commonly used in genetic studies. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(2), pp.597-600.
- Kieser, T., Bibb, M., Buttner, M., Chater, K. and Hopwood, D. (2000). *Practical Streptomyces genetics*. Norwich: John Innes Foundation.
- Kinoshita, T. (2000). Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis. *Current Opinion In Chemical Biology*, 4(6), 632-638.
- Kofron, J., Kuzmic, P., Kishore, V., Colon-Bonilla, E. and Rich, D. (1991). Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay. *Biochemistry*, 30(25), pp.6127-6134.
- Kornfeld, R. (1985). Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry*, 54(1), pp.631-664.
- Labeda, D. (2010). Multilocus sequence analysis of phytopathogenic species of the genus Streptomyces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(10), 2525-2531.
- Langsford, M., Gilkes, N., Singh, B., Moser, B., Miller, R., Warren, R., & Kilburn, D. (1987). Glycosylation of bacterial cellulases prevents proteolytic cleavage between functional domains. *FEBS Letters*, 225(1-2), 163-167.

- Lara, M., Servin-Gonzalez, L., Singh, M., Moreno, C., Cohen, I., Nimtz, 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*, 70(2), pp.679-685.
- Lehle, L., Strahl, S. and Tanner, W. (2006). Protein Glycosylation, Conserved from Yeast to Man: A Model Organism Helps Elucidate Congenital Human Diseases. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(41), pp.6802-6818.
- Lommel, M., Schott, A., Jank, T., Hofmann, V., & Strahl, S. (2011). A Conserved Acidic Motif Is Crucial for Enzymatic Activity of Protein O-Mannosyltransferases. *Journal Of Biological Chemistry*, 286(46), 39768-39775.
- Martin-Blanco, E. & Garcia-Bellido, A. (1996). Mutations in the rotated abdomen locus affect muscle development and reveal an intrinsic asymmetry in *Drosophila*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 93(12), 6048-6052.
- Moparthi, S., Hammarström, P., & Carlsson, U. (2009). A nonessential role for Arg 55 in cyclophilin18 for catalysis of proline isomerization during protein folding. *Protein Science*, 18(2), 475-479.
- Mormann M, Paulsen H, Peter-Katalinic J. 2005. Electron capture dissociation of O-glycosylated peptides: Radical site-induced fragmentation of glycosidic bonds. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, England)* 11:497–511.
- Mrc-lmb.cam.ac.uk, (2014). DOLOP - A Database of Bacterial Lipoproteins. [online] Sisonible en : [29 Sep. 2015].
- Murakami, T., Holt, T. y Thompson, C. (1989). Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol.*, 171(3), pp.1459-66.
- Nielsen, J.B.K. and Lampen, J.O. (1982) *J. Bacteriol.*, 152, 315-322. Ochman, H. and Wilson, A.C. (1987) *J. Mol. Evol.*, 26, 74-86. Parsot, C. (1986) *EMBO J.*, 5, 3013-3019.
- Ochi, K. (1995). Taxonomic Characterization of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans* 66 by Analysis of Ribosomal Proteins. *Actinomycetologica*, 9(1), 49-52.

- Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y. and Hattori, M. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), pp.12215-12220.
- Perez-Vilar, J., Hidalgo, J., and TeIasco, A.(1991) *J. Biol. Chem.* 266, 23967-23970
- Redenbach, M., Kieser, H., Denapaitte, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. and Hopwood, D. (1996). A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Molecular Microbiology*, 21(1), pp.77-96
- Roth, J. (1995). Biosynthesis. Compartmentation of Glycoprotein Biosynthesis. In: *Glycoproteins*, ed. J. Montreuil, H. Schachter, and J.F.G. Vliegenhart, Amsterdam: Elsevier, 287–312.
- Roy, A., Kucukural, A. and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*, 5(4), pp.725-738.
- Sabio y García, J., Bigi, F., Rossetti, O., & Campos, E. (2010). Expression of MPB83 from *Mycobacterium bovis* in *Brucella abortus* S19 induces specific cellular immune response against the recombinant antigen in BALB/c mice. *Microbes And Infection*, 12(14-15), 1236-1243.
- Schultz, J., & Takayama, K. (1975). The role of mannosylphosphorylpolyisoprenol in glycoprotein biosynthesis in *Mycobacterium smegmatis*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 381(1), 175-184.
-
- Shental-Bechor, D. & Levy, Y. (2008). Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 105(24), 8256-8261.
- Shevach, E. (1985). The Effects of Cyclosporin A on the Immune System. *Annual Review of Immunology*, 3(1), pp.397-423.

- Siekierka, J., Hung, S., Poe, M., Lin, C. and Sigal, N. (1989). A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature*, 341(6244), pp.755-757.
- Smith, G., Sweredoski, M. and Hess, S. (2014). O-linked glycosylation sites profiling in *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins. *Journal of Proteomics*, 97, pp.296-306.
- Steentoft, C., Vakhrushev, S., Joshi, H., Kong, Y., Vester-Christensen, M., Schjoldager, K., Lavrsen, K., Dabelsteen, S., Pedersen, N., Marcos-Silva, L., Gupta, R., Paul Bennett, E., Mandel, U., Brunak, S., Wandall, H., Lavery, S. and Clausen, H. (2013). Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology.
- Steentoft, C., Vakhrushev, S., Joshi, H., Kong, Y., Vester-Christensen, M., & Schjoldager, K. et al. (2013). Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J*, 32(10), 1478-1488.
- Strepdb.streptomyces.org.uk, (n.d.). StrepDB - The Streptomyces Annotation Server. [online] Disponible en: <http://strepdb.streptomyces.org.uk> [11 Sep. 2014].
- Szymanski, C., Logan, S., Linton, D. and Wren, B. (2003). Campylobacter a tale of two protein glycosylation systems. *Trends in Microbiology*, 11(5), pp.233-238.
- Tan, F., Tang, C., & Exley, R. (2015). Sugar coating: bacterial protein glycosylation and host-microbe interactions. *Trends In Biochemical Sciences*, 40(7), 342-350.
- Tavares Cornejo, M. (2012). Estudio de la expresión y glicosilación de la subunidad periplásmica del transportador específico de fosfatos (psts-1) de *mycobacterium tuberculosis* en *streptomyces coelicolor* (Licenciatura). UNAM.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76 (9)
- VanderVen BC, Harder JD, Crick DC, Belisle JT. Export-mediated assembly of mycobacterial glycoproteins parallels eukaryotic pathways. *Science*. 2005 5;309(5736):941-3.

- Virji, M., Saunders, J., Sims, G., Makepeace, K., Maskell, D. and Ferguson, D. (1993). Pilus-facilitated adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells: modulation of adherence phenotype occurs concurrently with changes in primary amino acid sequence and the glycosylation status of pilin. *Molecular Microbiology*, 10(5), pp.1013-1028.
- Wehmeier, S., Varghese, A., Gurcha, S., Tissot, B., Panico, M., & Hitchen, P. et al. (2009). Glycosylation of the phosphate binding protein, PstS, in *Streptomyces coelicolor* by a pathway that resembles protein O-mannosylation in eukaryotes. *Molecular Microbiology*, 71(2), 421-433.
- Worthen, D. (2007). *Streptomyces* in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. *Journal Of The History Of Medicine And Allied Sciences*, 63(2), 273-274.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. and Zhang, Y. (2014). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1), pp.7-8.
- Young, S. (2005). A thematic review series: lipid modifications of proteins. *The Journal of Lipid Research*, 46(12), pp.2529-2530.

11 Anexo

11.1 Protocolos

Extracción De DNA Plásmidico (Minipreps) de *E. coli*.

1. crecer toda la noche un cultivo de 3 ml con medio LB o YT2X y antibióticos correspondientes.
2. Al día siguientes, centrifugar 1.5 ml del cultivo a 6000 rpm por 6 minutos y retirar todo el sobrenadante.
3. Resuspender con ayuda del vórtex y resuspender el paquete celular en 100 μ l de Tris 25mM-EDTA 25 mM. Mezclar con vortex. Dejar 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Añadir 200 μ l de una solución NaOH 0.2N, SDS 1%. Se prepara justo al momento de usarse. Mezclar manualmente por inversión hasta que el cultivo se vea transparente, homogéneo y muy viscoso. Dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Añadir 150 μ l de Acetato de potasio 3M pH=4.8, mezclar muy bien manualmente hasta que disminuya la viscosidad y se vea un precipitado blanco. Dejar 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Añadir al tubo 400 μ l de fenol: cloroformo (1:1), mezclar con ayuda del vórtex por 30 segundos y centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm.
7. Recuperar la fase acuosa y pasarla a otro tubo. Añadir 1 ml de etanol absoluto frío (-20°C). Mezclar manualmente y dejar precipitando 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm. Retirar todo el sobrenadante. Dar un pulso en la centrífuga y retirar el sobrenadante restante.
9. Resuspender el pellet en 50 μ l de TE (10mM Tris, 0.1mM EDTA) en el baño caliente a 50-55°C por 5 minutos.
10. Agregar 150 μ l de Acetato de Sodio 4M pH=6 (para precipitar RNA). Mezclar muy bien manualmente y dejar 1 hora a -20°C.
11. Centrifugar 10 minutos a 14,000 rpm. Recuperar el sobrenadante, pasar a un tubo limpio y añadir 200 μ l de isopropanol. Agitar manualmente y dejar precipitando 10 minutos a temperatura ambiente.
12. Centrifugar 10 minutos a 14,000 rpm y eliminar todo el sobrenadante. Resuspender en 45 μ l de TE (10mM Tris, 0.1mM EDTA) en baño caliente a 50-55°C por 5 minutos. Después agregar 5 μ l de Acetato de Sodio 3M pH=6. Mezclar manualmente y posteriormente agregar 125 μ l de etanol absoluto frío (-20°C). Dejar 10 minutos a temperatura ambiente.
13. Centrifugar 10 minutos a 14,000 rpm y eliminar todo el sobrenadante. Secar el pellet en el baño caliente a 50-55°C por 5 minutos.
14. Resuspender en 25 μ l de TE (10mM Tris, 0.1mM EDTA). Guardar a -20°C.

Extracción de DNA plásmidico (Midipreps Y Maxipreps) De *E. coli*.

1. Para midipreps poner a crecer 30 ml, para maxipreps 100 ml de LB o YT2X toda la noche.
2. Centrifugar a 6,000 rpm 10 minutos y eliminar el sobrenadante. Centrifugar de nuevo (6,000 rpm, 2 minutos) para retirar todo el exceso de medio de las paredes de los tubos.
3. Mezclar mediante vórtex hasta que el pellet quede perfectamente resuspendido. Para las midipreps (30 ml) agregar 1 ml de TE 25mM-EDTA 25 mM y para las maxiprep (100 ml) agregar 4 ml de TE 25mM-EDTA 25 mM. Mezclar mediante vórtex. Dejar 13 minutos en hielo.
4. Prepara al momento una solución de NaOH 0.2N, SDS 1% (el stock de NaOH también debe prepararse al momento, para mejorar la lisis). Mezclar muy bien manualmente, de manera suave y abarcando toda la pared del tubo y la tapa, para que todas las células se lisen, hay que evitar que se formen burbujas. Se debe ver transparente, homogéneo y poco viscoso. Dejar 10 minutos en hielo.
5. Agregar 1.5 ml de Acetato de potasio 3M pH=4.8 para la midiprep (30 ml) y 6 ml de Acetato de potasio 3M pH=4.8 para la maxiprep (100 ml) y agitar de manera suave y abarcando toda la pared del tubo. Dejar 15 minutos en hielo.
6. Agregar 4 ml de fenol:cloroformo (1:1) para la midiprep y 16 ml de fenol:cloroformo (1:1) para la maxiprep. Agitar manualmente, no usar vortex. Centrifugar 7,500 rpm por 10 minutos a 4°C.
7. Colectar el sobrenadante con mucho cuidado usando una punta de 1 ml y pasarlo a un tubo limpio.
8. Agregar dos volúmenes de etanol frío (-20°C) y agitar manualmente. Dejar precipitando 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Centrifugar 7,500 rpm por 10 minutos a 4 °C. Eliminar el sobrenadante y dar un centrifugar de nuevo a 7,500 rpm por 2 minutos para retirar el exceso de etanol de las paredes del tubo.
10. Resuspender en 1 ml de TE (10mM Tris, 0.1mM EDTA) a 50-55°C por 10 minutos. Agregar 3 ml de Acetato de Sodio 4M pH=6, mezclar manualmente para precipitar..
11. Centrifugar y pasar el sobrenadante a un tubo limpio. Precipitar con 1 volumen (4 ml) de isopropanol. Dejar 10 minutos a temperatura ambiente.
12. Centrifugar, eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 500 µl de TE (10mM Tris, 0.1mM EDTA). Después agregar 1-2 µl de RNAasa e incubar a 37°C por lo menos una hora.
13. Agregar 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1) (500 µl), Mezclar mediante vórtex, recuperar la fase acuosa (dos o tres veces hasta que la interfase no sea blanca), después dar un pase con 1 volumen de cloroformo absoluto, recuperar la fase acuosa y pasar a un tubo limpio.
14. Precipitar el DNA con 1/10 de Acetato de Sodio 3M pH=6 y 1 volumen de isopropanol, mezclar manualmente. Dejar a temperatura ambiente 10 minutos.
15. Centrifugar 10 minutos a 14, 000 rpm, eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet 5 minutos a 50-55 °C en baño caliente.

16. Resuspender en 100 μ l de TE (10mM Tris, 0.1mM EDTA) y almacenar a -20°C.

Si se requiere el DNA para secuenciar o particularmente muy limpio se debe realizar (spooling):

1. Al DNA resuspendido agregar 1/10 de volumen de Acetato de Sodio 3M pH=6, mezclar y dar un bajón.
2. Agregar 1 volumen de isopropanol con cuidado para que se formen dos fases, mezclar manualmente y observar la formación de una malla. Pegar la malla al tubo, eliminar el sobrenadante y agregar 2 ½ volumen de etanol al 70% frío (-20°C), repetir todo el proceso hasta que el sobrenadante se vea transparente. (con unas 4 veces es generalmente suficiente).

Extracción de DNA Plásmidico (Minipreps) de *Streptomyces sp.*

1. Crecer un cultivo de 3 ml de LB + sacarosa al 34% y glicina al 0.5% y las esporas dos días antes.
2. Cumplido el tiempo, centrifugar el cultivo a 14,000 rpm por 10 minutos. Eliminar todo el medio.
3. Resuspender el pellet con el vórtex. Agregar 100 μ l de una solución Tris 25mM-EDTA 25 mM con 8 mg/ml de lisozima. Mezclar con el vórtex e incubar 2 horas a 37°C o hasta que las células se vean translúcidas.
4. Añadir 200 μ l de una solución preparada al momento de NaOH 0.2N + SDS 1% y mezclar 10 segundos en el vórtex con las tapas invertidas. Incubar 10 a temperatura ambiente (debe quedar perfectamente mezclado y la solución se debe ver translúcida).
5. Añadir 150 μ l de Acetato de Potasio 3M pH=4.8, mezclar bien manualmente hasta que se pierda la viscosidad y se vea un precipitado blanco. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Añadir al tubo 400 μ l de fenol:cloroformo (1:1), agitar 30 segundos en vórtex y centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos. Repetir hasta que la interfase no sea blanca.
7. Pasar la fase acuosa a un tubo limpio y añadir 1 ml de etanol absoluto frío (-20°C), mezclar manualmente y dejar precipitando 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm. Retirar todo el sobrenadante. Dar un pulso y quitar los excesos.
9. Resuspender el pellet en 50 μ l de TE (10mM Tris, 0.1mM EDTA) en baño caliente a 50-55°C por 5 minutos.
10. Agregar 150 μ l de Acetato de Sodio 4M pH=6 (para precipitar RNA). Mezclar muy bien manualmente y dejar 1 hora a -20°C.
11. Centrifugar 10 minutos a 14,000 rpm. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio y añadir 200 μ l de isopropanol. Agitar manualmente y dejar precipitando 10 minutos a temperatura ambiente.
12. Centrifugar 10 minutos a 14,000 rpm y eliminar todo el sobrenadante. Resuspender en 45 μ l de TE (10mM Tris, 0.1mM EDTA) en bano caliente a 50-55°C por 5 minutos. Después agregar 5 μ l de Acetato de Sodio 3M pH=6. Mezclar manualmente y posteriormente agregar 125 μ l de etanol absoluto frio (-20°C). Dejar 10 minutos a temperatura ambiente.

13. Centrifugar 10 minutos a 14,000 rpm y eliminar todo el sobrenadante. Secar el pellet en baño caliente a 50-55°C por 5 minutos.

14. Resuspender en 25 µl de TE (10mM Tris, 0.1mM EDTA). Guardar a -20°C.

Purificación De Fragmento De ADN En Geles De Agarosa De Bajo Punto De Fusión (LMP)

Los geles de agarosa LMP tienen propiedades diferentes a la agarosa normal, por lo que los geles se solidifican a 4°C por 30 minutos. Se corren toda la noche con la muestra, entre 12-15 Volts. Un gel de agarosa LMP al 0.6% equivale a uno de agarosa normal al 1%. También se disuelven en TBE 1X.

Las muestras de ADN se mezclan con colorante 5X antes de cargar.

1. Teñir con bromuro de etidio (concentración final 0,5 µg de EtBr/ml) nuevo en recipiente limpio por 15 minutos.

2. Cortar la banda radiando el ADN con una lámpara UV en onda larga y colocar en eppendorf.

3. Fundir la agarosa a 65-70° en baño caliente por 10 minutos. Añadir 1/10 de volumen de NaCl 5M. Mezclar bien y dejar 5 minutos a 65-70° en baño caliente.

4. Saturar fenol con NaCl 5M: en un eppendorf mezclar 100 µl de NaCl 5M + 400 µl de agua esterilizada + 500 µl de fenol. Mezclar en vórtex. Centrifugar 1 minuto a 14,000 rpm y retirar la fase acuosa. Colocar fenol saturado a 37°C.

5. Colocar la agarosa fundida 5 minutos a 37°C.

6. Añadir al tubo de agarosa 2/3 de volumen de fenol saturado y agitar en vórtex 30 segundos. Recuperar la fase acuosa y pasar a un tubo limpio.

7. Al tubo con agarosa, añadir 90 µl de TE (10mM Tris, 0.1mM EDTA) y 5 µl de NaCl 5M. Agitar en vórtex y centrifugar 2 minutos a 14, 000 rpm, recuperar la fase acuosa y mezclar con la anterior (paso 6).

8. Al tubo con las fases acuosas agregar 1 volumen de fenol:cloroformo 1:1, agitar 30 segundos en vórtex y centrifugar 2 minutos a 14, 000 rpm.

9. Recuperar la fase acuosa, pasar a un tubo limpio y agregar 1 volumen de cloroformo, agitar 30 segundos en vórtex y centrifugar 2 minutos a 14, 000 rpm.

10. Recuperar la fase acuosa y pasar a un tubo limpio, añadir 20 µg de glucógeno, mezclar y agregar 1 volumen de isopropanol. Precipitar el ADN a -20°C por dos horas por lo menos.

11. Centrifugar a 14,000 rpm por 10 minutos. Eliminar perfectamente todo el alcohol del tubo. Volver a centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos y retirara todo el alcohol.

12. Evaporar el alcohol por 5 minutos a 50-55°C en baño caliente.

13. Resuspender en 6-10 µl de TE (10mM Tris, 0.1mM EDTA).

14. Correr un gel de agarosa 0.8% para cuantificar ADN.

Ligación De Insertos En Sitios Romos:

I. Tratamiento del inserto:

300 ng de inserto

2 μ L de buffer de Ligasa 5X

0.5 μ L de dNTP's 10 mM c/u

0.5 μ L de DNA polimerasa del fago T4

Agua estéril

Volumen final 10 μ L

Incubar una hora a 37°C, después inactivar la polimerasa 10 minutos a 70°C, deje enfriar a temperatura ambiente 15 min.

Ligación de extremos cohesivos

- 1.-Determinar la concentración en ng/ μ L del vector y del inserto
- 2.-Dividir tamaño del vector en pares de bases / 1400 (constante) y el tamaño del inserto en pares de bases / 1400 (constante), el valor obtenido corresponde a ng del fragmento.
- 3.-Multiplicar el valor obtenido del inserto en pares de bases / 1400 (constante) por 5. La relación debe ser cinco veces el inserto, una vez el vector (5:1).
- 4.-Hacer la proporción correspondiente de μ l de inserto y vector requeridos para ligar.

Gel De Lisis

1. Sembrar en cajas en pequeños cuadrantes las clonas que se vayan a examinar para ver si tienen inserto. Incubar toda la noche.
2. Al día siguiente, resuspender una parte del cuadrante en un tubo con 20 μ l de la solución de lisis 1.
3. Una vez resuspendidas todas las colonias, agregar 20 μ l de la solución de lisis 2 preparada al momento: solución de lisis 1 + 0.1 mg de lisozima + 30 μ l de RNasas.
4. Mezclar muy bien, de esa mezcla tomar 10 μ l y cargar en un gel de agarosa 0.8%, una vez cargadas las muestras, agregar 10 μ l de colorante para gel de lisis.
5. Una vez cargadas todas las muestras, dejar 5 minutos.

6. Cumplido el tiempo, correr a la mitad del voltaje total 30 minutos, después aumentar el voltaje. Dejar correr hasta que el colorante llegue al final del gel. Teñir con bromuro de etidio (concentración final 0,5 µg de EtBr/ml)

Transformación de ADN En *Streptomyces*

1.- Crecer (100-300 µL) esporas en 25 mL de YEME suplementado con MgCl₂ 1M (125 µL) y glicina al 10% (1.25 mL) y antibióticos si le corresponde, de 36-40 horas a 30°C en matraz con resorte.

2.-Pasar el micelio a un tubo, enjuagar el matraz con 10 mL de sacarosa al 10.3% y centrifugar a 8000 rpm/ 10 min. Lavar el micelio con un volumen de sacarosa al 10.3%. Depende del pellet, distribuir el micelio en varios tubos o concentrar. Congelarlo a -20°C hasta su uso.

3.-Preparar cajas con el medio R2 suplementado. A una alícuota de 80 mL de R2 agregar: KH₂PO₄ (0.5%): 1 mL; CaCl₂-2H₂O (3.68%): 8 mL; L-Prolina (20%): 1.5 mL; Tris-Cl (3%, pH=7.2)= 10 mL; Trazas R5 = 0.2 mL; CuSO₄ (2mM)=0.2mL; NaOH (1N)=0.2mL; Extracto de Levadura (10%)=5mL. Dejar secar 4-5 horas.

4.-Suplementar Buffer-P. A 40 mL de Buffer P agregar: Trazas R5= 0.1mL; KH₂PO₄ (0.5%)= 0.5mL; CaCl₂-2H₂O (3.68%): 5 mL; Tris-Cl (3%, pH=7.2)= 5 mL, dejar a temperatura ambiente, por lo menos media hora antes de usarse.

5.-Pesar 15 mg de lisozima y disolver en 10 mL de Buffer P suplementado.

6.-Filtrar el buffer P en otro frasco (0.22 µm)

7.- Filtrar la lisozima disuelta sobre el micelio, incubar a 30°C por una hora (cada 15 minutos agitar manualmente). Cumplido el tiempo, filtrar los protoplastos en un filtro para esporas, pasar a un tubo y centrifugar 3500 rpm/10 min /temperatura ambiente.

8.-Mientras se centrifuga pesar 0.5 gr de PEG y disolverlo en 1.5 mL de Buffer P suplementado, de ahí tomar 0.6 mL.

9.-Una vez centrifugados los protoplastos, resuspender manualmente, agregar ADN y los 0.6 mL de PEG, mezclar con pipeta Pasteur dos o tres veces, con mucho cuidado. Agregar 5 mL de Buffer P suplementado y centrifugar a 3500 rpm/10 min /temperatura ambiente.

10.-Eliminar el sobrenadante y resuspender manualmente, agregar 0.3 mL de Buffer P suplementado, diluir y tomar 0.1 mL de la dilución, agregar a la caja y sobre esta gota, 2.5 mL de agar suave a 50°C, cubrir la superficie, dejar solidificar e incubar a 30°C toda la noche.

11.-Al día siguiente, entre las 18-20 horas, agregar el antibiótico correspondiente diluido en agua (1 mL por cada caja). Dejar a 30°C una semana.

Protocolos para la manipulación de proteínas.

Preparación de geles poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE)

Gel Separador

	6%	8%	10%	12%
Acrilamida:bis-acrilamida (29:1)	2 mL	2.6 mL	3.3 mL	4 mL
Buffer 1.5 M Tris-HCl pH=8.8	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
SDS 10%	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
Agua bidestilada	5.3 mL	4.6 mL	4 mL	3.3 mL
Persulfato de amonio 10%	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
Volumen final	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL

Gel concentrador

Acrilamida:bis-acrilamida (29:1)	1.3 mL
Buffer 0.5 M Tris-HCl pH=6.8	5 mL
SDS 10%	0.1 mL
Agua bidestilada	3.4 mL
Persulfato de amonio 10%	50 µL
TEMED	10 µL
Volumen final	10 mL

Buffer de tratamiento 2X

(0.125 M Tris-HCl pH= 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%)

Tris-HCl pH= 6.8	2.5 mL
SDS 10%.....	4 mL
Glicerol.....	2 mL
2-mercaptoetanol.....	1 mL
Agua bidestilada.....	0.5 mL
Azul de bromofenol.....	0.0005 gr
Volumen total.....	10 mL

Tinción con azul brillante de Coomassie

1. Teñir 30 min o toda la noche con solución de Tinción Coomassie
2. Desteñir 40 minutos – 1 hora con la solución de desteñido I
3. Desteñir 30 minutos con solución de desteñido II
4. Dejar 30 minutos en agua bidestilada (dar dos cambios)

Soluciones para tinción con Azul de Coomassie

Stock Azul de Coomassie brillante R-250 al 1%

Pesar 2 gr de Azul de Coomassie R-250, disolver en 200 mL de agua bidestilada y filtrar con papel Watman manualmente.

Solución de Tinción Coomassie

Stock Azul de Coomassie R-250 1%.....	12.5 mL
Metanol.....	50 mL
Ácido acético.....	10 mL

Agua bidestilada.....27.5 mL
Volumen final.....100 mL

Solución de Desteñido I

Metanol.....50 mL
Ácido acético.....10 mL
Agua bidestilada.....40 mL
Volumen final.....100 mL

Solución de Desteñido II

Metanol.....5 mL
Ácido acético.....7 mL
Agua bidestilada.....88 mL
Volumen final.....100 mL

Inmunotinción de membrana

Para membranas de nitrocelulosa: Dejar 10 minutos con agua destilada, 10 minutos con buffer de transferencia.

Para membranas de PVDF: Bañar la hoja en metanol absoluto 15 y pasar a buffer de transferencia.

Una vez corridas las muestras de proteínas, desmontar la cámara, enjuagar el gel con agua destilada y pasar a buffer de transferencia.

Por gel se necesitan 2 trozos de papel y un trozo de membrana.

Montar el sándwich de la siguiente manera (de la parte negra a la roja ó blanca)

Esponja mojada en buffer
Papel filtro mojado en buffer
Gel
Membrana
Papel filtro mojado en buffer
Esponja mojada en buffer

Al montar la membrana sobre el gel, es importante ELIMINAR todas las burbujas con un tubo de ensaye.

Colocar el sándwich en el aparato, que coincidan los colores.

Agregar el hielo y llenar con buffer.

Transferir toda la noche a 12 mAmp. Sí se quiere que la transferencia sea rápida 2 horas a 200 mAmp.

Terminada la transferencia, lavar la membrana en el resto del buffer de transferencia que sobro.

Dejar secar los excesos de buffer de la membrana. Para eliminar toda la humedad de la membrana sumergir en metanol absoluto 15 segundos y dejar 15 minutos a temperatura ambiente.

Buffer de transferencia

Tris base.....3 gr

Glicina.....14 gr

Agua destilada.....833 mL

Metanol.....167 mL

Identificación de proteínas

1. Ya que las proteínas están en la membrana, sumergirla en metanol absoluto por 10 segundos y dejar secar 10-15 minutos a temperatura ambiente.
2. Prepara una solución de TBS 1X- Tween 20 al 0.05% con leche sin grasa al 5% y bloquear por dos o tres horas en agitación a temperatura ambiente.
3. Agregar el anticuerpo primario a la dilución recomendada en TBS 1X- Tween 20 al 0.05% con leche sin grasa al 5% e incubar en agitación a 4°C toda la noche.
4. Al día siguiente, lavar 5 minutos con agua destilada en agitación, y después 10 minutos en agitación con TBS 1X- Tween 20 al 0.05% a temperatura ambiente.
5. Agregar el anticuerpo secundario a la dilución recomendada en TBS 1X- Tween 20 al 0.05% con leche sin grasa al 5% e incubar en agitación a temperatura ambiente 2 horas.

6. Cumplido el tiempo, lavar 5 minutos con agua destilada en agitación, y después tres lavados de 10 minutos cada uno en agitación con TBS 1X- Tween 20 al 0.05% a temperatura ambiente.
7. Revelar por quimioluminiscencia o con 3,3-diaminobencidina 0.5 mg/ mL + 1 μ L/ mL de H₂O₂, parar la reacción con agua.

Identificación de glicoproteínas

Correr el gel y transferirlo toda la noche en la cámara húmeda a 12 mA constantes a temperatura ambiente.

1. Ya que las proteínas están transferidas a la membrana, sumergirla en metanol absoluto por 10 segundos y dejar secar 10-15 minutos a temperatura ambiente.
2. Preparar una solución de TBS 1X con 1% de Albúmina (No agregar Tween 20) y bloquear 1 hora en agitación a temperatura ambiente.
3. Lavar tres veces con TBS 1X (No agregar Tween 20) de cinco minutos cada lavado a temperatura ambiente.
4. Incubar la Concanavalina A 1:1000 disuelta en TBS 1X (Sin Tween 20) con 1 mM de cloruro de Calcio, 1 mM de cloruro de Magnesio y 1mM de cloruro de Manganeso por 16 horas en agitación a temperatura ambiente.
5. Cumplido el tiempo, lavar tres veces de 10 minutos cada lavado en agitación con TBS 1X (sin Tween) a temperatura ambiente.
6. Revelar por quimioluminiscencia o con 3,3-diaminobencidina 0.5 mg/ mL + 1 μ L/ mL de H₂O₂, y parar la reacción con agua.

Precipitación de proteínas con metanol-cloroformo (de sobrenadante de cultivos de *Streptomyces*)

1. Remover el micelio a 14,000 rpm durante 10 minutos.
2. Del sobrenadante tomar 150 μ L y se agregaron 0.6 mL de metanol, mezclar.
3. Agregar 0.15 mL de cloroformo, mezclar.
4. Agregar 0.45 mL de agua, mezclar y centrifugar a 14, 000 rpm / 2 min, o 3,500 rpm por 10 min.
5. Eliminar la fase de arriba (las proteínas quedan en la interfase) y agregar 0.45 mL de metanol.
6. Mezclar y centrifugar en eppendorf a 14, 000 rpm/ 6 min para concentrar las proteínas.
7. Eliminar todo el metanol, dejar evaporar 15 minutos. Agregar a las proteínas buffer de carga. Hervir 5 minutos y congelar.

Protocolos para anticuerpos

Crecimiento de los cultivos de *E.coli* para expresión estándar (100 ml)

1. Inocular 10 ml de medio de cultivo que contiene tanto ampicilina (100 mg / ml) , de ser necesario ,y Kanamicina (25 g / ml) en un matraz de 50 ml. Crecer los cultivos a 37 ° C Toda la noche.
2. La Kanamicina debe omitirse cuando se utiliza la serie pQE-80L con vectores cis-reprimidos.
3. Inocular 100 ml de medio precalentado (con antibióticos) con 5 ml del precultivo y crecer a 37 ° C con agitación vigorosa hasta una OD600 de 0,6 se alcanza en (30-60 min)
4. Tomar una muestra de 1 ml inmediatamente antes de inducir. Esta muestra es el control no inducido; centrifugar las células y resuspender en buffer de muestra de 50 µl 5x SDS-PAGE. Congelar hasta que se vaya a utilizar.
5. Inducir la expresión mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM.
6. Incubar los cultivos por 4-5 horas. Recolectar una segunda muestra de 1 ml. Este es el control inducido; Precipitar las células y resuspender en 100 µl de buffer 5x SDS-PAGEs. Congelar y almacenar la muestra a -20 ° C hasta el análisis.
7. Centrifugar las células a 8000 rpm por 10 Min.
8. Congelar las células en hielo seco o nitrógeno líquido por 1 hora o toda la noche -20 ° C. Con el fin de facilitar el lisado de las células

Determinación de solubilidad de la proteína

Materiales

Medio LB (o YT2X)

Kanamycina stock

Ampicillina stock

Buffer de Lisis para la purificación en condiciones nativas

1x SDS-PAGE buffer

2x SDS-PAGE buffer

1. Inocular 10 ml de medio LB o YT2X que contiene 100 mg / ml de ampicilina (de ser necesario) y 25 g/ml de kanamicina en un matraz de 50 ml. Crecer el cultivo durante la noche a 37 ° C con agitación. La kanamicina debe omitirse cuando se utilizan vectores de la serie pQE-80L cis-reprimidos.
2. Inocular 50 ml de medio precalentado (con antibióticos) con 2,5 ml del precultivo y crecer a 37 ° C, con agitación vigorosa (~ 300 rpm), hasta que la densidad óptica alcance (OD600) 0.5-0.7 (aproximadamente 30-60 min)

3. Tomar una muestra de 1 ml inmediatamente antes de la inducción (control no inducido), centrifugar las células y resuspender en 50 μ l 1x buffer SDS-PAGE. Congelar la muestra a -20° C.
4. Inducir la expresión mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM.
5. Crecer los cultivos durante otras 4-5 horas. Se toma una segunda muestra de 1 ml (control inducido), centrifugar las células y resuspender en 100 μ l de buffer 1x SDS-PAGE. Congelar.
6. Centrifugar las células a 8000 rpm por 10 min.
7. *Extracción de la proteína*
8. Resuspender el pellet celular en 5 ml de buffer de lisis para purificación nativa.
9. Congelar la muestra en hielo seco y descongelar en agua fría. De ser necesario, agregue lisozima a 1 mg / ml e incubar en hielo durante 30 Min.
10. Sonicar a (200-300 W) 6x 10 s con pausas de 10 s. Sonicar en hielo.
11. Centrifugar a 10.000 rpm a 4° C durante 20-30 min. Decantar el sobrenadante (Extracto crudo, proteína soluble A), y mantener en hielo
12. Resuspender el precipitado en 5 ml de buffer de lisis. Esta es la materia insoluble (extracto crudo B, proteína insoluble).

Preparación de lisados de E. coli en condiciones nativas

Materiales

Pellet celular

Buffer de lisis

Lizosima

Buffer 2x SDS-PAGE

Descongelar el pellet de células durante 15 min en hielo y resuspender las células en buffer de lisis a 2-5 ml por gramo. El total de células requeridas depende del nivel de expresión de la proteína marcada con 6xHis y el sistema de expresión utilizado. La capacidad de unión de la resina de Ni-NTA es dependiente de la proteína y normalmente se encuentra entre 5-10 mg / ml. Por ejemplo, Ni-NTA Agarosa o Ni-NTA Superflow tiene una capacidad de unión de 0,3 mol / ml (8,0 mg / ml) durante DHFR marcada con 6xHis (~ 26 kDa). Consulte la Tabla 3 "Determinación de los requisitos de volumen de cultivo celular" en la página también 65. Lysis contiene imidazol 10 mM para reducir al mínimo el etiquetado de proteínas no deseadas y aumentar la pureza con menos lavados. Si la proteína marcada no se una bajo estas condiciones, la cantidad de imidazol se debe reducir a 1-5 mM. Con proteínas marcadas con 6xHis que presentan altas afinidades de unión, la concentración de imidazol puede aumentarse a 20 mM.

Añadir lisozima a 1 mg / ml e incubar en hielo durante 30 min.

Sonicar en hielo (6 pulsos de 10 segundos a 200-300 W con un período de 10 s de enfriamiento entre cada pulso.

(Opcional) Si el lisado es muy viscoso, añadir RNasa A (10 mg / ml) y DNasa I (5 g / ml) e incubar en hielo durante 10-15 min.

Centrifugar a 10000 rpm el lisado por 20-30 min a 4° C para sedimentar el lisado celular. Guardar el sobrenadante. Una cierta cantidad de la proteína celular, incluyendo la proteína etiquetada 6xHis-puede permanecer insoluble y se ubicará en el sedimento. Para la recuperación más completa de la proteína

marcada, la parte insoluble debe solubilizarse utilizando condiciones de desnaturalización escritas en el Protocolo 10 (no utilizado en el experimento).

Añadir 5µl de buffer 2x SDS-PAGE para 5µl sobrenadante y se almacena a -20 ° C.

Continuar con protocolos para la purificación en condiciones nativas partir de la página 81

Protocolo purificación en gradiente – FPLC – Columna de Níquel – Método programado de equipo

Encender equipo, encender PC, abrir programa PrimeView

Colocar las mangueras transparentes A1 y B1 al etanol 20%. Hacer un lavado con etanol 20%. Templates---Application templates---System Wash Method --- OK. * Hacer este paso sólo si el sistema lleva tiempo sin usarse.

* Si aparece el mensaje al dar ok:“62 Check that the position is ok”, verificar que el brazo fraccionador esté emparejado con los tubos o en su caso que la manguerita verde que da al fraccionador se encuentre dirigida hacia el desecho.

Pasar las mangueras transparentes A1 y B al agua Milli-Q. Entonces hacer un lavado con agua. Templates---Application templates---System Wash Method--- OK.

Montar la columna

Poner flujo en el equipo de la siguiente manera: Manual Run---Method Base---Flujo: 0.1ml/min; Pressure 0.4 (máx 0.5); Start Run---OK.

*Comenzará a tener flujo, entonces montamos columna, quitamos el tornillo negro de arriba sin tocar la parte roja de la columna, destornillamos la manguerita verde con punta roja y le vaciamos gotitas a la columna cuidando de no dejar burbujas, hasta que se haga un bordecito de agua, entonces atornillamos la punta roja de la manguerita verde en la columna y cerramos hasta. El flujo comenzará a pasar por la columna, quitamos entonces el tornillo negro o tapa de debajo de la columna y comenzamos a vaciar nuevamente gotitas pero ahora a la base en donde se pondrá la columna, nuevamente hasta que se haga un bordecito de agua. Finalmente atornillamos la columna sin tocar el tornillo de arriba para no perder presión.

Detener flujo del equipo apretando el botón “End”.

Nuevamente hacer un lavado con la columna puesta y con Agua. Templates---Application templates---System Wash---ok.

Colocación de loop (manguera con la muestra de 5ml) e introducción de muestra

Tomar el loop de 5ml y atornillarlo en la ranura 2 y 6 de la válvula de inyección.

Lavar el loop con 20ml de agua insertando una jeringa de 10ml en el tornillo negro que se encuentra al centro de la válvula de inyección. Cada vez que se introduce agua o buffer con la jeringa, cuidar de que no existan burbujas. Luego de los 20ml, lavar el loop con 10ml de buffer de la misma manera.

Ya que el loop está lavado y lleno de buffer, con ayuda de la jeringa pasar por el loop únicamente 5ml de muestra ya que esta desplazará al buffer que se encuentra en el loop. *Si se necesita pasar más de 5ml de muestra, es necesario hacer un método manual, ya que con éste no se puede. Otra opción es terminar la purificación, y comenzar nuevamente el protocolo para inyectar otros 5ml de muestra e ir purificando de 5 en 5 ml.

Inicio de gradiente y purificación

Antes de iniciar, asegurarse que la manguerita verde del fraccionador y el fraccionador se encuentren acoplados y que el fraccionador se encuentre posicionado en el carrito de tubos. Es necesario que ya se hayan colocado los tubos eppendorf en los cuales se colectarán las fracciones de elución. Por default, con este programa, únicamente se colectará en fracciones la elución, los lavados irán directamente al desecho. Cabe resaltar que ésta purificación se llevará a cabo en gradiente de imidazol, por lo que las fracciones colectadas tendrán diferentes concentraciones de imidazol.

Para comenzar la purificación hacer lo siguiente en el equipo: Templates---Application templates---His Tag Purification His Trap--- Set Sample Inj. Vol (05.0 ml)--- Run Application Template Press Ok to start.

*La purificación comenzará, primero se hará un lavado de la columna con el buffer a 20mM de Imidazol y después como de 20 minutos, comenzará a inyectar el buffer de elución a 0.5M de Imidazol.

*En este punto se puede dejar por completo la purificación, únicamente asegurarse que haya la suficiente cantidad de tubos, que aproximadamente son 40, el sistema termina solo y se pausa sin problema. Lo recomendable es que después de observar el pico en el cual tu muestra salió, inmediatamente guardar esas fracciones a -20C, pasar la manguerita verde del fraccionador y pasarla al desecho, de esta manera se ahorran tubos eppendorf, ya que lo que seguirá colectando es puro buffer con imidazol. De esta manera ya no se desperdiciarán los tubos.

Lavado de columna y de equipo.

Al finalizar, es necesario lavar el equipo. Inicialmente, lavar con Agua de la siguiente manera: Templates--- Application Templates---System Wash---Ok. Repetir esta operación dos o 3 veces.

Lavar el loop con ayuda de la jeringa inicialmente con 30ml de Agua y luego inyectarle con la jeringa únicamente aire para que el loop quede completamente vacío. Desatornillar el loop de las ranuras y guardar en la bolsita.

Hacer otro lavado con etanol al 20% de igual manera que el paso anterior. *Este paso únicamente se hace si el equipo no se usará en varios días, preguntar si alguien lo usará.

Lavado y almacenamiento de columna.

13. Poner flujo en el equipo de la siguiente manera: Manual Run---Method Base---Flujo: 1.0ml/min; Pressure 0.4 (máx 0.5); Start Run---OK. Verificar en la pantalla de la computadora que hayan pasado más de 5 volúmenes de la columna, después detener el programa presionando el botón de “end”. *Se aumenta el flujo, ya que la columna ya está en la base y no se está pasando muestra, sólo es para lavar y reducir el tiempo. Este paso se realizará con agua si el equipo se usará pronto, si tardará en usarse entonces se realiza con etanol al 20%.

Al finalizar el lavado, la columna se desatornilla de la base con cuidado, se programa otro Lavado “Manual Run”, pero ahora con un flujo de 0.1ml, se inicia y hay flujo a través de la columna, rápidamente se llena la tapita negra que va debajo de la columna y al llenarse se atornilla a la columna, inmediatamente se

desatornilla la manguerita verde de la columna, y se deja gotear etanol a la columna hasta que se haga el bordecito, después de esto la manguerita verde se atornilla en la base del equipo hasta el llegue. Para finalizar, la columna se cierra con su respectiva tapa negra y se vuelve a guardar a -20.

Se detiene el flujo presionando el botón “end”, se guardan los datos y se apaga el equipo.

Inmunizacion de conejos con antígenos solubles y particulados

Antígenos

Preparacion del antígeno soluble

1. Se quita la aguja a una jeringa de 5ml. y se saca el émbolo de la misma. Posteriormente se sella la punta con suficiente parafilm.
2. Un volumen que contenga 100 µg de la proteína se lleva a 500 µg con PBS 1X y se deposita en la jeringa de 5ml previamente preparada.
3. Se añaden 50 µl de adyuvante incompleto de Freund (IFA) y se sónica introduciendo el vástago del sonicador en la jeringa mientras esta se mantiene en hielo.
4. Sonicado: 3 pulsos de 45 segundos, con descansos de un minuto y medio entre ellos. Intensidad de dos (15%)
5. Preparación del antígeno particulado: Se toman 100 µg de la proteína y se cargan en un gel preparativo en SDS-PAGE cuyo porcentaje corresponderá al peso molecular de la proteína. Posteriormente se transfiere a membrana de nitrocelulosa y se tine con rojo de Ponceau para ubicarla y cortarla con un bisturí.
6. De acuerdo al protocolo de pulverización de nitrocelulosa con antígeno se obtiene un polvo particulado muy fino que se usará para la inmunización del conejo. Dicho polvo se resuspende en 500 µl de PBS 1X, se transfiere a la jeringa y se sigue el protocolo descrito para la emulsificación del antígeno soluble en IFA.

Conejos

Se usan generalmente dos hembras de la especie New Zealand de 8 semanas de edad. Se solicitan al bioterio con suficiente tiempo de anticipación ya que deben de pasar cuarentena antes de la inmunización.

Suero preinmune

Antes de inmunizar a los conejos es importante determinar si existe en ellos anticuerpos que pudiesen reconocer en forma cruzada o inespecíficamente a la proteína contra la cual se quiere generar la respuesta policlonal. Por tal razón es importante tomar una muestra de sangre de cada conejo previa a la inmunización y hacer un inmuno-blot contra el antígeno.

Vía de inmunización

Subcutanea

1. Se usa la vía subcutánea dado que el antígeno drenará rápidamente al sistema linfático local y llegara a concentrarse en los ganglios linfáticos cercanos al sitio de la inyección.
2. El conejo es inmovilizado con el fin de evitar que se lastime una vez que perciba la aguja.
3. Se jala parte de la piel cercana al cuello con los dedos índice y pulgar y en el espacio que queda se inserta la aguja.
4. Esto se repite en otros dos lugares, de tal forma que se apliquen aproximadamente 350 µl del antígeno emulsificado con el adyuvante en tres puntos en la espalda del animal.

Nota: En caso de que se desee aplicar antígeno soluble y este se encuentre muy diluido es posible inyectar un volumen de hasta 800 µl por sitio en diez sitios de la espalda del conejo en el mismo momento de inmunización. (8 ml totales).

Intramuscular

Se usa la vía intramuscular con el fin de que la liberación del antígeno en el sistema linfático local sea más lenta.

El conejo se deposita en una superficie rugosa (puede ser una toalla o la superficie del inmovilizador) para que se sienta más cómodo y no contraiga sus músculos. Se inserta la aguja en el músculo de la pata trasera y se aspira un poco, si aparece algo de sangre tratar en otro sitio cercano. Se aplican 500 µl del antígeno en cada pata del animal. Lentamente retirar la aguja y dar un suave masaje hasta que deje de sangrar el sitio de punción.

Protocolo de inmunización

1. Se empieza inmunizando vía subcutánea con una dosis de 100 µg del antígeno (particulado o soluble) en IFA.
2. Después de 14 días se toma una muestra 5ml de sangre de conejo y se evalúa en suero el título de anticuerpos.
3. A las 4 semanas (del inicio) se aplica una segunda dosis de 100 µg del antígeno (particulado o soluble) en IFA vía subcutánea.
4. Después de 14 días se toma una muestra de 5 ml. de sangre del conejo y se evalúa en suero el título de anticuerpos.
5. A las 4 semanas se aplica una segunda dosis de 100 µg del antígeno (particulado o soluble) en IFA vía intramuscular.
6. Después de 14 días se toma una muestra de 5 ml. de sangre del conejo y se evalúa en suero el título de anticuerpos.
7. Si el nivel es adecuado para los fines puede sangrarse a blanco el conejo y obtener todo el suero; de lo contrario, se espera a que pasen 4 semanas más y se aplica una cuarta inmunización vía intramuscular con 100 µg del antígeno (particulado o soluble) en IFA.
8. Pasados 14 días se sangra a blanco los conejos y se obtiene la totalidad del suero.

Obtencion del suero

Muestras de sangre

La muestra de sangre se toma de la vena marginal, la cual se encuentra en la esquina interna de la oreja y debe estar visible. En caso contrario, se debe acercar una lámpara a la oreja del animal (no usar xylol) hasta que la vena brote un poco.

Se introduce una aguja (sin la jeringa) y se deja que la sangre gotee en un tubo Falcon de 15 ml hasta obtener un volumen de 5 ml.

Preparacion del suero

1. Después de ser colectada la sangre se debe permitir que coagule de 30 a 60 minutos a 37 °C.
2. Se separa el coagulo de las paredes del tubo con un palillo de madera y se deja toda la noche a 4 para que termine de retraerse el coagulo. Se remueve el suero del coagulo y de cualquier material insoluble por centrifugación a 10 000 g por 10 minutos a 4°C.
3. Se separa el suero y se almacena a -70°C hasta por varios años en pequeñas alícuotas.

11.2 Medios y soluciones

		KCl 250mM Stock	10 mL
		Ajustar a pH=7 con NaOH 1M	
		Agua Milli-Q Aforar a 1 Lt	
Medio Manitol-Soya Para 1 Litro:			
Manitol	20 gr		
Harina de soya	20 gr	Tris 25 mM, EDTA 25 mM, pH 8.0	
Agua de la llave	1 Lt	Para 100 mL:	
Agar	1.5 gr por cada 100 mL	Tris 1M Stock	2.5 mL
		EDTA 0.5 M pH=8	5 mL
		Agua Milli-Q Aforar a 100 mL	
Medio SOB Para 1 Litro:		Esterilizar a 121°C por 15 minutos.	
Triptona	20 gr		
Extracto de levadura	5 gr		
NaCl	0.5 gr	Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM pH=8 Para 100 mL:	

Tris 1M Stock 1 mL

EDTA 0.5 M pH=8 20 μ L

Agua Milli-Q Aforar a 100 mL

Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Acetato de potasio 3M pH=4.8 Para 100 mL:

Acetato de potasio 29.442 gr

Agua Milli-Q 15 mL

Ácido acético glacial 80 mL

Precalentar el agua y disolver el acetato, después agregar el ácido acético a pH 4.8, aforar con agua a 100 mL.

Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Acetato de sodio 4M pH=6 Para 100 mL:

Acetato de potasio 32.812 gr

Agua Milli-Q 50 mL

Ácido acético glacial para ajustar el pH

Precalentar el agua y disolver el acetato, ajustar el pH con ácido acético, aforar con agua a 100 mL. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Acetato de sodio 3M pH=6 Para 100 mL:

Acetato de potasio 24.609 gr

Agua Milli-Q 50 mL

Ácido acético glacial para ajustar el pH

Precalentar el agua y disolver el acetato, ajustar el pH con ácido acético, aforar con agua a 100 mL.

Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Para Transformar *Streptomyces* por protoplastos.

Medio YEME Para 100 mL:

Extracto de levadura 0.3 gr

BactoPeptona 0.5 gr

Extracto de Malta 0.3 gr

Glucosa 1 gr

Sacarosa 34 gr

agua Milli-Q, aforar a 100 mL

Disolver y ajustar a pH=7.

Después de esterilizar, al momento de usar adicionar a 25 mL:

MgCl₂-6 H₂O 1M (Stock) 0.125 mL

Glicina 10% (Stock) 1.25 mL

Agar suave Para 100 mL

Sacarosa 10.3 gr

MgCl₂-6 H₂O 1.012 gr

Tris 3% pH=7.2 10 mL

CaCl₂ 5M 0.4 mL

Agua Milli-Q aforar a 100 mL

Disolver y ajustar a un volumen de 100 mL con agua milli-Q

Dividir en dos frascos de 50 mL cada uno y agregarle 0.325 gr de Difco Agar.

Colorante de carga 5X para ADN

Sacarosa	6 gr
Azul de Bromofenol	0.025 gr
Xilencianol	0.025 gr
EDTA (0.5 M pH=8)	0.2 mL

Agua Milli-Q aforar a 10 mL

Disolver la sacarosa en 3 mL de agua caliente y agregar EDTA, ajustar a 10 mL. Esterilizar.

Medio R2 Para 800 mL

Sacarosa	103 gr
K ₂ SO ₄	0.25 gr
MgCl ₂ -6H ₂ O	10.12 gr
Glucosa	10 gr
Casaminoácidos	0.1 gr

Agua Milli-Q aforar a 800 mL

Pesar 2.2 gr de Bacto-Agar (Difco) en botellas y añadir 80 mL de solución base, esterilizar.

Al momento de utilizar el medio, suplementar con:

KH ₂ PO ₄ (Stock 0.5%)	1 mL
CaCl ₂ -2H ₂ O (3.86%)	8 mL
L-Prolina (20%)	1.5 mL
Tris-HCl (3%, pH=7.2)	10 mL
Elementos traza	0.2 mL

CuSO ₄ 2 mM	0.2 mL
------------------------	--------

NaOH 1N	0.2 mL
---------	--------

Extracto de levadura (Stock 10%) 5 mL

Al suplementar dejar secar las cajas por 5 horas para que regeneren los protoplastos.

Buffer P Para 800 mL

Sacarosa	103 gr
MgCl ₂ -6H ₂ O	2.02 gr
K ₂ SO ₄	0.25 gr

Agua Milli-Q, aforar a 800 mL

Distribuir en botellas con 40 mL cada una y esterilizar.

Al momento de usar, suplementar mínimo media hora antes de empezar la transformación con:

Buffer P Suplementado Para una botella de 40 mL:

Elementos traza	100 µL
KH ₂ PO ₄ (Stock 0.5%)	0.5 mL
CaCl ₂ -2H ₂ O (3.86%)	5 mL
Tris-HCl (3%, pH=7.2)	5 mL
IPTG 100 mM	
IPTG	0.0477 gr
Agua Milli-Q	2 mL

Disolver y esterilizar pasando por filtros de 0.45 micras.

Medio mínimo M14 Para 1 Litro

KH ₂ PO ₄	1 gr
K ₂ HPO ₄	5.5 gr
(NH ₄) ₂ SO	1.4 gr
Tween 80	2 mL
Fuente de carbono	1%
Metales traza	1 mL
Agua Milli-Q, aforar a 1 Lt	

Composición de metales traza Para 100 mL

FeSO ₄	0.5 gr
MnSO ₄	0.16 gr
ZnSO ₄	0.14 gr
CONH ₃	0.2 gr

Nota: Disolver los compuestos uno por uno

Antes de usar el medio suplementar con MgSO₄ al 5% y CaCl₂ 3%.

Las fuentes de carbono se prepararon en Stock al 20% cada una.

Glucosa 20 gr en 100 mL de agua Milli-Q

Manitol 20 gr en 100 mL de agua Milli-Q

Peptona 20 gr en 100 mL de agua Milli-Q

Medio Mínimo NMMP (manual de *Streptomyces*, página 413) Para 1 Litro

(NH ₄) ₂ SO ₄	2 gr
Difco Casaminoácidos	5 gr
MgSO ₄	0.6 gr
Azúcar (25%)	250 gr
Agua Milli-Q, aforar a 1 Lt	
Al momento de usar, suplementar con:	
NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (0.1M, pH=6.8)	1.5 mL
Glucosa al 1% (Stock al 20%)	20 mL
Elementos trazas	200 µL

Añadir antibiótico correspondiente kanamicina o apramicina

Elementos trazas Solución Stock 10 mL

ZnCl ₂	400 mg
FeCl ₃ -6H ₂ O	2000 mg
CuCl ₂ -2H ₂ O	100 mg
MnCl ₂ -4H ₂ O	100 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ -10H ₂ O	100 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ -4H ₂ O	100 mg

Nota: Pesar y disolver uno por uno en este orden exactamente.

Preparación de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (0.1M cada uno, pH=6.8)

Para 200 mL:

K_2HPO_4 3.484 gr

NaH_2PO_4 2.768 gr

Agua Milli-Q, aforar a 200 mL

Disolver y ajustar pH=6.8, aforar a 200 mL y esterilizar

Medio LB Para 1 Litro

Triptona 10 gr

Extracto de levadura 5 gr

NaCl 10 gr

Agua Milli-Q, aforar a 1 Lt

Disolver y ajustar el pH= 7

Si el cultivo es para crecer *Streptomyces coelicolor*

Agregar como dispersante:

Azúcar (al 25%) 250 gr

Medio MacCONKEY suplementado con Maltosa al 1%

Difco Bacto MacCONKEY 5 gr

Agua Milli
100 mL

Esterilizar

Añadir solución de Maltosa

Maltosa 1 gr

Agua Milli Q aforar 100 mL Esterilizar

PBS 5X Para 1 Litro

NaCl 40 gr

KCl 1 gr

Na_2HPO_4 7.2 gr

KH_2PO_4 1.2 gr

Agua Milli-Q aforar a 1 Litro

Disolver en 800 mL y ajustar el pH= 7.4, aforar a 1 Litro.

TBS (Buffer Tris-Sal, pH=7.5) Para 1 Litro

Tris Base (50mM) 6.05 gr

NaCl (150 mM) 8.76 gr

Agua Milli-Q aforar a 1 Litro

Disolver en 800 mL y ajustar el pH= 7.5, aforar a 1 Litro.

De ser necesario, agregar Tween 20 al 0.05% al final.

Medio YT2X Para 1 Litro

Bactotriptona 16 gr

Extracto de levadura 10 gr

Cloruro de Sodio 5 gr

Agua Milli-Q, aforar a 1 Lt

Disolver y ajustar el pH= 7.2

Reactivo de Bradford Para 1 Litro

Nota: antes de preparar el reactivo es necesario lavar todo el material usado para pesar y disolver con detergentes libres de fosfatos y guantes para no activar el reactivo.

Azul de Commassie G-250 100 mg

Etanol al 95% 50 mL

Ácido fosfórico al 85% 100 mL

Agua Milli-Q, aforar a 900 mL

1.-Disolver los 100 mg de azul de Commassie en 50 mL de etanol al 95%.

2.-Ajustar el volumen a 900 mL con agua milli-Q y agitar

3.-Agregar los 100 ml de ácido fosfórico y agitar, el color cambiará de azul a café

4.-Filtrar con papel Watman #1 a mano, lentamente para que no se pasen las partículas de azul de commassie.

5.-Almacenar a 4°C en botella de frasco ámbar o forrada con papel aluminio.

Preparación de acetato de sodio 0.2 M

Acetato de sodio 16.406 gr

Agua Milli-Q, aforar a 1 Litro

Para sonicar, Buffer A Para 30 mL

MOPS 50mM 1.5 mL (Stock 1M)

β-mercaptoetanol 11.72 μL

MgCl₂ 10 mM 0.3 mL (Stock 1M)

Agua Milli-Q 28.2 mL

Buffers para protocolos de Anticuerpos

Buffers para la purificación en condiciones nativas (de *E. coli*) protocolos de 6 y 9 (The QIAexpressionist 2003)

Buffer de lisis (1 litro):

50 mM NaH₂PO₄ 6.90 g de NaH₂PO₄ · H₂O (MW 137,99 g / mol)

NaCl 300 mM 17,54 g de NaCl (MW 58,44 g / mol)

10 mM imidazol 0,68 g de imidazol (MW 68,08 g / mol)

Ajustar el pH a 8,0 usando buffer NaOH.

Buffer de lavado (1 litro):

50 mM NaH₂PO₄ 6.90 g NaH₂PO₄ · H₂O (MW 137.99 g / mol)

NaCl 300 mM 17,54 g de NaCl (MW 58,44 g / mol)

mM imidazol 1,36 g de imidazol (MW 68,08 g / mol)

Ajustar el pH a 8,0 usando buffer NaOH.

Buffer de Elución

50 mM NaH₂PO₄ 6.90 g de NaH₂PO₄ · H₂O (MW 137.99 g / mol)

NaCl 300 mM 17,54 g de NaCl (MW 58,44 g / mol)

250 mM de imidazol 17,00 g de imidazol (MW 68,08 g / mol)

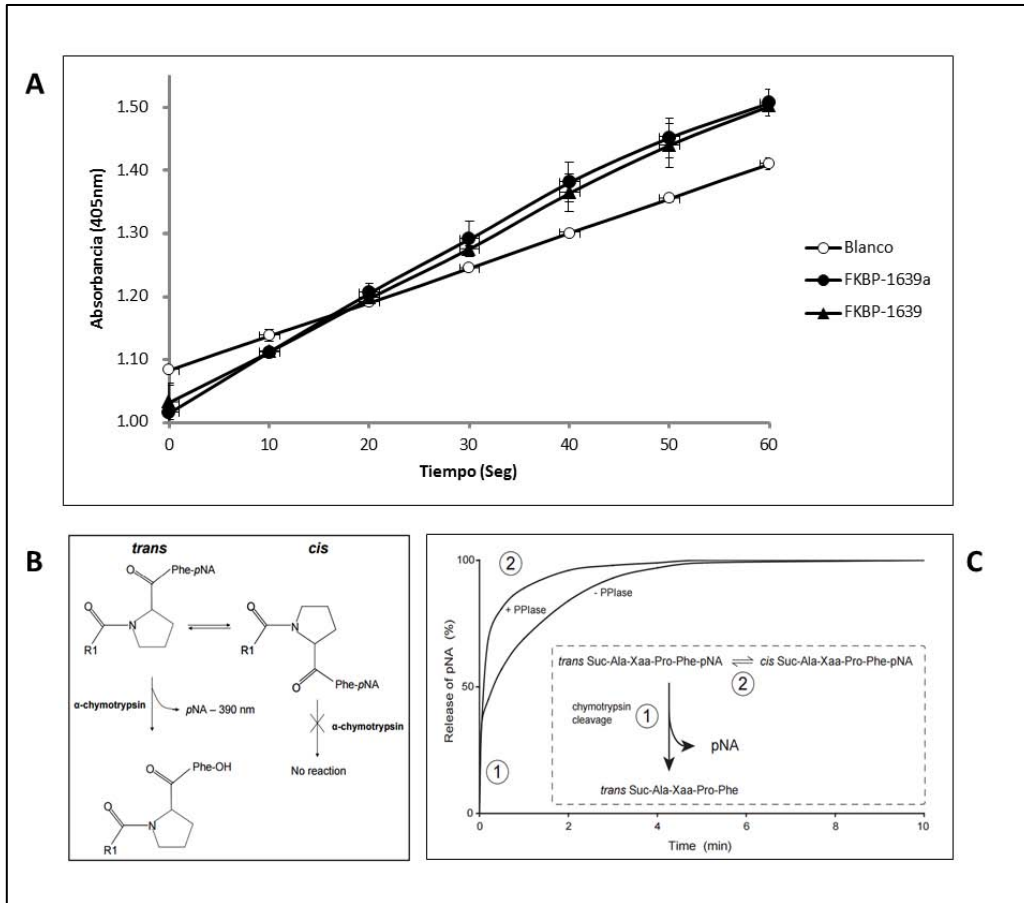
Ajustar el pH a 8,0 usando NaOH

11.3 Información complementaria.

Datos usados para la construcción de las gráficas

segundos	Blanco	FKBP-1639a	FKBP-1639	Vector Vacío
0	1.08	1.02	1.03	1.12
10	1.14	1.11	1.11	1.18
20	1.19	1.21	1.20	1.24
30	1.24	1.29	1.27	1.30
40	1.30	1.38	1.36	1.35
50	1.36	1.45	1.44	1.39
60	1.41	1.51	1.50	1.44
70	1.47	1.55	1.56	1.48
80	1.52	1.60	1.62	1.52
90	1.56	1.64	1.66	1.56
100	1.61	1.67	1.70	1.59
110	1.65	1.71	1.73	1.62
120	1.67	1.74	1.77	1.65
130	1.70	1.78	1.80	1.68
140	1.72	1.81	1.83	1.72
150	1.75	1.84	1.86	1.75
160	1.78	1.88	1.89	1.78
170	1.80	1.90	1.91	1.81
180	1.82	1.91	1.92	1.84
190	1.84	1.92	1.93	1.87
200	1.86	1.93	1.94	1.89
210	1.88	1.94	1.95	1.91
220	1.90	1.95	1.96	1.93
230	1.91	1.96	1.97	1.95
240	1.93	1.97	1.98	1.96
250	1.95	1.97	1.98	1.97
260	1.95	1.98	1.99	1.97
270	1.96	1.99	1.99	1.97
280	1.96	1.99	2.00	1.98
290	1.96	1.99	2.00	1.98
300	1.96	1.99	2.00	1.98
310	1.97	1.99	2.00	1.98
320	1.97	2.00	2.00	1.99
330	1.97	2.00	2.00	1.99
340	1.98	2.00	2.00	1.99
350	1.98	2.00	2.00	2.00
360	1.98	2.00	2.00	2.00
370	1.98	2.00	2.00	2.00
380	1.99	2.00	2.00	2.00
390	1.99	2.00	2.00	2.00
400	1.99	2.00	2.00	2.00

Explicación y comparación del ensayo enzimático realizado



A) Actividad enzimática de la FKBP recombinante en *E. coli* (FKBP-1639a) y *S. lividans* (FKBP-1639) mediante el método de Kofron et al. (Realizado en este trabajo); Se usaron 5µg de proteína total en ambos casos y un ensayo sin proteína como blanco. Ensayo realizado a 4°C. Datos obtenidos por triplicado. Se muestra la desviación estándar de cada punto. B) Corte específico isómero de *trans* - Phe - pNA por la quimotripsina .Las PPIasas catalizan la isomerización *cis* / *trans* de enlaces de prolina, solamente el isómero *trans* es un sustrato para quimotripsina. La quimotripsina rompe el péptido y causando la liberación de un cromóforo (pNA) que puede ser medido a 390 o 405 nm. Phe = fenilalanina; pNA = p- nitroanilida ; R1 = cadena lateral (Fischer et al., 1984). C) Comportamiento normales de la gráfica durante el ensayo de la PPIasa. Cuando se inicia la reacción se encuentra una mezcla de péptido en conformación *cis* y *trans* . La isoforma *trans* inicial es escindida por la quimotripsina en una reacción rápida. La isomerización lenta *cis* -*trans* del péptido *cis* restante se controla mediante la escisión inmediata de péptidos *trans* formados y la liberación de pNA . En presencia de una PPIasa se aumenta la velocidad de isomerización y alcanza la terminación más rápido. (Tomado de Fischer et al., 1984).

