

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería



**Análisis funcional de la actividad disulfuro oxidasa de la
proteína DsbA de *Mycobacterium tuberculosis* mediante
complementación de la mutante DsbA de *Escherichia coli***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

Veronica Castro Flores

Tijuana, Baja California.

Mayo de 2018.

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No.24

Tijuana, B. C., a 05 de Abril de 2018

C. Veronica Castro Flores
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción Tesis

Es propuesto, por la Dra. Rosa Elena Mares Alejandre quien será la responsable de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema "Análisis Funcional de la Actividad Disulfuro Oxidasa de la Proteína DsbA de *Mycobacterium tuberculosis* Mediante Complementación de la Mutante DsbA de *Escherichia coli*", el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- RESUMEN
- II.- INTRODUCCIÓN
- III.- PARTE EXPERIMENTAL
- IV.- DISCUSIÓN Y RESULTADOS
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- REFERENCIAS
- VII. ANEXOS

Rosa E. Mares A.

Dra. Rosa Elena Mares Alejandre
Directora de Tesis

[Signature]
Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA

[Signature]
Dr. José Luis González Vázquez
Subdirector

Castro Flores, Veronica

Análisis funcional de la actividad disulfuro oxidasa de la proteína *DsbA* de *Mycobacterium tuberculosis* mediante complementación de la mutante *DsbA* de *Escherichia coli*

Tesis de licenciatura

Todos los derechos sobre los datos y resultados, derivados de la investigación realizada, contenidos en este documento son propiedad de los autores y de las instituciones donde se realizó el estudio. Por tal motivo, se prohíbe la reproducción, distribución, publicación, traducción, y cualquier otro uso o adaptación (total o parcial) de la información, por cualquier medio o forma de difusión.

La prohibición anterior no tendrá validez, de forma exclusiva y limitada, cuando el uso o adaptación de la información cumpla los siguientes requisitos:

- 1) el material o medio de difusión sea utilizado sólo para fines académicos, no lucrativos ni comerciales;
- 2) incluir la siguiente cita: “Castro Flores, Veronica. Análisis funcional de la actividad disulfuro oxidasa de la proteína *DsbA* de *Mycobacterium tuberculosis* mediante complementación de la mutante *DsbA* de *Escherichia coli*. Tesis de licenciatura. Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Mayo de 2018.”
- 3) enviar un correo electrónico a rmars@uabc.edu.mx, solicitando anuencia y dando aviso de qué datos se van a utilizar y cuál es el propósito de su uso.

Lo anterior no otorga derecho o licencia alguna, respecto a la información utilizada.

Para cualquier otro asunto relacionado, contactar a rmars@uabc.edu.mx.

D.R. © Castro Flores, Veronica. Tesista.

D.R. © Mares Alejandre, Rosa Elena. Directora de tesis.

D.R. © Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Unidad Académica de la UABC.

D.R. © Universidad Autónoma de Baja California. Institución de Educación Superior.

©2018.

Tesis: Análisis funcional de la actividad disulfuro oxidasa de la proteína *DsbA* de *Mycobacterium tuberculosis* mediante complementación de la mutante *DsbA* de *Escherichia coli*

Grado: Licenciatura, Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo

Institución: Universidad Autónoma de Baja California

Sustentante: Veronica Castro Flores

Fecha: Mayo de 2017

El presente proyecto de investigación fue realizado en el **Laboratorio de Biotecnología** de la **Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC**, bajo la dirección de la **Dra. Rosa Elena Mares Alejandro**, y la asesoría del **Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra**, con el financiamiento del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**: Fondo Sectorial SEP-CONACYT para **Investigación en Ciencia Básica** (apoyo 155714) y Fondo Sectorial SSA/IMSS/ISSSTE para **Investigación en Salud** (apoyo 161544), otorgados al Dr. Ramos Ibarra.

Los resultados correspondientes fueron presentados en el **5to. Encuentro Estatal de Jóvenes Investigadores en Baja California**, realizado en el BIT Center de Tijuana, Baja California, los días 28 y 29 de septiembre de 2017. La participación en el evento académico fue apoyada por la Dirección de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC.

Tesis: Análisis funcional de la actividad disulfuro oxidasa de la proteína *DsbA* de *Mycobacterium tuberculosis* mediante complementación de la mutante *DsbA* de *Escherichia coli*

Grado: Licenciatura, Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo

Institución: Universidad Autónoma de Baja California

Sustentante: Veronica Castro Flores

Fecha: Mayo de 2018

El presente **Manuscrito de Tesis** fue **Revisado y Aprobado** por un **Comité Académico**, conformado por los profesores:

Marco Antonio Ramos Ibarra, Dr. (Presidente)
Patricia Lilián Muñoz Muñoz, Dra. (Secretaria)
Pablo Alfonso Madero Ayala, QFB (Sinodal)
Rosa Elena Mares Alejandre, Dra. (Suplente)
Samuel Guillermo Meléndez López, Dr. (Suplente)

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

-Henry Ford

Agradecimientos

Ahora que he terminado esta etapa tan bonita y difícil para mí, quiero agradecer a algunas personas destacables que estuvieron conmigo en cada paso que daba para lograr este proyecto; que si bien, yo no creía ser capaz de lograrlo; ellos de alguna forma estuvieron ahí guiándome, apoyándome y echándome porras en cada momento en el que necesitaba un empujoncito para seguir adelante. Recordándoles que una parte de esta tesis le pertenece a cada uno de ustedes, porque sin su apoyo no creo que lo hubiera logrado.

Quiero comenzar por agradecerle principalmente a mi familia por todo su apoyo tanto económico como emocional, por aguantarme todas esas veces en las que querían salir, ver una película o jugar y yo siempre decía que no podía porque tenía que trabajar en mi tesis, tenía que leer o demás cosas. Gracias a mi mamá, por brindarme su apoyo permitiendo que realizara este documento sin importar todo lo que implicaba.

Gracias a la Dra. Mares y al Dr. Marco, porque a pesar de no ser la mejor estudiante me abrieron las puertas del laboratorio de biotec desde el servicio social, por ver en mi capacidad e impulsarme a lograr esta meta, transmitirme mucho conocimiento, enseñarme a ser una persona crítica, poner en práctica la palabra disciplina y sobre todo contagiarme ese amor por la investigación. Gracias por todos los consejos, llamadas de atención, bromas y cada uno de los momentos compartidos. Muchas gracias por sus consejos y apoyo a todo el equipo del laboratorio: Dra. Lilián, Dr. Samuel, Pablo, sobre todo a Alexis, quien, aunque al final casi no nos tocó compartir tiempo, fue quien se encargó de mi iniciación en el laboratorio además de guiarme en mis primeros meses y ver esas etapas de adaptación.

Le agradezco infinitamente a esta experiencia haberme topado con la convivencia de unas personas únicas en el mundo con quienes pasé muy buenas experiencias, de quienes aprendí también muchísimo y lo más importante, en quienes encontré una muy bonita y espero, muy duradera amistad, porque el laboratorio nunca hubiera sido lo mismo sin ellos, muchas gracias: Kat, Ana, Jess, Eliseo, Jorge. A mi “twin”, claro que no se me olvida: Celina. Porque a pesar de estudiar cuatro años en el mismo salón y de hablarnos de vez en cuando, nunca coincidimos tanto como el tiempo que trabajamos juntas en el laboratorio. Gracias por todas esas pláticas existenciales, esas bromas, esas “nadadas” y esos desayunos infinitos en los que creíamos que el doctor ya nos iba a correr por tardarnos tanto; en esencia, gracias por brindarme tu amistad sincera, tu apoyo y por siempre hacerme ver las cosas con una mejor perspectiva.

Y finalmente, Christopher, quien me mantenía despierta cuando tenía que enviar avances, quien desde el inicio me dijo que confiaba en mí, quien me hacía ver mis errores, quien se malpasaba cuando me esperaba a que saliera del laboratorio para ir a comer, y quien, cuando yo creía que no podría y quería correr en círculos, me decía que yo podía lograr todo siempre y cuando lo siguiera intentando, gracias por siempre ver lo mejor de mí.

Gracias a todas las personas que estuvieron al pendiente preguntándome: “¿Cómo vas con la tesis?”, a todo los que se presentaron este día tan importante y a quienes, aunque están lejos, de alguna forma siempre creyeron en mí.

A mi familia

Contenido

Agradecimientos	6
Contenido	8
Índice de Figuras y Tablas	10
Abreviaturas	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Tuberculosis y <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
1.1.1. Tuberculosis como problema de salud pública	12
1.1.2. <i>M. tuberculosis</i> : ciclo biológico y patogénesis	12
1.1.3. Diagnóstico y tratamiento de TB	14
1.2. Plegamiento y secreción de proteínas en procariotas	15
1.2.1. Plegamiento de proteínas	15
1.2.2. Maquinaria celular de plegamiento	16
1.2.3. Secreción de proteínas	17
1.3. Familia de proteínas Dsb en bacterias	18
1.3.1. Dsb en Gram-negativas	18
1.3.2. Dsb en Gram-positivas	19
1.4. La proteína DsbA de <i>M. tuberculosis</i>	19
1.4.1. Gen, proteína y función	19
1.4.2. Diana terapéutica	20
1.5. <i>E. coli</i> como modelo bacteriano	21
1.5.1. Genética y fisiología	21
1.5.2. Compartimientos subcelulares	21
1.5.3. Sistemas de expresión heteróloga	21
1.5.4. DsbA como plegasa del periplasma bacteriano	22
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
2.1. Hipótesis	23
2.2. Objetivo general	23
2.3. Objetivos específicos	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Reactivos biológicos y químicos	24
3.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos	24
3.1.2. Enzimas y anticuerpos	24
3.1.3. Estuches comerciales	24
3.2. Bacterias y medios de cultivo	24
3.3. Plásmidos	25

3.4. Equipo y programas computacionales	25
3.5. Protocolos generales	26
3.5.1. Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	26
3.5.2. Preparación de bacterias competentes	26
3.5.3. Transformación bacteriana.....	26
3.5.4. Mini-ensayo de expresión de proteínas	27
3.5.5. Electroforesis de proteínas en gel de SDS-poliacrilamida (<i>SDS-PAGE</i>)	27
3.5.6. Ensayo de inmuno-reconocimiento (<i>Western Blot</i>).....	27
3.6. Construcción del plásmido pBPelB-MtDsbA-Myc	28
3.6.1. Amplificación de PelB-MtDsbA-6xHis	28
3.6.2. Preparación del vector y el inserto	28
3.6.3. Ligación y obtención de pBPelB-MtDsbA-Myc	28
3.7. Ensayo de complementación funcional	29
3.7.1. Transformación de <i>E. coli</i> JCB571 y cultivos bacterianos.....	29
3.7.2. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina periplásmica	29
3.8. Tratamiento de datos y análisis estadístico	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1. Obtención de pBPelB-MtDsbA-Myc	32
4.2. Expresión de MtDsbA en <i>E. coli</i> JCB571	33
4.3. MtDsbA complementa la función disulfuro oxidasa de la mutante DsbA de <i>E. coli</i>	35
4.4. Recomendaciones adicionales para el estudio de la DsbA de <i>M. tuberculosis</i>	37
5. CONCLUSIONES	38
6. BIBLIOGRAFÍA	39

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1-1. Esquema del ciclo de vida de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13
Figura 1-2. Proceso de formación del granuloma tuberculoso.	14
Figura 1-3. Pirámide de éxito en el tratamiento de la tuberculosis.	15
Figura 1-4. Estados conformacionales y plegamiento de una proteína.	16
Figura 1-5. Modelo de exportación de proteínas en bacterias.	18
Figura 1-6. Estructura de la región extracelular de la proteína DsbA de <i>M. tuberculosis</i>	20
Figura 1-7. Modelo de ciclo catalítico propuesto para la formación de enlaces disulfuro asistido por MtDsbA y MtVKOR.....	20
Figura 4-1. Representación esquemática del diseño para la producción y localización de la proteína recombinante MtDsbA.	32
Figura 4-2. Representación esquemática de las características moleculares del inserto contenido en el plásmido pET22b(+)/MtDsbA.	32
Figura 4-3. Representación esquemática de la unidad de transcripción contenida en el plásmido pBPelB-BHX-Myc.....	32
Figura 4-4. Análisis de transformantes estables portadoras de pBPelB-MtDsbA-Myc mediante PCR de colonia.....	33
Figura 4-5. Representación esquemática del plásmido pBPelB-MtDsbA-Myc (3663 pb).....	34
Figura 4-6. Análisis de transformantes estables portadoras de plásmidos de complementación (+controles/testigos) mediante PCR de colonia.	34
Figura 4-7. Análisis de expresión proteica de las transformantes estables JCB571.	35
Figura 4-8. Análisis de la actividad disulfuro oxidasa de la MtDsbA mediante complementación funcional de <i>E. coli</i> JCB571 (mutante DsbA).....	36
Tabla 3-1. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en el estudio.	25

Abreviaturas

BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Albumina sérica bovina
dNTPs	Deoxirribonucleótidos trifosfatados
DO	Densidad óptica
EC	Extracelular
h, min, seg	Horas; minutos; segundos
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodalton
L, mL, μ L	Litro; mililitro; microlitro
LB	Luria-Bertani
ME	Membrana externa
MI	Membrana interna
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la salud
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RE	Retículo endoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
SSA	Secretaria de Salud
TB	Tuberculosis
Trx	Tiorredoxina

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tuberculosis y *Mycobacterium tuberculosis*

1.1.1. Tuberculosis como problema de salud pública

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa causada por una bacteria del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Actualmente, la TB prevalece como un importante problema de salud pública, ubicándose como una de las diez principales causas de mortalidad a nivel mundial. En su reporte del año 2016, la OMS estimó 10.4 millones de nuevos casos y reportó la identificación de más de 580 mil aislados clínicos resistentes a fármacos: alrededor de 480 mil multirresistentes (TB-MR) y un poco más de 100 mil resistentes a rifampicina (TB-RR). Desafortunadamente, la constante aparición de este tipo de cepas impide la reducción de los índices de morbilidad y mortalidad global¹.

En México, la TB es prevalente en todo el territorio nacional, siendo los estados de Baja California, Sonora y Nuevo León los que presentan mayores tasas de morbilidad y mortalidad. De acuerdo con las cifras oficiales del Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE, Secretaría de Salud, México), Baja California reportó las mayores tasas de morbilidad y mortalidad (por cada 100 mil habitantes): 57.9 (en 2016) y 7.1 (en 2015), respectivamente, confirmándose como el estado con mayor incidencia en el país².

1.1.2. *M. tuberculosis*: ciclo biológico y patogénesis

La TB es una enfermedad crónica que afecta de manera común a los pulmones y es causada primordialmente por la bacteria *M. tuberculosis* (bacilo Gram-positivo). La enfermedad puede desarrollar una fase latente, donde los pacientes infectados son asintomáticos. Sin embargo, cuando las defensas del sistema inmune disminuyen, la bacteria tiene la oportunidad de propagarse y es entonces cuando el paciente evoluciona hacia la fase activa. Algunos de los principales síntomas de la enfermedad son: tos intensa, con sangre o esputo, debilidad, fatiga, escalofríos, fiebre, y sudores nocturnos [NOM-006-SSA2-2013].

La patogénesis de la tuberculosis pulmonar se desarrolla en 4 etapas (Figura 1-1): la primera inicia cuando las micobacterias infectan al huésped, principalmente por la inhalación de micropartículas cargadas del patógeno, instalándose a lo largo de las vías respiratorias. La mayoría

¹ WHO, World Health Organization. Global tuberculosis report 2016, http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.

² CENAPRECE, http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/tuberculosis/cifras_oficiales.html.

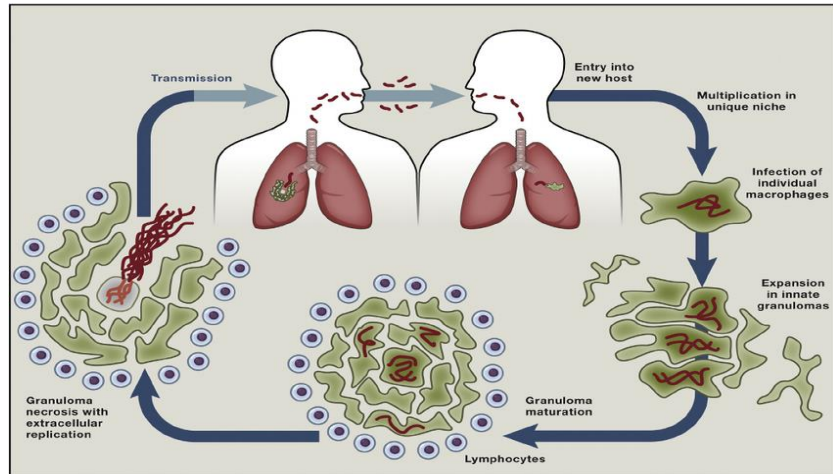


Figura 1-1. Esquema del ciclo de vida de *Mycobacterium tuberculosis*.

Imagen tomada de Cambier (2014). Los bacilos tuberculosos al entrar al organismo inician infectando macrófagos y expandiéndose por medio de granulomas; una vez conseguido cierto nivel de maduración y que se presentan las condiciones adecuadas, comienzan el proceso de replicación de forma extracelular; expandiéndose así cada vez más, logrando transmitirse a otros hospederos por medio de micropartículas expulsadas vía oral al toser, estornudar o incluso hablar.

de los bacilos quedan atrapados en las vías aéreas superiores, donde se encuentran las células caliciformes (encargadas de secretar moco y de remover cualquier partícula adherida sobre su superficie), siendo este el primer mecanismo de defensa [Knechel, 2009]. De sobrevivir a este, las micobacterias se propagan hasta los alvéolos pulmonares, donde frecuentemente son eliminadas por los macrófagos alveolares. Pero si logran resistir al ataque intracelular, se multiplican y alteran la fisiología del macrófago [Crevel *et al.*, 2002]. También se cree que es posible que las micobacterias sean fagocitadas por neumocitos alveolares epiteliales, los cuales se encuentran en mayor proporción que los macrófagos [Smith, 2003].

En la segunda etapa, monocitos y otras células inflamatorias circulantes son atraídos hacia el pulmón, donde los monocitos se diferencian en macrófagos y fagocitan a las micobacterias sin eliminarlas. Contrariamente, las micobacterias se duplican y esos macrófagos (derivados de la sangre, recientemente infectados) se acumulan, produciendo cierto daño tisular [Crevel *et al.*, 2002]. La infección normalmente se concentra en el pulmón, formando granulomas (Figura 1-2), donde los macrófagos activados y demás células rodean el sitio de la infección para intentar limitar el daño tisular y así restringir la diseminación bacteriana [Forrellad *et al.*, 2013].

Aproximadamente tres semanas posteriores a la infección, las células T comienzan a actuar. Particularmente, los linfocitos T específicos del antígeno llegan y proliferan dentro de las primeras lesiones, o tubérculos, y a la vez activan a los macrófagos para destruir las micobacterias (que se

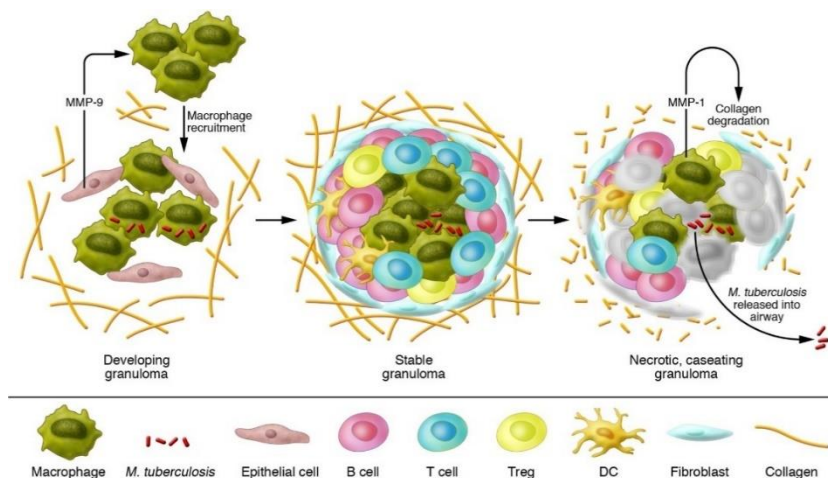


Figura 1-2. Proceso de formación del granuloma tuberculoso.

Imagen tomada de Salgame (2011).

encuentran de forma intracelular), deteniendo el crecimiento de los bacilos. Este proceso es considerado como la tercera etapa [Crevel *et al.*, 2002]. Como resultado final, dentro del granuloma derivado, algunos bacilos permanecen latentes, los cuales pueden persistir en ese estado durante décadas, sin originar enfermedad clínica (esto es, como TB latente). Sin embargo, ante cualquier condición de inmunodepresión, las micobacterias en estado latente pueden activarse, replicarse y extenderse, tanto al pulmón como a otros tejidos [Forrellad *et al.*, 2013].

1.1.3. Diagnóstico y tratamiento de TB

En adultos, la baciloscopia permanece como la técnica de elección para el diagnóstico rápido de *M. tuberculosis*, ya que es simple y económica. Por otro lado, el esputo es el espécimen clínico considerado como la primera elección para el diagnóstico de TB pulmonar. Para la TB extrapulmonar, el tipo de espécimen depende del tejido o fluido donde se sospecha la infección y, regularmente, requiere de procedimientos invasivos [Schito *et al.*, 2015]. Para aumentar la sensibilidad del diagnóstica de TB, habitualmente la baciloscopia se acompaña de un cultivo, el cual permite la caracterización molecular y bioquímica de la micobacteriana.

De manera adicional, algunas técnicas de imagen de tórax se utilizan para valorar el grado de la enfermedad; p. ej. la radiografía (más común) o la radio-imagen digital (más moderna). A futuro, se prevén otras opciones, tales como la resonancia magnética nuclear, la tomografía computarizada, y la tomografía por emisión de positrones [Schito *et al.*, 2015].

En el año 2010, la OMS convocó a un grupo de expertos para evaluar la eficacia del ensayo conocido como “*Xpert MTB/RIF*”. Los resultados obtenidos indicaron mayor sensibilidad que la baciloscopia (23% mayor para casos positivos) y, como beneficio adicional, la posibilidad de detectar resistencia a rifampicina. Por lo tanto, se recomendó como método seguro y eficaz para diagnóstico de TB [WHO, 2013].

La Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013, para la Prevención y Control de la Tuberculosis, indica el esquema de primera línea recomendado para casos nuevos, que consiste en la administración de 4 de antibióticos (Figura 1-3): isoniazida, rifampicina, pirazinamida, y etambutol, durante un período de 6 meses. Además, para casos de abandono del tratamiento, recaída o reconquista, sugiere reestablecer los fármacos de la primera línea e incluir a estreptomicina, durante un periodo de 8 meses. Por otro lado, en caso de fracaso al tratamiento o retratamiento, recomienda un esquema mixto con fármacos de primera y segunda línea, ajustado a las necesidades del paciente, durante un período de 24 meses.

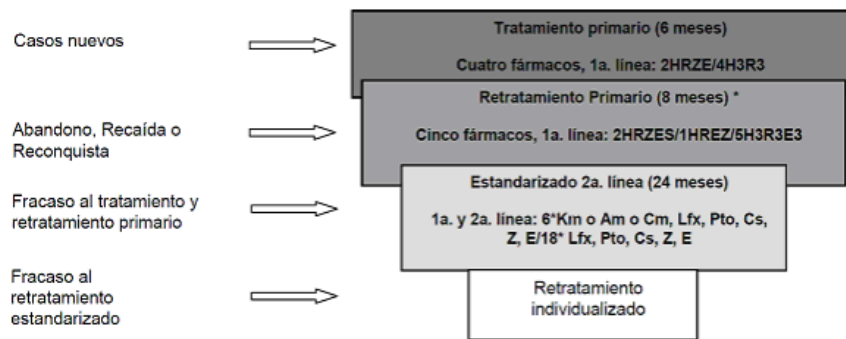


Figura 1-3. Pirámide de éxito en el tratamiento de la tuberculosis.

Imagen tomada de la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013, Para la prevención y control de la tuberculosis (<http://dof.gob.mx>). DOF: 13/11/2013.

1.2. Plegamiento y secreción de proteínas en procariontas

1.2.1. Plegamiento de proteínas

La estructura terciaria de una proteína está determinada por la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, la estructura nativa y funcional está definida por su conformación espacial (Figura 1-4). Diversos estudios sobre estabilidad y renaturalización sugieren que el plegamiento de una proteína es dirigido en gran medida por los residuos que la conforman; es decir, por más conformaciones

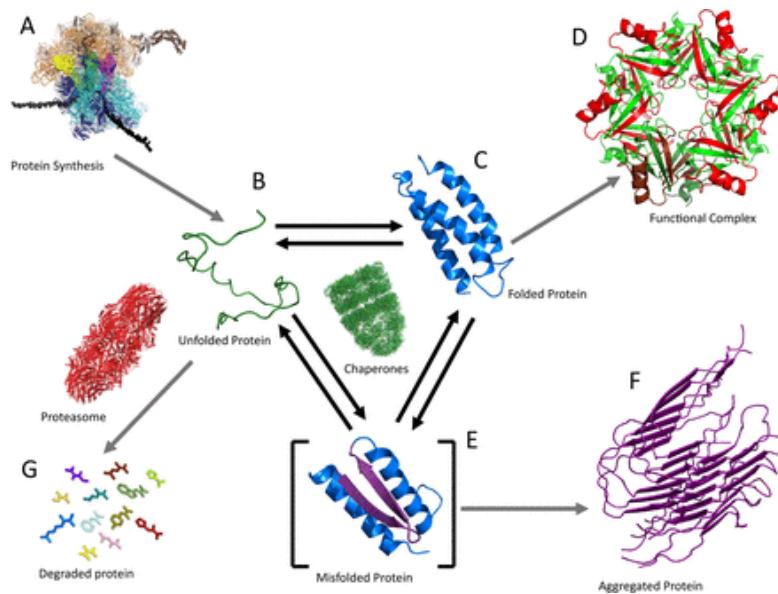


Figura 1-4. Estados conformacionales y plegamiento de una proteína.

Imagen tomada de Munoz (2016). Cuando una proteína se sintetiza en el ribosoma, la cadena nascente se mantiene típicamente unida a chaperonas moleculares, que mantienen su estado desplegado hasta que el proceso se completa y la cadena se libera (A). Después, la proteína se pliega de manera autónoma y reversible (repetidamente), estableciendo un equilibrio entre los estados desplegado (B) y plegado (C). Este equilibrio conformacional es determinado por la función de la proteína, sea como monómero o como complejo macromolecular (D). El tiempo de vida media de la función biológica es también controlado por ese equilibrio, donde el estado desplegado es eliminado por una maquinaria especializada, p. ej., proteasoma (G). De igual manera, la formación transitoria de conformaciones parcialmente plegadas puede conducir a eventos de plegamiento aberrante (E), los que a su vez pueden conducir a la formación de agregados proteicos tóxicos, p. ej., amiloides (F).

aleatorias o casuales que se puedan adquirir, existen vías de plegamiento definidas que conducen a la proteína hacia su conformación nativa [Voet *et al.*, 2016].

La conformación de una proteína puede ser favorecida por las condiciones ambientales circundantes; ya que le ayudan a mantener una estructura termodinámicamente estable (nativa). Además, se piensa que las proteínas nativas poseen núcleos hidrofóbicos compactos, por lo que es probable que aporten la fuerza impulsora para su plegamiento. Por otro lado, la formación de enlaces disulfuro estabiliza la conformación nativa. Con esto, una proteína que es incapaz de mantener su conformación nativa se le denomina desnaturalizada [Nelson & Cox, 2015; Voet *et al.*, 2016].

1.2.2. Maquinaria celular de plegamiento

In vivo, el plegamiento de proteínas requiere de un mecanismo rápido y eficiente que no demande un gasto de energía excesivo. Para esto, las células contienen una maquinaria altamente

especializada de proteínas «chaperonas» que aumentan la probabilidad de que un polipéptido adquiriera su estructura nativa, principalmente mediante unión a polipéptidos no plegados, parcialmente plegados, o incorrectamente plegados, impidiendo su aglomeración y favoreciendo su correcto plegamiento [Watson *et al.*, 2014]. Para su estudio, las proteínas chaperonas se han clasificado en dos familias:

- (1) Chaperonas moleculares, una familia muy amplia y diversa, que se unen a sus clientes polipeptídicos (en estados estructurales no nativos e inestables) y asisten el plegamiento de una manera dependiente de energía. En procariontes y eucariotes, la subfamilia de proteínas de respuesta a choque térmico (Hsp) es la más estudiada (p. ej., DnaK/Hsp70 y GroE/Hsp60).
- (2) Plegasas (enzimas del plegamiento), que catalizan modificaciones post-traduccionales de polipéptidos, tal como la formación y rearreglo de enlaces disulfuro (p. ej., PDI en eucariotes y Dsb en procariontes) o la isomerización cis/trans de residuos de prolina (p. ej., PPI en eucariotes y SurA en procariontes).

1.2.3. Secreción de proteínas

En células eucariotas, la secreción de proteínas inicia a nivel de la síntesis en el ribosoma. Cuando los primeros 20-30 residuos del extremo N-terminal (péptido señal) emergen, la partícula de reconocimiento de la señal (SRP) se une al polipéptido nascente, mediante interacciones hidrofóbicas, y arresta la elongación. Enseguida, la SRP dirige al complejo ribosoma-polipéptido hacia el retículo endoplásmico (RE) y, mediante interacción con su receptor (SRPR), transfiere el polipéptido nascente al complejo de translocación del RE. Inmediatamente, la SRP se disocia por completo y la síntesis del polipéptido se reanuda, favoreciendo su importación hacia el lumen del RE. Una vez dentro, el polipéptido es plegado y, simultáneamente, puede ser sujeto de diferentes modificaciones post-traduccionales (p. ej., formación y rearreglo de enlaces disulfuro, isomerización cis/trans de residuos de prolina, o glicosilación de residuos de asparagina) como parte del proceso de maduración. Posteriormente, la proteína correctamente plegada es transportada hacia al complejo de Golgi, a través de un sistema especializado de vesículas, donde experimenta modificaciones adicionales que definen su destino final [Nelson & Cox, 2005].

En células procariontes (p. ej. *Escherichia coli*), el mecanismo de secreción mejor conocido es mediado por las proteínas Sec (Figura 1-5). Después de la traducción, los polipéptidos sufren un plegamiento lento, ya que su N-terminal se los impide. A este nivel, la chaperona SecB se une a la secuencia señal (N-terminal) y transporta al polipéptido hacia la membrana citoplásmica, donde interacciona con SecA (una proteína asociada a la superficie interna de la membrana que actúa como

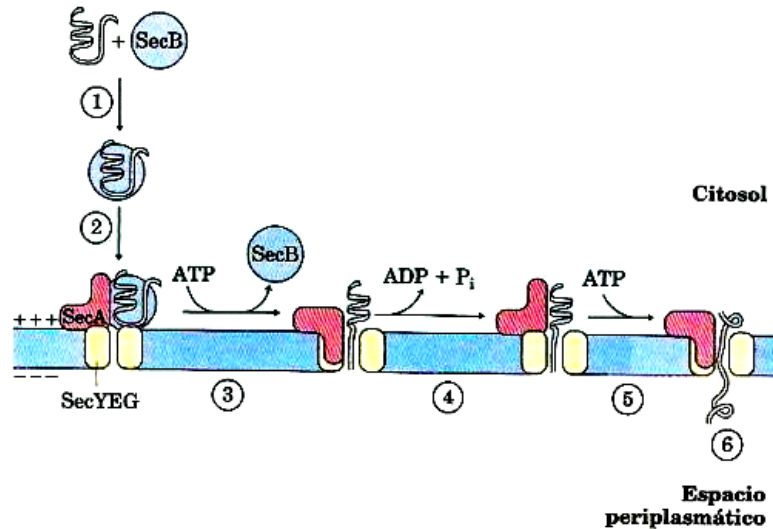


Figura 1-5. Modelo de exportación de proteínas en bacterias.

Imagen tomada de Nelson y Cox (2005).

receptor y ATPasa de translocación) y libera al polipéptido. Enseguida, el complejo de translocación de membrana SecY/E/G facilita su exportación del citosol [Nelson & Cox, 2005].

En bacterias Gram-negativas, las proteínas secretadas maduran en el compartimiento periplásmico (con asistencia del medio ambiente oxidante y la participación de diferentes chaperonas); en cambio, en bacterias Gram-positivas (que carecen de tal compartimento), las proteínas secretadas maduran en un ambiente no regulado, circundado por la pared celular [Daniels *et al.*, 2010].

1.3. Familia de proteínas Dsb en bacterias

1.3.1. Dsb en Gram-negativas

En bacterias Gram-negativas, algunas proteínas secretadas requieren de la formación correcta de enlaces disulfuro para adoptar una conformación apropiada (nativa y estable). En el citosol, esas proteínas se encuentran de forma reducida (susceptibles a degradación); sin embargo, después de su translocación al interior del periplasma, el ambiente oxidante y la intervención de la maquinaria de proteínas Dsb favorecen su plegamiento oxidativo [Lasica & Jagiszyn-Krynicka, 2007].

En *E. coli*, la plegasa periplásmica DsbA contribuye en la formación de enlaces disulfuro (oxidación) de polipéptidos recién translocados; por su parte, la plegasa periplásmica DsbC es responsable de rearrreglar los enlaces disulfuros formados de manera incorrecta (isomerasa), por el

ambiente oxidante o por error de DsbA. El correcto funcionamiento de DsbA y DsbC es asegurado por las proteínas de membrana DsbB y DsbD, respectivamente: DsbB reoxida a DsbA, mientras que DsbD mantiene reducida a DsbC [Bocian-Ostrzycka *et al.*, 2017].

Aunque se demostró que las proteínas Dsb no son importantes para el crecimiento bacteriano, se comprobó que son esenciales para la patogénesis de *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Yersinia pestis*, *Bordetella pertussis*, y *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales secretan factores de virulencia que contienen enlaces disulfuro [Daniels *et al.*, 2010]. Inclusive, se reportó que la proteína ortóloga a DsbA es requerida para el plegamiento apropiado de proteínas del pili y toxinas, entre otras [Reardon-Robinson & Ton-That, 2016].

1.3.2. Dsb en Gram-positivas

En bacterias Gram-positivas, el mecanismo de plegamiento oxidativo de proteínas no se ha estudiado con tanta amplitud, principalmente por la ausencia de un compartimento funcionalmente equivalente al periplasma [Daniels *et al.*, 2010; Reardon-Robinson *et al.*, 2016]. Sin embargo, se piensa que las proteínas secretadas se asocian a la pared celular o se liberan al ambiente extracelular [Goulding *et al.*, 2003].

En la bacteria *M. tuberculosis* existen dos sistemas distintos de proteínas Dsb: uno formado por dos proteínas periféricas (MtDsbE y MtDsbF) y una transmembranal (MtDsbD), y otro compuesto por una proteína de membrana (MtVKOR, parecida a un vitamina K epóxido reductasa) y una proteína integral (MtDsbA, homóloga de proteínas DsbA) [Chim *et al.*, 2013].

1.4. La proteína DsbA de *M. tuberculosis*

1.4.1. Gen, proteína y función

El gen Rv2969c de *M. tuberculosis* codifica para un polipéptido, de 255 residuos de aminoácidos, con alta homología a proteínas DsbA. Los primeros estudios de localización confirmaron que MtDsbA corresponde a una proteína anclada a la membrana bacteriana. Además, se ha propuesto como diana terapéutica para el desarrollo de una clase nueva de fármacos anti-tuberculosis [Patarroyo *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013].

El análisis de la secuencia primaria predice un péptido señal en el extremo N-terminal (primeros 19 residuos), que le facilita su translación hacia la membrana citoplásmica, seguido de un paso transmembrana (residuos 20-42), que le permite anclarse a la membrana bacteriana, y una región extracelular (EC) en el extremo C-terminal (residuos 43-255), que contiene un dominio a tiorredoxina (con su respectivo motivo catalítico CPAC, residuos 89-92) [Chim *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013].

La estructura de la región EC ya fue resuelta (Figura 1-6) y se subdivide en dos dominios: tiorredoxina (azul) y α -helicoidal (rosa) [Wang *et al.*, 2013].

El modelo propuesto para la función fisiológica de MtDsbA se muestra en la Figura 1-7. Inicialmente, MtDsbA_{OX} «oxidada» reacciona con el sustrato reducido (A), formando un enlace disulfuro MtDsbA-sustrato intermediario (B); esta reacción es rápida y la unión se resuelve mediante un ataque hidrolítico: tiol libre del sustrato hacia el enlace intermediario, rindiendo el sustrato oxidado y MtDsbA_{RED} «reducida» (C); finalmente, MtDsbA_{RED} es reoxidada por acción de MtVKOR (D) [Luong *et al.*, 2017; Premkumar *et al.*, 2013].

1.4.2. Diana terapéutica

La caracterización de los factores moleculares que intervienen en los procesos celulares de plegamiento oxidativo de proteínas representa la primera fase para la investigación de posibles dianas terapéuticas. De manera específica, el estudio de la relación estructura-función de chaperonas bacterianas es esencial para la búsqueda y desarrollo de nuevos antibióticos dirigidos a controlar infecciones de interés biomédico.

Mediante una predicción, se estimó que aproximadamente el 60% de las proteínas secretadas por *M. tuberculosis* poseen enlaces disulfuro y participan en diversas funciones celulares, incluyendo virulencia y mantenimiento de la pared celular, que le permiten sobrevivir a

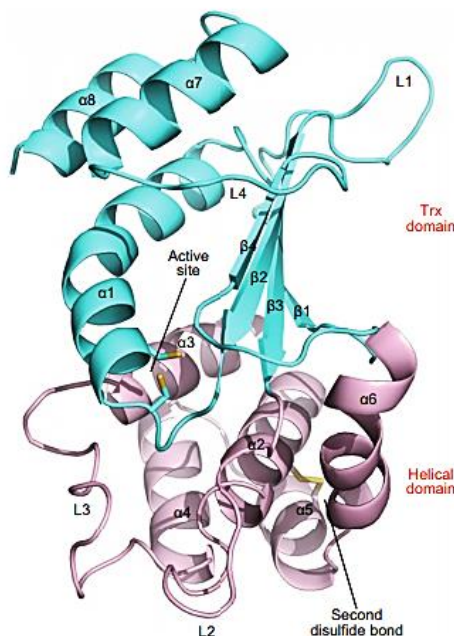


Figura 1-6. Estructura de la región extracelular de la proteína DsbA de *M. tuberculosis*.

Imagen tomada de Wang (2013).

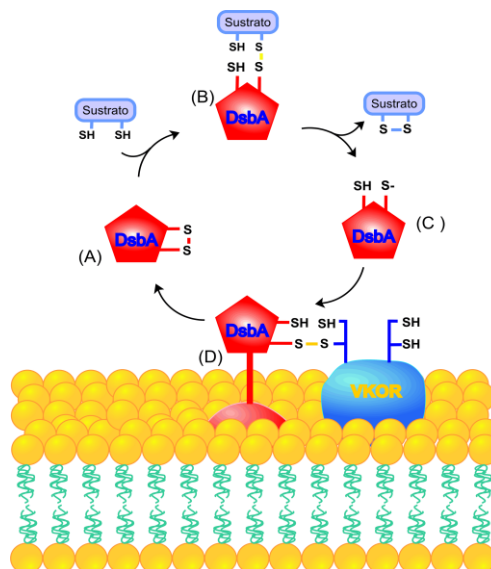


Figura 1-7. Modelo de ciclo catalítico propuesto para la formación de enlaces disulfuro asistido por MtDsbA y MtVKOR.

las condiciones adversas del ambiente intracelular propiciado por la célula hospedera; por lo tanto, es factible suponer que dependen de un plegamiento oxidativo correcto, el cual es asistido o facilitado por plegasas (p. ej., oxidorreductasas Dsb) [Chim *et al.*, 2013; Goulding *et al.*, 2003; Premkumar *et al.*, 2013].

En consideración al papel funcional de las proteínas DsbA, y los estudios *in vitro* reportados a la fecha, se propone que la caracterización bioquímica *in vivo* de la plegasa MtDsbA rendirá conocimientos básicos que servirán como plataforma para el diseño o desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la tuberculosis.

1.5. *E. coli* como modelo bacteriano

1.5.1. Genética y fisiología

La bacteria *E. coli* es extensamente utilizada como organismo modelo en muchos protocolos de investigación. Es un bacilo Gram-negativo, aerobio facultativo y termófilo, que habita el intestino de mamíferos. Por otro lado, la secuenciación de su genoma reveló una gran diversidad genética y una amplia asociación fenotípica, lo que facilita su manipulación en ambos niveles celulares [Blount, 2015].

1.5.2. Compartimientos subcelulares

Al igual que otras bacterias Gram-negativas, *E. coli* posee dos barreras celulares: la membrana interna (MI), que se encuentra en contacto directo con el citoplasma; y la membrana externa (ME), que constituye la interfase entre el ambiente intracelular y el medio extracelular.

Además del citoplasma, *E. coli* contiene otro compartimiento subcelular: el periplasma, espacio ubicado entre las dos membranas (MI y ME). Alrededor de 400 proteínas son dirigidas hacia el periplasma con la intención de facilitar diversas funciones fisiológicas, p. ej., el plegamiento proteico. Además, su ambiente oxidante y la presencia de oxidorreductasas periplásmicas, favorece la formación y rearreglo de enlaces disulfuros en polipéptidos residentes o en tránsito hacia el medio extracelular [Arts *et al.*, 2015].

1.5.3. Sistemas de expresión heteróloga

El desarrollo de la ingeniería genética, y los avances biotecnológicos asociados, han promovido la generación de diversos protocolos de producción recombinante de proteínas empleando sistemas de expresión heteróloga de fácil cultivo, rápido crecimiento y alta producción (p. ej., bacteria y levadura). Por sus características genéticas, bioquímicas y fisiológicas, *E. coli* representa un sistema

idóneo para la producción recombinante de proteínas [Merck, 2018]. Además, el conocimiento de la regulación genética y metabolismo de lactosa (operon *lac*) ofrece la ventaja técnica de un sistema de expresión inducible; esto es, usando plásmidos recombinantes portadores del gen de interés bajo el control del promotor del operón de lactosa (PLac) es factible promover la sobreexpresión de proteínas usando análogos de lactosa (p. ej., IPTG) [Blount, 2015].

1.5.4. DsbA como plegasa del periplasma bacteriano

La oxidorreductasa periplásmica DsbA es la plegasa con mayor capacidad oxidante en el periplasma de *E. coli*. De manera interesante, las mutaciones DsbA de *E. coli* (EcDsbA) causan efectos pleiotrópicos en la formación correcta de enlaces disulfuro de diferentes sustratos, tales como disminución de la motilidad celular, reducción de la actividad de la fosfatasa alcalina periplásmica, y sensibilidad al agente reductor ditioneitol (DTT) [Rietsch *et al.*, 1996]. Esta linealidad genotipo→fenotipo se ha utilizado ampliamente para valorar la funcionalidad de proteínas homólogas, sugiriendo que las funciones oxidorreductoras de la plegasa DsbA se conservan en diferentes organismos [Jonda *et al.*, 1999].

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

MtDsbA es una plegasa con actividad disulfuro oxidasa capaz de complementar la mutación DsbA en *E. coli* y reestablecer la actividad de la fosfatasa alcalina periplásmica.

2.2. Objetivo general

Evaluar la actividad disulfuro oxidasa de la plegasa DsbA de *M. tuberculosis* (MtDsbA) mediante un ensayo de complementación funcional de la mutación DsbA en *E. coli* y determinación de la actividad de fosfatasa alcalina periplásmica.

2.3. Objetivos específicos

1. Obtener el plásmido pBPelB-MtDsbA-Myc, que expresa la proteína recombinante etiquetada con un epítotope c-Myc bajo el control del promotor PLac y la localización hacia el periplasma bacteriano, mediante técnicas típicas de clonación molecular.
2. Detectar la expresión de MtDsbA recombinante en *E. coli* JCB571 portadora del plásmido pBPelB-MtDsbA-Myc mediante inmuno-reconocimiento en lisados bacterianos totales.
3. Determinar la actividad disulfuro oxidasa de MtDsbA mediante un ensayo de complementación funcional de *E. coli* JCB571 y evaluación de la actividad de fosfatasa alcalina periplásmica.
4. Valorar el papel operacional de la actividad disulfuro oxidasa de la proteína DsbA de *M. tuberculosis*, mediante un análisis comparativo simple con su homóloga de *E. coli*, durante el replegamiento oxidativo *in vivo* de una enzima dependiente de DsbA.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos biológicos y químicos

3.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos

Amresco: cloruro de sodio (NaCl). *Becton Dickinson*: agar bacteriológico, extracto de levadura, triptona. *Biorad*: agarosa, acrilamida/bis-acrilamida (solución al 30 %), azul brillante de *Coomassie*. *IBI Scientific*: Tris (tris[hidroximetil]aminometano). *Nestlé*: leche en polvo (*Svelty*TM). *New England Biolabs*: solución 10 mM de deoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), amortiguador NEB2 (10X), albúmina sérica bovina (BSA 100X) a 10 mg/mL. *Productos Químicos Monterrey*: cloruro de calcio (CaCl₂). *Shelton Scientific*: glicerol. *Sigma*: ampicilina, 2-mercaptoetanol, bromuro de etidio (BrEt), dimetilsulfóxido (DMSO), dodecil sulfato de sodio (SDS), kanamicina, isopropanol, tetraciclina, Tween-20.

3.1.2. Enzimas y anticuerpos

Agilent: polimerasa de ADN de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu* ADN-pol) y su solución amortiguadora (10X). *New England Biolabs*: endonucleasas: XbaI y XhoI, ligasa de ADN del bacteriófago T4 (T4 ADN-ligasa) y su solución amortiguadora (10X). *Qiagen*: solución maestra 2X *Taq Mix*. *Rockland*: anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra IgG de ratón y acoplado a fosfatasa alcalina (AP/anti-IgG). *Sigma*: anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra c-Myc (anti-Myc).

3.1.3. Estuches comerciales

Los fragmentos de digestión de ADN y los productos de *PCR* se purificaron con el estuche *QIAquick PCR Purification Kit*, los fragmentos de ADN se extrajeron a partir de gel de agarosa con el estuche *QIAquick Gel Extraction Kit*, el ADN plasmídico se purificó con el estuche *QIAprep Spin MiniPrep Kit*; todos de *Qiagen*. Las reacciones de inmuno-reconocimiento (*Western Blot*) se revelaron con el estuche *AP Conjugate Substrate Kit* de *Biorad*.

3.2. Bacterias y medios de cultivo

Las cepas de *E. coli* utilizadas en el presente proyecto se enlistan en la Tabla 3-1. ER2738, como hospedera en los protocolos típicos de clonación molecular; y JCB570 y JCB571, como hospederas en los procedimientos de expresión proteica y complementación funcional.

Tabla 3-1. Cepas de *E. coli* utilizadas en el estudio.

Cepa	Genotipo	Nomenclatura	Fuente
ER2738	<i>F' proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 zcf::Tn10(Tet^R)/fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5</i>	silvestre: <i>dsbA</i> ⁺	New England Biolabs
JCB570	<i>araD139 Δ(araABC-leu)7679 galU galK Δ(lac)X74 rpsL thi phoR zih-12::Tn10(Tet^R)</i>	silvestre: <i>dsbA</i> ⁺	Bardwell, 1991
JCB571	JCB570 <i>dsbA::kan</i>	mutante: <i>dsbA</i> ⁻	Bardwell, 1991

Las células bacterianas se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) líquido (1% de triptona; 0.5% de extracto de levadura; 1% de NaCl) o sólido (LB líquido + 1.7% de agar bacteriológico). Los medios LB se suplementaron con los antibióticos ampicilina (0.15 mg/mL), tetraciclina (0.015 mg/mL), o kanamicina (0.025 mg/mL), de acuerdo con la selectividad requerida en cada experimento. Las bacterias transformadas por choque térmico se recuperaron en medio 2X YT (1.6% de triptona; 1% de extracto de levadura; 0.5% de NaCl) [Sambrook *et al.*, 2001].

3.3. Plásmidos

El plásmido recombinante pET22b(+)/MtDsbA, derivado del vector comercial pET22b(+) (*Novagen*), contiene la secuencia codificante para la región EC de MtDsbA, en fase con las secuencias PelB (N-terminal) y 6xHis (C-terminal), bajo el control del promotor de la polimerasa de ARN del bacteriófago T7 (T7 ARN-pol) [Madero Ayala, 2016]. El plásmido recombinante pBPelB-BHX-Myc, derivado del vector comercial pBluescript SK(-) (pBSSK(-); *Stratagene*), contiene las secuencias de reconocimiento para las endonucleasas BamHI-HindIII-XhoI, ubicadas entre la secuencia señal PelB (N-terminal) y la etiqueta molecular c-Myc (C-terminal), bajo el control del promotor PLac [Ramos MA, comunicación personal]. El plásmido recombinante pBEcDsbA contiene la secuencia codificante para la proteína completa DsbA de *E. coli*, insertada en los sitios XbaI y HindIII del plásmido comercial pBSSK(-), bajo el control del promotor PLac [Mares RE y Ramos MA, comunicación personal]. Todos los plásmidos se obtuvieron de la reserva de reactivos biológicos del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería (UABC).

3.4. Equipo y programas computacionales

Las amplificaciones (PCR) se realizaron en un termociclador *Gradient Thermal Cycler Multigene* (Labnet International, Inc.). Los fragmentos de ADN, separados mediante electroforesis en gel de agarosa y teñidos con BrEt, se visualizaron y documentaron en un fotodocumentador *Gel*

Doc™ EZ Imager (Biorad). Las células bacterianas se cultivaron en una incubadora de temperatura y agitación controlada *Incubator Shaker Series 25 (New Brunswick Scientific Co.)*. Las incubaciones en microtubo se realizaron en un termobloque *Digital Dry Block Heater (VWR)*. Las fracciones celulares se obtuvieron usando las microcentrífugas *Biofuge Fresco (Heraeus)* y *MiniSpin Plus (Eppendorf)*. Los lisados bacterianos se realizaron en un homogenizador *Disruptor Genie (Scientific Industries Inc.)*. Las lecturas y registros colorimétricos en microplaca se realizaron en el espectrofotómetro *Microplate Reader 680 (Biorad)*. Los plásmidos fueron construidos *in silico* usando programas computacionales del dominio público: *Serial Cloner* (<http://serialbasics.free.fr>) y *SnapGene® Viewer* (<http://www.snapgene.com>).

3.5. Protocolos generales

3.5.1. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Los fragmentos de ADN se separaron, de acuerdo con su talla molecular, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las muestras se prepararon mezclando 10 partes de la solución de ADN con 1 parte de solución amortiguadora de carga (10X: 0.25% de azul de bromofenol; 0.25% de azul de xilencianol; 30% de glicerol): enseguida, se cargaron en gel de agarosa (sumergido en solución amortiguadora 1X TAE) suplementado con BrEt (en 1X TAE). La separación electroforética se realizó a 100 volts (30-45 min). Una vez concluida, el gel se analizó en fotodocumentador.

3.5.2. Preparación de bacterias competentes

Las células bacterianas competentes se prepararon de acuerdo con el protocolo estándar del laboratorio [Sambrook *et al.*, 2001], siempre manteniendo al máximo las condiciones estériles y de baja temperatura (4-10 °C). La pastilla bacteriana de 1 mL de cultivo ($DO_{650} = 0.5 \pm 0.1$) se obtuvo mediante centrifugación (12,000 rpm; 2 min). Después de dos lavados, el primero con 0.5 mL de agua destilada y el segundo con 0.5 mL de $CaCl_2$ a 100 mM «ambos favorecidos por resuspensión manual, incubación en hielo (5 min), y centrifugación fría (5,000 rpm; 5 min; 10 °C)», la pastilla bacteriana se resuspendió en 0.1 mL de $CaCl_2$ a 100 mM y se incubó en hielo (5 min).

3.5.3. Transformación bacteriana

La muestra de ADN (2 µL: ligación o plásmido) se agregó al microtubo conteniendo 0.1 mL de la suspensión de bacterias competentes. Después de 30 min de incubación en hielo, la mezcla bacteria/ADN se sometió a un protocolo típico de choque térmico: 1.5 min a 42 °C seguidos de 5 min en hielo. De manera inmediata, las bacterias se recuperaron en medio 2X YT (1 mL) mediante

incubación a 37 °C durante 1 h. Las transformantes estables se seleccionaron en LB suplementado con el(los) antibiótico(s) apropiado(s), mediante crecimiento a 37 °C durante 14-16 h.

3.5.4. Mini-ensayo de expresión de proteínas

La expresión proteica se llevó a cabo usando subcultivos de las bacterias que portan el plásmido de interés. Un cultivo joven (2 mL; LB líquido suplementado con antibióticos de selección) se obtuvo mediante proliferación a 37 °C (12-14 h; 300 rpm). Al día siguiente, se preparó el subcultivo a mini-escala (3 mL) mediante dilución 1:100 en medio selectivo. La etapa de pre-inducción se realizó durante 2 h de cultivo (37 °C; 300 rpm). Enseguida, la expresión proteica se estimuló con la adición del inductor (IPTG) a una concentración final de 0.5 mM. De manera adicional, la sobreexpresión se permitió durante 4 h de cultivo (37 °C; 300 rpm). La pastilla celular (1 mL) se obtuvo mediante centrifugación (12,000 rpm; 2 min) y se preservó en congelación hasta su uso.

3.5.5. Electroforesis de proteínas en gel de SDS-poliacrilamida (*SDS-PAGE*)

Las proteínas bacterianas se separaron, de acuerdo con su talla molecular, mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 13.5%. Las muestras de proteínas totales se prepararon de la siguiente manera: la pastilla celular se resuspendió en 0.1 mL de agua destilada y se mezcló con 0.1 mL de solución de carga 2X para *SDS-PAGE* en condiciones reductoras (10% de glicerol; 2.5% de SDS; 5% de 2-mercaptoetanol; 0.002% azul de bromofenol; 50 mM de Tris-HCl, pH 6.8). La lisis bacteriana se favoreció mediante disrupción celular a 3,000 rpm (5 min) y la desnaturalización irreversible de proteínas mediante incubación a 95-100 °C (10 min). Alícuotas de 10 µL se cargaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 13.5%. La separación electroforética procedió en 2 etapas: una a 80 volts, durante el paso de la muestra a través del gel concentrador (20-30 min), y otra a 120 volts, durante el paso de la muestra a través del gel separador (60-90 min). El gel se tiñó con solución AA-CBB (25% de isopropanol; 10% de ácido acético; 0.2% de azul brillante de *Coomassie*) durante 1-4 h y se destiñó con solución AA (10% de isopropanol; 10% de ácido acético) durante 12-18 h.

3.5.6. Ensayo de inmuno-reconocimiento (*Western Blot*)

El inmuno-reconocimiento de proteínas etiquetadas con c-Myc se realizó siguiendo un protocolo estándar de *Western Blot*. De manera inicial, las muestras proteicas se separaron mediante *SDS-PAGE*. Enseguida, las proteínas se electro-transferieron a una membrana de nitrocelulosa usando el sistema *Criterion™ Blotter* (*Biorad*) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Posteriormente, la membrana se bloqueó durante la noche (12-16 h) con una solución de leche *Svelty™* al 5% (en solución TBST: 0.1 M de Tris-HCl, pH 8.0; 0.15 M de NaCl; 0.05% de Tween-

20). De manera previa a cada reconocimiento, la membrana se lavó 3 veces (10 min cada vez) con la solución TBST. Cada reconocimiento se realizó durante 1 h. Primario: anticuerpo monoclonal anti-Myc (1:5,000 en TBST). Secundario: anticuerpo policlonal AP/anti-IgG (1:5,000 en TBST). Después de 3 lavados (tal como antes), el reconocimiento indirecto se reveló con un estuche comercial siguiendo las instrucciones del proveedor.

3.6. Construcción del plásmido pBPelB-MtDsbA-Myc

3.6.1. Amplificación de PelB-MtDsbA-6xHis

El fragmento PelB-MtDsbA-6xHis (correspondiente a la fusión de la secuencia señal de PelB, la región extracelular de la proteína DsbA de *M. tuberculosis*, y la etiqueta molecular 6xHis) se amplificó mediante *PCR* de alta fidelidad. La mezcla de reacción (0.05 mL) se preparó en solución amortiguadora 1X para *Pfu* ADN-pol conteniendo 20 picomoles de cada oligonucleótido (T7: 5'- taa tac gac tca cta tag ggg- 3'; T7_RV: 5'- ccg ttt aga ggc ccc aag ggg tta tgc tag -3'), 0.2 mM de dNTPs, 2% de DMSO, 2-4 ng de pET22(+)/MtDsbA, y 2.5 U de *Pfu* ADN-pol. Condiciones de termociclado: 1 ciclo de desnaturalización inicial (2 min a 94 °C); 45 ciclos de amplificación exponencial (20 seg a 94 °C, 20 seg a 50 °C, 60 seg a 72 °C); y 1 ciclo de extensión final (7 min a 72 °C). Al finalizar, se mantuvo a 12 °C hasta ser retirado del termociclador. La amplificación se verificó mediante electroforesis de ADN en gel de agarosa.

3.6.2. Preparación del vector y el inserto

El vector y el inserto se obtuvieron mediante digestión del plásmido pBPelB-BHX-Myc y del producto de *PCR* PelB-MtDsbA-6xHis con las endonucleasas XbaI y XhoI. Las mezclas de reacción (20 µL) se prepararon en solución amortiguadora 1X NEB2 conteniendo 0.1 mg/mL de BSA, 1-2 µg de ADN, y 10 U de cada endonucleasa (XbaI y XhoI). Las condiciones de digestión se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del proveedor (2 h a 37°C). De manera paralela, el vector fue defosforilado suplementado 1 µL de fosfatasa alcalina (*bCIP*) a los 90 min del transcurso de digestión. Los fragmentos se purificaron usando un estuche comercial, siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante, y se analizaron mediante electroforesis de ADN en gel de agarosa.

3.6.3. Ligación y obtención de pBPelB-MtDsbA-Myc

El vector (pB-/XbaI/XhoI-/Myc, defosforilado) y el inserto (/XbaI-/PelB-MtDsbA-/XhoI/) se ligaron por acción de la ligasa de ADN del bacteriófago T4 (T4 DNA-ligasa). La mezcla de reacción (10 µL) se preparó en solución amortiguadora 1X de T4 DNA-ligasa conteniendo 7µL del

inserto, 1µL del vector, y 400 U de T4 ADN-ligasa. La ligación se llevó a cabo en condiciones típicas (14-16 °C; 12-14 h), y posteriormente se transformó en *E. coli* ER2738. El plásmido pBPelB-MtDsbA-Myc se purificó a partir de un cultivo (3 mL) de una transformante estable. La autenticidad del fragmento insertado se verificó mediante secuenciación automática de ADN.

3.7. Ensayo de complementación funcional

3.7.1. Transformación de *E. coli* JCB571 y cultivos bacterianos

Las bacterias competentes *E. coli* JCB571 se transformaron por choque térmico con los plásmidos pBSSK(-), pBEcDsbA, y pBPelB-MtDsbA-Myc. Las transformantes estables se seleccionaron mediante crecimiento en medio LB sólido suplementado con tetraciclina, kanamicina, y ampicilina. Los cultivos bacterianos se prepararon inoculando una colonia de *E. coli* JCB570, JCB571, o JCB571 portadora de plásmido, en 3 mL de medio LB líquido suplementado con los antibióticos apropiados. La proliferación celular se llevó a cabo a 37 °C durante la noche (12-14 h) con agitación constante (300 rpm). Las pastillas bacterianas provenientes de 1 mL de cultivo se obtuvieron mediante centrifugación (12,000 rpm; 2 min) y se conservaron en congelación (-16 °C) hasta su análisis.

3.7.2. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina periplásmica

Inicialmente, la pastilla bacteriana fue lavada, resuspendida, y diluida en Tris-HCl a 1 M (pH 8.0) hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.4 – 0.6. La fracción periplásmica se obtuvo mediante extracción clorofórmica en una mezcla conteniendo 95 µL de Tris-HCl a 1 M (pH 8.0), 100 µL de suspensión bacteriana, 5 µL de SDS a 0.1%, y 10 µL de cloroformo. La disrupción de la membrana externa se favoreció mediante 5 seg de agitación (1,500 rpm) seguidos de 5 min de incubación (30 °C). La reacción catalizada por la fosfatasa alcalina periplásmica fue iniciada mediante la adición de 40 µL del sustrato pNPP (fosfato de p-nitrofenilo) a 15 mM. La reacción procedió durante 10 min a 30 °C y se detuvo con 60 µL de NaOH a 2 N. La hidrólisis del sustrato fue valorada en la fase acuosa (sobrenadante) de la reacción mediante la lectura de absorbancia a 415 nm (A₄₁₅). El sobrenadante de la reacción se obtuvo mediante centrifugación (14,500 rpm; 15 min). La actividad de la fosfatasa alcalina periplásmica se calculó, en unidades de Miller, usando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades de Miller} = \frac{A_{415}}{t (\text{min}) \cdot v (\text{mL}) \cdot A_{600}} \times 1000$$

donde A₄₁₅ es el valor de la emisión cromogénica del p-nitrofenolato liberado, *t* el tiempo de reacción (10 min), *v* el volumen de suspensión celular (0.1 mL), y A₆₀₀ el valor las UDO₆₀₀ correspondientes.

3.8. Tratamiento de datos y análisis estadístico

A menos que se mencione diferente, todos los resultados se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes y se expresaron como media \pm error estándar. Estos datos se compararon mediante un análisis de varianza rutinario (ANOVA). Cuando el valor p fue menor a 0.05, ANOVA fue seguido de una prueba de Tukey (comparativa múltiple). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete computacional *Prism*[®] v 4.0 (*Graphpad*[™] *Software*).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La formación de enlaces disulfuro y el plegamiento correcto es esencial para la función de muchas proteínas secretadas. En bacterias, la formación de enlaces disulfuro es facilitada por las oxidorreductasas Dsb, las cuales contienen el dominio conservado tiorredoxina (Trx). En *E. coli*, las proteínas Dsb han sido caracterizadas extensivamente: (i) EcDsbA cataliza la formación de enlaces disulfuro en sustratos polipeptídicos; (ii) EcDsbB se encarga de mantener a EcDsbA en su estado redox activo; (iii) EcDsbC y EcDsbG actúan como disulfuro isomerasas, corrigiendo los enlaces disulfuro formados incorrectamente en sustratos polipeptídicos; (iv) EcDsbD es responsable de mantener a EcDsbC y EcDsbG en su estado redox activo; y (v) EcDsbE es una reductasa involucrada en la maduración de citocromo c [Denoncin & Collet, 2013; Heras *et al.*, 2009].

De manera interesante, en bacterias de interés biomédico y biofarmacéutico, las proteínas con homología a DsbA han sido involucradas en el plegamiento oxidativo de factores de virulencia, lo que sugiere un potencial como diana terapéutica. La bacteria *M. tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis en humanos, secreta alrededor de 160 proteínas hacia el ambiente extracelular, las cuales participan en diversas funciones biológicas, incluyendo virulencia y patogenicidad. Se ha estimado que alrededor del 60% de esas biomoléculas contiene al menos un enlace disulfuro, lo que supone la participación de un mecanismo de plegamiento oxidativo en las cercanías de la membrana citoplásmica [Chim *et al.*, 2010]. Por ejemplo, la proteína secretada EspA (la cual posee un enlace disulfuro) es clave para la progresión de la infección y mantenimiento de la pared celular [Garces *et al.*, 2010].

M. tuberculosis posee dos sistemas de proteínas Dsb: (i) MtDsbA-MtVKOR y (ii) MtDsbE-MtDsbF. Recientemente, se demostró que MtDsbA y MtVKOR se colocalizan en la superficie de la bacteria y están asociadas a la membrana. Como ambos genes se ubican en el mismo operón y MtVKOR puede sustituir funcionalmente a EcDsbB *in vivo*, es posible suponer que MtDsbA y MtVKOR funcionan en conjunto. Por otro lado, mediante estudios mutagénicos, se demostró que los genes codificantes para ambas proteínas, MtVKOR y MtDsbA, son esenciales para el crecimiento micobacteriano, en tanto MtDsbE y MtDsbF no lo son, estableciendo la importancia funcional del sistema MtDsbA-MtVKOR para el patógeno. Además, los primeros estudios bioquímicos mostraron que MtDsbA exhibe preferencia por sustratos polipeptídicos diferentes, en comparación con MtDsbE y MtDsbF, indicando que posee propiedades estructurales únicas y actividades funcionales específicas. Ante esto, es posible suponer que la interrupción del plegamiento oxidativo asistido por MtDsbA puede detener la infección de *M. tuberculosis* [Chim *et al.*, 2010; Goulding *et al.*, 2004].

4.1. Obtención de pBPelB-MtDsbA-Myc

El papel funcional de la MtDsbA se estudió usando el periplasma de una mutante DsbA de *E. coli* como plataforma de expresión proteica y análisis operacional. Para este fin, se utilizó a la cepa JCB571, ya que ofrece una linealidad genotipo→fenotipo muy simple: la mutación del gen *dsbA* ocasiona una pérdida de la actividad fosfatasa alcalina periplásmica (FAP), debido a que la estructura de la FAP es dependiente del correcto plegamiento oxidativo asistido por DsbA. Además, JCB571 expresa de manera constitutiva a la FAP.

Inicialmente, se construyó un plásmido de expresión periplásmica de la proteína MtDsbA recombinante. El diseño planteado para la producción y localización bacteriana se muestra en la Figura 4-1: péptido señal PelB en el extremo N-terminal, seguido de la región EC de MtDsbA (UniProt O33272: Ser²⁶-Ser²⁵⁵) y del epítipo c-Myc (extremo C-terminal), bajo el control del promotor PLac.

El plásmido pET22b(+)/MtDsbA se utilizó como molde para la amplificación molecular de la secuencia MtDsbA. Las características moleculares del inserto se presentan en la Figura 4-2.

La secuencia de interés se amplificó mediante *PCR* usando los oligonucleótidos T7 y T7_RV como iniciadores y la enzima *Pfu* ADN-pol como polimerasa de alta fidelidad. Después, el producto de *PCR* se sub-clonó en el plásmido pBPelB-BHX-Myc (Figura 4-3), mediante inserción direccional en los sitios de restricción *Xba*I y *Xho*I.

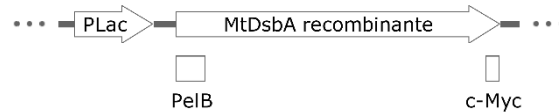


Figura 4-1. Representación esquemática del diseño para la producción y localización de la proteína recombinante MtDsbA.

PLac, promotor del operón de lactosa; PelB, péptido señal; c-Myc, epítipo molecular.

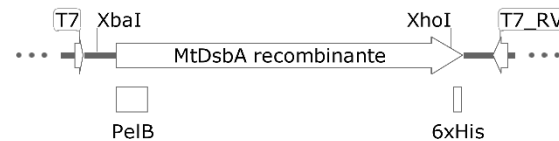


Figura 4-2. Representación esquemática de las características moleculares del inserto contenido en el plásmido pET22b(+)/MtDsbA.

T7 y T7_RV, regiones de hibridación de los iniciadores de *PCR*; *Xba*I y *Xho*I, sitios de reconocimiento por las endonucleasas de clonación. PelB, péptido señal; c-Myc, epítipo molecular.

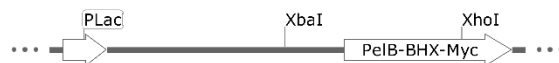


Figura 4-3. Representación esquemática de la unidad de transcripción contenida en el plásmido pBPelB-BHX-Myc.

PLac, promotor del operón de lactosa; *Xba*I y *Xho*I, sitios de reconocimiento por las endonucleasas de clonación. PelB, péptido señal; BHX, BamHI-HindIII-XhoI; c-Myc, epítipo molecular.

Hasta aquí, es pertinente resaltar tres aspectos importantes de la estrategia de sub-clonación molecular: (1) El producto del *PCR* PelB-MtDsbA-6xHis, amplificado con los oligonucleótidos T7 y T7_RV (Figura 4-2), contiene las secuencias de reconocimiento para las endonucleasas XbaI y XhoI, flanqueando la secuencia de MtDsbA; (2) el plásmido pBPelB-BHX-Myc también incluye tales secuencias (Figura 4-3); (3) por tal motivo, la ligación del vector y el inserto, digeridos ambos con las endonucleasas en cuestión, habilitó la inserción de MtDsbA en fase con respecto a PelB y c-Myc, y direccional en relación al promotor PLac.

El producto de la ligación se utilizó para transformar a *E. coli* ER2738. Después del crecimiento en medio selectivo (LB con ampicilina), de manera aleatoria, se eligieron 5 unidades formadoras de colonias (clonas) para su análisis por *PCR* de cultivo, usando dos oligonucleótidos universales (M13FW y M13RV) como iniciadores. Como se observa en la Figura 4-4, las clonas 21, 22, 24, y 25 portan el plásmido recombinante de interés, ya que se amplificó un fragmento con tamaño molecular cercano a 950 pb, concordante con el esperado (931 pb). Cabe destacar que los

resultados suponen que la clona 23 porta el plásmido vacío (es decir, sin inserto). De manera adicional, para asegurar la certeza del inserto clonado, se proliferó la clona 21, se aisló el ADN plasmídico (de alta pureza), y se verificó la codificación de PelB-MtDsbA-Myc mediante un servicio de secuenciación automática de ADN. A partir de este resultado, ese plásmido se consideró como pBPelB-MtDsbA-Myc y se utilizó para las siguientes etapas del estudio. La Figura 4-5 muestra la representación esquemática del plásmido recombinante y sus características moleculares.

4.2. Expresión de MtDsbA en *E. coli* JCB571

De manera previa al ensayo de complementación funcional, las cepas utilizadas se analizaron mediante *PCR*, *SDS-PAGE* y *Western Blot*, para verificar la presencia de los plásmidos correspondientes y la respectiva expresión de proteínas. Inicialmente, se transformó *E. coli* JCB571

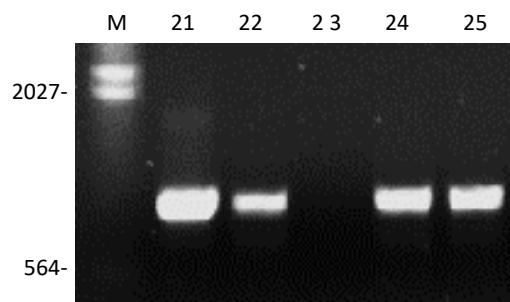


Figura 4-4. Análisis de transformantes estables portadoras de pBPelB-MtDsbA-Myc mediante *PCR* de colonia.

Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. M, marcador de peso molecular (*NEB λDNA-HindIII*, pb); 21-25, clonas analizadas.

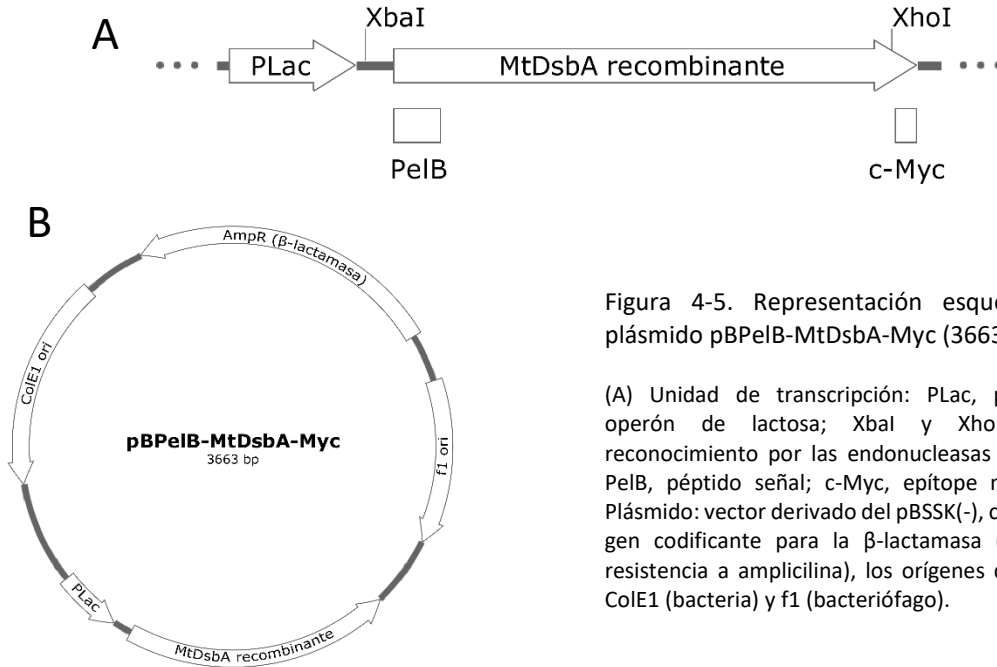


Figura 4-5. Representación esquemática del plásmido pBPelB-MtDsbA-Myc (3663 pb).

(A) Unidad de transcripción: PLac, promotor del operón de lactosa; XbaI y XhoI, sitios de reconocimiento por las endonucleasas de clonación. PelB, péptido señal; c-Myc, epítipo molecular. (B) Plásmido: vector derivado del pBSSK(-), conteniendo el gen codificante para la β -lactamasa (que confiere resistencia a ampicilina), los orígenes de replicación ColE1 (bacteria) y f1 (bacteriófago).

con los plásmidos de interés (pBSSK(-); pBEcDsbA; pBPelB-MtDsbA-Myc). Una colonia de cada transformante estable fue proliferada durante la noche. De manera paralela, se preparó un cultivo de *E. coli* JCB570 y JCB571, los cuales se utilizaron como testigos de los ensayos.

Como primera prueba, se realizó un *PCR* de colonia usando dos oligonucleótidos universales (M13FW y M13RV). Como se distingue en la Figura 4-6, el control negativo de la reacción de *PCR* (carril N, sin células) y las amplificaciones conteniendo células sin plásmido (carril 1, JCB570; carril 2, JCB571) rindieron resultados negativos, tal como se esperaba; en tanto, la reacción incluyendo JCB571/pBSSK(-) (carril 3) produjo un producto ligeramente mayor a 200 pb, correspondiente a la secuencia codificante para el N-terminal del péptido α de la β -galactosidasa y la región de clonaciones múltiples (226 pb); por otro lado, las reacciones considerando JCB571/pBEcDsbA (carril 4) o JCB571/pBPelB-MtDsbA-Myc

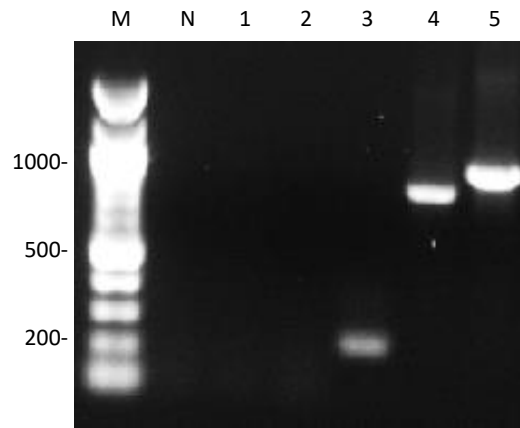


Figura 4-6. Análisis de transformantes estables portadoras de plásmidos de complementación (+controles/testigos) mediante *PCR* de colonia.

Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. M, marcador de peso molecular (*NEB 100-bp Ladder*, pb); N, control negativo; 1, JCB570; 2, JCB571; 3, JCB571/pBSSK(-); 4, JCB571/pBEcDsbA; 5, JCB571/pBPelB-MtDsbA-Myc.

(carril 5) exhibieron productos cercanos a 800 y 950 pb, respectivamente, coherentes con los tamaños esperados para los insertos correspondientes: EcDsbA (817 pb) y PelB-MtDsbA-Myc (931 pb).

Como segunda prueba, se realizó un análisis cualitativo de expresión mediante electroforesis en gel SDS-poliacrilamida (*SDS-PAGE*) e inmuno-reconocimiento (*Western Blot*) con anticuerpos dirigidos con la etiqueta molecular (c-Myc). La sobreexpresión periplásmica se llevó a cabo en cultivos a mini-escala, siguiendo el protocolo estándar del laboratorio: 2 h de pre-inducción, 0.5 mM de IPTG, y 4 h de post-inducción. Los extractos totales se prepararon en condiciones reductoras y

desnaturalizantes. Como se observa en la Figura 4-7, el patrón electroforético (*SDS-PAGE*) muestra pocas diferencias proteicas asignables a producción específica de MtDsbA; sin embargo, el ensayo de inmuno-reconocimiento (*Western Blot*) con anticuerpos anti-Myc reveló una banda única en el extracto correspondiente JCB571/pBPelB-MtDsbA-Myc (carril 5).

De manera conjunta, los resultados de los ensayos analíticos (*PCR*, *SDS-PAGE* y *Western Blot*) demuestran que cada cultivo alberga el plásmido específico y que sólo la mutante JCB571 correspondiente expresa la proteína MtDsbA.

4.3. MtDsbA complementa la función disulfuro oxidasa de la mutante DsbA de *E. coli*

La actividad disulfuro oxidasa *in vivo* de la proteína DsbA de *M. tuberculosis* se evaluó mediante un ensayo de complementación funcional de la mutante DsbA de *E. coli* (JCB571) y el análisis de actividad de la fosfatasa alcalina periplásmica, dependiente de DsbA, como fenotipo cuantitativo. La actividad fosfatasa se cuantificó utilizando a fosfato de p-nitrofenilo (pNPP) como sustrato cromogénico: la hidrólisis del sustrato por acción enzimática produce p-nitrofenolato (pNP),

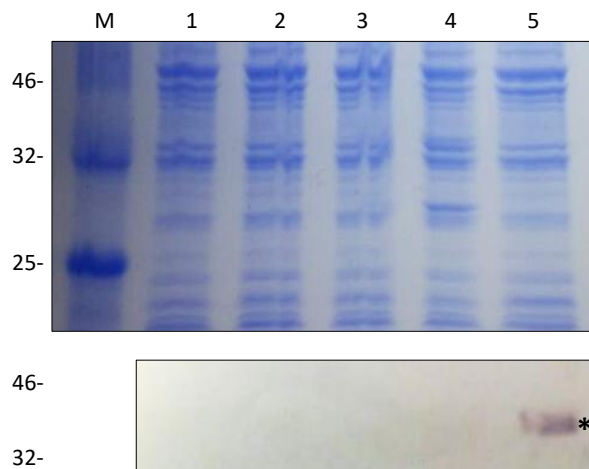


Figura 4-7. Análisis de expresión proteica de las transformantes estables JCB571.

(A) Gel de SDS-poliacrilamida al 13.5% teñido con azul brillante de *Coomassie*. M, marcador de peso molecular (*NEB Protein Standard - Broad Range*, kDa); 1, JCB570; 2, JCB571; 3, JCB571/pBSSK(-); 4, JCB571/pBEcDsbA; 5, JCB571/pBPelB-MtDsbA-Myc. (B) *Western Blot* revelado con sustrato BCIP/NBT (para fosfatasa alcalina, AP). Inmuno-reconocimiento con anti-Myc, seguido con anti-IgG/AP. El asterístico indica la movilidad relativa de MtDsbA-Myc.

el cual emite una coloración amarilla en condiciones básicas (medible a una absorbancia de 415 nm). De esta manera, la linealidad genotipo→fenotipo se utilizó como indicador de la actividad funcional de la plegasa micobacteriana.

Inicialmente, se verificó la dependencia de la fosfatasa alcalina periplásmica de *E. coli* a la acción de EcDsbA. Como se distingue en la Figura 4.8(A), el periplasma de *E. coli* JCB570 (silvestre EcDsbA⁺) reveló una actividad fosfatasa alcalina significativa, 400 veces mayor en comparación con *E. coli* JCB571 (mutante EcDsbA⁻), la cual mostró nula actividad, corroborando la premisa del ensayo de complementación. Enseguida, se analizó el periplasma de *E. coli* JCB571 portadora de los plásmidos de normalización (pBSSK(-) y pBEcDsbA) y del plásmido de interés (pBPelB-MtDsbA-Myc). Como se observa en la Figura 4.8(B), el periplasma de JCB571/pBSSK(-) (control de normalización: 0%) exhibió una ligera actividad, atribuible a las condiciones ambientales; contrariamente, el periplasma de JCB571/pBEcDsbA (control de normalización: 100%) presentó una elevada y significativa actividad, 10 veces mayor en comparación con JCB571/pBSSK(-) ($p < 0.05$), confirmando la complementación homóloga y la confiabilidad del ensayo; por otro lado, de manera interesante, el periplasma de JCB571/pBPelB-MtDsbA-Myc (plegasa de interés) reveló una actividad significativa, 4 veces mayor en comparación con JCB571/pBSSK(-) ($p < 0.05$), comprobando la

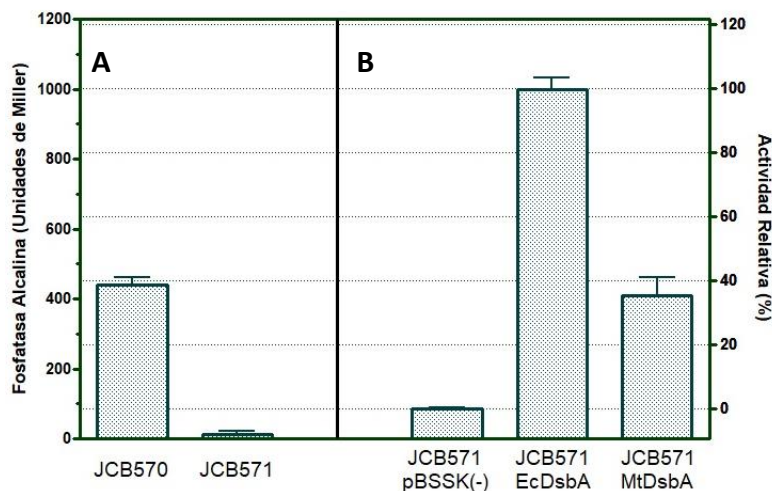


Figura 4-8. Análisis de la actividad disulfuro oxidasa de la MtDsbA mediante complementación funcional de *E. coli* JCB571 (mutante DsbA).

(A) Actividad hidrolítica de la fosfatasa alcalina periplásmica de *E. coli* JCB570 (DsbA⁺) y JCB571 (DsbA⁻). (B) Actividad hidrolítica de la fosfatasa alcalina periplásmica de *E. coli* JCB571 portadora de los plásmidos pBSSK(-), pBEcDsbA (EcDsbA), y pBPelB-MtDsbA-Myc (MtDsbA). Izquierda: unidades de actividad enzimática. Derecha: porcentaje de actividad relativa.

hipótesis que supone a MtDsbA como plegasa con actividad disulfuro oxidasa. Sin embargo, comparada con EcDsbA, demostró una actividad relativa cercana al 35% ($p < 0.05$), aludiendo que MtDsbA posee actividad disulfuro oxidasa limitada. Esta condición puede ser interpretada mediante dos posibles explicaciones: (1) la fosfatasa alcalina periplásmica no corresponde a un sustrato fisiológico (endógeno) *in vivo*, condicionando el reconocimiento molecular enzima-sustrato, y (2) este sustrato posee tres enlaces disulfuro, demandando un plegamiento oxidativo asistido por una plegasa de alta eficiencia.

4.4. Recomendaciones adicionales para el estudio de la DsbA de *M. tuberculosis*

De manera simple, se plantean las siguientes recomendaciones para completar el estudio de la actividad disulfuro oxidasa de la DsbA de *M. tuberculosis*: (i) determinar su estado redox mediante modificación de tioles, (ii) determinar su actividad sobre otro sustrato no fisiológico que contenga un solo enlace disulfuro, como la quitinasa amibiana *Eh*CHT1, y (iii) determinar su actividad sobre un sustrato fisiológico que contenga un solo enlace disulfuro, p. ej., la serina proteasa micobacteriana MtMarP. Con esto, será posible valorar su potencial como diana terapéutica para la búsqueda de nuevas moléculas con actividad inhibitoria específica, dirigidas hacia el control de la tuberculosis en humanos.

5. CONCLUSIONES

El plásmido pBPelB-MtDsbA-Myc, que regula la expresión periplásmica de MtDsbA mediante el promotor del operón de lactosa (PLac), se obtuvo de manera exitosa empleando protocolos típicos de clonación molecular. La proteína MtDsbA recombinante se produjo adecuadamente en *E. coli* JCB571, mutante DsbA, portadora del plásmido pBPelB-MtDsbA-Myc mediante un procedimiento típico de sobreexpresión inducida. La proteína DsbA de *M. tuberculosis* exhibe actividad disulfuro oxidasa *in vivo*, ya que posee la habilidad de complementar la mutación DsbA de *E. coli* y es capaz de restablecer (parcialmente) la actividad hidrolítica de la fosfatasa alcalina periplásmica (dependiente del plegamiento oxidativo asistido por DsbA). El compartimiento periplásmico de *E. coli* JCB571 ofrece bondades bioquímicas únicas: un ambiente redox fisiológico carente de DsbA (principal disulfuro oxidasa), las cuales fueron convenientemente utilizadas para el análisis funcional de una plegasa micobacteriana (MtDsbA).

6. BIBLIOGRAFÍA

- Arts, I.S., Gennaris, A., Collet, J. (2015). Reducing systems protecting the bacterial cell envelope from oxidative damage. *FEBS Letters*, 589(14), 1559-1568.
- Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *ELife*, 4, e05826.
- Bocian-Ostrzycka, K.M., Grzeszczuk, M.J., Banaś, A.M., Jagusztyn-Krynicka, E.K. (2017). Bacterial thiol oxidoreductases — from basic research to new antibacterial strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(10), 3977-3989.
- Cambier, C., Falkow, S., Ramakrishnan, L. (2014). Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*, 159(7), 1497-1509.
- Chim, N., Harmston, C. A., Guzman, D. J., Goulding, C. W. (2013). Structural and biochemical characterization of the essential DsbA-like disulfide bond forming protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Structural Biology*, 13(1), 23.
- Chim, N., Riley, R., The, J., Im, S., *et al.* (2010). An extracellular disulfide bond forming protein (DsbF) from *Mycobacterium tuberculosis*: structural, biochemical, and gene expression analysis. *Journal of Molecular Biology*, 396(5), 1211-1226.
- Crevel, R.V., Ottenhoff, T.H., Van Der Meer, J.W.M. (2002). Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 294-309.
- Daniels, R., Mellroth, P., Bernsel, A., Neiers, F., Normark, S., Heijne, G.V., Henriques-Normark, B. (2009). Disulfide bond formation and cysteine exclusion in Gram-positive bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 285(5), 3300-3309.
- Denoncin, K., Collet, J. (2013). Disulfide Bond Formation in the Bacterial Periplasm: Major Achievements and Challenges Ahead. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(1), 63-71.
- Forrellad, M.A., Klepp, L.I., Gioffré, A., Sabio y García, J., Morbidoni, H.R., *et al.* (2013) Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 4(1), 3-66.
- Garces, A., Atmakuri, K., Chase, M. R., Woodworth, J. S., Krastins, B., *et al.* (2010). EspA acts as a critical mediator of ESX1-dependent virulence in *Mycobacterium tuberculosis* by affecting bacterial cell wall integrity. *PLoS Pathogens*, 6(6).
- Goulding, C.W., Apostol, M.I., Gleiter, S., Parseghian, A., *et al.* (2003). Gram-positive DsbE proteins function differently from Gram-negative DsbE homologs. *Journal of Biological Chemistry*, 279(5), 3516-3524.
- Heras, B., Shouldice, S. R., Totsika, M., Scanlon, M. J., *et al.* (2009). DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 7(3), 215-225.
- Jonda, S. (1999). Complementation of DsbA deficiency with secreted thioredoxin variants reveals the crucial role of an efficient dithiol oxidant for catalyzed protein folding in the bacterial periplasm. *The EMBO Journal*, 18(12), 3271-3281.
- Knechel, N.A. (2009). Tuberculosis: pathophysiology, clinical features, and diagnosis. *Critical Care Nurse*, 29(2), 34-43.
- Łasica, A.M., Jagusztyn-Krynicka, E.K. (2007). The role of Dsb proteins of Gram-negative bacteria in the process of pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(5), 626-636.
- Luong, T. T., Reardon-Robinson, M. E., Siegel, S. D., Ton-That, H. (2017). Reoxidation of the thiol-disulfide oxidoreductase MdbA by a bacterial vitamin K epoxide reductase in the biofilm-forming *Actinobacterium actinomyces*. *Journal of Bacteriology*, 199(10).
- Madero Ayala, Pablo Alfonso. Análisis de las actividades oxidoreductasas de la proteína DsbA recombinante de *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis de licenciatura. Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Junio de 2016.
- Munoz, V., Cerminara, M. (2016). When fast is better: Protein folding fundamentals and mechanisms from ultrafast approaches. *Biochemical Journal*, 473(17), 2545-2559.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2015). *Lehninger principios de bioquímica*. Barcelona: Omega.
- NOM-006-SSA2-2013. Norma oficial mexicana para la prevención y control de la tuberculosis.
- Patarroyo, M.A., Plaza, D.F., Ocampo, M., Curtidor, H., *et al.* (2008). Functional characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Rv2969c membrane protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372(4), 935-940.
- Paxman, J.J., Borg, N.A., Horne, J., Thompson, P.E., Chin, Y., *et al.* (2009). The structure of the bacterial oxidoreductase enzyme DsbA in complex with a peptide reveals a basis for substrate specificity in the catalytic cycle of DsbA enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 284(26), 17835-17845.
- Premkumar, L., Heras, B., Duprez, W., Walden, P., Halili, M., *et al.* (2013). Rv2969c, essential for optimal growth in *Mycobacterium tuberculosis*, is a DsbA-like enzyme that interacts with VKOR-derived peptides and has atypical features of DsbA-like disulfide oxidases. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 69(10), 1981-1994.
- Reardon-Robinson, M.E., Ton-That, H. (2015). Disulfide-bond-forming pathways in Gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology*, 198(5), 746-754.
- Ren, G., Champion, M.M., Huntley, J.F. (2014). Identification of disulfide bond isomerase substrates reveals bacterial virulence factors. *Molecular Microbiology*, 94(4), 926-944.

- Rietsch, A., Belin, D., Martin, N., Beckwith, J. (1996). An *in vivo* pathway for disulfide bond isomerization in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93(23), 13048-13053.
- Rudner, D.Z., Losick, R. (2010). Protein subcellular localization in bacteria. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2(4).
- Salgame, P. (2011). MMPs in tuberculosis: granuloma creators and tissue destroyers. The Journal of Clinical Investigation, 121(5), 1686–1688.
- Sambrook, J. (2001). Molecular cloning. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schito, M., Migliori, G.B., Fletcher, H.A., Mcnerney, R., Centis, R., *et al.* (2015). Perspectives on advances in tuberculosis diagnostics, drugs, and vaccines. Clinical Infectious Diseases, 61(Suppl 3).
- Smith, I. (2003). *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clinical Microbiology Reviews, 16(3), 463-496.
- Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C.W. (2016). Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular. México, D.F.: Médica Panamericana.
- Wang, L., Li, J., Wang, X., Liu, W., Zhang, X. C., Li, X., Rao, Z. (2013). Structure analysis of the extracellular domain reveals disulfide bond forming-protein properties of *Mycobacterium tuberculosis* Rv2969c. Protein & Cell, 4(8), 628-640.
- Watson, J.D. (2016). Biología molecular del gen. Madrid: Editorial Médica Paramericana.
- WHO (2013). Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MT.