



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

IDENTIFICACIÓN DE UNA
MANOSILTRANSFERASA INVOLUCRADA EN LA
GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS EN
STREPTOMYCES COELICOLOR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
**LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA**

P R E S E N T A:

ERICK ELIGIO ARROYO PÉREZ

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

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

SEPTIEMBRE 2017

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

Facultad de Medicina





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A mi tutor, el dr. Luis Servín González, por todo lo que me ha enseñado y por la confianza que me ha tenido.

A la M. en C. Gabriela González Cerón, por su apoyo técnico y sus consejos en el laboratorio.

A la dra. Gloria Soberón y sus alumnos, por sus aportaciones en los seminarios de grupo.

A la dra. Clara Espitia y el dr. Roberto Arreguín, por su colaboración en este proyecto, sus observaciones y su apoyo técnico.

A la dra. Laura Córdova, por enseñarme a trabajar en el laboratorio y al M. en C. Isaí Arista, por su apoyo en la obtención de los espectros de masas.

A la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, a cargo de la dra. Laura Ongay-Larios y la biol. Guadalupe Códiz Huerta, por sus servicios de secuenciación para este trabajo.

Al dr. Luis David Alcaraz y al dr. Rodolfo García, por sus comentarios sobre este manuscrito.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por haber brindado el apoyo del fondo Ciencia Básica CB2013-01 para el proyecto #220020.

Índice

1. Resumen	4
2. Introducción	
2.1. Glicosilación de proteínas	5
2.2. Glicoproteínas en bacterias	5
2.3. Biosíntesis de <i>O</i> -manoproteínas	7
2.4. <i>Streptomyces</i> como modelo de estudio	8
3. Materiales y Métodos	
3.1. Cepas y plásmidos	10
3.2. Oligonucleótidos	12
3.3. Mutagénesis del gen <i>sco3902</i>	12
3.4. Clonación del gen <i>sco3902</i>	13
3.5. Ensayos de plaqueo de ϕ C31	14
3.6. Purificación de la proteína Apa	14
3.7. MALDI-TOF-MS	15
3.8. Búsqueda bioinformática de los ortólogos de PimE y Sco3902 en actinobacterias	15
4. Antecedentes	16
5. Objetivo	17
6. Resultados	
6.1. Búsqueda de posibles glicosiltransferasas en <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	18
6.2. Aislamiento de cepas mutantes carentes del gen <i>sco3902</i>	20
6.3. Glicosilación del receptor de ϕ C31	20
6.4. Expresión y purificación de la proteína Apa de <i>M. tuberculosis</i> de las distintas cepas de <i>S. coelicolor</i>	22
6.5. Espectrometría de masas de la proteína Apa	23
6.6. Búsqueda de las manosiltransferasas PimE y Sco3902 en genomas de actinobacterias	25
7. Discusión	27
8. Conclusiones	29
9. Referencias	30

1. Resumen

Las actinobacterias son bacterias Gram positivas capaces de glicosilar algunas proteínas secretadas con residuos de manosa en serinas y treoninas, un proceso conocido como *O*-manosilación. Este proceso ocurre con un mecanismo de adición secuencial, en el que la enzima membranal manosiltransferasa de proteínas (Pmt) cataliza la adición de una molécula de manosa a residuos específicos de serina o treonina en las proteínas que están siendo secretadas. En las micobacterias ocurre una adición subsecuente de más residuos individuales de manosa, catalizada por la enzima membranal PimE. Esto resulta en proteínas glicosiladas con pequeñas cadenas de oligomanósidos.

Streptomyces coelicolor es una actinobacteria modelo, capaz de secretar proteínas *O*-manosiladas, tanto endógenas como de otras actinobacterias, también por acción de Pmt. Por ejemplo, se ha observado que la glicoproteína Apa de *Mycobacterium tuberculosis* se produce con el mismo patrón de glicosilación y una actividad antigénica comparable cuando se expresa en *Streptomyces*. También se ha visto que el bacteriófago ϕ C31 requiere que su receptor esté manosilado para infectar a *S. coelicolor*, pues mutantes carentes de Pmt son resistentes a este fago. Sin embargo, el papel de PimE en esta especie no ha sido estudiado.

Una búsqueda mediante BLAST con la secuencia de PimE de *M. tuberculosis* mostró que hay una única proteína ortóloga, codificada por el gen *sco2335*, en *S. coelicolor*. Se construyó una mutante nula en este gen, pero esta cepa era tan susceptible como la cepa silvestre a ϕ C31. Además, la proteína Apa producida en esta cepa era igualmente reactiva a la lectina concanavalina A (la cual reconoce manósidos) que la proteína producida en la cepa silvestre, sugiriendo que PimE no participa en la glicosilación de proteínas en *S. coelicolor*. Una búsqueda de homólogos lejanos a PimE mediante PSI-BLAST encontró otro gen codificante de una manosiltransferasa, *sco3902*, por lo que se aisló una mutante con una delección en este gen. Al ser expuesta al fago ϕ C31, esta mutante presentó una eficiencia de formación de placas 10 veces menor que la cepa silvestre, y las placas resultantes eran de menor tamaño.

Al analizar por espectrometría de masas MALDI-TOF la glicoproteína Apa producida en la mutante Δ *sco2335* se confirmó que presenta el patrón de glicosilación de la cepa silvestre, mientras que la proteína purificada de la mutante Δ *sco3902* presentó un patrón correspondiente a la proteína Apa con solamente una molécula de manosa en cada sitio, confirmando que la proteína *Sco3902*, y no PimE, es la responsable de la elongación de las cadenas de oligomanósidos de las glicoproteínas en *S. coelicolor*.

2. Introducción

2.1. Glicosilación de proteínas

La glicosilación de proteínas es una modificación post-traduccional que ocurre en todos los dominios de la vida. Consiste en la unión covalente de azúcares, oligosacáridos o polisacáridos, lineales o ramificados, a residuos específicos de una proteína. Se pueden clasificar los tipos de glicosilación por el átomo con el que se forma el enlace glicosídico: en la *N*-glicosilación se unen por el nitrógeno del grupo amida de un residuo de asparagina mientras que en la *O*-glicosilación se unen por el grupo hidroxilo de residuos de serina o treonina, o menos frecuentemente de tirosina, hidroxiprolina o hidroxilisina. Menos estudiada es la *P*-glicosilación, donde la unión es mediante un grupo fosfato, y la *C*-glicosilación, que ocurre en el carbono 2 de residuos de triptófano. Estos últimos dos se han descrito únicamente en eucariontes.¹

Otra forma de clasificar los tipos de glicosilación es por la forma en que se sintetiza el oligo- o polisacárido. Se puede sintetizar el polímero parcial o totalmente, anclado en un lípido de membrana, que después es transferido *en bloc* al polipéptido, lo cual es característico de la *N*-glicosilación. Otra forma es por la adición secuencial de mono- o disacáridos directamente al polipéptido, lo cual ocurre generalmente en la *O*-glicosilación.²

La glicosilación es necesaria para el plegamiento correcto de algunas proteínas secretadas y bloquean estéricamente a las proteasas, haciendo a las glicoproteínas más resistentes a la degradación. Las glicoproteínas en la membrana externa le dan mayor rigidez a la superficie celular, favorecen interacciones con otros glicoconjugados y la retención de moléculas de agua, lo que podría ayudar a soportar la desecación. Además, la enorme diversidad de estructuras que se pueden generar con los carbohidratos hace que las glicoproteínas tengan un papel importante en el reconocimiento celular mediante las interacciones con otras proteínas.^{3,4}

2.2. Glicoproteínas en bacterias

Inicialmente, la glicosilación de proteínas en bacterias se descubrió en *Campylobacter jejuni*, donde la *N*-glicosilación de las proteínas de superficie es importante para la adhesión al hospedero, así como para el reconocimiento por parte del sistema inmune. Sin embargo, la *N*-glicosilación no parece ser muy abundante fuera de las ϵ -Proteobacterias.²

La *O*-glicosilación, por otra parte, parece ser mucho más abundante. Se han encontrado *O*-glicoproteínas tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas. Se han caracterizado glicoproteínas estructurales del flagelo y de pili de γ - y ϵ -Proteobacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* y la

misma *C. jejuni*, y en diversos géneros de Gram positivas de bajo contenido de G+C, los Firmicutes, como *Listeria* y *Clostridium*. Estas glicoproteínas suelen ser determinantes para la clasificación de serovares.²

La *O*-glicosilación también está presente en bacterias Gram positivas de alto contenido de G+C. La *O*-manosilación, es decir, la glicosilación con oligomanósidos en residuos de serina o treonina, está presente en las actinobacterias en general.⁵ La *O*-manosilación en actinobacterias es semejante a la que ocurre en ascomicetos, y se cree que las enzimas involucradas se adquirieron por transferencia horizontal desde levaduras.⁶

En *Mycobacterium*, un género de actinobacterias con muchas especies de patógenos intracelulares, la *O*-manosilación de las proteínas secretadas es necesaria para el reconocimiento por las células del sistema inmune e inducir la fagocitosis de la bacteria, estableciendo la infección intracelular.⁵ Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* incapaces de glicosilar proteínas tienen menor capacidad para infectar ratones.⁷ Muchos antígenos de *M. tuberculosis* son glicoproteínas que pueden ser separadas por cromatografía de afinidad con la lectina concanavalina A (ConA).⁸ El antígeno de 45/47 kDa, también conocido como proteína Apa, es una manoproteína inmunodominante secretada por *M. tuberculosis* a la que se le ha caracterizado por completo su patrón de glicosilación.⁹ Este patrón es determinante para la actividad antigénica; la proteína Apa hipermanosilada por *Mycobacterium smegmatis* presenta menor actividad antigénica, mientras que la Apa sin manosilar la pierde casi por completo.¹⁰ En cambio, la proteína Apa producida heterológamente en *Streptomyces lividans*, otra actinobacteria más lejana a *Mycobacterium*, presenta el mismo patrón de glicosilación, y la misma actividad antigénica que la Apa de *M. tuberculosis*.¹¹

En las bacterias del género *Streptomyces* se descubrió la manosilación de proteínas por medio de estudios con el bacteriófago ϕ C31. Mutantes de *S. coelicolor* deficientes en las enzimas de la vía de manosilación de proteínas son resistentes a la infección por ϕ C31,^{12, 13} presumiblemente porque el receptor del fago tiene que estar glicosilado para ser reconocido, aunque éste no ha sido identificado. De hecho, poco se sabe de las glicoproteínas de *S. coelicolor*. La única caracterizada es el transportador de fosfato PstS, una lipoproteína secretada que se glicosila por una vía homóloga a la de *Mycobacterium*.¹⁴

En general, el género *Mycobacterium* presenta más glicoconjugados en su superficie que el género *Streptomyces*. Además de las muchas glicoproteínas del secretoma de *Mycobacterium tuberculosis*,^{15, 16} estas bacterias producen distintos tipos de glicolípidos y lipoglicanos que varían en su composición, configuración y localización en la célula: pueden contener residuos de manosa, arabinosa o galactosa, formando polímeros lineales o ramificados de alto peso molecular, y que se encuentren en la cara externa

de la membrana celular, anclados a la pared de peptidoglicano, o en la membrana externa de ácidos micólicos o “micomembrana”, característica de las micobacterias.⁴ En particular los glicolípidos fosfatidil inositol manósidos (PIM) y los lipoglicanos lipomanano (LM) y lipoarabinomanano (LAM), son los gliconconjugados lipídicos cuyas terminaciones manosiladas son más similares a las de las glicoproteínas. LM y LAM presentan cadenas de oligomanosa en sus extremos unidas por enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$, igual que las glicoproteínas, y tanto las glicoproteínas como los lipoglicanos pueden interactuar con el receptor de manosa de macrófagos e inducir una fagocitosis permisiva que promueva la sobrevivencia de *M. tuberculosis*.⁵

2.3. Biosíntesis de *O*-manoproteínas

La *O*-manosilación de proteínas se describió inicialmente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En levaduras, la *O*-manosilación comienza en el retículo endoplasmático a partir de residuos de manosa unidos a un lípido de membrana, el dolicol, en forma de dolicol fosfato β -D-manosa. Éste se sintetiza a partir de GDP- α -D-manosa (GDP-Man) y dolicol fosfato por acción de la enzima sintasa de dolicol fosfato manosa (DPM), del lado del citoplasma. La dolicol fosfato β -D-manosa se transloca al interior del retículo endoplasmático, donde una manosiltransferasa de proteínas (PMT) transfiere el residuo de manosa del dolicol fosfato β -D-manosa a un residuo de serina o treonina de un polipéptido que está siendo secretado por el sistema de secreción SEC, formando el enlace glicosídico α . Después, en el aparato de Golgi, otras manosiltransferasas utilizan la GDP-Man para elongar la cadena y formar $\alpha(1\rightarrow2)$ manodiósidis y manotriósidis. Finalmente, otras enzimas alargan, ramifican y diversifican el proteoglicano.¹⁷

En actinobacterias, la *O*-manosilación procede por una vía muy semejante (Fig. 1). Tienen enzimas homólogas a las DPM y PMT de levaduras, llamadas Ppm y Pmt, que se localizan en la membrana plasmática. En la cara interna la enzima Ppm cataliza la síntesis de poliprenol fosfato β -D-manosa, análoga a la dolicol fosfato β -D-manosa. Ésta tiene que traslocarse a la cara externa de la membrana, aunque aquí tampoco se sabe cómo ocurre. Es en esta cara externa de la membrana donde la Pmt cataliza la formación del enlace glicosídico α con residuos de serina o treonina en proteínas que están siendo secretadas por el sistema de secreción Sec.^{18, 19} Después también se añaden más residuos de manosa con enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$. Como este paso ocurre en el lado extracelular, donde no hay GDP-Man, las enzimas no pueden ser homólogas a las de levadura.

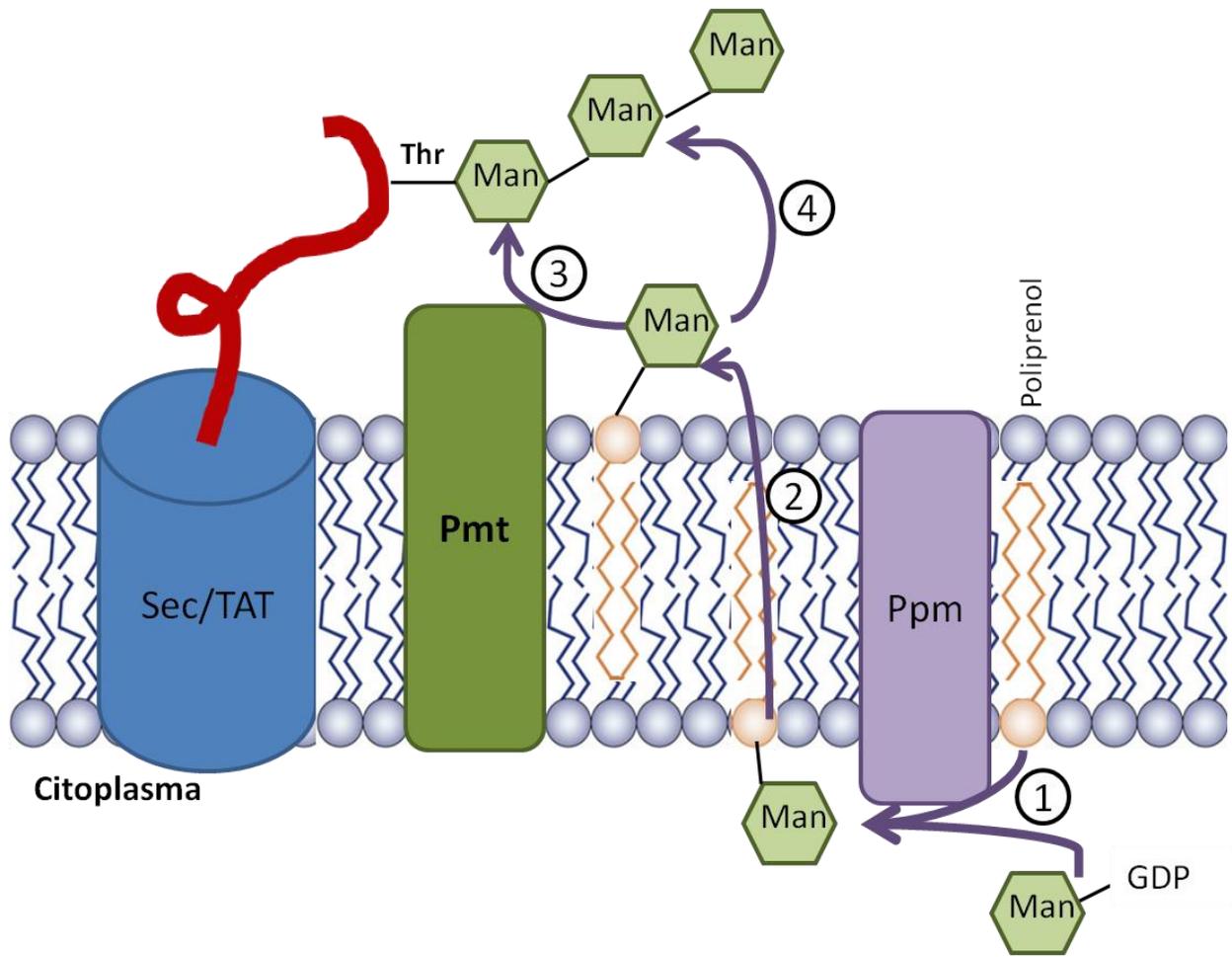


Figura 1. Biosíntesis de glicoproteínas en actinobacterias.

La vía comienza con la síntesis de poliprenol fosfato manosa a partir de GDP-Man (1), la cual es traslocada al lado extracelular (2) donde la Pmt cataliza la formación del enlace glicosídico (3). Después se producen cadenas de oligomanosa con enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$ en un paso que no está completamente caracterizado (4). Modificado de ¹⁹

En *Mycobacterium* hay una enzima de la vía de síntesis de PIM que agrega la 5^o manosa al fosfatidilinositol con un enlace $\alpha(1\rightarrow2)$, llamada PimE.²⁰ Esta manosiltransferasa también es responsable de la adición de manosas subsecuentes en las glicoproteínas en micobacterias.⁷ En *Streptomyces* se desconoce cuál es la enzima que cataliza esta reacción.

2.4. *Streptomyces* como modelo de estudio

Mientras que las micobacterias representan a las actinobacterias patógenas más conocidas, en el género *Streptomyces* han surgido muchos aportes benéficos para la medicina. La diversidad de metabolitos secundarios que producen los miembros de este género ha sido explotada para la obtención de la mayor parte de los antibióticos utilizados en la clínica actualmente,²¹ además de agentes antitumorales e

inmunosupresores. Esto ha sido posible por la facilidad que presentan muchas especies para crecer en el laboratorio, especialmente *S. coelicolor*. No sólo se han desarrollado metodologías para propagar, seleccionar y preservar las cepas,²² sino que también se han desarrollado muchas técnicas y herramientas para su análisis genético que han sido relevantes no sólo para la microbiología, sino incluso para la genética humana.²³ La biblioteca de cósmidos ordenados del cromosoma de *S. coelicolor* ha ayudado a la manipulación y caracterización genética de esta especie, y permitió finalmente la secuenciación del genoma completo de la cepa A3(2).²⁴ Aunado a todo esto, se han desarrollado vectores para la clonación y expresión de proteínas heterólogas en *Streptomyces*. Esto es de especial interés para la expresión de proteínas de micobacterias: por ser organismos más cercanos filogenéticamente que el modelo clásico *Escherichia coli*, *Streptomyces* tiene mayor capacidad para secretar proteínas de micobacterias, correctamente plegadas y glicosiladas.²⁵

Por las facilidades que se tienen para cultivarla, las herramientas para hacer mutaciones dirigidas, introducir genes y expresar proteínas heterólogas, *S. coelicolor* es un modelo ideal para estudiar muchos procesos metabólicos de actinobacterias, como la biosíntesis de glicoproteínas.

3. Materiales y Métodos

3.1. Cepas y plásmidos

Las distintas cepas de *E. coli*, *S. coelicolor* y ϕ C31 fueron preservadas, cultivadas y manipuladas genéticamente mediante técnicas estándar.^{22,26} Las cepas y plásmidos utilizados fueron los siguientes:

Cepas

Escherichia coli

Nombre	Genotipo	Referencia
DH5 α	F-, Δ (<i>argF-lac</i>)169, ϕ 80 <i>dlacZ</i> 58(M15), Δ <i>phoA</i> 8, <i>glnX</i> 44(AS), λ -, <i>deoR</i> 481, <i>rfbC</i> 1?, <i>gyrA</i> 96(NalR), <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>thiE</i> 1, <i>hsdR</i> 17	27
ET12567	F- <i>dam</i> -13::T9, <i>dcm</i> -6, <i>hsd</i> -M	28
BW25113	F-, Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), λ , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	29

Streptomyces coelicolor

Nombre	Genotipo	Referencia
M145	A3(2) SCP1- SCP2-	22
J1928	M145 Δ <i>pglY</i> :: <i>aadA</i>	30
IB11	M145 Δ <i>pmt</i>	31
IB25	J1928, Δ <i>pmt</i>	31
IB31	J1928 Δ <i>pmt</i>	31
IB74	M145 Δ <i>sco</i> 2335	Tavares-Cornejo, comunicación personal
IB76	1928 Δ <i>sco</i> 2335	Tavares-Cornejo, comunicación personal
IB82	M145 Δ <i>sco</i> 3902	Este trabajo
IB84	IB74 Δ <i>sco</i> 3902	Este trabajo

IB86	J1928 Δ <i>sco3902</i>	Este trabajo
IB88	IB76 Δ <i>sco3902</i>	Este trabajo

Bacteriófagos

Nombre	Genotipo	Referencia
KC519	Derivado <i>c' attP'</i> de ϕ C31	32

Plásmidos

Nombre	Descripción	Referencia
StH24	Cósmido derivado de SuperCos 1, Kan ^R Ap ^R , con un fragmento del cromosoma de <i>S. coelicolor</i> A3(2) que incluye el gen <i>sco3902</i>	33
pIJ773	Apra ^R , contiene el cassette <i>aac(3)IV-oriT</i> , flanqueado por sitios FRT	34
pIJ784	Apra ^R , fragmento con cassette <i>aac(3)IV-oriT</i> , flanqueado por las regiones aledañas del gen <i>bla</i> del SuperCos 1	34
pIJ790	Plásmido de recombinación de λ -RED inducible por L-arabinosa, Cm ^R ; replicación sensible a temperatura	34
pCP20	Ap ^R Cm ^R , codifica la recombinasa sitio-específico FLP; replicación sensible a temperatura	29
pUZ8002	Plásmido ayudador o <i>helper</i> no movilizable; Kan ^R	22
pSET152	Vector integrativo de <i>Streptomyces</i> derivado de ϕ C31, de replicación en <i>E. coli</i> ; Apra ^R	36
pSET152:: <i>SCO3902</i>	<i>sco3902</i> con su propio promotor clonado en pSET152	Este trabajo
pIJ6021	Vector de expresión de alto número de copias con el promotor inducible del gen <i>tipA</i> ; Kan ^R	36
pIJ6021-APA6H	<i>Rv1680</i> clonado en pIJ6021, con una etiqueta de 6 histidinas en el carboxilo terminal	37

3.2. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia	Descripción	Referencia
SCO3902forward	5' GCA CGG CGT GGG CTA CGC CTT GGA GAC GCC GAC GCC ATG ATT CCG GGG STC CGT CGA CC 3'	Para mutagénesis del gen <i>sco3902</i> por Redirect	Este trabajo
SCO3902reverse	5' CGC AGT GGA TCT TGA CGC TCC GCT TCG AAC CCT ACG TCA TGT AGG CTG GAG CTG CTT C 3'	Para mutagénesis del gen <i>sco3902</i> por Redirect	Este trabajo
SCO3902Up	5' GCG ATT TCT GGG ACA TCA AC 3'	Para confirmar mutación del gen <i>sco3902</i> y clonarlo	Este trabajo
SCO3902Down	5' GAC GTC CTT GTG ATC CTC GT 3'	Para confirmar mutación del gen <i>sco3902</i> y clonarlo	Este trabajo
M13fwd	5' GTT TTC CCA GTC ACG AC 3'	Para secuenciar el gen <i>sco3902</i>	39
M13rev	5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'	Para secuenciar el gen <i>sco3902</i>	39
SCO3902Left	5' GGA CAT CCC GCA CCT CTA 3'	Para secuenciar el gen <i>sco3902</i>	Este trabajo
SCO3902Right	5' GCA GCA TCA GAA GCG TGG 3'	Para secuenciar el gen <i>sco3902</i>	Este trabajo

3.3. Mutagénesis del gen *sco3902*

Para obtener mutantes nulas sin marcadores se utilizó el protocolo Redirect, el cual consiste en la técnica de *PCR targeting*²⁹ adaptada para *Streptomyces coelicolor* mediante el uso de la biblioteca de cósmidos de Redenbach.³³ Se utilizó el cósmido StH24 de dicha biblioteca de *S. coelicolor*, transfiriendo la mutación por conjugación y recombinación a partir de *E. coli* a las distintas cepas de *S. coelicolor*.³⁴ El cósmido StH24, que contiene la región del cromosoma que contiene el gen *sco3902*, fue introducido por electroporación a la cepa BW25113/pIJ790, que expresa el sistema de recombinación Red en presencia de L-arabinosa. Se utilizaron los oligonucleótidos SCO3902Forward y SCO3902Reverse para amplificar el cassette de resistencia a apramicina (*aac(3)IV-oriT*) a partir del plásmido pIJ773, flanqueado por 36 pares de bases río arriba y río abajo del marco de lectura de *sco3902*. Al cultivar la cepa

BW25113/pIJ790+StH24 con L-arabinosa se induce la expresión del sistema de recombinación Red; en ese estado se le introduce por electroporación el fragmento *aac(3)IV-oriT* flanqueado por las secuencias aledañas al gen, para generar el cósmido recombinante StH24 $\Delta sco3902::aac(3)IV-oriT$. Este cósmido ahora confiere resistencia a apramicina y puede ser movilizado por conjugación con ayuda del plásmido *helper* pUZ8002.

Se recuperaron las transformantes a 37° C para promover la pérdida del plásmido pIJ790, seleccionando Apra^R y se extrajo DNA plasmídico que contiene el cósmido StH24 $\Delta sco3902::aac(3)IV-oriT$. Para introducirlo en *S. coelicolor*, se electroporó la cepa ET12567/pUZ8002 con el cósmido mutante. Esta cepa de *E. coli* permite introducir por conjugación el cósmido no metilado a *Streptomyces*, para evitar que sea destruido por el sistema de restricción en estas bacterias.

Una vez que esporularon las exconjugantes, se buscaron colonias Apra^R Kan^S, indicativas del doble entrecruzamiento entre el cósmido y el cromosoma; es decir, colonias con el alelo $\Delta sco3902::aac(3)IV-oriT$ en el cromosoma.

A su vez, el cósmido StH24 $\Delta sco3902::aac(3)IV-oriT$ fue introducido a la cepa DH5 α /pCP20. Después, la cepa resultante fue incubada a 42° C para inducir la expresión de la recombinasa FLP que reemplaza la región *aac(3)IV-oriT* por una secuencia “cicatriz” de 81 pb sin codones de paro. Se identificaron mediante réplica las colonias Kan^R Apra^S, y a partir de una de ellas se obtuvo el cósmido StH24 $\Delta sco3902::scar$, el cual contiene una mutación nula, sin marcadores de selección ni efectos polares de la mutación. Éste cósmido se introdujo en la cepa BW25113/pIJ790, para reemplazar el gen *bla* del cósmido por el fragmento de pIJ784 *aac(3)IV-oriT*, para poder introducirlo de nuevo por conjugación a las cepas marcadas $\Delta sco3902::aac(3)IV-oriT$, seleccionando la integración del cósmido mediante resistencia a kanamicina. Se dejaron esporular las exconjugantes en ausencia de antibióticos y después se obtuvieron colonias aisladas y se buscaron colonias Apra^S Kan^S que hubieran reemplazado el alelo $\Delta sco3902::aac(3)IV-oriT$ con el alelo $\Delta sco3902::scar$. La mutación resultante no tiene efectos polares ni resistencias a antibióticos adicionales a la cepa parental. Todas las mutaciones se confirmaron por PCR con los oligonucleótidos SCO3902Up y SCO3902Down.

3.4. Clonación del gen *sco3902*

Con los oligos SCO3902Up y SCO3902Down se amplificó el gen mediante PCR, utilizando como templado DNA cromosomal de la cepa M145 y la enzima Pfu Ultra AD (Agilent Technologies), la cual es de alta fidelidad. El fragmento obtenido de 1850 pb se purificó por gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP), y se clonó en el plásmido pSET152 digerido con EcoRV. El plásmido resultante se purificó de *E.*

suplementado con azúcar al 25% y kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a una densidad óptica de $\text{OD}_{450}=0.1$, en matraces de 2 L. Estos cultivos fueron incubados con agitación a 30° C por 12 h antes de inducir la expresión a partir del promotor *PtipA* con tiostreptón, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y permitir el crecimiento hasta completar 36-40 h. Posteriormente se separó el sobrenadante del micelio por centrifugación y filtración, se ajustó el volumen a 400 mL con agua destilada y se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido hasta alcanzar el 80% de saturación a 4° C con el fin de precipitar las proteínas del sobrenadante. Se dejó a 4° C de 2-4 h y posteriormente se centrifugó a 15 000 g por 1 h. La pastilla de proteínas precipitadas se disolvió en agua destilada y se dializó contra Tris-HCl 20 mM pH=8.0, con al menos 3 cambios. La proteína obtenida se cargó en una columna de Ni-NTA acoplado a agarosa (QIAGEN), previamente equilibrada con el mismo *buffer*. La columna se lavó con 10 volúmenes del mismo *buffer* de + imidazol 20 mM y posteriormente se eluyó la proteína con *buffer* de Tris + imidazol 100 mM, recolectando fracciones de 0.5 mL. La pureza de la proteína en cada fracción se analizó mediante un gel desnaturante de poliacrilamida con SDS.³⁹

3.7. MALDI-TOF-MS

A las fracciones de proteína pura se les evaporó el solvente al vacío para concentrarlas, en un equipo Savant™ SpeedVac™. Se preparó la solución de cristalización saturando de 2, 4, 6-trihidroxiacetofenona (THAP) una mezcla 1:2 v:v de acetonitrilo y agua Mili-Q y ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1 %. 1 μL de la proteína concentrada se mezcló con 1 μL de la solución de cristalización; se depositó 1 μL de la mezcla resultante en la placa para el espectrómetro y se dejó cristalizar 5 minutos. Los espectros fueron obtenidos con un espectrómetro de masas MALDI-TOF microflex de Bruker.

3.8. Búsqueda bioinformática de los ortólogos de PimE y Sco3902 en actinobacterias

Se construyó un árbol filogenético de las actinobacterias con las secuencias del gen 16S de todas las cepas tipo almacenadas en la base de datos SILVA⁴⁰ (83 en total). Las secuencias se alinearon con el programa ClustalW, y se creó el árbol por el método de máxima verosimilitud, usando el modelo general reversible en el tiempo y la distribución gama con sitios invariantes para calcular la verosimilitud, realizando 100 réplicas de bootstrap. El análisis filogenético fue realizado con el *software* MEGA versión 6.⁴¹

Para identificar los ortólogos de las manosiltransferasas en cada una de estas cepas, se realizó una búsqueda mediante BLASTP contra el genoma de cada una de ellas, usando como consulta la secuencia de las proteínas PimE de *M. smegmatis* (Msmeg_5149), Pmt de *S. coelicolor* (Sco3154) y Sco3902. Se tomaron como positivos los hallazgos si el alineamiento tenía un valor $e \leq 1e-5$.

4. Antecedentes

Previamente a este trabajo se había buscado a la proteína encargada de la adición de las manosas subsiguientes a la manosa inicial añadida por la enzima Pmt a las serinas y treoninas de las glicoproteínas en *S. coelicolor*. Para esto, se realizó una búsqueda por medio de BLAST con la secuencia de la proteína Rv2181 de *M. tuberculosis*. Esta enzima es la responsable de la síntesis de las terminaciones de las ramas del lipoarabinomano, que son cadenas de oligomanósidos unidos por enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$.⁴² Ésta es la misma conformación de las cadenas de oligomanosa de las glicoproteínas, por lo que se pensaba que también podría cubrir esa función en la manosilación de proteínas.^{5,42}

La proteína homóloga a Rv2181 en el genoma de *S. coelicolor* es codificada por el gen *sco2335* (22.2% similitud, valor $e = 2e^{-18}$). Ésta tiene el dominio putativo de glicosiltransferasa (DUF2029) fusionado a un dominio presente en inositol transferasas (PAP2 tipo Aur1). Sin embargo, este dominio está presente en los ortólogos de sólo algunas especies de *Streptomyces*; otros miembros del género, como *S. avermitilis* o *S. albus*, sólo cuentan con el dominio de glicosiltransferasa (Fig. 3).

En nuestro laboratorio se aislaron mutantes nulas del gen *sco2335* (Tavares-Cornejo, datos no publicados), para evaluar la glicosilación de sus proteínas. Estas mutantes se aislaron tanto en el fondo genético de la cepa silvestre M145, dando lugar a la cepa IB74, como en el fondo genético de la cepa J1928, la cual está afectada en el sistema Pgl mediante una inserción de un gen de resistencia a espectinomicina en el gen *pglY* (*pglY::aadA1*)³⁰, dando lugar a la cepa IB76. La mutante IB74 se utilizó para expresar a la glicoproteína Apa de *M. tuberculosis* de forma heteróloga, y se midió su reactividad a concanavalina A, una lectina que reconoce glucósidos y manósidos. Con este ensayo no se encontraron

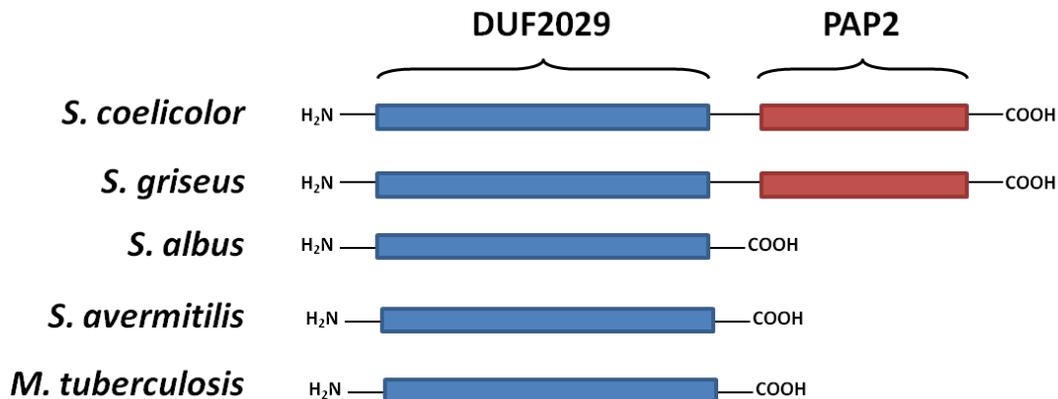


Figura 3. Organización de los dominios de los homólogos de Rv2181. Comparación de las proteínas SCO2335, SGR_5168, SLE_48590, SAV_5840 y Rv2181.

diferencias respecto a la cepa silvestre, ya que la reacción de la proteína Apa expresada en la cepa IB74 con la concanavalina A fue igual que la expresada en la cepa silvestre M145. Adicionalmente se midió la sensibilidad al fago ϕ C31 de la cepa IB76, como un indicador de la glicosilación del receptor de este fago, pero se encontró que esta cepa mutante era tan sensible como la cepa J1928 (Tavares-Cornejo, datos no publicados). Adicionalmente estas cepas mutantes nulas del gen *sco2335* no mostraron diferencias fenotípicas aparentes con la cepa silvestre en cuanto a morfología, a diferencia de cepas mutantes en los genes *ppm* o *pmt* afectadas en glicosilación de proteínas, las cuales muestran una morfología diferente a la de la cepa silvestre.^{12, 13} Debido a estos resultados se descartó que la glicosiltransferasa putativa codificada por *sco2335* tuviera un papel en la glicosilación de proteínas. Es importante mencionar que este trabajo previo se realizó antes de que la enzima responsable de añadir manosas adicionales a las glicoproteínas de *M. tuberculosis* fuera identificada. Posteriormente se demostró que la enzima responsable de colocar las manosas adicionales a las glicoproteínas en este organismo no es Rv2181, sino PimE, cuya función es adicionar la quinta manosa a los fosfatidil inositol manósidos de la membrana celular.⁷

5. Objetivo

Identificar la proteína responsable de la adición de oligomanósidos a las glicoproteínas en *S. coelicolor*.

6. Resultados

6.1. Búsqueda de posibles glicosiltransferasas en *Streptomyces coelicolor* A3(2)

Una vez identificada la manosiltransferasa PimE como la involucrada tanto en la síntesis de PIMs como la responsable de añadir las extensiones de oligomanosa a las proteínas glicosiladas en *M. tuberculosis*,⁷ se realizó una búsqueda por medio de BLAST en las secuencias de proteínas codificadas en el genoma de *S. coelicolor*, con la finalidad de identificar al homólogo de PimE. Utilizando BLASTP, se encontró que la secuencia de proteína con mayor similitud a PimE de *M. tuberculosis* en el genoma de *S. coelicolor* es la codificada por el gen *sco2335* (27% de identidad, valor $e = 3e^{-11}$). Curiosamente, se trata de la misma proteína que mostraba la mayor similitud con la manosiltransferasa que adiciona las terminaciones de oligomanosa en enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$ del LAM, codificada en el gen Rv2181 en *M. tuberculosis* y que se había sugerido que podría ser la enzima responsable de poner estas extensiones en las glicoproteínas⁴² antes de que se determinara que la responsable era en realidad PimE.

Como se mencionó antes, una mutación nula en el gen *sco2335* parecía no tener ningún efecto sobre la capacidad del fago ϕ C31 para infectar a *S. coelicolor*, y la proteína Apa de *M. tuberculosis* purificada de dicha cepa reaccionaba con la concanavalina A, por lo que se había descartado la glicosiltransferasa codificada en dicho gen como la responsable de añadir las extensiones de oligomanosa a las glicoproteínas en *S. coelicolor*. Por lo tanto, fue necesario realizar una búsqueda más exhaustiva de genes candidatos para codificar dicha función.

Para encontrar otra manosil transferasa $\alpha(1\rightarrow2)$ de glicoproteínas parecida a PimE se realizaron búsquedas de proteínas homólogas a PimE de *M. smegmatis* tanto en *S. coelicolor* como en otras especies de *Streptomyces* mediante alineamientos con el algoritmo PSI-BLAST. Después de seis iteraciones, el producto del gen *sco3902* se mantuvo con el mayor puntaje entre las proteínas codificadas en el genoma de *S. coelicolor*.

El gen *sco3902* codifica una probable glicosiltransferasa, con baja similitud a la proteína PimE de *M. smegmatis* (27% de identidad, valor $e=0.27$) (Fig. 4). A pesar de ser poco similar a PimE, un análisis de topología con el programa TOPCONS⁴³ encontró que hay conservación en la organización de los cruces transmembranales entre ambas proteínas, mientras que la proteína codificada por el gen *sco2335* muestra una organización diferente (Fig. 4). Ambas proteínas presentan conservado el aspartato del asa 1, que se ha visto es importante para la función de otras manosil transferasas.¹⁹ Por lo tanto, la glicosiltransferasa codificada en el gen *sco3902* parecía ser una nueva enzima candidata para encontrarse involucrada en la manosilación de proteínas en *S. coelicolor*.

```

SCO3902      PTTEDPVAA-AGSELIGGPL---G--RRALLGTSWWTTPVRVIALVAIGMFALGLVQKAPC
SCO2335      TNGAGGRRGVANA EHSGRPAESFGASAADVT-RARWRVARLGLWLIAAVL-----AV
Rv1159       SAI-AKVRQID--TTSSTPA-----AARRVT-SPPARETRA AVL LLLV-LS-----VG
MSMEG_5149   -----MLLV-VS-----IL
              :      :

SCO3902      YNGAWFFGASSQYTHACYS DIPHL YQGRGFVDGLVPYFDKL-----PGDMEYLEYPVLTG
SCO2335      RQVA AVLGTPRG---ERLT DLETWVGEHGVLVHVEGSLYDSTQ-----FTGT PFVVG
Rv1159       ARLAWTYLAPNG---ANFV DLHVYVSGAASLDHPGTYGYVYADQTPDFPLPFTYPPFAA
MSMEG_5149   ARLAWTYLVPNG---ANFV DLHVYVGGADALDGPALYDYVYADQTPDFPLPFTYPPFAA
              . *      .      * :      : .      :      :      :      : ..

SCO3902      LFMEVASWLT PGS GSIQHQE QWY WMVNAGMLMVCAAVI AVCVT---R---THTRRPWDGL
SCO2335      LVLK-----PFTRAAEQALGW WTFGS LLLVVALGLVAARA--LPQPVGRRTALLAAPV
Rv1159       VVFY-----PLHLVPFGLIALL WQVVTMAALY GAVRISQRLMGGTAETGHFAAMLWT--
MSMEG_5149   IVFY-----PLHLLPFGVVAFI WQIGIIAALYGVVRVSQRLMGLQSQ--RRVAMLWT--
              : :      *      * .      :      : :      .

SCO3902      LVA-----LAPAFALTATVNWDL LAVALTAAAVLMWSRERPLAF GVLLGLATAAKLYP
SCO2335      AISLLM LSLPVRNA FWLGQTSI-IPVLLVLLGCFAVRGA-QGDRAG GVLI GVAAAFQPTV
Rv1159       --AIAIWIEPLRST FDY GQINV-LLMLAALWAVYTPRW-----WLS GLLV GVASGVKLT P
MSMEG_5149   --ALGIWTEPLRST FDY GQVNV-VLVLA VLCAVSTTRW-----WLS GLLV GLAAGIKLTP
              :      :      : *      :      . * .      .      * : * : * : * : . :

SCO3902      FLILGPLLVLCWRAGKWR AFAT----ALGGAAGAWLVVNL PVMLFAFDGWSKFYTF---S
SCO2335      LLFVPLLWFTD--RR--RAVSTGITFAACTAVAWAAMAQDSYTY----WVHHMAGVGLG
Rv1159       AI--TAVYLVG--VRRLH AAAFSVVVFLATVGV SLLVVGDEARYY----FTDLLGDAGR V
MSMEG_5149   AV--AGLYFLG--ARRWA AVACSAAVFFATVGVSWLVVGAQARRY----FTELLGDADRI
              :      : .      * .      . . . :      : :      :      : .

SCO3902      QERGVD FGSFWLILVQNSDNPPSTETVNTLATLLMLLCCGAV AALTLTAPR-----RPRF
SCO2335      GEADDLANQSLHGVLRL---GLN---GPLEIALFLLLGA AV LALRRAVRYARDGQLL
Rv1159       GPIATSFNQSWRGAISRIL--GHDAGFGPLVLA AI-ASTAVL AILAWRA-L--DR-SDRL
MSMEG_5149   GPIGTSFNQSWRGGISRIL--GHDAGFGPLVLIGI-GITAVL ALLAWRA-I--GGAQDRL
              .      :      .      *      :      . : * * :      :

SCO3902      AQLAFLIVAAFILTNKVYSPQYVL WLVPLAAL-----ARPKWRDFLIWQACEVAYFLG
SCO2335      LAVAVTGCAAVAVSPATW-QHQLL WLVPAVVGRVGRRASD-----RYVWP-----
Rv1159       GKLLVVELFGLLLSPI SW-THHW WLVPLMIWLIDGPARERPGA-RILGWG-----
MSMEG_5149   GGILVVS LFLGLVLSPI SW-THHW WLIP LMMWLLHGPLSALRGA-RILGWG-----
              : . . : : : * : *

```

Figura 4. Alineamiento de las manosil transferasas. Subrayado los segmentos transmembranales predichos por el algoritmo TOPCONS. En rojo el aspartato conservado del asa 1. Rv1159, PimE de *M. tuberculosis*. MSMEG_5149, PimE de *M. smegmatis*

6.2. Aislamiento de cepas mutantes carentes del gen *sco3902*

Con el fin de determinar si la proteína que codifica *sco3902* efectivamente está involucrada en la glicosilación de proteínas, se procedió al aislamiento de mutantes nulas en dicho gen, para lo cual se utilizó el método de recombinación basado en el sistema Red del fago lambda²⁹ adaptado a *S. coelicolor*.³⁴ Como se mencionó en los antecedentes, en el laboratorio ya se habían aislado mutantes nulas en el gen *sco2335* (cepas IB74 e IB76), que codifica la proteína más parecida a PimE de *M. smegmatis*, pero que aparentemente no estaba involucrada en la glicosilación de proteínas de *S. coelicolor*. Además de incluir estas cepas en todos los experimentos de este trabajo, se aislaron dobles mutantes $\Delta sco2335 \Delta sco3902$ para evaluar la posibilidad de que los dos genes tuvieran una función redundante. Todas las mutantes de este trabajo se obtuvieron tanto en el fondo genético de la cepa silvestre M145, la variante sin plásmidos de la cepa secuenciada A3(2), como en el fondo genético de la cepa J1928, para los experimentos con el bacteriófago $\phi C31$.

6.3. Glicosilación del receptor de $\phi C31$

Como primera aproximación para evaluar la glicosilación de proteínas de mutantes nulas del gen *sco3902* de *S. coelicolor* se midió la sensibilidad al bacteriófago $\phi C31$. El receptor de este fago tiene que estar glicosilado para ser reconocido; es por esto que supusimos que en una cepa con proteínas hipoglicosiladas tendría menos probabilidad de establecerse la interacción entre el fago y su receptor, y en consecuencia la cepa sería más resistente a la infección.

En este ensayo de infección se mezclaron esporas de las cepas mutantes derivadas de J1928, sensibles al bacteriófago, con una misma dilución de partículas de $\phi C31$, se dejaron germinar 16 hr y posteriormente se contaron las placas de lisis. Mientras que en la cepa mutante IB76 ($\Delta sco2335$) se formó la misma cantidad de placas de lisis que con su cepa parental J1928, en la mutante IB86 ($\Delta sco3902$) y en la doble mutante IB88 ($\Delta sco2335 \Delta sco3902$) la formación de placas tuvo un título de un orden de magnitud menor que en la cepa J1928 ($p < 0.05$; Fig. 5B). Además, las placas que se observaron en las cepas IB86 e IB88 eran más pequeñas que las de la cepa parental J1928 (Fig. 5A). En la mutante IB25 (Δpmt), que no glicosila proteínas y que se utilizó como control negativo, no se observaron placas. Estos resultados sugieren que el gen *sco3902* es necesario para la glicosilación del receptor de $\phi C31$ y que, en su ausencia, el receptor está menos glicosilado y el fago se propaga con más dificultad. El gen *sco2335* parece no estar involucrado, pues su delección no tuvo efecto sobre la eficiencia de formación de placas, ni por sí sola ni en conjunto con la mutación $\Delta sco3902$.

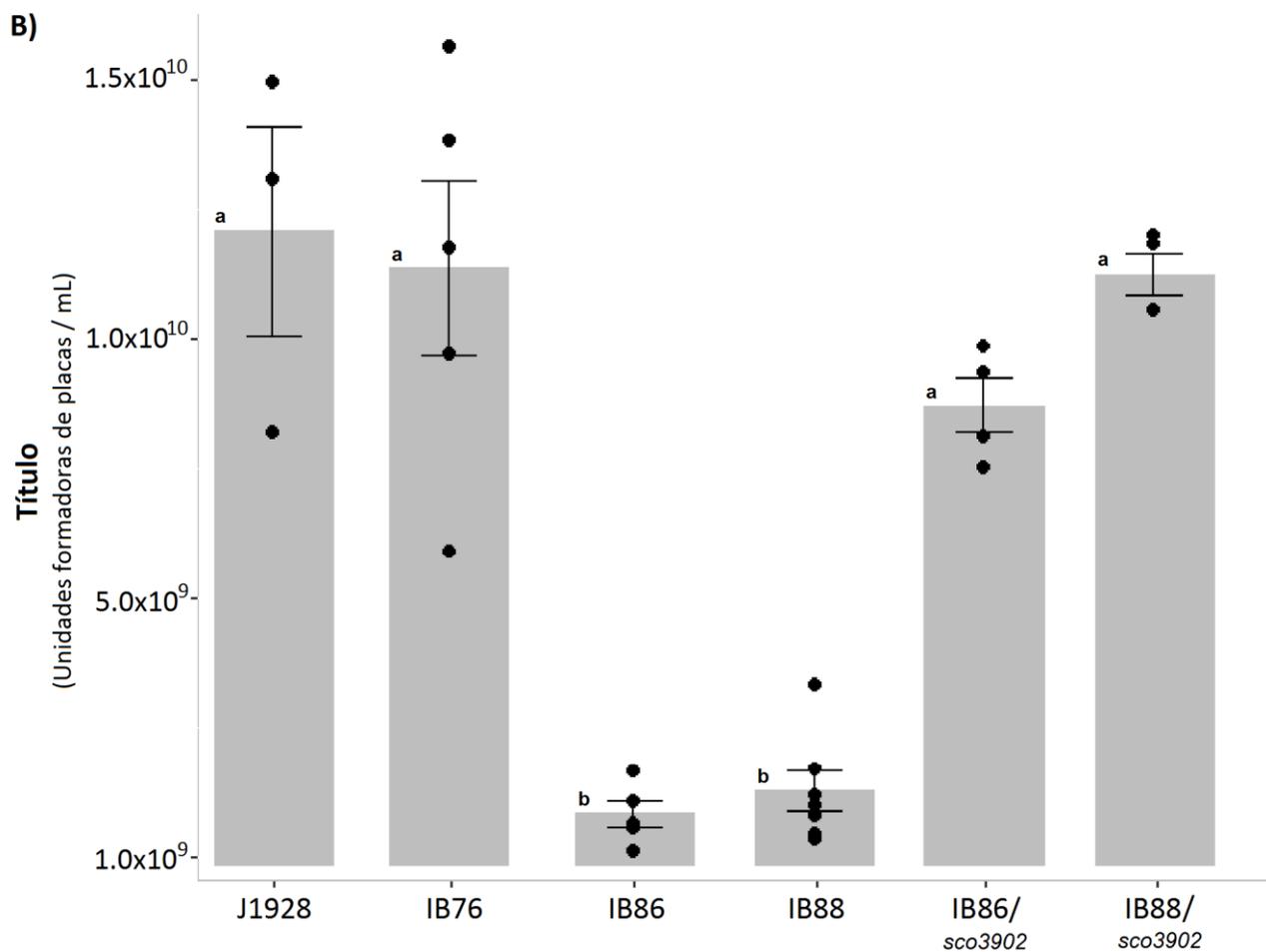
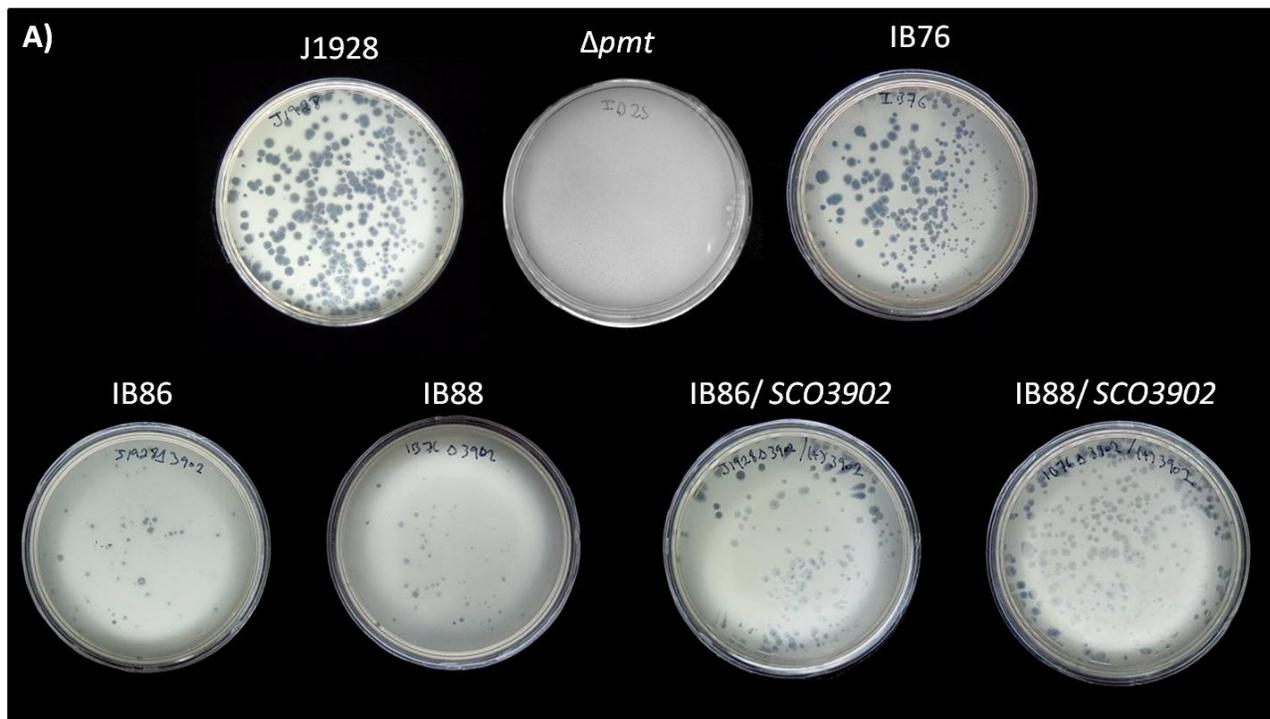


Figura 5. Infección por el bacteriófago ΦC31.

A) Formación de placas en las cepas indicadas. B) Eficiencia de plaqueo. Cada punto indica un replicado independiente, las barras el promedio y las letras significancia estadística (ANOVA con Bonferroni, $p < 0.05$)

Para descartar que el fenotipo de las mutantes se debiera a efectos polares, se clonó el gen *sco3902* en el vector integrativo pSET152, con 299 pares de bases río arriba, con la finalidad de que el gen se exprese desde su propio promotor. Al introducir este plásmido en las cepas IB86 e IB88 se logró restaurar el fenotipo silvestre (Fig. 5), demostrando que efectivamente el gen *sco3902* es el responsable de la disminución de la sensibilidad a ϕ C31.

6.4. Expresión y purificación de la proteína Apa de *M. tuberculosis* de las distintas cepas de *S. coelicolor*

Otra forma de medir la glicosilación de las proteínas secretadas en estas cepas es mediante la expresión heteróloga de una glicoproteína bien caracterizada como es la proteína Apa de *M. tuberculosis*. Para ello se utilizó el plásmido multicopia pIJ6021-APA6H,³⁷ que tiene clonado el gen que codifica la proteína Apa de *M. tuberculosis*, el cual se modificó para añadir a la proteína una etiqueta de 6 histidinas en el extremo carboxilo terminal. La expresión de este gen se encuentra bajo el control del promotor del gen *tipA*, que es inducible por el antibiótico tiostreptón.⁴⁴ Este plásmido se introdujo, mediante transformación de protoplastos, a las cepas M145, IB74 e IB82, y con las esporas obtenidas de estas cepas transformadas se inocularon cultivos para purificar a la proteína Apa; se indujo la expresión añadiendo tiostreptón a las 12 horas, y después de 24 hr de inducción el sobrenadante se separó del micelio por centrifugación y las proteínas fueron precipitadas con sulfato de amonio al 80% de saturación. El precipitado se disolvió en *buffer* de Tris 20mM pH=8, se dializó contra el mismo *buffer* y se pasó por una columna de afinidad de Ni-NTA acoplado a agarosa (QIAGEN); la columna fue lavada con *buffer* que contenía imidazol 20 mM

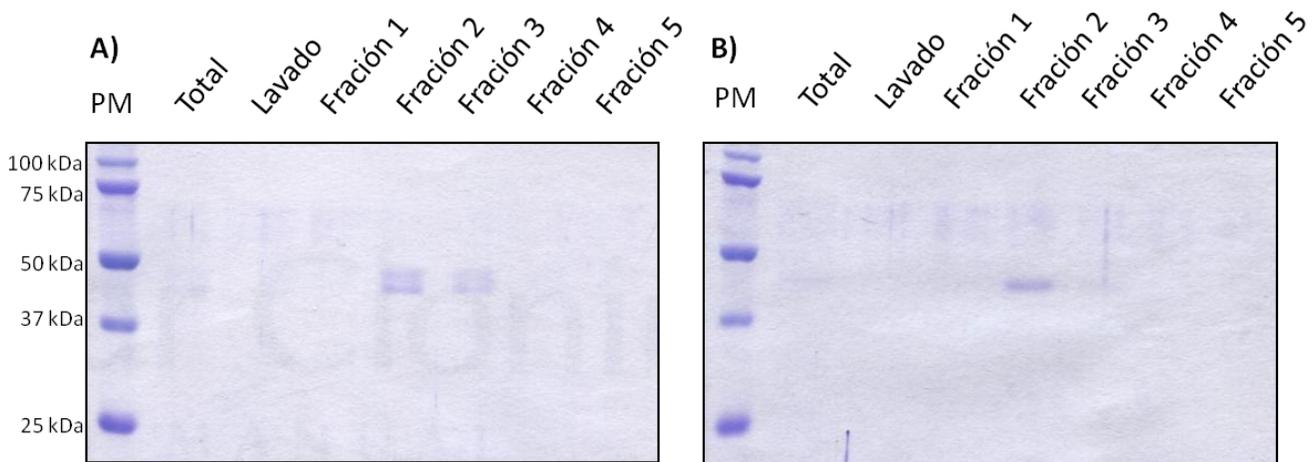


Figura 6. Purificación de la proteína Apa por columna de afinidad a Níquel. Precipitado total, lavado y fracciones de elución del sobrenadante de la cepa A) M145 y B) IB82.

y se eluyó con imidazol 100 mM.

Las fracciones obtenidas de la columna se analizaron por SDS-PAGE. Aunque aparentemente no se obtuvo mucha proteína total, se logró concentrar y purificar la proteína Apa (Fig. 6). Interesantemente, mientras que la proteína silvestre presentó el patrón característico de dos bandas (45 y 47 kDa), la proteína purificada de la cepa IB82 sólo tenía la banda de mayor movilidad electroforética (45 kDa). Se sabe que la banda de 45 kDa corresponde al mismo polipéptido, pero no reacciona con la lectina ConA; es decir, es una forma menos glicosilada de la proteína Apa.¹¹ Así, la movilidad electroforética de las proteínas purificadas de estas cepas es consistente con la hipótesis de que la cepa IB82 produce proteínas hipoglicosiladas.

6.5. Espectrometría de masas de la proteína Apa

Para determinar el grado de glicosilación de la proteína Apa purificada de cada cepa, se analizaron muestras de la proteína completa por MALDI-TOF MS. En un espectro de masas de este tipo, múltiples picos separados por una distancia de 162 Da son indicativos de moléculas que difieren por la adición de una manosa; es decir, de polipéptidos glicosilados.

La proteína Apa se glicosila del lado amino-terminal en tres residuos de treonina con cadenas de hasta tres manosas en cada sitio, y en un residuo de treonina en el carboxilo-terminal con hasta cuatro manosas (Fig. 7A). Así, en el espectro de la proteína silvestre se esperaría observar picos equivalentes a una proteína que tiene desde ninguna hasta trece manosas, separados por 162 Da, mientras que la proteína Apa sin glicosilar sólo debería presentar el primer pico.

Una cepa capaz de manosilar proteínas solo por la acción de la *Pmt*, responsable de unir la primer manosa, producirá una proteína Apa con máximo de una manosa en cada uno de los cuatro sitios de glicosilación. Entonces, el espectro de masas debería mostrar hasta cinco picos, correspondientes a la proteína que tiene desde ninguna hasta cuatro manosas.

Al analizar los espectros generados por MALDI-TOF MS, la proteína purificada de la cepa silvestre mostró el patrón esperado, con hasta catorce picos separados por aproximadamente 162 Da. En cambio, la proteína sin glicosilar, purificada a partir de la cepa Δpmt , presentó únicamente un pico. La proteína expresada en la cepa IB74 mostró el mismo número de picos que la proteína silvestre, mientras que aquella expresada en la cepa IB82 tuvo picos claros correspondientes hasta 4 manosas (Fig. 7b).

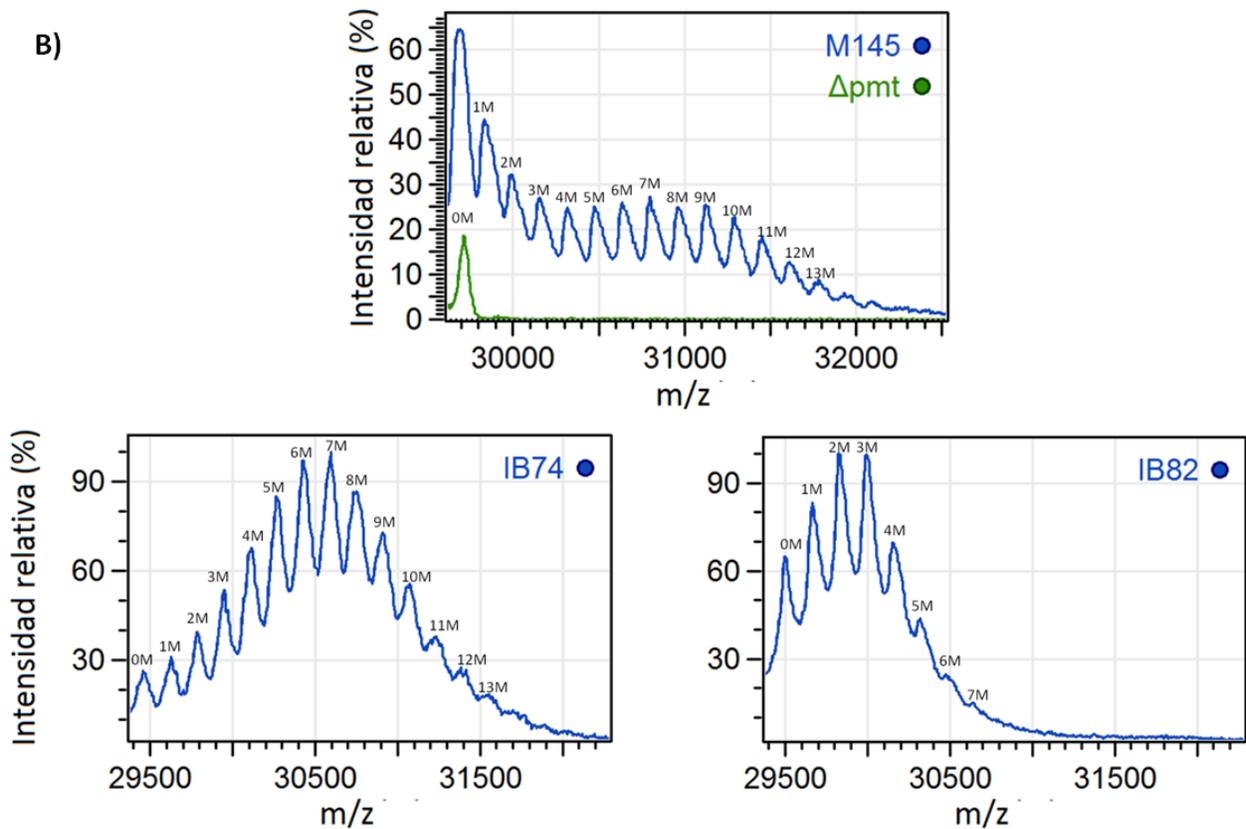
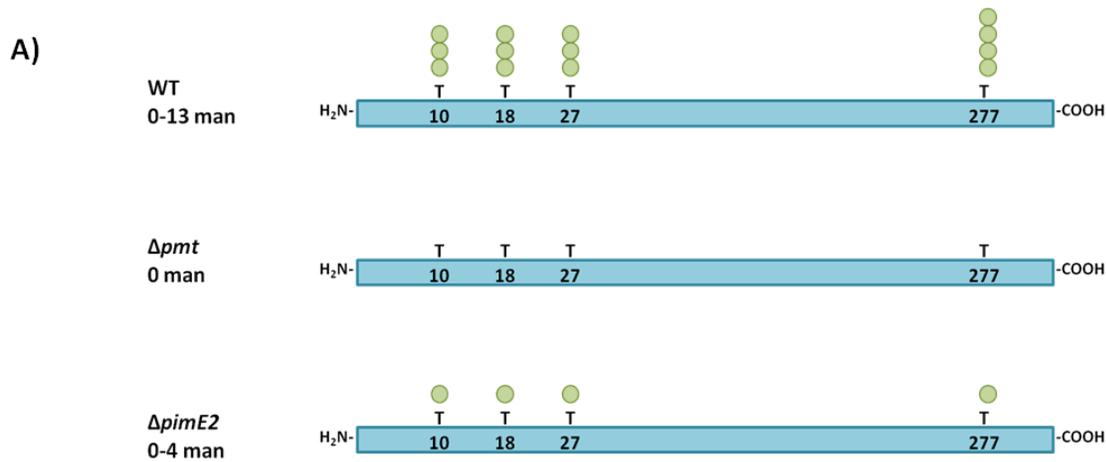


Figura 7. A) Sitios de glicosilación de la proteína Apa. B) Espectros de masas de la proteína Apa purificada de las diferentes cepas.

Sin embargo, el espectro muestra todo un continuo de pesos moleculares, seguramente debido a una fragmentación durante la ionización de la proteína. Además, el hecho de que el pico inicial dé una masa menor que la masa predicha de la proteína (29 510 vs. 29 603 Da) sugiere una degradación de la misma.

6.6. Búsqueda de las manosiltransferasas PimE y Sco3902 en genomas de actinobacterias

Tendiendo dos manosiltransferasas diferentes, PimE y Sco3902, que cumplen la misma función en dos organismos diferentes (*M. tuberculosis* y *S. coelicolor*), quisimos conocer la distribución de estas dos proteínas en las actinobacterias en general. Para ello, se realizó una búsqueda por BLAST contra los genomas de cepas tipo de actinobacterias, y se consideró que éstos tenían un homólogo a Sco3902 o a PimE si se encontraba un acierto con un valor $e \leq 1e-5$. También se buscaron homólogos a la proteína Pmt de *S. coelicolor* como control.

Comparando los resultados de la búsqueda con la filogenia de las actinobacterias (Fig. 8), se encontró que ambas proteínas, PimE y Sco3902, están ampliamente distribuidas en todo el filo, pero no están presentes en todas las especies analizadas (Fig. 8). Hay especies que sólo tienen homólogo de PimE, especies que sólo tienen homólogo de Sco3902, e incluso especies que no tienen ninguno. En particular, todos los miembros del suborden *Corynebacterineae*, al que pertenecen las micobacterias, presentan un homólogo de PimE, pero no todos presentan un homólogo de Sco3902 (e. g. *M. yongonense*, *C. glutamicum*). Esto refleja la relevancia de PimE en este grupo, lo cual puede deberse a su participación en la síntesis de lipoglicanos, que son esenciales en algunas especies, pero también a su papel en la síntesis de glicoproteínas.

En cambio, en el suborden *Streptomycineae*, todos los miembros cuentan con un homólogo de Sco3902, pero al menos *S. fulvissimus* no presenta un homólogo de PimE. Pareciera que en este grupo PimE no es tan importante, y en cambio Sco3902 cumple esas funciones, por lo menos en la síntesis de glicoproteínas.

Todas las especies que tienen un homólogo de PimE o Sco3902 también cuentan con la manosiltransferasa de proteínas Pmt.

7. Discusión

En este trabajo se estudiaron dos genes que codifican manosiltransferasas putativas y su probable papel en la adición de cadenas de oligomanosa a glicoproteínas en *S. coelicolor*. Uno de ellos, *sco2335*, se identificó como el homólogo de *pimE* de *M. tuberculosis*, que codifica una enzima que participa en la síntesis de PIMs, y que es también responsable de la adición de manosas subsecuentes a la manosa inicial añadida a las glicoproteínas por Pmt en micobacterias. La otra posible manosiltransferasa, codificada por el gen *sco3902*, fue identificada como un homólogo lejano de PimE de *M. smegmatis*. Aunque los dos genes codifican proteínas membranales con un dominio DUF2029 de manosiltransferasa, el producto del gen *sco3902* no parece ser un ortólogo probable de PimE, pues en la búsqueda mediante BLAST el valor de E fue muy alto (0.27). Así, hay dos manosiltransferasas diferentes codificadas en el genoma de *S. coelicolor* que podrían ser responsables de la adición de manosas en configuración $\alpha(1\rightarrow2)$ a las glicoproteínas.

Para estudiar la función de estos genes se aislaron cepas con mutaciones nulas en ellos. También se estudió la cepa doble mutante, por si los dos genes tenían una función redundante. En estas cepas se midió la glicosilación de proteínas de dos formas, una de ellas indirecta y otra directa. La sensibilidad al fago ϕ C31 da una idea de la glicosilación de las proteínas endógenas, pues su receptor (o receptores) tiene(n) que estar manosilado(s) para que pueda reconocerlo. Por lo tanto, era lógico pensar que la ausencia de una manosiltransferasa que afectara el grado de glicosilación del receptor tuviera un efecto en la infección por el fago. Con este ensayo se observó que el fago presentaba una eficiencia de plaqueo ~10 veces menor en las cepas Δ *sco3902*. En cambio, la mutación Δ *sco2335* no tuvo ningún efecto sobre la eficiencia de plaqueo. Con este método, además, se observó que el fenotipo de las mutantes Δ *sco3902* se podía complementar mediante la expresión en *trans* del mismo gen desde su propio promotor, demostrando que la resistencia a ϕ C31 no es resultado de un efecto polar de la mutación. Estos resultados sugieren que el producto del gen *sco3902* está involucrado en la síntesis de glicoproteínas. Estos resultados sugieren que la manosiltransferasa codificada en el gen *sco3902* sí participa en la glicosilación del receptor del fago. Además, indican fuertemente que si el receptor tiene únicamente un residuo de manosa en cada sitio de glicosilación, el reconocimiento por el fago todavía ocurre, pero con una eficiencia menor, por lo que la probabilidad de que las partículas de fago establezcan la infección se reduce aproximadamente un orden de magnitud.

El otro método para medir la glicosilación en estas cepas fue mediante la expresión heteróloga de la glicoproteína Apa de *M. tuberculosis*. La proteína purificada de estas cepas pudo ser analizada por MALDI-TOF; se esperaba detectar a la proteína glicosilada como una sería de picos separados por 162

Da, característicos de moléculas glicosiladas con hexosas. Los sitios de glicosilación de la proteína Apa se han estudiado en detalle,^{9, 11} y se sabe que se glicosila en cuatro sitios específicos. Entonces, si el gen *sco3902* es el responsable de la adición de las manosas subsecuentes a la añadida por Pmt, la proteína Apa purificada de cepas Δ *sco3902* podría tener entre 0 y 4 manosas como máximo, que se observarían como 5 picos separados por 162 Da, a diferencia de los 13 picos de la proteína silvestre. En el espectro obtenido de la proteína purificada de esta cepa se observaron claramente esos 5 picos, lo que sugiere fuertemente que estas proteínas están menos glicosiladas que la silvestre. Sin embargo, se alcanzan a distinguir unos picos minoritarios. Como los espectros se obtuvieron a partir de muestras de proteína completa, es muy probable que se esté observando productos de fragmentación de la misma, o bien que la preparación de proteína purificada contenga fragmentos de proteína causados por proteólisis debida a las abundantes proteasas del sobrenadante de *S. coelicolor*. Esto también explicaría por qué el pico inicial, correspondiente a la proteína sin manosilar, se observa 90 Da más pequeño de lo esperado. Para eliminar estos artefactos se tiene planeado analizar péptidos individuales producidos por la digestión enzimática de estas proteínas, que se ionizan con mayor facilidad y dan espectros más limpios. Lo ideal sería analizar un péptido que contenga solo un sitio de glicosilación, como el péptido C-terminal producido por la enzima LysC.¹¹

Los resultados de los ensayos de infección por ϕ C31 y los espectros de las glicoproteínas sugieren fuertemente que en *S. coelicolor* es el producto del gen *sco3902*, y no PimE, el responsable de la extensión de oligomanósidos en las glicoproteínas. Buscando entre diversas actinobacterias, encontramos que las dos proteínas están ampliamente distribuidas en el filo, pero ninguna por completo. En general, parece que PimE está completamente conservada entre las micobacterias (*Corynebacterineae*) pero *Sco3902* no. Esto podría ser indicativo de que en estas bacterias, que tienen una envoltura celular compleja, hay más presión para mantener a PimE, que participa en la síntesis de lipoglicanos y glicoproteínas,^{7, 20} y *Sco3902* no es tan importante. Entre los estreptomicetos ocurre lo contrario: *Sco3902* está completamente conservada y PimE no. Aquí pareciera que PimE no es tan importante, pues no hay síntesis de lipoglicanos en estreptomicetos. En cambio, *Sco3902* se conserva porque en este grupo llegó a cubrir una función necesaria (glicosilación de proteínas). Hay que recordar que aunque los estreptomicetos no sintetizan lipoglicanos, sí tienen PIMs, que son un componente importante de su membrana celular.^{45, 46} Queda pendiente explorar el papel de PimE y *Sco3902* en la síntesis de estos glicolípidos.

Todas las especies que presentan una de estas manosiltransferasas también tienen un gen de Pmt, sugiriendo que la manosilación de proteínas está tanto o más conservada que la función de PimE o *Sco3902* entre las actinobacterias. Incluso hay grupos en los que está presente Pmt pero ninguna de estas

dos manosiltransferasas, lo que sugiere que en estas bacterias o las glicoproteínas están monomanosiladas en cada sitio, o tienen otras manosiltransferasas desconocidas que cumplen esa función.

Si consideramos el origen evolutivo de la glicosilación en actinobacterias, podemos imaginar por qué hay tal diversidad de manosiltransferasas para sintetizar las cadenas de oligomanósidos de las proteínas, mientras que Pmt, que pone la primer manosa, está muy conservada. Las actinobacterias adquirieron estas glicosiltransferasas por un evento de transferencia horizontal de un ancestro de levaduras.⁶ En levaduras, el ortólogo de Pmt se localiza en la membrana del retículo endoplasmático y cataliza la primera glicosilación utilizando dolicol fosfato β -D-manosa como donador de manosas.¹⁷ En cambio, la elongación de los oligosmanósidos ocurre en el aparato de Golgi, mediante manosiltransferasas solubles que utilizan GDP- α -D-manosa como donador. Sin embargo, las actinobacterias no tienen retículo endoplasmático ni aparato de Golgi; todas las reacciones deben ocurrir en el lado extracelular de la membrana, donde no se pueden acumular ni GDP- α -D-manosa ni manosiltransferasas solubles. Así, las manosiltransferasas responsables de la elongación de los oligomanósidos en actinobacterias no pueden ser las mismas que las de levadura. Entonces es probable que estas enzimas hayan evolucionado a partir de otras manosiltransferasas dependientes de dolicol (y no de GDP- α -D-manosa), en un proceso que ocurrió al menos dos veces de forma independiente en la historia de las actinobacterias, según los resultados obtenidos en este trabajo.

8. Conclusiones

- En *S. coelicolor*, PimE no es necesaria para la manosilación de proteínas
- En cambio, Sco3902 es la responsable de la adición de cadenas de oligomanósidos a las glicoproteínas
- El bacteriófago ϕ C31 no requiere de las cadenas de oligomanósidos para infectar, pero la eficiencia disminuye considerablemente en su ausencia

9. Referencias

1. Spiro R. G. 2002. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptides bonds. 2002. *Glycobiology*. 12(4): 43R-56R.
2. Tytgat H. L. P. y S. Lebeer. 2014. The Sweet Tooth of Bacteria: Common Themes in Bacterial Glycoconjugates. 2014. *Microbiology Molecular Biology Reviews*. 78(3): 372-417.
3. Alberts B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. Nueva York, E. U.: Garland Science.
4. Angala S. K., J. M. Belardinelli, E. Huc.Claustre, W. H. Wheat y M. Jackson. 2014. The cell envelope glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. 2014. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 49(5): 361-399.
5. Espitia C., L. Servín-González y R. Mancilla. 2010. New insights into protein O-mannosylation in actinomycetes. 2009. *Molecular BioSystems*. 6: 775-781.
6. Lommel M. y S. Strahl. 2009. Protein O-mannosylation: Conserved from bacteria to humans. 2009. *Glycobiology*. 19 (8): 816-828.
7. Liu C., L. Tonini, W. Malaga, M. Beau, A. Stella, D. Bouyssié, M. Jackson, J. Nigou, G. Puzo, C. Guilhot, O. Burlet-Schiltz y M. Rivière. 2012. Bacterial protein-O-mannosylating enzyme is crucial for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. 2012. *PNAS*. 110: 6560-6565.
8. Espitia C. y R. Mancilla. 1989. Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens. 1989. *Clinical and experimental Immunology*. 77:378-383.
9. Dobos K. M., K. Khoo, K. M. Swiderek, P. J. Brennan y J. T. Belisle. 1995. Definition of the Full Extent of Glycosylation of the 45-Kilodalton Glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. 1995. *Journal of Bacteriology*. 178(9): 2498-2506.
10. Horn C., A. Namane, P. Pascale, M. Rivière, F. Romain, G. Puzo, O. Bâzu y G. Marchal. 1999. Decreased Capacity of Recombinant 45/47-kDa Molecules (Apa) of *Mycobacterium tuberculosis* to Stimulate T Lymphocyte Responses Related to Changes in Their Mannosylation Pattern. 1999. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(45): 32023-32030.
11. Lara M., L. Servín-González, M. Singh, C. Moreno, I. Cohen, M. Nimtz y C. Espitia. 2004. Expression, Secretion, and Glycosylation of the 45- and 46-kDa Glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans*. 2004. *Applied Environmental Microbiology*. 70(2): 679-685.
12. Cowlshaw D. A. y M. C. M. Smith. 2001. Glycosylation of a *Streptomyces coelicolor* A3(2) cell envelope protein is required for infection by bacteriophage $\Phi\phi$ C31. 2001. *Molecular Microbiology*. 41(3): 601-610.
13. Cowlshaw D. A. y M. C. M. Smith. 2002. A Gene Encoding a Homologue of Dolichol Phosphate- β -D-Mannose Synthase Is Required for Infection of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by Phage ϕ C31. 2002. *Journal of Bacteriology*. 184(21): 6081-6083.
14. Wehmeier S., A. S. Varghese, S. S. Gurcha, B. Tissot, M. Panico, P. Hitchen, H. R. Morris, G. S. Besra, A. Dell and M. C. M. Smith. 2009. Glycosylation of the phosphate binding protein, PstS, in *Streptomyces coelicolor* by a pathway that resembles protein O-mannosylation in eukaryotes. 2009. *Molecular Microbiology*. 71(2): 421-433.

15. González-Zamorano M., G. Mendoza-Hernández, W. Xolalpa, C. Parada, A. J. Vallecillo, F. Bigi y C. Espitia. 2009. Mycobacterium tuberculosis Glycoproteomics Base on ConA-Lectin Affinity Capture of Mannosylated Proteins. 2009. Journal of Proteome Research. 8: 721-733.
16. Smith G. T., M. J. Sweredoski y S. Hess. 2014. O-linked glycosylation sites profiling in *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins. Journal of Proteomics, 97: 296-306.
17. Loibl M. y S. Strahl. 2013. Protein O-mannosylation: What we have learned from baker's yeast. 2013. Biochimica et Biophysica Acta. 1833:2438-2446.
18. Guricha S. S., A. R. Baulard, L. Kremer, C. Loch, D. B. Moody, W. Muhlecker, C. E. Costello, D. C. Crick, P. J. Brennan y G. S. Besra. 2002. Ppm1, a novel polyprenol monophosphomannose synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. 2002. Biochemical Journal. 365: 441-450.
19. VanderVen B. C., J. D. Harder, D. C. Crick y J. T. Belisle. 2005. Export-Mediated Assembly of Mycobacterial Glycoproteins Parallels Eukaryotic Pathways. 2005. Science. 309: 941-943.
20. Morita Y., C. Sena, R. Waller, K. Kurokawa, M. Sernee, F. Nakatani, R. Haites, H. Billman-Jacobe, M. McConville, Y. Maeda y T. Kinoshita. 2006. PimE Is a Polyprenol-phosphate-mannose-dependent Mannosyltransferase That Transfers the Fifth Mannose of Phosphatidylinositol Mannoside in Mycobacteria. 2006. J.Biol Chem. 281:25143-25155.
21. Hopwood D. A. (2007). *Streptomyces in Nature and Medicine*. Nueva York, E. U.: Oxford University Press.
22. Kieser T., M. Bibb, M. Buttner, K. Chater y D. A. Hopwood. (2000). *Practical Streptomyces genetics*. Norwich, Inglaterra: John Innes Foundation.
23. Hopwood D. A., H. M. Wright, M. J. Bibb y S. N. Cohen. 1977. Genetic recombination through protoplast fusion in *Streptomyces*. 1977. Nature. 268(5616): 171-174.
24. Bentley S. D., K. F. Chater, A. M. Cerdeño-Tárraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C. H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M. A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrell, J. Parkhill y D. A. Hopwood. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). 2002. Nature. 417(6885): 141-147
25. Anné J., B. Maldonado J. Van Impe, L. Van Mellaert y K. Bernaerts. 2011. Recombinant protein production and streptomycetes. 2011. Journal of Biotechnology. doi: 10.1016/j.biotech.2011.06.028.
26. Sambrook J. y D. W. Russell. (2001). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3era edición. Nueva York, Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
27. Hopwood D. A., H. M. Wright, M. J. Bibb y S. N. Cohen. 1977. Genetic recombination through protoplast fusion in *Streptomyces*. 1977. Nature. 268(5616): 171-174.
28. MacNeil D. J., K. M. Gewain, C. L. Ruby, G. Dezeny, P. H. Gibbons y T. MacNeil. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. Gene, 111: 61-68.
29. Datsenko K. A., y B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. PNAS. 97(12): 6640-6645.

30. Bedford D. J., C. Laity y M. J. Buttner. 1995. Two genes involved in the phase-variable ϕ C31 resistance mechanism of *Streptomyces coelicolor* A3(2) *Journal of Bacteriology*, 177: 4681–4689.
31. Córdova-Dávalos L. E., C. Espitia, G. González-Cerón, R. Arreguín-Espinosa, G. Soberón-Chávez y L. Servín-González. 2014. Lipoprotein N-acyl transferase (Lnt1) is dispensable for protein O-mannosylation by *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiology Letters*, 350: 72-82.
32. Rodicio M. R. y K. F. Chater. 1988. The SalI (SalGI) restriction-modification system of *Streptomyces albus* G. *Gene*, 74: 39-42.
33. Redenbach M., H. M. Kieser, D. Denapate, A. Eichner, J. Cullum, H. Kinashi y D. A. Hopwood. 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: 77-96.
34. Gust B., G. Chandra, D. Jakimowicz, T. Yuqing, C. J. Bruton y K. F. Chater. 2004. λ Red-Mediated Genetic Manipulation of Antibiotic-Producing *Streptomyces*. *Advances in Applied Microbiology*, 54: 107-128.
35. Biermann M., R. Logan, K. O'Brien, E. T. Seno, R. N. Rao y B. E. Schoner. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 116: 43-49.
36. Takano E., J. White, C. J. Thompson, y M. J. Bibb. 1995. Construction of a thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. *Gene*, 166: 133-137.
37. Aguilar-Rangel, E. J. (2015). Utilización del péptido señal de la glicoproteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* para la secreción y glicosilación de lipoproteínas en *Streptomyces*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
38. Messing J. 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods in Enzymol*, 101: 20–78.
39. Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
40. Quast C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, F. O. Glöckner. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acid Research*, 41 (D1): D590-D596.
41. Tamura K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski y S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
42. Kaur D., A. Obregón-Henao, H. Pham, D. Chatterjee, P. J. Brennan y M. Jackson. 2008. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium*: Mannose capping by a multifunctional terminal mannosyltransferase. *PNAS*: 105(46): 17973-17977.
43. Tsirigos K. D., C. Peters, N. Shu, L. Käll y A. Elofsson. 2015. The TOPCONS web server for combined membrane protein topology and signal peptide prediction. *Nucleic Acids Research*. 43 (Webserver issue): W401-W407.
44. Murakami T., T. G., Holt y C. J. Thompson. 1989. Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology*, 171:1459-1466.
45. Sandoval-Calderón M., D. D. Nguyen, C. A. Kapon, P. Herron, P. C. Dorrestein y C. Sohlenkamp. 2015. Plasticity of *Streptomyces coelicolor* Membrane Composition Under Different Growth Conditions and During Development. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1465.
46. Sandoval-Calderón M., Z. Guan y C. Sohlenkamp. 2017. Knowns and unknowns of membrane lipid synthesis in streptomycetes. *Biochemie*, doi.org/10.1016/j.biochi.2017.05.008.