



**UNIVERSIDAD DE LA HABANA
INSTITUTO DE FARMACIA Y ALIMENTOS
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

**“Evaluación de *Streptomyces lividans* como hospedero para la
expresión de interferón alfa 2b y estreptoquinasa”**

**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud**

Autor: Lic. Elsa T. Pimienta Rodríguez

**Tutores: Dr. Carlos Vallín Plous
Dr. Jozef Anné**

Ciudad de La Habana

2009

AGRADECIMIENTOS

Escribir los agradecimientos es la parte más difícil porque debo resumir en pocas palabras la ayuda, la amistad, el compañerismo, el cariño o el amor de las personas que me han acompañado por tantos años o en momentos muy oportunos. Trataré de no olvidar mencionar a todos los que me han ayudado.

Quisiera agradecer a mis amigos del lab Cary, Leo, Jony, Julito, Mónica y Sandra por compartir todos estos años juntos, su paciencia y ayudarme a terminar; y también a Yanelis, Aniurka, Loreta, Ricardo, Yane, Tai y otros que ya no están.

A Vallín por ser mi tutor, por darme la oportunidad de recibir entrenamientos en otros laboratorios y por incidir tanto en que termine la tesis.

A mis amigos del antiguo CQF, en especial a Ulises, René, Dagmar Patricia y Ritsie por escucharme, comprenderme y animarme a terminar.

A mis queridos amigos del antiguo lab de cólera del CENIC y a todos los nuevos que se han incorporado por estar dispuestos siempre a ayudar y hacerme sentir en una gran familia: Karen, Javier, Fando, Edicilla, Talena, Celso, Elsa, Boris, Luly, Betty, Ernesto, Lino, Ludis, Mayrin y Orlando.

A mis queridos Alina y Andy por brindarme su amistad y su laboratorio como si fuera el mío para la purificación de la SKC-2.

A Raudel, Yamilé, Neida, Nieves y a todos los que trabajaron en Control de Procesos del CIGB el año que estuve con ellos, por brindarme su alegría y ayuda. A Abrisleida por ayudarme en la realización de muchos de los ELISAs que se hicieron en el trabajo de IFN α 2b. En especial a Julio César por su amistad y por estar siempre dispuesto a escucharme y ayudarme.

A los oponentes de predefensa Drs. Rafael Fando y Javier Campos por el cuidado, los conocimientos y el esmero en la revisión del documento de tesis. Gracias a ellos la tesis dio un salto increíble en organización y calidad.

A la Dra. Gisela Cañedo, a los miembros del Dpto. de Postgrado y al Consejo Científico de Biotecnología del CENIC por la ayuda prestada en el acto de predefensa.

A mis amigos Karen, Celso, Alina y Dagmar por revisar el documento de tesis y por las magníficas sugerencias.

A Luciano Hernández por estar siempre dispuesto a apoyarme y ayudarme desde el primer momento que le pedí su opinión sobre la tesis.

A Chang por ser mi amigo y ayudarme tanto en las fermentaciones de *Streptomyces*.

Al Profe Higginson, Dannelis, Crislene y Nelson por estar siempre dispuestos a apoyarme y animarme cada vez que les pedí ayuda y por hacerme sentir en su laboratorio como en el mío.

Al Profe Anné, Wesley, Smitha, Sophie, Kristof, Nick, Elke, Eef, y en especial a Lieve por contribuir notablemente a mi formación el tiempo que estuve en el Instituto Rega y al regresar.

A mis queridos Gina, Paul, Jeannine y Rik por su cariño, toda la ayuda que me brindaron y por hacerme sentir en Lovaina como en casa.

Al Dr. Gustavo Sierra por su disposición a orientarme y ayudarme desde el primer momento en que lo conocí.

A mi amigo Ariel por ser incondicional cada vez que necesite mandar correspondencias, fotocopiar, imprimir documentos. Eres especial.

A Loany por su paciencia, tiempo, ayuda y todos los consejos electrónicos en tiempos de dudas.

A Leonardo por su amistad y ayuda en un momento muy importante de la tesis.

Al Prof. Paul Proost del Instituto Rega por realizar las secuencias amino terminal de la SKC-2.

Al Dr. Eduardo Martínez, María del Carmen, Dinorah, Lázara e Inalvis, de la División de Desarrollo del CIGB, por su disposición a realizar las determinaciones de ELISA y actividad biológica de la SKC-2.

A Jorge Valdés por su valiosa y oportuna ayuda en un momento muy importante de la tesis.

A Joel Ferrero y Mayda Martínez del Dpto. de Control de la Calidad del CIGB por la realización de los ensayos de actividad antiviral del IFN α 2b y el ensayo *in vitro* de lisis del coágulo de fibrina para la SKC-2.

A mis profesores del Instituto de Farmacia y Alimentos, a los que están y a los que ya no se encuentran, por su formación inicial que me permitió llegar aquí. Al Dr. Oscar Ros por su comprensión y ayuda.

A Maílo, Ivón y Elenita por ayudarme en la impresión de los documentos de la tesis.

A Pipo, por los años de ayuda incondicional a encontrar reactivos; artículos, documentos y hacer presentaciones.

Por su apoyo y ayuda cuando estuve en Bélgica y por editar e imprimir los documentos de tesis y resumen de predefensa como si fueran suyos. Su ayuda fue muy valiosa.

A mi mamá, por ser ante todo mi amiga, por su amor y apoyo incondicional y por no dejarme renunciar nunca. A mi hermano Herminito y mi sobrinito Eddy por su cariño, a Ivón, a Daysi, Tony y a mi familia por su apoyo y cariño.

A mi querido Dios por ayudarme y sostenerme tantas veces antes de ni siquiera pensar en llegar hasta aquí.

DEDICATORIA

A mis padres, por el amor y la educación que recibí de ellos, en especial a mi madre por su ternura y ayuda incondicional. A mi hermano Herminito por su cariño y a mi sobrino Eddy por su alegría y momentos felices.

ABREVIATURAS

- ADN ácido desoxirribonucleico
- amp ampicilina
- amp-r resistencia o resistente a ampicilina
- ARN ácido ribonucleico
- ELISA ensayo inmunoenzimático (por sus siglas en inglés, *Ensyme Linked Immunosorbent Assay*)
- EDTA ácido etilendiaminotetracético
- FDA órgano regulatorio para medicamentos y alimentos de EE. UU. (por sus siglas en inglés, *Food and Drug Administration*)
- IFN α 2b interferón alfa 2b
- kb kilobase
- LPS lipopolisacáridos
- min minutos
- pb par de bases nucleotídicas
- PBS solución salina tamponada con fosfato (por sus siglas en inglés, *Phosphate Buffered Saline*)
- PBS-T PBS suplementado con tween 20 al 0,05%.
- PCR reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*)
- PEG polietilenglicol
- Plg plasminógeno
- RBS sitio de unión al ribosoma (por sus siglas en inglés, *Ribosome Binding Site*)
- rpm revoluciones por minuto
- SDS dodecil sulfato de sodio (por sus siglas en Inglés, *Sodium Dodecil Sulfate*)
- SDS-PAGE electroforesis en geles de poli(acrilamida en presencia de SDS (por sus siglas en inglés, *SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)
- SN sobrenadante de cultivo
- tsr tioestreptona
- tsr-r resistencia o resistente a tioestreptona
- Tris Tris-(hidroximetil)-aminometano

INDICE

1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 Fisiología y genética de <i>Streptomyces</i>	9
2.2 Translocación de proteínas en bacterias.....	11
2.2.1 Señales de translocación.....	12
2.2.2. Procesos de translocación Sec y Tat en bacterias	13
2.2.2.1 Sistema de secreción Sec en bacterias.....	13
2.2.2.2 Sistema de secreción Tat en bacterias.....	15
2.2.3 Componentes que intervienen en eventos post-traduccionales.....	18
2.2.3.1 Peptidasas señales	18
2.2.3.2 Enzimas que asisten en el plegamiento de las proteínas.....	19
2.3 <i>Streptomyces</i> como hospedero para la producción de proteínas heterólogas.....	20
2.3. 1 Elección de la cepa hospedera.....	20
2.3. 2 Vectores de clonación	20
2.3. 3 Elección del promotor	20
2.3. 4 Terminadores de la transcripción	21
2.3. 5 Sitio de unión al ribosoma.....	22
2.3. 6 Uso de codones.....	22
2.3. 7 Péptido señal	22
2.3. 8 Sitio de corte de la peptidasa señal.....	23
2.3. 9 Condiciones de cultivo y proteasas del hospedero.....	24
2.3.10 Aplicaciones y rendimientos de producción	25
2.4 Proteínas de interés biofarmacéutico.....	27
2.4.1 Interferón α 2b humano	27
2.4.1.1 Estructura y propiedades físico-químicas del IFN α 2b.....	27
2.4.1.2 Mecanismo de acción y actividad biológica del IFN α 2b.....	27
2.4.1.3 Obtención de IFN α 2b en hospederos heterólogos.....	28
2.4.2 Estreptoquinasa	30
2.4.2.1 Estructura y propiedades físico-químicas de la SKC.....	30
2.4.2.2 Mecanismo de acción de la SKC.....	31
2.4.2.3 Ventajas y desventajas de la SKC.....	32
2.4.2.4 Obtención de la SKC.....	33
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
3.1 Cepas bacterianas empleadas	36
3.2 Medios de cultivo para el crecimiento bacteriano y procedimientos utilizados en el trabajo con <i>S. lividans</i>	37
3.2.1 Medios de cultivo, soluciones y procedimientos utilizados en el trabajo con <i>S. lividans</i>	37
3.3 Procedimientos generales.....	40
3.3.1 Procedimientos utilizados en el trabajo con ADN	40
3.3.2 Procedimientos utilizados en el trabajo con proteínas	42
3.4 Procedimientos para obtener cepas recombinantes de <i>S. lividans</i> TK24.....	43
3.4.1 Procedimientos para obtener plasmidios replicativos que codifiquen para el IFN α 2b fusionado al LipA-sp o al Vsi-sp o al XlnC-sp.....	43

3.4.1.1	Procedimientos para obtener plasmidios que codifiquen para el IFN α 2b fusionado al LipA-sp.....	43
3.4.1.2	Procedimientos para obtener plasmidios que codifiquen para el IFN α 2b fusionado al Vsi-sp o al XlnC-sp	48
3.4.2.	Procedimientos para obtener plasmidios replicativos que codifiquen para la SKC-2 fusionada al LipA-sp o al Vsi-sp o al XlnC-sp	52
3.4.2.1	Procedimiento para obtener una construcción genética que permita fusionar el gen <i>skc-2</i> en el marco de lectura de <i>lipA-ss</i> , <i>vsi-ss</i> o <i>xlnC-ss</i>	52
3.4.2.2	Procedimiento para obtener un plasmidio que codifique para la SKC-2 fusionada al LipA-sp.....	53
3.4.2.3	Procedimiento para obtener un plasmidio que codifique para la SKC-2 fusionada al Vsi-sp.....	54
3.4.2.4	Procedimiento para obtener un plasmidio que codifique para la SKC-2 fusionada al XlnC-sp	55
3.4.3	Introducción de los plasmidios recombinantes en <i>S. lividans</i> TK24.....	56
3.5	Procedimientos para evaluar la expresión y secreción del IFN α 2b o la SKC-2 por las cepas de <i>S. lividans</i> recombinantes	56
3.5.1	Procedimientos para evaluar la expresión y secreción del IFN α 2b.....	56
3.5.2	Procedimientos para evaluar la expresión y secreción de la SKC-2.....	58
3.6	Procedimientos para la purificación y caracterización de la SKC-2 recombinante	59
3.6.1	Purificación de la SKC-2 recombinante.....	59
3.6.1.1	Cromatografía de intercambio aniónico.....	59
3.6.1.2	Cromatografía de interacciones hidrofóbicas.....	60
3.6.2	Procedimientos para la caracterización de la SKC-2 purificada	61
4	RESULTADOS Y DISCUSION	63
4.1	Obtención de cepas de <i>S. lividans</i> TK24 que portan plasmidios replicativos que codifican para el IFN α 2b o la SKC-2	63
4.1.1	Obtención de plasmidios replicativos que codifican para el IFN α 2b en <i>S. lividans</i> .	63
4.1.1.1	Obtención de plasmidios que codifican para el IFN α 2b fusionado al LipA-sp. 63	
4.1.1.2	Obtención de un plasmidio que codifica para el IFN α 2b fusionado al Vsi-sp ..	66
4.1.1.3	Obtención de un plasmidio que codifica para el IFN α 2b fusionado al XlnC-sp	67
4.1.2	Obtención de plasmidios replicativos que codifican para la SKC-2 en <i>S. lividans</i> ..	68
4.1.2.1	Obtención de un plasmidio que codifica para la SKC-2 fusionada al LipA-sp .	68
4.1.2.2	Obtención de un plasmidio que codifica para la SKC-2 fusionada al Vsi-sp	69
4.1.2.3	Obtención de un plasmidio que codifica para la SKC-2 fusionada al XlnC-sp .	70
4.1.3	Obtención de las cepas de <i>S. lividans</i> TK24 recombinantes	70
4.2	Evaluación de la secreción del IFN α 2b o la SKC-2 por <i>S. lividans</i>	71
4.2.1	Expresión secretoria del IFN α 2b en <i>S. lividans</i>	71
4.2.1.1	Proceso de secreción que utiliza el LipA-sp para mediar la translocación del IFN α 2b en <i>S. lividans</i>	76
4.2.2	Expresión secretoria de la SKC-2 en <i>S. lividans</i>	77
4.3	Purificación de la SKC-2 secretada por <i>S. lividans</i>	80
4.3.1	Selección de un medio de cultivo adecuado para la producción secretoria y purificación de la SKC-2.....	80
4.3.2	Purificación de la SKC-2.....	82
4.3.3	Análisis físico- químico y biológico de la SKC-2 purificada	88

4.3.4 Potencialidades de <i>S. lividans</i> como hospedero para la obtención de la SKC-2.....	89
5 DISCUSION GENERAL	93
6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	97
CONCLUSIONES.....	97
RECOMENDACIONES	98
7 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	99
8 AUTOBIBLIOGRAFÍA	114
9 ANEXOS	118

SÍNTESIS

Los hospederos heterólogos se utilizan frecuentemente para la producción de proteínas de interés biofarmacéutico como una alternativa eficaz al aislamiento a partir de su fuente natural. *Escherichia coli* ha sido el hospedero heterólogo más utilizado. Sin embargo, muchas proteínas se acumulan en cuerpos de inclusión, lo cual dificulta los procesos de replegamiento de estas en su conformación nativa. En contraste, las bacterias grampositivas como *Streptomyces lividans* ofrecen la ventaja de secretar las proteínas al medio de cultivo y esto favorece su correcto plegamiento y facilita su purificación. En este trabajo se evalúa la utilidad de *S. lividans* TK24 para secretar interferón α 2b humano (IFN α 2b) y estreptoquinasa de *Streptococcus equisimilis* ATCC9542 (SKC-2) biológicamente activos al medio de cultivo. Para mediar la secreción de ambas proteínas se seleccionaron los péptidos señales del inhibidor de subtilisina de *Streptomyces venezuelae* CBS762.70 (Vsi-sp) –dependiente de la vía Sec-, de la xilanaso C de *Streptomyces lividans* –dependiente de la vía Tat- y el de la lipasa A de *Streptomyces exfoliatus* M11 (LipA-sp), el cual no había sido utilizado con anterioridad. *S. lividans* TK24 secretó la SKC-2, fusionada al Vsi-sp, biológicamente activa al medio de cultivo hasta 4 mg l⁻¹. La SKC-2 fue purificada a escala de laboratorio mediante las cromatografías de intercambio iónico e interacciones hidrofóbicas; lo que permitió aumentar su pureza hasta el 90%. La SKC-2 purificada tuvo una actividad específica de 35 928 UI mg⁻¹ y su identidad fue verificada mediante la secuenciación de su extremo amino. Además, la proteína purificada tuvo un máximo de absorción UV característico a los 277 nm. Los niveles de la SKC-2 secretada aumentaron hasta 15 mg l⁻¹ cuando la cepa recombinante fue cultivada siguiendo un procedimiento de fermentación por lote no optimizado a escala de banco. Este incremento en la cantidad secretada de la SKC-2 muestra el potencial que tiene la optimización de la fermentación de *S. lividans* para la obtención soluble de la estreptoquinasa SKC-2.

El IFN α 2b fue secretado biológicamente activo al medio extracelular de *S. lividans* TK24 cuando se fusionó al Vsi-sp o al LipA-sp a niveles <1 mg l⁻¹. Estos niveles de expresión son bajos, pero aún quedan posibilidades por explorar para incrementar la cantidad del IFN α 2b; entre ellas, la evaluación de otros péptidos señales para dirigir la secreción de esta biomolécula.

S. lividans TK24 es un hospedero bacteriano no patógeno, que no posee LPS en su estructura celular. Estas propiedades lo hacen más atractivo para la obtención biológicamente activa de la SKC-2, una proteína de gran utilidad en la práctica clínica.

1 INTRODUCCIÓN

Los sistemas de expresión heteróloga se utilizan frecuentemente para la producción de proteínas de importancia biofarmacéutica debido a que pueden alcanzar mayores niveles de producción que la fuente original. Se han empleado sistemas de expresión efectivos que incluyen las bacterias, levaduras, células de mamíferos, plantas y animales transgénicos para la obtención de proteínas a gran escala con fines industriales o a pequeña escala para estudiar su función. La elección de un sistema en particular depende de varios factores como tiempo de producción, costos, aplicaciones, características de la proteína de interés, expresión intracelular o extracelular, modificaciones post-traduccionales, actividad biológica, entre otros. Los rendimientos de las proteínas recombinantes varían dependiendo de la proteína específica y del sistema de expresión seleccionado.

Dentro de la amplia variedad de herramientas disponibles para expresar proteínas de origen heterólogo, las bacterias son, en muchos casos, los hospederos más atractivos debido a sus características de crecimiento y los bajos costos relativos asociados. Son especialmente útiles cuando las proteínas de interés no requieren modificaciones post-traduccionales para que sean biológicamente activas. *Escherichia coli* continúa siendo el hospedero bacteriano más utilizado debido a su rápido crecimiento en sustratos relativamente baratos, su genética bien caracterizada y la disponibilidad comercial de gran cantidad de vectores de clonación y cepas mejoradas¹. En general, en este microorganismo, las proteínas recombinantes sobre-expresadas se acumulan en el citoplasma o en el espacio periplasmático. Con mayor frecuencia, el citoplasma es la primera elección debido a que se obtienen generalmente rendimientos más altos, pero la acumulación intracelular de las proteínas en cuerpos de inclusión requiere de procesos de extracción de las proteínas con agentes fuertes y de renaturalización para el repliegamiento adecuado de las proteínas, los cuales pueden afectar su actividad biológica. Esos procesos suelen ser laboriosos, caros y con consecuencias para el medio ambiente^{1,2}.

Por tales razones, algunos géneros de bacterias grampositivas están siendo evaluados como hospederos para la producción de proteínas heterólogas debido a que estas bacterias secretan directamente las proteínas al medio extracelular. La posibilidad de purificar la proteína del medio de cultivo es una ventaja importante pues el material de partida tiene mayor pureza que el material soluble intracelular y por ende, el número de pasos del proceso de purificación es menor. Ciertas especies de *Lactococcus* y *Corynebacterium*, utilizadas también en la industria alimenticia, parecen prometedoras como hospederos³⁻⁶. Algunas especies de bacilos o estreptomicetos secretan naturalmente grandes cantidades de enzimas

hidrolíticas y en los últimos años han sido investigadas para la producción secretoria de proteínas heterólogas⁷⁻⁹.

Los estreptomicetos se conocen por producir más de la mitad de 10 000 compuestos bioactivos documentados y se consideran una reserva de productos naturales¹⁰⁻¹³. El género *Streptomyces* ha sido de interés a la investigación académica por producir dos tercios de los antibióticos obtenidos por vía natural y una amplia gama de metabolitos con actividad antifúngica, antitumoral, antihelmíntica o herbicidas, entre otros^{11,13}. Además, varias especies de este género secretan eficientemente proteínas y enzimas extracelulares, dentro de las que se destacan celulasas, amilasas, xilanasas, proteasas, endonucleasas de restricción y lipasas¹².

Debido a la gran diversidad de biomoléculas que secreta el género *Streptomyces* también ha sido de interés a la industria; y por más de 50 años se han comercializado fundamentalmente antibióticos y enzimas extracelulares producidas por estas bacterias^{12,14}. Como resultado de los años de experimentación se dispone de experiencia en la optimización de las fermentaciones de *Streptomyces* para incrementar los rendimientos de las biomoléculas de interés,^{12,14}.

Entre los *Streptomyces*, *Streptomyces lividans* es el que ha sido generalmente utilizado para la expresión de genes¹³; y en los últimos años, su capacidad natural de secretar proteínas – tales como xilanasas (A, B y C), quitinasa, endoglucanasas (A y B), β -galactosidasa, esterasa, entre otras- ha sido evaluada para la obtención de proteínas recombinantes^{7,14-16}. *S. lividans* no posee un extenso sistema de restricción-modificación al ADN foráneo, no se ha informado sobre la ocurrencia de cuerpos de inclusión en su citoplasma y es considerado un organismo no patógeno a humanos (nivel de contención 1)¹³. Particularmente, el derivado *S. lividans* TK24 ha sido frecuentemente utilizado ya que posee relativamente baja actividad de proteasas extracelulares, las cuales pueden afectar la integridad y los rendimientos de las proteínas^{12,14}.

Cuando se ha utilizado a *S. lividans* para la producción de proteínas recombinantes, la estrategia ha sido fusionar el gen de interés a la secuencia señal de una proteína homóloga abundantemente secretada a través de la vía de secreción Sec^{12,14}. Uno de los ejemplos más sobresalientes ha sido la obtención del factor α de necrosis tumoral murino (mTNF α) a niveles de 300 mg l⁻¹ de sobrenadante de cultivo (SN) cuando se utilizaron las señales reguladoras y de secreción del inhibidor de subtilisina de *Streptomyces venezuelae* CBS762.70 (Vsi)¹⁷. Posteriormente, el mTNF α fue secretado entre 200 y 300 mg l⁻¹ al medio de cultivo cuando la cepa recombinante fue crecida en el caldo TSB a escala piloto¹⁸. Esta citocina fue purificada

en su forma trimérica nativa a partir de *Streptomyces* y fue significativamente más activa que la forma dimérica obtenida a partir de *E. coli*¹⁸. Actualmente el mTNF α es comercializado por *Minotech Biotechnology* (Creta, Grecia). Este resultado sugiere que las señales reguladoras y de secreción del *vsi* pueden ser eficientes en dirigir la expresión y translocación de otras proteínas heterólogas en *S. lividans* TK24.

En general, los estreptomicetos tienen gran potencial como fuente de nuevas proteínas extracelulares y, por consiguiente, de nuevas señales reguladoras y de secreción para ser evaluadas en la expresión de proteínas de interés biofarmacéutico. Particularmente, algunas especies del género *Streptomyces* con conocidas por secretar abundantemente enzimas lipolíticas, de las cuales no se ha informado sobre la utilización de sus señales de secreción para dirigir la translocación de proteínas heterólogas en *S. lividans*. Por lo antes expuesto, es atractivo evaluar el péptido señal de una lipasa, como el de la lipasa A de *Streptomyces exfoliatus* M11^{19,20} (LipA), para dirigir la translocación de proteínas de interés en *S. lividans*.

Recientemente se informó sobre la funcionalidad del proceso de translocación “*twin-arginine*” (Tat) en *S. lividans* TK24; que, a diferencia del proceso Sec, secreta proteínas de variadas dimensiones que han adquirido algún grado de estructura terciaria en el citoplasma²¹. Este proceso de secreción fue recientemente evaluado para la expresión del factor α de necrosis tumoral humano (hTNF α) y la interleucina 10 humana (IL-10) en *S. lividans* TK24. Ambas proteínas fueron fusionadas, por separado, al péptido señal de la xilanasas C de *S. lividans* (XlnC-sp) o al de la tirosinasa de *Streptomyces antibioticus* (MelC1-sp). La xilanasas C y la tirosinasa son únicamente translocadas a través del proceso Tat, puesto que su secreción se bloqueó en mutantes de *S. lividans* TK24 en los genes *tatB* y *tatC*^{21,22}. El hTNF α y la IL-10 se secretaron a través de la vía Tat en *S. lividans*, pero los rendimientos fueron menores comparados con los obtenidos por la vía Sec, cuando las dos proteínas se fusionaron por separado al péptido señal del Vsi (Vsi-sp)²³.

El péptido señal de MelC1 también ha sido utilizado para dirigir la translocación del TNF α humano²⁴, la fofatasa alcalina de *E. coli*²⁴, la linfotóxina humana²⁴ y la calcitoína de salmón²⁵ antes de que se informara que la proteína nativa es secretada exclusivamente a través de la vía Tat en *Streptomyces*. Particularmente, la calcitoína de salmón fue obtenida a niveles de 30 mg l⁻¹ cuando la cepa recombinante fue cultivada en el medio de la caseína en un fermentador²⁵. Este péptido fue recobrado con una actividad y conformación equivalente al estándar sintético.

En el año 2006, Widdick y cols aportaron evidencias sobre la utilización del proceso Tat como una vía general de secreción de proteínas en *Streptomyces coelicolor*²⁶ y desarrollaron un

sistema de búsqueda de proteínas secretadas exclusivamente por la vía Tat que empleó la agarasa de *S. coelicolor* como proteína reportera de la secreción Tat. Cerca del 30% de las proteínas secretadas por *S. coelicolor* fueron identificadas como sustratos translocados únicamente por la vía Tat²⁶. Esta ruta puede, como consecuencia, ser una alternativa valiosa para la secreción de proteínas “incompatibles con el sistema Sec” en *Streptomyces*.

La optimización del medio de cultivo y de los parámetros de la fermentación ha sido una alternativa muy utilizada para incrementar los rendimientos de las proteínas nativas y heterólogas producidas por *S. lividans*^{8,18,27}. Particularmente, el incremento de la osmolaridad del medio de cultivo ha sido efectivo para aumentar los rendimientos de varias enzimas expresadas por *S. lividans*^{27,28}. Ali y cols reportaron que al incrementar la osmolaridad del medio de cultivo hubo cambios en el super-enrollamiento negativo del ADN e incrementos significativos de las cantidades de las enzimas expresadas²⁸. En ese estudio, al medio de cultivo TSB completo (TSB suplementado con extracto de levadura) se le adicionaron los osmolitos sacarosa (BTSB)²⁹ o NaCl²⁸. DeSanti y cols reportaron niveles de 2 mg l⁻¹ de endostatina humana secretada por *S. lividans* cuando fue cultivado en caldo TSB completo suplementado con sacarosa, los cuales fueron similares a las cantidades de otras proteínas de origen humano secretadas por *S. lividans*^{14,30}. Epicum y cols también reportaron un incremento significativo en las cantidades de tres β -lactamasas secretadas por *S. lividans* cuando las cepas recombinantes fueron cultivadas en presencia de sacarosa²⁷.

Para estudiar la secreción de proteínas heterólogas a través de las vías Sec y Tat en *S. lividans* TK24, se analizaron las propiedades terapéuticas y las fuentes de obtención del interferón α 2b humano (IFN α 2b) y la estreptoquinasa de *Streptococcus equisimilis* (SKC). El IFN α 2b ha sido utilizado satisfactoriamente en el tratamiento de hepatitis B y C, papilomatosis respiratoria, esclerosis múltiple, condilomas, conjuntivitis hemorrágica, esquizofrenia y otras enfermedades, incluyendo 14 tipos de cáncer³¹⁻³³. La SKC fue la primera droga introducida como terapia para el infarto agudo del miocardio hace más de 40 años³⁴ y es un agente fibrinolítico de elección, principalmente en países en vías de desarrollo. Actualmente forma parte de la Lista Modelo de los Medicamentos Esenciales propuesta por la Organización Mundial de la Salud³⁵.

La obtención por vía recombinante de estas dos biomoléculas ha sido extensamente investigada considerando, en ambos casos, las limitaciones de obtención a partir de la fuente natural. El IFN α 2b es una proteína secretada naturalmente por los leucocitos humanos, mientras que la SKC es secretada por *Streptococcus equisimilis* al medio de cultivo a bajos niveles. Esta bacteria grampositiva secreta varias toxinas al medio extracelular que son

potencialmente inmunogénicas en humanos. Por ello, la producción comercial actual de la SKC a partir de su fuente natural requiere de condiciones estrictas de bioseguridad y un control de calidad riguroso del producto manufacturado^{35,36}.

En Cuba se reportó la expresión del IFN α 2b en *E. coli* por primera vez por Silva y cols en 1988³⁷. Posteriormente se informó la expresión a altos niveles de la estreptoquinasa mutante SKC-2 por Estrada y cols³⁸. Desde hace varios años estas dos proteínas se producen en Cuba como productos recombinantes obtenidos a partir de *E. coli*. Sin embargo, ambas moléculas se acumulan inactivas en cuerpos de inclusión en el citoplasma, lo cual tiene la desventaja de requerir procesos de extracción y renaturalización para la solubilización y el repliegamiento adecuado de las proteínas³⁹⁻⁴¹. Durante el proceso de renaturalización ocurren pérdidas considerables, como en el caso del IFN α 2b que se reportan mermas del 50%³⁹. Del material que se recupera del proceso de renaturalización se pueden obtener moléculas acetiladas, con aminoácidos oxidados, con una metionina en el extremo amino, agregados moleculares y en el caso del IFN α 2b con cisteínas parcial o completamente reducidas o con puentes disulfuro malformados. Algunas de estas especies moleculares tienen baja actividad específica y pueden ser responsables de reacciones adversas e inmunogénicas⁴⁰.

Para facilitar el recobrado del IFN 2α b se ha estudiado su expresión secretoria en *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae*^{42,43}. *B. subtilis* expresó el IFN α 2b fusionado al péptido señal de la α amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* con rendimientos entre 0,5 y 1 mg l⁻¹ y una actividad antiviral semejante al IFN α 2b nativo (10⁸ UI l⁻¹)⁴². Niveles similares de actividad antiviral fueron obtenidos cuando el IFN α 2b se fusionó a su péptido señal nativo o a un híbrido compuesto por los péptidos señales del interferón alfa 1 y 2 y se utilizó a *S. cerevisiae* como hospedero. En este caso, se detectó heterogeneidad en el extremo amino del IFN α 2b⁴³. En el caso de la SKC, su expresión secretoria ha sido estudiada extensamente en varios hospederos bacterianos y en las levaduras *Pichia pastoris* y *Schizosaccharomyces pombe*. El gen *skc* de *S. equisimilis* H46A fue inicialmente clonado en *E. coli*⁴⁴ y se han informado varias estrategias para incrementar la productividad de la SKC como su fusión a péptidos señales de proteínas secretadas en *E. coli*⁴⁵⁻⁴⁹. *B. subtilis* también fue utilizado como hospedero para la expresión secretoria de la SKC y los mejores resultados se obtuvieron con la cepa WB600, deficiente en seis proteasas extracelulares⁵⁰. *Lactococcus lactis* fue otro hospedero bacteriano utilizado para la obtención de la SKC, pero esta fue degradada por proteasas del hospedero a productos inactivos⁵¹. Cuando *P. pastoris* fue utilizada como hospedero, la SKC fue secretada al medio de cultivo pero fue modificada post-traduccionalmente por N-glicosilación⁵². En *S. pombe*, se reportó la expresión secretoria de la SKC sin modificaciones

por glicosilación o degradación significativa. Sin embargo, la SKC solamente se secretó al periplasma⁵³. La secreción de la estreptoquinasa SKC-2 de *Streptococcus equisimilis* ATCC9542 ha sido estudiada en *E. coli* y *P. pastoris*^{45,54-56}. Los rendimientos de la SKC-2 alcanzaron hasta 5 000 UI ml⁻¹ cuando dicha proteína fue fusionada a la secuencia señal *ompA* de *E. coli*. Sin embargo, cerca del 95% de la SKC-2 fue secretada principalmente al periplasma de *E. coli*⁴⁵. Estrada y cols ensayaron la expresión extracelular de la SKC-2 en *P. pastoris*, pero la proteína fue modificada por glicosilación⁵⁶. Por lo antes reportado se justifica la búsqueda de un nuevo hospedero para la expresión secretoria de la estreptoquinasa.

S. lividans es una bacteria grampositiva que secreta directamente las proteínas al medio extracelular y ha sido satisfactoriamente utilizada para la expresión de proteínas de origen eucariota^{14,18,25,57} y procariota^{8,15,58} correctamente plegadas, no glicosiladas y bioactivas en el medio de cultivo. Ello ha simplificado el recobrado de la proteína de interés.

Teniendo en consideración lo antes expuesto y que en Cuba hay disponibilidad de sistemas analíticos establecidos para la detección, cuantificación y caracterización de las proteínas IFN α 2b y la SKC-2, la **hipótesis** de este trabajo fue la siguiente:

“*Streptomyces lividans* TK24 secreta al medio extracelular el interferón alfa 2b o la estreptoquinasa SKC-2 biológicamente activos, cuando los expresa fusionados al péptido señal del inhibidor de la subtilisina de *S. venezuelae*, de la lipasa A de *S. exfoliatus* M11 o de la xilanasas C de *S. lividans*”.

Para probar o refutar la hipótesis se planteó el siguiente **Objetivo general**:

Evaluar si *Streptomyces lividans* TK24 transformado con plasmidios que codifican proteínas de fusión entre el péptido señal del inhibidor de la subtilisina de *S. venezuelae*, de la lipasa A de *S. exfoliatus* M11 o de la xilanasas C de *S. lividans* y el interferón alfa 2b o la estreptoquinasa SKC-2 secreta las biomoléculas en estado biológico activo.

Objetivos específicos

1. Obtener cepas de *S. lividans* TK24 transformadas con plasmidios replicativos que codifiquen para proteínas de fusión entre cada péptido señal y interferón alfa 2b o a la SKC-2.

Tareas:

- 1.1 Construcción de plasmidios replicativos que codifiquen para el IFN α 2b fusionado al:
 - a) péptido señal del inhibidor de subtilisina de *S. venezuelae* CBS762.70
 - b) péptido señal de la xilanasas C de *S. lividans*
 - c) péptido señal de la lipasa A de *S. exfoliatus* M11.
- 1.2 Construcción de plasmidios replicativos que codifiquen para la SKC-2 fusionada al:

- a) péptido señal del inhibidor de subtilisina de *S. venezuelae* CBS762.70
- b) péptido señal de la xilanasa C de *S. lividans*
- c) péptido señal de la lipasa A de *S. exfoliatus* M11.

Transformación de *S. lividans* TK24 con cada plasmidio obtenido por separado.

2. Evaluar si las cepas de *S. lividans* TK24 recombinantes secretan al cultivo el interferón alfa 2b o la estreptoquinasa SKC-2 y si las biomoléculas secretadas son biológicamente activas.

Tareas:

- 2.1 Inmunodetección por *Western blotting* e inmunocuantificación por ELISA del producto génico IFN α 2b o SKC-2 expresado por la cepa recombinante crecida en zaranda en el medio de cultivo BTSB.
- 2.2 Cuantificación de la actividad biológica antiviral del IFN α 2b expresado por *S. lividans* TK24 en las condiciones indicadas en 2.1.
- 2.3 Detección por zimografía de la actividad amidolítica de la SKC-2 expresada por *S. lividans* TK24 en las condiciones indicadas en 2.1.
3. Purificar las proteínas IFN α 2b o SKC-2, si alguna de ellas se secreta al medio de cultivo en forma biológicamente activa y alcanza una concentración $\geq 2,0 \text{ mg l}^{-1}$

Tareas:

- 3.1 Inmunocuantificación por ELISA e Inmunodetección por *Western blotting* del IFN α 2b o la SKC-2 expresado por la cepa recombinante crecida en zaranda en los medios de cultivo BTSB, TSB y en el medio de la caseína.
- 3.2 Purificación del IFN α 2b o la SKC-2 mediante técnicas cromatográficas convencionales.
- 3.3 Análisis físico, químico y biológico del producto purificado mediante espectrofotometría UV, secuenciación del extremo amino y actividad biológica.
- 3.4 Evaluación del potencial de *S. lividans* para la expresión del IFN α 2b o la SKC-2 mediante su cultivo en un fermentador a escala de banco.

Novedad científica

Este trabajo de tesis informa por primera vez a la comunidad científica:

1. La secreción del interferón alfa 2b humano biológicamente activo al medio extracelular en *Streptomyces lividans*.
2. La secreción de la estreptoquinasa SKC-2 de *Streptococcus equisimilis* ATCC9542 biológicamente activa al medio extracelular en *Streptomyces lividans*.
3. La purificación de la estreptoquinasa SKC-2 de *Streptococcus equisimilis* ATCC9542 bioactiva a partir del medio de cultivo de *Streptomyces lividans*.

4. La utilización del péptido señal de la lipasa A de *Streptomyces exfoliatus* M11 para promover la secreción de proteínas heterólogas al medio extracelular de *Streptomyces lividans*.

Importancia teórica

1. Se demuestra que el péptido señal de la lipasa A de *Streptomyces exfoliatus* M11 promueve la translocación de proteínas a través de un proceso no dependiente de la vía Tat en *Streptomyces lividans*.
2. El conjunto de técnicas empleadas constituye un aporte metodológico al estudio de la secreción de proteínas heterólogas por *Streptomyces lividans* en Cuba.

Importancia práctica

Al fusionar la SKC-2 al péptido señal del inhibidor de subtilisina de *Streptomyces venezuelae* CBS762.70, ésta fue secretada por *Streptomyces lividans* al medio de cultivo en cantidades que permitieron purificarla a escala de laboratorio y caracterizar satisfactoriamente su actividad biológica. El incremento en las cantidades de la SKC-2 cuando la cepa recombinante fue crecida en un fermentador a escala de banco muestra el potencial que tiene su optimización para la obtención soluble de la estreptoquinasa SKC-2. En consecuencia, este sistema puede servir de punto de partida para el establecimiento de una producción a mayor escala. La estreptoquinasa es el más económico de los trombolíticos empleados actualmente y si se lograra un proceso de producción más seguro al personal productor o más sencillo pudiera bajar el costo de su producción y llegar a ser más accesible a los pacientes que la necesiten.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fisiología y genética de *Streptomyces*

El género *Streptomyces* pertenece al orden *Actinomycetales*, los cuales fueron considerados por mucho tiempo un grupo inusual de hongos. Análisis químicos y de microscopía electrónica revelaron que ellos son realmente bacterias grampositivas procariotas. Los estreptomicetos son únicos dentro de las bacterias considerando su ciclo de vida a partir de la germinación de una espora y la consiguiente formación de micelio, lo cual involucra una compleja regulación de la expresión génica. En medio agarizado (Figura 1A, 1B) las colonias de *Streptomyces* están altamente diferenciadas. La parte más baja de la colonia consiste de hifas de micelio vegetativo sustrato ramificado que penetran en el medio y su superficie está cubierta de hifas aéreas que se forman utilizando nutrientes primarios procedentes de la hidrólisis del micelio sustrato más viejo. El estado final del desarrollo es la conversión de micelio aéreo en esporas (Figura 1C) y esto ocurre en la parte más alta del micelio aéreo, donde se forman septos. Finalmente estas esporas pueden dispersarse y restaurar el ciclo de vida⁵⁹.

Durante su crecimiento, los estreptomicetos no sólo adaptan su morfología celular diferenciada, sino también experimentan cambios dramáticos en el metabolismo celular. Por ello, la diferenciación celular y sus mecanismos regulatorios se han convertido en un tema de investigación en progreso. La secreción de una amplia variedad de metabolitos secundarios ocurre de manera coordinada con cambios de morfología del micelio sustrato al micelio aéreo. Ejemplos tipos son *S. lividans* y *S. coelicolor* que producen micelio aéreo rojo y esporas pimentadas en azul como consecuencia de la producción de los metabolitos secundarios undecilprodigiosina y actinorrodina, respectivamente (Figura 1A, 1B)⁶⁰.

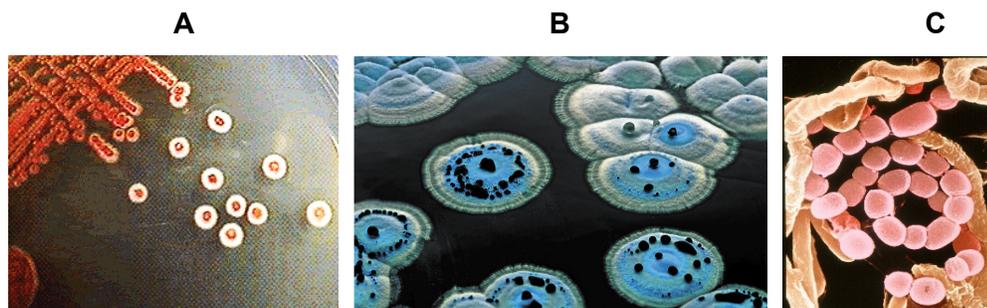


Figura 1. (A) Vista panorámica de la morfología de las colonias de *S. lividans* 66 y (B) de *S. coelicolor* A3(2), incluyendo el antibiótico actinorrodina, de color azul, secretado en el medio y en la superficie hidrofóbica de la colonia como gotas azules. (C) Micelio aéreo y esporas de *S. coelicolor* A3(2)⁶⁰.

Los miembros de este género producen gran cantidad de metabolitos secundarios, lo cual hace de estos microorganismos uno de los grupos más importantes para la industria biofarmacéutica. Alrededor de dos tercios de los antibióticos conocidos son sintetizados por

los estreptomicetos⁶¹. Además, la producción de agentes farmacológicamente activos como medicamentos antitumorales, inmunosupresores y anti-infecciosos han establecido un importante papel en la biotecnología. Se considera que los *Streptomyces* están excepcionalmente concebidos para la “guerra bioquímica” ya que pueden eliminar competidores como las bacterias y los hongos en los ecosistemas del suelo⁶⁰. Ellos también son una fuente de herbicidas⁶² y enzimas industrialmente importantes utilizadas en la alimentación⁶³ y en la industria del papel⁶⁴.

Adicionalmente, los *Streptomyces* exhiben una versatilidad nutricional basada en su capacidad de degradar materiales orgánicos complejos en el medio ambiente. La mayoría de ellos son biopolímeros insolubles de origen animal o vegetal. En correspondencia, se han identificado una amplia variedad de enzimas extracelulares como: celulasas, amilasas, hemicelulasas y xilanasas, las cuales hidrolizan proteínas y carbohidratos complejos^{12,65}. En los últimos años se ha informado que algunas especies del género *Streptomyces* producen enzimas lipolíticas⁶⁶, como es el caso de *S. exfoliatus* M11 que secreta abundantemente la lipasa A de 28 kDa al medio extracelular por intermedio de un péptido señal (LipA-sp)^{19,20}. Los *Streptomyces* también secretan enzimas proteolíticas e inhibidores enzimáticos en grandes cantidades al medio extracelular¹². Por todas estas propiedades, los *Streptomyces* son considerados un sistema crucial para el ecosistema del suelo.

El interés de la biotecnología y otras ramas en los estreptomicetos hacen de ellos blancos para la Ingeniería Genética. *S. coelicolor* A3(2) es el estreptomiceto modelo para el estudio de la síntesis de antibióticos y diferenciación y es el miembro genéticamente mejor estudiado del género¹¹. Con la disponibilidad de la secuencia de su genoma en el año 2001, se conoció que este microorganismo tiene un cromosoma lineal grande con un origen de replicación localizado en el centro (*oriC*) y en ambos extremos largas regiones invertidas⁶⁷. La mayoría de los genes esenciales y de mantenimiento están localizados en la región central del cromosoma, mientras que los “brazos” del cromosoma contienen genes de mayor variabilidad. El análisis de este genoma de 8 667 507 pb, el cual fue físicamente mapeado¹³, mostró 7825 posibles genes, de los cuales muchos están probablemente relacionados con su estilo de vida de sobrevivir y competir en el ambiente del suelo. El mismo es casi dos veces más grande que el genoma de *E. coli* y de *B. subtilis*⁶⁷. Por lo demás, el ADN de *S. coelicolor* tiene un alto contenido de G+C de 72,12%, el cual es característico de todos los genomas de los actinomicetos⁶⁷. En el año 2003, la secuencia de un segundo genoma de *Streptomyces* se hizo pública: *Streptomyces avermitilis*. Este contiene una región central similar a *S. coelicolor*, pero brazos casi completamente diferentes que probablemente han evolucionado

independientemente⁶⁸. Recientemente, se informó sobre la secuencia del genoma de *Streptomyces griseus* IFO 13350 que produce el antibiótico antituberculoso estreptomina⁶⁹. El cromosoma lineal consiste de 8 545 929 pb con un contenido de G+C de 72,2% y posee 7 138 marcos de lectura abiertos. Al compararlo con los otros dos genomas de *Streptomyces* secuenciados se evidenció la existencia de 24 proteínas específicas de *Streptomyces*.

2.2 Translocación de proteínas en bacterias

El proceso de translocación de proteínas a través de las membranas hidrofóbicas es esencial para las células. Los sistemas de transporte, los cuales actúan en un modo co- o post-traducciona, han evolucionado y aseguran la localización de las proteínas desde el citoplasma a su lugar de acción, incluyendo las membranas citoplasmáticas, la pared celular o el ambiente extracelular. Este transporte activo de proteínas a su destino final es denominado secreción de proteínas. Debido a las diferencias en la organización de la pared celular, el paso de proteínas secretadas ocurre a través de diferentes grupos de mecanismos de transporte en las bacterias.

En las bacterias grampositivas, las proteínas pueden ser translocadas hacia o a través de la membrana citoplasmática, mediante una ruta de translocación dependiente de una extensión en su extremo amino denominada péptido señal. Además de esta ruta de secreción se ha descrito otro proceso de translocación activa, el cual se ha denominado proceso tipo I o de casete de unión a ATP (ABC, por sus siglas en inglés, *ATP-binding cassette-pathway*)⁷⁰.

En las bacterias gramnegativas, las proteínas se pueden insertar en o pasar a través de la membrana interna y ser liberadas en el periplasma a través de las rutas de translocación dependiente de péptido señal⁷⁰. En los sistemas de secreción tipo II y tipo VI, el tránsito a través de la membrana externa ocurre por la formación de un poro por determinadas proteínas de membrana interna y externa (tipo II) o por la región carboxilo terminal del sustrato (tipo VI). La secreción tipo II es el proceso principal para la secreción de proteínas extracelulares por la bacteria⁷⁰. El sistema de secreción tipo VI comprende un grupo de auto-transportadores, los cuales forman un poro en la membrana externa a través del cual pasa el dominio "pasajero". El subsiguiente corte auto-proteolítico de la región carboxilo terminal libera la proteína en el medio extracelular. Para el proceso de secreción "two-partner" (tipo V), el dominio "pasajero" y el dominio formador del poro son dos proteínas separadas. Otro proceso de secreción para el transporte de proteínas a través de la membrana externa es el sistema tipo IV. La maquinaria de secreción del sistema tipo IV consiste de un canal y un *pilus* para la asociación con la célula receptora. Sin embargo, además del transporte dependiente de péptido señal a través de la membrana interna, algunos sustratos tipo IV pueden también

ser transportados independientemente de péptidos señales en un paso a través de la membrana interna y externa⁷⁰. Además, las proteínas que no tienen péptido señal pueden ser transportadas mediante los mecanismos de secreción tipo I o tipo III. La secreción tipo I secreta proteínas directamente a través de la membrana bacteriana en el medio extracelular sin una parada periplasmática⁷¹. El sistema de secreción tipo III (T3S) permite a la bacteria gramnegativa, en proximidad cercana con la célula eucariota hospedera, inyectar proteínas directamente desde su citoplasma hasta el citosol de las células blanco⁷².

2.2.1 Señales de translocación

En bacterias, la mayoría de las proteínas son translocadas a través de la membrana citoplasmática mediante el proceso II, del cual sólo se han informado dos tipos: el proceso Sec y el proceso de translocación “*twin-arginine*” (Tat). La característica fundamental de las proteínas transportadas a través del proceso II es que son sintetizadas en el citoplasma con un péptido señal removible por su extremo amino. En general, los péptidos señales muestran muy poca similitud en la secuencia aminoacídica. Sin embargo, se distinguen tres dominios separados: un dominio amino denominado N, un dominio H central y un dominio C carboxilo (Anexo 1)⁷³.

El **dominio N** tiene generalmente una carga neta positiva debido a la presencia de varios residuos de aminoácidos Lys o Arg. La sustitución de estos aminoácidos cargados positivamente por residuos cargados negativamente reduce significativamente la translocación del precursor. Los residuos cargados positivamente probablemente aumentan la secreción de las proteínas por la unión a la superficie cargada negativamente de la bicapa lipídica de las membranas citoplasmáticas⁷⁴. Además, se considera que las cargas positivas de la región N orientan al péptido señal dentro de la bicapa lipídica⁷⁵.

El **dominio H** constituye el centro hidrofóbico del péptido señal y es la parte más importante requerida para la localización e inserción de la pre-proteína en la membrana. Esto se ha ilustrado a través del incremento en la hidrofobicidad de este dominio, lo cual puede compensar mutaciones realizadas en otras regiones del péptido señal⁷⁶. Los residuos en el dominio H tienden a formar una α hélice. Frecuentemente, un residuo interruptor de hélices (Gly o Pro) se encuentra en el medio de la región H, lo cual permite al péptido señal formar una estructura tipo horquilla que se puede insertar en la bicapa lipídica. El péptido señal probablemente se inserta en la membrana citoplasmática desenrollando esta horquilla⁷⁴.

El **dominio C** incluye el sitio de corte de la peptidasa señal (SPase) y es la única región del péptido señal que demanda cierta especificidad de la secuencia primaria de los aminoácidos. El análisis estadístico de los residuos de aminoácidos cercanos al sitio de corte de la SPase

ha dado lugar a la regla denominada (-3 -1), donde los residuos en las posiciones -3 y -1, relativos a la proteína madura, generalmente son residuos pequeños y neutros como: Ala, Gly, Ser y Thr con una fuerte preferencia por Ala (Ala-X-Ala)⁷⁷. En contraste, las posiciones -2 pueden ser ocupadas por casi cualquier aminoácido, aunque la presencia de Met en esa posición es muy rara⁷⁸. Los residuos que interrumpen estructuras secundarias como Pro o Gly aparecen frecuentemente en la posición -6, definiendo la transición de la región H hidrofóbica al dominio C⁷⁵.

Los péptidos señales bacterianos pueden variar significativamente en longitud entre diferentes especies⁷⁹. Los péptidos señales de *Streptomyces* tienen un promedio de $35,5 \pm 7,9$ aminoácidos, mientras la longitud promedio de los péptidos señales de otras bacterias grampositivas es $29,2 \pm 5,6$ y los de las bacterias gramnegativas es $23,6 \pm 3,4$ aminoácidos⁸⁰.

2.2.2. Procesos de translocación Sec y Tat en bacterias

2.2.2.1 Sistema de secreción Sec en bacterias

La mayoría de las proteínas transportadas a través de la membrana interna de las bacterias gramnegativas son translocadas a través del proceso Sec. La característica distintiva del aparato Sec es que las proteínas son secretadas en una conformación extendida y se unen frecuentemente a chaperonas. En *E. coli*, el aparato Sec consiste de la proteína SecA de membrana y del complejo proteico SecYEGDF. También tiene un papel importante la proteína SecB que reconoce a la proteína precursora, la mantiene en una conformación no plegada y competente para la translocación y promueve su interacción con SecA, la cual reconoce el péptido señal del precursor, su región madura no plegada y a SecB⁸¹. SecA tiene actividad ATPasa e interacciona con los fosfolípidos de la membrana y con la translocasa hexamérica, la cual consiste de SecY, E, G, D, F y YajC. El dominio SecYE es suficiente para que al unirse a SecA se active la translocasa, pero una translocación eficiente requiere de SecG y de miembros del operón *secD* (SecD, SecF y YajC)⁸¹. La translocasa media la secreción de precursores a través de la membrana utilizando ATP y la fuerza motriz transportadora de protones. SecA puede alternar entre formas de proteína periférica e integral de membrana durante la translocación⁸².

Además de las proteínas Sec, las chaperonas pueden interactuar con las moléculas precursoras. Ellas interactúan con conformaciones no plegadas de los precursores para evitar la agregación de la nueva proteína. Estas interacciones tienen un papel importante en mantener a los precursores en una forma competente para la secreción y en el plegamiento de la proteína en su estructura nativa. Las proteínas de inducción por estrés térmico de las familias GroE y DnaK actúan como chaperonas moleculares y asisten en el plegamiento de

los nuevos polipéptidos sintetizados. La sobre-expresión y co-expresión regulada de los operones *groE* y *dnaK* puede aumentar la producción de una proteína en *E. coli*⁸³.

La localización hacia el translocón Sec ocurre en un modo post-traducciona, con la intervención de las chaperonas, o a través del proceso que utiliza la Partícula de Reconocimiento de Señal SRP (por sus siglas en inglés, *Signal Recognition Particle*), como se ilustra en la Figura 2. El sistema SRP es esencial y bien conservado en todas las bacterias conocidas. En ninguna bacteria grampositiva, que su secuencia genómica se haya completado, se ha encontrado un homólogo de SecB que sustente la translocación post-traducciona; lo cual sugiere un papel importante del sistema SRP y que puede ser capaz de sustituir la deficiencia de SecB en la translocación de proteínas en bacterias grampositivas⁸⁴. Se considera que la hidrofobicidad de las pre-proteínas es la determinante primaria para su reconocimiento por las chaperonas o la SRP.

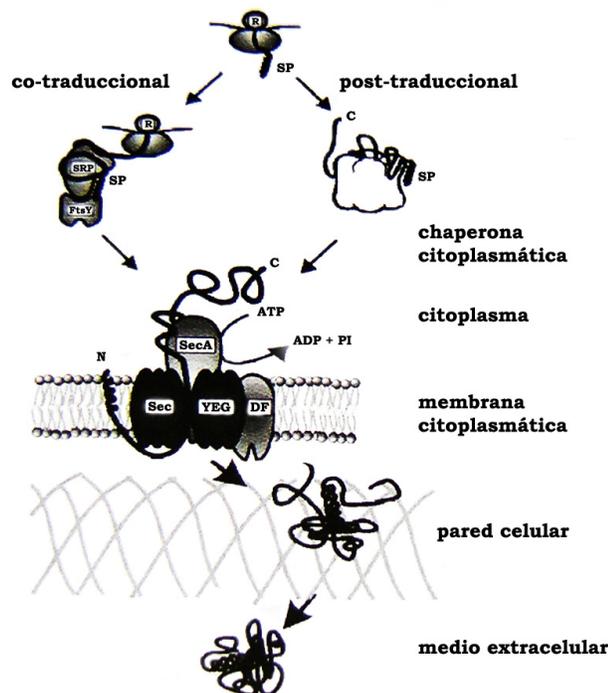


Figura 2. Secreción de proteínas a través del proceso Sec en bacterias grampositivas. Las proteínas pueden ser translocadas co-traducciona hacia el translocón Sec por el proceso SRP o post-traducciona mediante chaperonas. La maquinaria Sec está integrada por el motor SecA y el complejo SecYEG que forma un canal en la membrana (adaptado de Tjalsma y cols)⁷³.

Homólogos de SecA, SecY, SecE, SecD y SecF se han encontrado en *Streptomyces*. SecG no ha sido reportado en *Streptomyces* pero se supone que una proteína homóloga a dicho factor debe existir⁸⁵. Un profundo análisis de la secuencia genómica de *S. coelicolor* reveló la ausencia del gen *secB* y en *S. lividans* parece estar ausente también⁸⁶.

Los genes que codifican para los componentes de la SRP de *S. lividans* se clonaron y se caracterizaron recientemente. La SRP en *S. lividans* está integrada por Ffh -un homólogo de la proteína 54SRP de mamíferos-, por un ARN de talla pequeña (82 nucleótidos) y por el receptor FtsY, el cual tiene homología con el receptor de SRP de mamíferos. En un estudio

posterior se demostró que el receptor FtSY estaba asociado con la SRP en el citoplasma de *S. lividans* y que estaba involucrado en la translocación de proteínas⁸⁶. Se realizaron varios intentos para obtener mutantes en algunos de los genes correspondientes al sistema SRP y los intentos fueron fallidos, lo cual sugirió la posible naturaleza esencial de los componentes del sistema SRP en *S. lividans*⁸⁷.

2.2.2.2 Sistema de secreción Tat en bacterias

Hace varios años se descubrió un proceso alternativo de secreción, dependiente de péptido señal, para el transporte de las proteínas a través de la membrana citoplasmática en procariontes, el cual es similar al sistema de importación dependiente de ΔpH en las membranas de los tilacoides de los cloroplastos y se denominó proceso Tat (del inglés, *Twin arginine translocation*)⁸⁸. La característica fundamental del transporte Tat es que exporta proteínas de variadas dimensiones que ya adquirieron algún grado de estructura terciaria en el citoplasma previo a la secreción por asociación con cofactores. La estructura general de estos péptidos señales es similar a los utilizados para transportar proteínas por el proceso Sec, pero se diferencian fundamentalmente en que contienen una secuencia consenso S/T-R-R-x-F-L-K en la vecindad de la regiones N y H. Estudios de mutagénesis en esta secuencia consenso en *E. coli* han esclarecido que la primera Arg puede ser sustituida por una Lys, y la segunda Arg puede ser sustituida por Gln o Asn, así como por Lys con variada eficiencia^{89,90}. La sustitución de los dos residuos de Arg por Lys bloqueó completamente la secreción Tat. La región H de los péptidos señales Tat es marcadamente menos hidrofóbica que la de los péptidos señales Sec, como consecuencia de la presencia de más residuos de glicinas y treonina⁹¹. Los péptidos señales Tat frecuentemente contienen un residuo básico en la región C que es muy raro en los péptidos señales Sec y que puede servir como una secuencia motivo efectiva para evitar los componentes del sistema Sec⁹¹. En general, en *E. coli*, los péptidos señales Tat son más largos que los péptidos señales Sec con una longitud promedio de 38 aminoácidos contra 24 de los péptidos Sec, debido a la región N extendida⁹¹.

En adición a los péptidos señales Tat, hay señales dentro de la proteína madura que parecen afectar su transporte. Un análisis reciente de los péptidos señales de *E. coli* reveló que la selectividad del sistema Tat está influenciada por la carga neta de la región C junto con el amino terminal de la proteína madura. De esta forma una carga neta de +2 o mayor resultó en especificidad para el sistema Tat⁹².

Los componentes mínimos de la translocasa Tat de *E. coli* son TatA, TatB y TatC, los cuales están ensamblados en la membrana^{93,94}. TatA y TatB son proteínas que tienen estructuras similares pero tienen diferentes funciones. El conocimiento actual del proceso Tat en *E. coli*

es aún limitado y la manera en que estos componentes actúan juntos para transportar proteínas plegadas a través de la membrana interna todavía se está investigando. Uno de los primeros eventos que ocurre es la interacción de la membrana con las pre-proteínas. Esta interacción se estabiliza por contribuciones de las fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas, seguido de la difusión lateral de la pre-proteína a través de la superficie de la membrana buscando el translocón Tat⁹⁵. El paso posterior es el reconocimiento del péptido señal Tat por las interacciones proteína-proteína con la translocasa. Evidencias recientes sugieren que las subunidades TatA y TatC forman el sitio inicial de unión al péptido señal y específicamente TatC contiene probablemente el sitio de unión primario al péptido señal Tat, ya que se han encontrado evidencias de que complejos que contienen sólo TatC son capaces de interactuar con los péptidos señales Tat⁹⁶.

Por otro lado, se ha sugerido que la translocasa Tat de *E. coli* monitorea el estado de plegamiento de los sustratos Tat antes de su translocación. Se ha propuesto un modelo en el cual después de la unión del péptido señal a TatC, el dominio maduro del sustrato es llevado en estrecha proximidad a TatB y el dominio citoplasmático de TatB puede detectar el estado plegado del precursor. De esta manera, el sistema Tat puede discriminar conformaciones plegadas de las incorrectamente plegadas y en consecuencia decide cual transporte debe continuar o cual debe ser abortado. El fundamento de este modelo procede de estudios recientes de unión cruzada que mostraron una interacción proteína-proteína entre la porción madura de una pre-proteína (dependiente de Tat) y TatB, sin la intervención de los otros componentes del sistema Tat⁹⁷.

El tamaño del complejo TatABC se ha estimado en 130 Å en su dimensión más grande, pero se considera pequeño para formar un canal y acomodar el tránsito de todas las proteínas plegadas⁹⁸. Por ello se cree que subunidades o complejos adicionales de TatA se reclutan hacia el complejo primario TatABC en un paso dependiente de la energía de la fuerza motriz protónica⁹⁷. Evidencias estructurales como la presencia de grandes complejos oligoméricos de TatA en la membrana de *E. coli* sugieren que TatA forma el canal que conduce la proteína⁹⁹.

Hace pocos años, tres genes que codifican para TatA, TatB y TatC fueron identificados en el genoma de *S. lividans*, basados en las proteínas homólogas Tat de *E. coli*. Este hallazgo diferenció estructuralmente el proceso Tat de *Streptomyces* de la generalidad de las bacterias grampositivas que sólo tienen dos tipos de componentes Tat. Inicialmente se determinó que los genes *tatA* y *tatC* en *S. lividans* están organizados en una estructura agrupada y *tatB* forma una unidad transcripcional independiente²¹. La funcionalidad del proceso de secreción

Tat en *Streptomyces* se demostró inicialmente cuando el transporte de la tirosinasa de *S. antibioticus* fue bloqueado en una cepa de *S. lividans* con una delección en el gen *tatC*²¹.

Las proteínas TatA y TatB están relacionadas por secuencia, tienen una estructura común y son individualmente prescindibles, mientras que TatC es muy hidrofóbica y esencial para la secreción Tat en *Streptomyces*. La caracterización inicial del proceso Tat en *S. lividans* reveló una localización dual de TatA y TatB como proteínas solubles y asociadas a la membrana, por lo que el sistema de transporte Tat en *Streptomyces* puede ser diferente del proceso Tat de *E. coli*, donde no se ha detectado ningún componente soluble¹⁰⁰. TatA y TatB participan en el transporte de la pre-proteína hacia la translocasa y también en la translocación a través de la membrana citoplasmática. Los componentes TatA y TatB solubles se encontraron como heterodímeros TatAB en el citoplasma y ambos componentes solubles mostraron afinidad similar para unirse a dos pre-proteínas (XlnC y MelC1). Por otra parte, los complejos TatAB solubles tienen afinidad exclusivamente por TatC, la cual es la única proteína con localización de membrana del aparato Tat y por ello se le ha asignado un papel esencial para la inserción de TatAB en la membrana¹⁰¹.

Una característica distintiva del sistema Tat de *Streptomyces* fue el hallazgo de que TatA y TatB solubles se unían preferentemente a los péptidos señales Tat antes de su interacción con la translocasa Tat, lo que indicó que TatC no es el sitio de reconocimiento primario para las pre-proteínas dependientes de Tat como lo es en *E. coli*¹⁰¹. El sitio de reconocimiento inicial para la unión de TatAB soluble está probablemente situado en el motivo “*twin-arginine*”¹⁰¹.

Un resultado importante se obtuvo cuando se estudió la afinidad de unión de una pre-proteína típica dependiente del sistema Sec a los componentes TatA/B solubles de *Streptomyces* y se encontraron interacciones subóptimas en un rango entre 100 y 1000 veces menos afines que las encontradas para las pre-proteínas dependientes de Tat. Estas observaciones evidenciaron que TatA/B se unen preferentemente a sustratos dependientes de Tat. De esta manera, a pesar de que los péptidos señales Tat tienen una estructura similar tripartita semejante a los péptidos señales Sec, el sistema Tat parece que evita interacciones con los sustratos Sec¹⁰¹.

Experimentos *in vitro* evidenciaron la unión de los sustratos Tat a TatA, localizada en la membrana, lo cual sugiere que TatA desempeña un papel principal en la formación del canal de translocación Tat en *S. lividans*¹⁰¹. De Keersmaeker propuso un modelo para el sistema Tat en *Streptomyces* que se ilustra en la Figura 3. En dicho modelo, el complejo TatAB soluble lleva el sustrato directamente hacia TatC, que se encuentra embebido en la

membrana y media la inserción del complejo Tat-precursor en la membrana. Posteriormente, después de la reorganización de los componentes Tat en la membrana citoplasmática, el complejo Tat-precursor recluta complejos adicionales TatA o TatAB para formar un sistema de translocación funcional que contiene a TatABC. Esta asociación puede ser temporal y concluye una vez que el sustrato es translocado¹⁰².

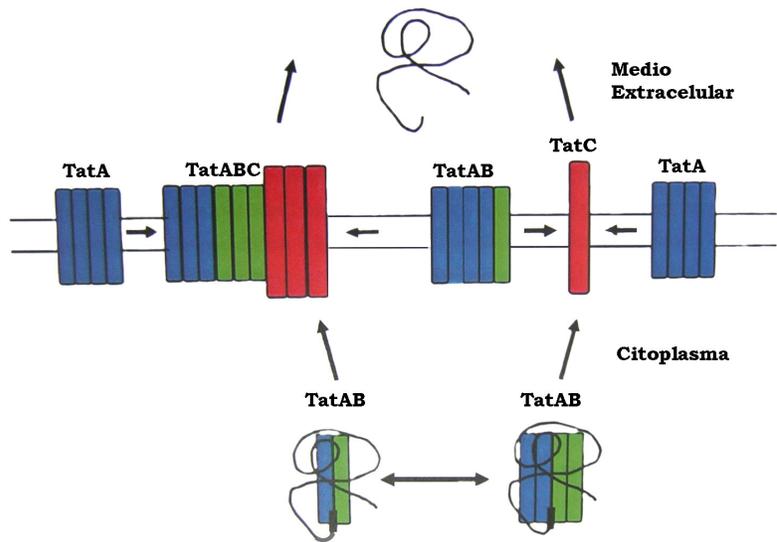


Figura 3. Modelo de translocación del sistema Tat en *S. lividans*. TatA y TatB como heterodímeros o heterooligómeros, se unen a los péptidos señales para reclutar los sustratos para la translocasa. TatC, como monómero o parte del complejo TatABC, es el sitio más probable de inserción del complejo TatAB-sustrato. Con el reclutamiento de complejos adicionales TatA o TatAB se forma una translocasa TatABC activa. Las proteínas TatA, TatB y TatC aparecen en azul, verde y rojo, respectivamente. El péptido señal "twin arginine" de los sustratos Tat es indicado por un rectángulo negro. Tomado de De Keersmaecker y modificado por el autor¹⁰².

En un estudio reciente se identificaron 27 proteínas secretadas exclusivamente por la vía Tat en *S. coelicolor* utilizando a la agarasa de *S. coelicolor* como proteína reportera de la translocación Tat. Este número representó el 30% de todas las proteínas detectadas en la pared celular e informó que el sistema Tat es una ruta general de translocación de proteínas en *Streptomyces*²⁶. Las proteínas identificadas representaron un amplio rango de clases funcionales. Algunas se predice que están involucradas en el metabolismo de carbohidratos, fosfatos, lípidos, polímeros, transporte de nutrientes y metabolismo secundario²⁶. Estas evidencias destacan el potencial que tiene el sistema Tat en *Streptomyces* para la producción de proteínas heterólogas.

2.2.3 Componentes que intervienen en eventos post-traduccionales

2.2.3.1 Peptidasas señales

Las peptidasas señales (SPases) cortan los péptidos señales de las proteínas pre-secretadas durante o momentos antes de su translocación. Solamente después, la parte madura de las proteínas secretadas pueden ser liberada al ambiente extracelular¹⁰³. En todas las bacterias estudiadas, este tipo de SPases (tipo I) son esenciales para la viabilidad celular. La eliminación de las SPases conlleva a la acumulación de proteínas precursoras en la membrana citoplasmática y posteriormente, a la muerte celular^{104,105}. *S. lividans* contiene al menos cuatro SPases tipo I: SipW, X, Y, Z¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. SipY es la SPase que desempeña el papel

más importante en el procesamiento de las pre-proteínas y su deficiencia puede ser compensada con alguna de las otras SPases¹⁰⁹.

2.2.3.2 Enzimas que asisten en el plegamiento de las proteínas

El plegamiento de las proteínas maduras en su estado nativo es realizado por las oxidoreductasas tiol/disulfuro (proteínas Dsb), las isomerasas de enlaces disulfuro (proteínas PDI) y las peptidil propil *cis/trans* isomerasas (PPlases). Las proteínas Dsb y las PDI son las responsables de la formación, plegamiento e isomerización de los enlaces disulfuro, mientras que las proteínas PPlases catalizan la isomerización de los enlaces X-prolina. En *E. coli*, se han reportado seis óxidoreductasas: DsbA-E y DsbG¹¹⁰.

La formación de los puentes disulfuro es un proceso esencial para la actividad y estabilidad de muchas proteínas, los cuales se forman generalmente en el periplasma debido a que el citoplasma es mantenido en un ambiente muy reductor¹¹⁰. En *Streptomyces* no se ha examinado todavía las enzimas que intervienen en el plegamiento de proteínas producidas por la maquinaria celular. Sin embargo, los *Streptomyces* secretan numerosas proteínas que poseen puentes disulfuro entre las que se encuentra el inhibidor tendamistat de *S. tendae*, que tiene dos puentes disulfuro y exhibe un comportamiento de plegamiento de dos estados que no se ha informado en otra proteína que contenga dos puentes disulfuro¹¹¹. Las lipasas y las esterases secretadas por *Streptomyces* frecuentemente contienen uno o dos residuos de cisteínas cerca de otro residuo de cisteína involucrados en la formación de puentes disulfuro^{112,113}. También se ha descrito que los inhibidores de subtilisina, los cuales se secretan a altos niveles en *Streptomyces*, tienen cuatro residuos de cisteínas conservados involucrados en la formación de dos puentes disulfuro¹¹⁴.

El ambiente reductor del citoplasma bacteriano es mantenido por el sistema de las tioredoxinas, el cual está integrado por la reductasa de tioredoxina TrxR y el sustrato de la proteína tioredoxina activa redox Trx, que se encuentra desde las bacterias hasta los humanos. La tioredoxina reducida es la reductasa principal de puentes disulfuro celular y sirve como un donante de electrones para enzimas específicas del metabolismo primario. Además del sistema clásico tioredoxina-tioredoxina reductasa, la mayoría de los organismos vivos poseen un sistema de glutatión y coexisten ambos sistemas redox en el citoplasma celular¹¹⁵. Se ha informado que los estreptomicetos no sintetizan glutatión y el estado tiol-disulfuro de las proteínas es mantenido por las tioredoxinas. Recientemente, se clonaron los genes *trxA* y *trxR* y se caracterizaron parcialmente las correspondientes proteínas de *S. coelicolor*, ya que puede servir como modelo para estudiar el sistema tioredoxina¹¹⁵.

2.3 *Streptomyces* como hospedero para la producción de proteínas heterólogas

En *Streptomyces*, como en otros sistemas hospederos, una expresión y secreción eficiente requiere de una sucesión de eventos coordinados. A continuación se describen los factores y elementos moleculares más importantes que pueden influir en la producción secretoria de proteínas en *Streptomyces*.

2.3.1 Elección de la cepa hospedera

A pesar de que *S. coelicolor* A3(2) es la especie mejor caracterizada desde el punto de vista genético dentro del género; la especie *S. lividans* 66 ha sido más utilizada para la expresión génica debido a que no posee un extenso sistema de restricción-modificación¹¹⁶. *S. lividans* es considerado un organismo no patógeno a humanos (nivel de contención 1)¹³ y particularmente el derivado *S. lividans* TK24 secreta relativamente bajas cantidades de proteasas extracelulares, las cuales pueden afectar los rendimientos de las proteínas secretadas^{117,118}. Existen pocos reportes de la utilización de otras cepas de *Streptomyces* como hospedero de proteínas heterólogas¹².

2.3.2 Vectores de clonación

Los vectores de clonación en *Streptomyces* pueden dividirse en dos clases: los plasmidios replicativos y los integrativos. Vectores de bajo número de copias por célula, basados en el replicon SLP1.2, así como derivados del plasmidio pIJ101, de alto número de copias, se han utilizado en la clonación de genes y casetes de expresión-secreción. El plasmidio pIJ702, derivado de pIJ101, se mantiene establemente en la célula entre 40 y 300 copias, aún en la ausencia de la presión selectiva del marcador de selección¹¹⁶. El marcador de selección utilizado preferentemente ha sido el gen de resistencia a tioestreptona de *S. azureus*. El origen de replicación de pIJ101 también ha servido para la construcción de vectores bifuncionales *Streptomyces* - *E. coli*, los cuales simplifican apreciablemente la construcción de plasmidios, aunque se han descrito ocasionalmente como inestables en *S. lividans*¹³.

2.3.3 Elección del promotor

En *Streptomyces* se han descrito dos clases de promotores: los promotores consensos de *E. coli*, reconocidos por las ARN polimerasas de *E. coli* como la dependiente del factor σ^{70} , y los promotores que no tienen las regiones típicas conservadas -10 y -35¹¹⁹. Los estreptomicetos contiene varios factores σ para formar diferentes holoenzimas ARN polimerasas, las cuales reconocen específicamente promotores regulados. El sitio de inicio de la transcripción de genes en los estreptomicetos generalmente comienza entre 9 y 345 nucleótidos cadena arriba de la región codificante¹²⁰.

Para la expresión de genes homólogos en *S. lividans* algunas veces el promotor nativo fue reemplazado por otro con propósitos de optimización. Por ejemplo, la cantidad extracelular de α -amilasa de *S. griseus* se incrementó dieciséis veces cuando se reemplazó el promotor nativo por el promotor *saf* de *S. griseus*¹²¹. En el caso de genes heterólogos, el promotor nativo fue generalmente reemplazado por un promotor eficiente de *Streptomyces* como el promotor *aph* (gen de la aminoglucósido fosfotransferasa de *S. fradiae*), el promotor *ermEp** (promotor mutante del gen de resistencia a eritromicina de *Saccharopolyspora erythraea*), el promotor *saf*, el promotor *vsi* o el promotor de la β -galactosidasa de *S. lividans*¹². Solamente en pocos estudios se ha comparado el efecto de varios promotores para dirigir la expresión de un gen heterólogo específico. Chang y Chang reportaron un incremento de cuatro veces en la producción del hTNF α cuando el promotor *ermEp** fue utilizado en lugar del promotor *aph*²⁴. En un estudio realizado por Van Mellaert y cols se comparó la eficiencia del promotor *vsi* con los promotores *aph* de *S. fradiae* y *ermEp** de *S. erythraea* en iniciar la transcripción del gen de la neomicina de *S. fradiae* ATCC1074. El promotor *vsi* tuvo una capacidad de inicio de la transcripción 1,5 y 1,9 veces mayor que los promotores *aph* y *ermEp**, respectivamente¹¹⁴. Los promotores regulados son de gran interés para la expresión de genes heterólogos debido a que ellos pueden contribuir a una expresión génica más controlada. En *Streptomyces*, estos promotores están usualmente involucrados en la biosíntesis de antibióticos, lo cual está generalmente asociado al metabolismo secundario. A pesar de que estos promotores parecen estar estrictamente regulados, no son apropiados para controlar la expresión génica heteróloga debido a la ausencia de un inductor bien establecido, dificultad en lograr cultivos homogéneos en la fase estacionaria y alta actividad de proteasas asociadas con la etapa del metabolismo secundario¹²². Los promotores regulables que más atención han recibido son el promotor inducible por tioestreptona *tipA*¹²³ y el promotor *gal-P1* inducible por galactosa¹²⁴.

2.3.4 Terminadores de la transcripción

En general, los terminadores de la transcripción de *Streptomyces* son semejantes a los encontrados en bacterias y contienen secuencias repetidas invertidas largas e imperfectas con potencial para formar estructuras de horquillas. Ellos son similares a los terminadores *rho* no dependientes de *E. coli* pero generalmente carecen de secuencias típicas ricas en timidina. La presencia de un terminador de la transcripción puede contribuir a la estabilidad del ARNm y como consecuencia, al rendimiento final de la proteína¹². Pulido y Jiménez mostraron que la inserción del terminador de la transcripción *aph* cadena abajo del gen *ifn α 2b* conllevó un aumento de cuatro veces en el rendimiento de la expresión intracelular del interferón¹²⁵. Sin embargo, no se obtuvo ese efecto en el caso de la producción del

tendamistat utilizando el mismo terminador¹²⁶. En el caso de la producción de péptidos heterólogos como proteínas de fusión con el gen *ssi* (*Streptomyces subtilisin inhibitor*) de *S. albogriseolus*, la remoción de uno de los dos terminadores tuvo un efecto positivo sobre la producción de la proteína de fusión en *S. lividans*^{127,128}. El efecto de un terminador sobre los rendimientos de producción depende del gen específico, por lo que se recomienda ensayarlo experimentalmente.

2.3.5 Sitio de unión al ribosoma

La secuencia Shine-Dalgarno (SD) o RBS (por sus siglas en inglés, *R*ibosome *B*inding *S*ite) de *Streptomyces* fue identificada por Strohl (a/g-G-G-A-G-G) con una localización de 5 a 12 nucleótidos cadena arriba del codón de inicio de la traducción (ATG/GTG)¹¹⁹. Las secuencias RBS de *Streptomyces* no requieren un alto grado de complementariedad con el ARNr 16S (5-CUGGAUCACCUCCUUCU-3')¹²⁹. Algunos genes de *Streptomyces*, que codifican para proteínas secretadas, contienen secuencias señales largas con dos codones de inicio de la traducción, cada uno antecedido por un motivo SD. Cuando dichas señales se usaron para dirigir la síntesis de la xilanasa A, los rendimientos aumentaron entre 1,5 a 2,5 veces. Esto fue explicado por el uso concomitante de dos RBS consecutivos¹³⁰.

2.3.6 Uso de codones

Debido a que los estreptomicetos tienen un genoma con alto contenido de GC, el uso de codones se caracteriza por el uso preferencial de estos dos nucleótidos en la tercera posición¹³¹, lo cual está reflejado en las moléculas de ARNt presentes en las células. Como consecuencia, este uso de codones puede influir en el nivel de traducción de un gen heterólogo con menor contenido de GC. Se han informado varios estudios relacionados con el efecto de cambios en codones minoritarios de genes heterólogos para adaptarlos al uso de codones de *Streptomyces*. Dentro de estos estudios se destaca el informado por Lammertyn y cols, en el que se cambiaron cinco codones minoritarios consecutivos en la región 5' del gen *mtnf α* por codones de uso preferenciado en *Streptomyces*. Los niveles de expresión del mTNF α disminuyeron y se encontró una fuerte correlación entre la cantidad de ARNm y los rendimientos de la proteína secretada¹³².

2.3.7 Péptido señal

El alto contenido de GC del genoma de *Streptomyces* tiene efectos sobre la composición de la región N de los péptidos señales. Debido a que los codones que codifican para Arg son más ricos en GC que los de Lys, la Arg es usada preferentemente en los péptidos señales de *Streptomyces*, los cuales tienen una carga neta promedio de +3,5. Este valor es mayor que el de los péptidos señales de las bacterias grampositivas (+2,9) o de los de *E. coli* (+2)⁷⁹.

La fusión de un péptido señal a una proteína constituye una unidad de translocación única que ha sido utilizada como herramienta molecular para optimizar los rendimientos de las proteínas secretadas. En este sentido, se obtuvieron mayores rendimientos de mTNF α cuando el gen *mtnf α* fue fusionado a la secuencia señal de *vsi* (*vsi-ss*) (300 mg l⁻¹) que cuando fue fusionado a la secuencia señal de la α -amilasa (1-10 mg l⁻¹), manteniendo el mismo promotor y las otras regiones reguladoras intactas^{17,133}. Pagé y cols analizaron la secreción de la xilanasasa A (XlnA) en *S. lividans* cuando el gen *xlnA* fue fusionado a seis secuencias señales de proteínas nativas de *Streptomyces* y se obtuvo una amplia variación de la producción de la XlnA¹³⁴.

La mutagénesis de las secuencias señales también ha sido una estrategia utilizada para aumentar el rendimiento de las proteínas sintetizadas. Este fue el caso de la mutagénesis realizada en la región amino del péptido señal del inhibidor de subtilisina de *S. venezuelae* CBS762.70, que cuando se disminuyó la carga neta positiva de esa región de +3 (proteína salvaje) a +2 se obtuvo un incremento de 2 a 10 veces en la cantidad del mTNF α secretado¹⁷.

2.3.8 Sitio de corte de la peptidasa señal

Varios autores utilizaron como estrategia la inserción de un péptido espaciador entre el péptido señal y la proteína madura de interés con el objetivo de favorecer el corte preciso del péptido señal por las SPases de *Streptomyces*. Fornwald y cols insertaron una secuencia pequeña entre el sitio de corte de las SPases y el extremo amino de un derivado D1D2 de CD4, debido a que el extremo amino de esa proteína tenía varios residuos Lys; los cuales probablemente interfirieron en la remoción del péptido señal. Las cantidades de D1D2, con el extremo amino nativo, constituyeron solo el 5% en comparación cuando se utilizó el péptido espaciador¹³⁵.

Se ha descrito que cuando ciertos aminoácidos se localizan en o cerca del extremo amino de las proteínas pueden bloquear o reducir considerablemente la eficiencia de las SPases y se han obtenido bajas cantidades de las proteínas secretadas. El ejemplo más representativo lo constituye las cisteínas involucradas en la formación de puentes disulfuro^{136,137}. Se ha informado que las cisteínas pueden causar impedimento estérico a las SPases y por ende, afectar el corte proteolítico y la subsiguiente liberación de la proteína madura. En ese caso, la eficiencia de la remoción del péptido señal fue mejorada mediante la inserción de un péptido espaciador de tres o seis aminoácidos que probablemente proporcionó una estructura más flexible entre el péptido señal y el extremo amino de la proteína madura. Esta práctica fue favorable para la secreción de las proteínas interleucina-7 (IL-7), el factor de células

indiferenciadas (SCF) y la eritropoietina humana (EPO), las cuales tienen enlaces disulfuro que involucran al segundo, cuarto y séptimo aminoácido de la proteína, respectivamente^{136,137}.

2.3.9 Condiciones de cultivo y proteasas del hospedero

Varios estudios han informado sobre diferencias significativas en los patrones de las proteínas nativas o heterólogas secretadas por *S. lividans* cuando fue crecido en diferentes fuentes de carbono y condiciones de cultivo. Estos hallazgos han indicado que las condiciones de crecimiento ejercen regulación sobre los genes de las proteínas secretadas o de los genes de los procesos de secreción en *Streptomyces*, lo cual no ha sido informado en *E. coli*¹³⁸⁻¹⁴². Además, se ha reportado la ocurrencia de cambios morfológicos en *S. lividans* cuando fue crecido en medio líquido en la presencia de altas concentraciones de glucosa o fructuosa¹⁴³. Parro y Mellado informaron sobre el efecto represor de la glucosa (5%) sobre la secreción de la agarasa de *S. coelicolor*, el cual afectó más a nivel de la secreción que en la transcripción. Además, en la presencia de glucosa la secreción general de las proteasas disminuyó considerablemente en *S. lividans* y *S. coelicolor*¹⁴⁰. En un reporte posterior, Isiegas y cols observaron un efecto represor de la glucosa (5%) sobre la secreción de la β -lactamasa TEM de *E. coli* cuando fue fusionada al péptido señal de la agarasa de *S. lividans*, lo cual fue revertido cuando la cepa recombinante fue cultivada en concentraciones limitantes de fosfato¹⁴⁴.

En *S. lividans* se estudió los niveles de los ARNm de los genes *sec* en función de la temperatura de crecimiento y la concentración de la fuente de carbono utilizada: glucosa y xilano¹⁴⁵. En presencia de glucosa, las xilanasas y las celulasas no son producidas normalmente por *S. lividans*, lo cual indicó una fuerte represión catabólica de la glucosa sobre la expresión de los genes relacionados¹⁴⁶. Para ambos sustratos, los niveles de ARNm de *secA*, *secD*, *secE*, *secF* y *secY* dependieron de la fase de crecimiento y se transcribieron activamente durante el proceso de diferenciación celular. Además, los niveles de expresión de los genes *sec* fueron entre 1,5 y 2 veces mayores en presencia de xilano que de glucosa, lo cual indicó que *S. lividans* era capaz de incrementar sus niveles de expresión en respuesta a la demanda de enzimas extracelulares para degradar el xilano. Por otra parte, no dependieron de temperaturas entre 28 y 40°C.

El incremento de la osmolaridad del medio de cultivo ha sido utilizado para aumentar los rendimientos de varias enzimas expresadas por *S. lividans*^{27,28}. En un estudio informado por Ali y cols, el incremento de la osmolaridad del medio de cultivo fue correlacionado con cambios en el super-enrollamiento negativo del ADN y el incremento de las cantidades de las enzimas reporteras luciferasa y kanamicina fosfotransferasa del transposon Tn5²⁸. Como

osmolitos fueron utilizados la sacarosa y el NaCl²⁸. Epicum y cols también reportaron un incremento significativo en las cantidades de tres β -lactamasas homólogas secretadas por *S. lividans* cuando las cepas recombinantes fueron cultivadas en presencia de 34% de sacarosa²⁷. DeSanti y cols reportaron niveles de 2 mg l⁻¹ de endostatina humana secretada por *S. lividans* cuando fue cultivado en caldo TSB completo suplementado con sacarosa³⁰. Como en otras bacterias, el rendimiento de las proteínas heterólogas expresadas por cepas recombinantes de *S. lividans* es, en ocasiones, afectado por la acción de las proteasas del hospedero¹⁴⁷. La actividad de las proteasas extracelulares de *S. lividans* fue inicialmente descrita por Aretz y cols¹¹⁸. En ese estudio se identificaron cuatro endopeptidasas y tres aminopeptidasas. Otro componente importante identificado de la actividad proteolítica extracelular de *S. lividans* fue una tripeptidilaminopeptidasa denominada Tap que remueve tripéptidos como APA, APM y APS de los extremos aminos de las proteínas^{148,149}. El gen *tap* fue deletado del cromosoma de *S. lividans* 66 y se obtuvo la cepa mutante con capacidad disminuida de remover tripéptidos del extremo amino de las proteínas¹⁵⁰. La utilización de este tipo de cepas como hospederos heterólogos forma parte de una tecnología patentada de Cangene (Canadá) denominada CANGENUS™, la cual produce fundamentalmente dos proteínas bioactivas, no glicosiladas y correctamente plegadas¹³⁶. Estas proteínas son la hormona de crecimiento humano, la cual fue aprobada recientemente por la FDA, y el factor estimulante de colonias de macrófagos-granulocitos. Ambas se comercializan actualmente bajo las marcas de Accretropin™ y Leucotropin™, respectivamente (<http://www.cangene.com/products-cangenus.htm>).

2.3.10 Aplicaciones y rendimientos de producción

Se han informado varios ejemplos sobresalientes de la expresión secretoria de proteínas de origen procarionte en *S. lividans*^{12,151}. El estudio más reciente describió la clonación del gen que codifica para la xiloglucanasa de *Jonesia* sp. (Xg) bajo el control del promotor y la secuencia señal del *vsj*. Xg fue secretada a altos niveles (100 - 150 mg l⁻¹) en *S. lividans*, a diferencia de hospederos como *E. coli* y *B. subtilis* en los cuales no se expresó la proteína. Este estudio demostró que *S. lividans* es capaz de secretar polipéptidos heterólogos de más de 100 kDa a través del mecanismo Sec⁸.

La secreción de proteínas eucariotas ha sido también evaluada a través de la vía Sec en *S. lividans*. Sin embargo, los rendimientos no han sido altos en todos los casos. Uno de los resultados más exitosos, sobrepasando los 300 mg l⁻¹, fueron obtenidos con un derivado D1D2 soluble del receptor CD4 de células T humanas cuando el gen correspondiente fue expresado bajo el control de las señales reguladoras y de secreción del gen del inhibidor de la

tripsina de *S. longisporus*¹³⁵. Rendimientos similares se obtuvieron cuando el mTNF α fue expresado bajo el control de las señales transcripcionales, traduccionales y de secreción del gen *vs1*¹⁷. En el caso del mTNF α , posteriormente se informó sobre su obtención a niveles entre 200 y 300 mg l⁻¹ cuando la cepa recombinante fue cultivada a escala piloto. Esta citocina fue recobrada en forma trimérica, semejante a la nativa, y fue significativamente más activa que la obtenida en forma dimérica a partir de *E. coli*¹⁸. En la actualidad, el mTNF α es comercializado por *Minotech Biotechnology* (Creta, Grecia).

Las características de las proteínas maduras son factores que pueden determinar su translocación. La hidrofobicidad de la interleucina 2 fue un factor decisivo en sus bajos rendimientos de secreción¹⁵². Con el mismo sistema, la hirudina fue secretada en mayores cantidades¹⁵³. La presencia de puentes disulfuro en la proteína tiene también impacto sobre su secreción. Haas-Lauterbach y cols estudiaron el efecto de las cisteínas sobre la secreción del tendamistat, el cual tiene cuatro cisteínas involucradas en la formación de dos puentes disulfuro secuenciales. La sustitución de una cisteína conllevó a la disminución de la producción del tendamistat, mientras que las dobles mutantes tuvieron un incremento entre 2 y 10 veces. En ese estudio se consideró que el grupo SH libre en las mutantes simples debió afectar el proceso de secreción al interferir con el plegamiento de la proteína y causar formación de dímeros¹⁵⁴.

La secreción de dos proteínas humanas fue investigada utilizando péptidos señales Tat en *S. lividans*. Las secuencias que codifican para las proteínas hTNF α e IL-10 fueron fusionadas, por separado, a las secuencias señales de *xInC* (*xInC-ss*) o de *meIC1*. Ambas proteínas fueron secretadas con un rendimiento de 1,6 mg l⁻¹ y 4,8 μ g l⁻¹, respectivamente. Sin embargo, en ambos casos los niveles de secreción fueron menores comparados con los obtenidos por la vía Sec, cuando las dos proteínas se fusionaron por separado al péptido señal del *Vsi*²³.

El péptido señal de *MeIC1* también ha sido utilizado para dirigir la secreción de las proteínas TNF α humano²⁴, linfotóxina humana²⁴, la fosfatasa alcalina de *E. coli*²⁴ y la calcitoína de salmón²⁵. Para la obtención de la calcitoína bioactiva fue necesario clonar el gen que codifica para la enzima α amidasa de rata (α -AE), fusionado a las señales de expresión y secreción de *meIC1*, en el mismo plasmidio que se clonó la calcitoína. La enzima α -AE es responsable del procesamiento post-traduccional por el extremo carboxilo de la calcitoína para su conversión en un producto bioactivo. La calcitoína fue producida a niveles de 30 mg l⁻¹ y fue purificada con una actividad y conformación equivalente a la proteína nativa y el estándar sintético²⁵.

2.4 Proteínas de interés biofarmacéutico

2.4.1 Interferón α 2b humano

En 1957 Isaacs y Lindenmann describieron un factor que confería la propiedad de interferencia viral y lo denominaron interferón (IFN)¹⁵⁵. En la clasificación más reciente de los interferones, estos fueron divididos en dos grandes subgrupos de acuerdo a su habilidad de unirse a varios tipos de receptores¹⁵⁶. Los interferones humanos tipo I incluyen al: IFN α , IFN β , IFN ω e IFN τ y se unen a un receptor de la superficie de las células, el cual consiste de dos proteínas trans-membranas: ifnar1¹⁵⁷ y ifnar2¹⁵⁸. Además son estables a pH ácido. Existen tres formas alélicas del gen *ifn α 2*: *ifn α 2a*, *ifn α 2b* y el *ifn α 2c*¹⁵⁹. Estas variantes génicas codifican proteínas maduras con 165 aminoácidos que difieren entre sí en la posición de 2 nucleótidos, que a su vez provocan cambios en la secuencia aminoacídica.

2.4.1.1 Estructura y propiedades físico-químicas del IFN α 2b

El IFN α 2b es un monómero formado por cinco hélices α unidas por un largo “bucle” (AB) y tres hélices de menor longitud: BC, CD y DE (Figura 4)¹⁶⁰. El IFN α 2b es una molécula compuesta por 165 aminoácidos y tiene cuatro cisteínas que forman dos puentes disulfuro intramoleculares entre las posiciones 1 y 98 y las posiciones 29 y 138, con punto isoeléctrico de 5.99. El puente Cys29-Cys138 es esencial para su actividad biológica, mientras el Cys1-Cys98 puede ser reducido sin afectar su actividad¹⁶¹. El IFN α 2b es uno de los subtipos glicosilados; pero se han acumulado evidencias de que la glicosilación no es un factor determinante en su actividad biológica¹⁶².

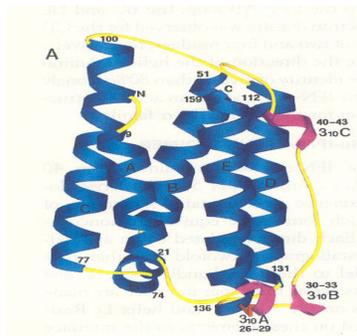


Figura 4. Estructura molecular del IFN α 2b. Las hélices α se colorearon en azul, las hélices 3₁₀ en magenta y los “bucles” en amarillo. Tomado de Walter y cols¹⁶⁰.

2.4.1.2 Mecanismo de acción y actividad biológica del IFN α 2b

Los interferones poseen un amplio espectro de actividades involucradas en complejas interacciones que básicamente pueden dividirse en tres grandes acciones protectoras: actividad antiviral, antiproliferativa y reguladora de la respuesta inmune³¹.

El mecanismo de acción de los interferones α y β se inicia con su unión al dominio extracelular del receptor superficial ifnar, constituido por dos subunidades: ifnar-1, de 110 kDa

y la ifnar-2, de 100 kDa¹⁵⁸ (Anexo 2). Las quinasas Tyk2 y JAK1 se expresan constitutivamente y están asociadas a las subunidades ifnar-1 e ifnar-2, respectivamente. La interacción de los interferones α y β con el receptor provoca la fosforilación de estas quinasas y la consecuente fosforilación de los dominios intracelulares de ambas subunidades del receptor¹⁶³. Estos residuos fosforilados sirven como sitio de reclutamiento de las proteínas transportadoras de señales y activadores transcripcionales STAT. Estas proteínas activadas forman homo y heterodímeros y componen finalmente un gran complejo activador transcripcional denominado factor génico 3 estimulado por interferón (ISGF3). Este complejo de proteínas está formado fundamentalmente por STAT1 α o p91, STAT1 β (variante molecular de STAT1 α , también llamada p84), STAT2 o p113 y una proteína adaptadora de unión a ADN de la familia de los factores regulados por interferón, la p48 (también llamada IRF9, ISGF3 γ) que funciona independiente de las modificaciones pos-traduccionales inducidas por los interferones α y β ¹⁶⁴. El complejo ISFG3 penetra en el núcleo celular y se une con alta afinidad a secuencias génicas específicas (AGTTTN₃TTTCC), llamadas elementos de respuesta estimulada por interferón (ISRE), activando la transcripción génica de numerosas proteínas efectoras^{164,165}.

El IFN α 2b humano fue el primer interferón obtenido en cantidades suficientes para su aplicación en humanos. Ha sido utilizado para tratar pacientes con las enfermedades virales más comunes producidas por virus de ARN (Dengue, Enterovirus, Coxsackie, enfermedades respiratorias), de ADN (Hepatitis B, Herpes simplex, Herpes zoster, Papilloma) y retrovirus (Virus HIV de la inmunodeficiencia humana). Su efecto antiviral se debe a su acción sobre las células, no sobre los virus, y es precisamente esta baja especificidad sobre los virus una ventaja terapéutica¹⁶⁶. El IFN α 2b también ha sido utilizado satisfactoriamente en oncología debido a su efecto antitumoral, el cual parece estar relacionado con una combinación directa antiproliferativa y efectos indirectos mediados por el sistema inmune. Las mayores indicaciones en oncología incluyen: carcinomas de células renales, sarcoma de kaposi asociado al SIDA, linfoma folicular, leucemia de células velludas y melanoma maligno crónico³¹. Además, se está aplicando en la enfermedad de Alzheimer¹⁶⁷, esclerosis múltiple¹⁶⁸ y en la enfermedad de Peyronié¹⁶⁹, entre otras.

2.4.1.3 Obtención de IFN α 2b en hospederos heterólogos

La tecnología del ADN recombinante ofreció una oportunidad única para producir grandes cantidades de interferones por una vía más económica que la producción a partir de los leucocitos u otras células infestadas con virus. Algunos grupos de investigadores aislaron los subtipos de interferón alfa mediante enfoques un tanto diferentes pero análogos¹⁷⁰⁻¹⁷².

El interferón es un medicamento genérico ampliamente comercializado como producto recombinante. En Cuba se expresó por primera vez en el año 1988 por Silva y cols³⁷. El gen *ifn α 2b* fue clonado bajo el control del promotor derecho del fado lambda pero la proteína fue obtenida a bajos niveles en *E. coli*³⁷. Posteriormente, se elevaron los niveles de expresión del IFN α 2b cuando el gen fue clonado bajo el control del promotor de la vía biosintética del triptófano y se utilizó el terminador de la transcripción del fago T4, lo cual permitió realizar un proceso de purificación rentable¹⁷³. A partir de esta construcción genética se ha desarrollado el proceso actual de obtención del IFN α 2b (Heberon alfa®) a partir de *E. coli* en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (La Habana, Cuba)^{39,174}. Sin embargo, el IFN α 2b precipita en agregados insolubles denominados cuerpos de inclusión que contienen a la proteína insoluble e inactiva³⁹, lo cual requiere de procesos de ruptura celular, extracción y renaturalización para la solubilización y el repliegamiento adecuado del IFN α 2b^{39,40}. Durante el proceso de extracción se reportan cuantiosas pérdidas (~50%)³⁹. Del material que se recupera del proceso de renaturalización se pueden obtener moléculas acetiladas, con una metionina en el extremo amino, con aminoácidos oxidados, con cisteínas parcial o completamente reducidas, con puentes disulfuro malformados o agregados moleculares. Algunas de estas especies moleculares tienen una baja actividad específica y pueden ser responsables de reacciones adversas e inmunogénicas⁴⁰.

La expresión intracelular del IFN α 2b también ha sido ensayada en otros sistemas heterólogos como *S. lividans*, *S. cerevisiae* y *P. pastoris*¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. Cuando el IFN α 2b fue expresado intracelularmente en *S. lividans* bajo el control del promotor de la fosfotransferasa de aminoglucósidos de *S. fradiae* (*aph*), la proteína fue obtenida soluble y biológicamente activa en el citoplasma, pero los niveles fueron bajos (10^6 UI l⁻¹)¹⁷⁵. Los niveles de expresión de IFN α 2b también fueron bajos cuando se expresó bajo el control del promotor de la fosfoglicerato quinasa en *S. cerevisiae* (2×10^6 IU mg⁻¹ proteína total)¹⁷⁶. En cambio, cuando se utilizó *P. pastoris* como hospedero y el promotor de la alcohol oxidasa, los niveles de expresión del IFN α 2b fueron mayores que en los dos casos anteriores (400 mg l⁻¹ de IFN α 2b), pero se obtuvo con el extremo amino bloqueado y modificado con grupos acetilo en un 70% del producto purificado, lo cual disminuyó su actividad específica¹⁷⁷.

Otra de las estrategias evaluadas fue expresar el IFN α 2b fusionado a un péptido señal que dirigiese su translocación hacia el medio extracelular. Los hospederos que se evaluaron con este propósito fueron *B. subtilis* y *S. cerevisiae*. En el caso de *B. subtilis*, en un primer reporte, el IFN α 2b fue fusionado mediante una secuencia espaciadora al péptido señal de la α

amilasa de *B. amyloliquefaciens* (*amy-ss*) y fue expresado en una cepa de *B. subtilis* con baja actividad de proteasas extracelulares. Se utilizaron dos tipos de secuencias espaciadoras: una que aportó seis aminoácidos en la fusión y mantuvo los cuatro primeros aminoácidos del extremo amino de la α amilasa (VNGT) y otra que sólo utilizó el aminoácido Ala para espaciar el IFN α 2b del péptido señal. La adición de los seis aminoácidos al extremo amino del IFN α 2b no afectó su actividad específica y los niveles de expresión secretoria oscilaron entre 0,5 y 1 mg l⁻¹ 42. En un estudio posterior, se comparó la cantidad de moléculas precursoras y procesadas de IFN α 2b acumuladas en el citoplasma de *B. subtilis* IH6140 respecto a la cantidad IFN α 2b secretado y se encontró grandes cantidades de IFN α 2b acumulado dentro de la célula (entre 30 y 40%)¹⁷⁸. Cuando se evaluó a *S. cerevisiae* como hospedero heterólogo para la expresión secretoria del IFN α 2b, este se fusionó al péptido señal nativo o a un híbrido de los péptidos señales de los interferones alfa 1 y 2. Los niveles de IFN α 2b fueron similares al IFN α 2b nativo (10⁸ UI l⁻¹); sin embargo, se detectó heterogeneidad en el extremo amino⁴³.

2.4.2 Estreptoquinasa

La estreptoquinasa (SKC) (EC 3.4.99.22) es una proteína extracelular no enzimática producida por estreptococos β hemolíticos a través del proceso de secreción Sec⁴¹ y es utilizada como agente fibrinolítico debido a su capacidad de activar de forma indirecta al plasminógeno (Plg), lo cual favorece su paso a plasmina, una serino proteasa responsable de la degradación de los coágulos de fibrina de la sangre¹⁷⁹. A comienzos de 1930, Lancefield diferenció los *Streptococcus* β -hemolíticos en grupos inmunológicos designados por las letras desde la A hasta la O a partir de análisis serológicos¹⁸⁰. Las principales fuentes de SKC han sido los *Streptococcus* β -hemolíticos de los grupos A, C y G de Lancefield. El grupo C ha sido preferentemente utilizado para la producción de estreptoquinasa pues carece de algunas toxinas eritrogénicas que son excretadas por los otros dos grupos¹⁸¹. La cepa H46A (ATCC12449) del grupo C, aislada de una fuente humana en 1945, se ha utilizado frecuentemente para la producción de SKC debido a que fue la más activa³⁶.

2.4.2.1 Estructura y propiedades físico-químicas de la SKC

La estreptoquinasa es una proteína monomérica, formada por una cadena polipeptídica de 414 aminoácidos sin puentes disulfuro⁴⁴. Tiene un peso molecular de 47,4 kDa, su actividad máxima es a pH 7,5 y su punto isoeléctrico es 4,7¹⁸². En su estructura no contiene cistina, cisteína, fósforo, carbohidratos conjugados ni lípidos y posee un coeficiente de extinción de 9,49¹⁸³.

El número de dominios de SKC es un aspecto que ha sido muy discutido. Los resultados de dispersión dinámica y dispersión de rayos X de pequeño ángulo sugieren la existencia de cuatro dominios compactos plegados separadamente y unidos por un segmento móvil de cadena proteica¹⁸⁴. Otros estudios de SKC y sus fragmentos proteolíticos por calorimetría diferencial de barrido (CDB), realizados por Radek y Castellino¹⁸⁵, Welfle y cols¹⁸⁶, Misselwitz y cols¹⁸⁷, sugieren la existencia de dos dominios estructurales a pH neutro y baja fuerza iónica. Estudios de CDB más recientes por Medved y cols¹⁸⁸, Welfle y cols¹⁸⁹ refieren la existencia de tres o cuatro transiciones de dos estados. Estudios de Resonancia Magnética nuclear y dicroísmo circular a pH 7 indicaron la existencia de tres dominios estructurales, los cuales se denominaron α , β y γ ¹⁹⁰⁻¹⁹².

La estructura cristalina del dominio catalítico de la plasmina humana acomplejada con la SKC fue determinada por Wang y cols¹⁹³. La SKC aparece en el complejo con tres dominios: α , β , y γ (comenzando por el extremo amino). Los dominios α y β contienen una hoja β de cinco cadenas β y una α hélice. El dominio γ tiene sólo cuatro cadenas β y tiene un segmento enrollado alrededor de la α hélice.

Recientemente se caracterizó la estructura de la estreptoquinasa mutante SKC-2 producida por *S. equisimilis* ATCC9542, la cual difiere en cinco residuos de aminoácidos respecto a la SKC de *S. equisimilis* HA46. Los residuos Ser71, Asn210, Arg244, Arg253 y Asp303 en el producto del gen *skc* están cambiados por Pro71, Thr210, His244, Glu253 y Asn303 en el producto del gen *skc-2*³⁸. Se determinó que a pH neutro o básico, la SKC-2 tiene cuatro dominios y que cambios suaves en las condiciones experimentales como: acidificación ligera o incremento de la concentración de NaCl disminuye el número de dominios. Los autores provisionalmente reportaron la localización de los cuatro dominios como sigue: Ile151–His 291 (T1 o dominio β), Ile 1–Lys 59 (T2 o dominio α 1), Leu292–Lys 414 (T3 o dominio γ) y Ser 80–Pro150 (T4 o dominio α 2)¹⁹⁴. En este estudio, la única discrepancia encontrada fue en los primeros 150 aminoácidos de la SKC-2, que se informaron como dos dominios separados a baja fuerza iónica y pH neutro o ligeramente básico. La localización de los dominios β y γ fue semejante al modelo de tres dominio de SKC defendido por Parrado y cols¹⁹² y Conejero-Lara y cols^{190,191,194}.

2.4.2.2 Mecanismo de acción de la SKC

La SKC por sí misma carece de actividad proteolítica. Es la unión de esta con el Plg en proporción 1:1 la que forma un complejo activador de alta afinidad, el cual no es afectado por la α -2-antiplasmina (Anexo 3). La α -2-antiplasmina es un inhibidor de la plasmina que forma un complejo irreversible con esta. El complejo SKC-Plg hidroliza el resto del Plg circulante a

nivel del enlace Arg561 - Val562 y lo transforma en plasmina. La SKC también aumenta la eficiencia catalítica de la plasmina¹⁹⁵.

Estudios recientes del mecanismo de acción de SKC han identificado las regiones de SKC que intervienen en la formación del complejo activador SKC-Plg y de la interacción entre el complejo activador y el Plg. De la región amino-terminal, que comprende los residuos del 1 al 59, se ha reportado que tiene baja afinidad por el Plg¹⁹⁶. Se han realizado estudios que sugirieron que el extremo amino podría constituir un dominio independiente, cuya función no está relacionada con el Plg. Dentro de estos estudios se incluyen la remoción de 15 aminoácidos del extremo amino de la SKC, la cual no afectó su actividad¹⁹⁷, o la obtención de una mutante por remoción de sus primeros trece aminoácidos que mantuvo su actividad intacta⁴⁶. Otros autores han planteado que la región amino de la SKC es importante para que esta ejerza su función. Lee y cols obtuvieron una mutante por remoción de los primeros veinte aminoácidos que sólo conservó un 4% de la actividad de la molécula intacta¹⁹⁸. Por otra parte, se ha reportado que la SKC sin los residuos 1-59 del extremo amino tiene una estructura secundaria inestable y que la región Asp41-His48 interviene en la unión al Plg¹⁹⁹, mientras que la función de la región adyacente a los residuos 48 al 59 todavía es discutida²⁰⁰. En contraste, el dominio carboxilo-terminal de la SKC (Leu294 – Lys386) desempeña un papel importante en el reconocimiento y activación del Plg^{201,202}. La región enrollada del dominio γ (Leu314 – Ala342) se considera esencial para la activación del Plg y las deleciones de los últimos 40 ó 41 residuos del extremo carboxilo de la SKC no afectaron su actividad amidolítica^{201,203-205}. El dominio β está involucrado en la formación del complejo SKC-Plg y es responsable de la activación del Plg²⁰⁶.

2.4.2.3 Ventajas y desventajas de la SKC

A pesar de ser la SKC el medicamento trombolítico más antiguo continúa siendo la droga de elección, particularmente en las economías pobres por el bajo costo relativo (US\$ 200 por tratamiento). Sus reacciones adversas están bien definidas y pueden ser clínicamente tratadas²⁰⁷. Por ello, es el trombolítico más prescrito aún para el tratamiento del infarto agudo del miocardio y, en términos de eficacia terapéutica, es más aceptada que la uroquinasa y el activador tisular del Plg. Estos dos últimos, a pesar de ser relativamente inertes inmunológicamente cuando se comparan con la SKC, poseen tiempos de vida media significativamente menores *in vivo* y son mucho más caros que la SKC²⁰⁸. La potencia trombolítica y la especificidad por la fibrina de los trombolíticos de última generación no ha sido la esperada, por lo que la búsqueda de nuevos agentes trombolíticos continúa³⁵.

2.4.2.4 Obtención de la SKC

En la producción industrial de SKC se continúan utilizando cepas parentales o mutantes de *S. equisimilis*. La productividad del proceso de obtención de la SKC se ha incrementado a niveles económicamente viables mediante la manipulación de las condiciones de fermentación. Sin embargo, debido a que *S. equisimilis* secreta diversas toxinas que dificultan el proceso de purificación (estreptodornasa, desoxirribonucleasas, estreptolisina O, hialuronidasa y proteasas) se han evaluado otros hospederos alternativos que permitan obtener mayores rendimientos y representen menos riesgos para los productores y los pacientes³⁵.

El gen *skc* de *S. equisimilis* H46A fue inicialmente clonado y expresado en *E. coli* utilizando las señales reguladoras nativas⁴⁴. La SKC fue detectada en el medio de cultivo en el orden de 0,15 a 1,82 mg l⁻¹, lo que sugirió la presencia de una secuencia señal que fue confirmada un año después²⁰⁹. En general, el hospedero heterólogo más estudiado ha sido *E. coli*^{44,210,211} y se han reportado altos niveles de expresión; pero en muchos casos, la proteína se acumuló en el citoplasma formando cuerpos de inclusión^{38,211,212}.

El primer ejemplo de la expresión a altos niveles de una estreptoquinasa recombinante en *E. coli* fue el informado por Estrada y cols en 1992. Ellos seleccionaron el gen que codifica para la proteína mutante SKC-2 y lo clonaron bajo el control del promotor de la ruta biosintética del triptófano. La SKC-2 representó el 25% de las proteínas totales de *E. coli* y se obtuvo con un rendimiento de 350 mg l⁻¹. La actividad específica de la SKC-2 purificada a muy alto grado de pureza fue 52 407 UI mg⁻¹³⁸. A partir de esta construcción genética se ha desarrollado el proceso actual de producción de la SKC-2 (Heberkinasa®) a partir de cuerpos de inclusión de *E. coli* en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (La Habana, Cuba)²¹³.

Pupo y cols compararon la solubilidad del producto de los genes *skc* y *skc-2* al utilizar el mismo vector plasmídico y la cepa *E. coli* W3110 cultivada en las mismas condiciones. El 80% del producto recombinante del gen *skc* se encontró soluble en el citoplasma, mientras que el producto del gen *skc-2* fue encontrado principalmente en cuerpos de inclusión²⁰⁴. Los autores atribuyeron este comportamiento a las diferencias en la composición aminoacídica de las dos proteínas o a un nivel de expresión ligeramente superior del gen *skc-2* (25%) respecto al gen *skc* (15%). Además, se demostró las ventajas de la expresión soluble intracelular para el recobrado de la estreptoquinasa en forma bioactiva al evitar los procesos de solubilización y replegamiento necesarios para su recobrado a partir de los cuerpos de inclusión²⁰⁴.

Recientemente, Balagurunathan y cols informaron sobre la obtención de la SKC recombinante en la fracción soluble del citoplasma de *E. coli* a niveles de expresión superiores (20%) que

los reportados por Pupo y cols, y plantearon que la menor solubilidad del producto del gen *skc-2* pudiera ser sólo debido a los pequeños cambios en la composición aminoacídica de la SKC-2 respecto a la SKC²¹⁴.

No obstante, también se ha reportado que la SKC sobre-expresada ha precipitado inactiva en cuerpos de inclusión en *E. coli*. Goyal y cols²¹¹ y Cherish Babu y cols²¹⁵ obtuvieron altos rendimientos de la SKC y reportaron procesos efectivos para su renaturalización *in vitro* y recobrado. En el primer estudio la SKC fue purificada mediante una cromatografía en lecho expandido acoplada a ligandos de interacciones hidrofóbicas y el producto final purificado tuvo una actividad específica de 96 000 UI mg⁻¹ ²¹¹. En el segundo reporte, el gen *skc* fue expresado bajo el control del promotor *pL-pR* del bacteriófago lambda y la proteína purificada tuvo un rendimiento de 200 mg l⁻¹ con una actividad específica de 150 000 UI mg⁻¹ ²¹⁵.

La expresión intracelular de la SKC fue evaluada en *P. pastoris* mediante la fusión del gen *skc* cadena abajo del promotor *pAOX-1*. Durante la fermentación continua de *P. pastoris* recombinante, la SKC-2 se encontró soluble en el citoplasma con un rendimiento de 77 mg l⁻¹. Sin embargo, no se informó de su purificación a partir del material soluble intracelular²¹⁶.

Una de las estrategias ensayadas para evitar la purificación de la SKC a partir del hospedero natural y, a la vez, facilitar el proceso de recobrado fue la expresión soluble extracelular. La expresión secretoria de la SKC ha sido extensamente ensayada en hospederos tales como *B. subtilis*⁵⁰, *L. lactis*⁵¹, *E. coli*^{44,47,210}, *P. pastoris*⁵² y *S. pombe*⁵³. Cuando se utilizó *B. subtilis* WB600, deficiente en seis proteasas extracelulares, se favoreció la estabilidad de la SKC frente a las proteasas del hospedero⁵⁰. En un estudio reciente, el gen *skc* fue clonado y expresado bajo el control del promotor *P170* en *L. lactis*, pero la SKC recombinante fue degradada por proteasas del hospedero a productos inactivos⁵¹. La expresión secretoria de la SKC ha sido ampliamente estudiada en *E. coli*, después de los estudios iniciales de Malke y cols⁴⁴. Avilán y cols reportaron la purificación de la SKC del periplasma de *E. coli* mediante las cromatografías de intercambio aniónico e interacciones hidrofóbicas²¹⁰. Además de la SKC de 47 kDa, se detectó una especie molecular mayoritaria de 44 kDa y otra de 32 kDa; las cuales fueron similares a las obtenidas cuando la SKC fue secretada por su hospedero natural^{217,218}. En la mayor parte de los estudios de secreción de la SKC en *E. coli* solo se ensayó la productividad del sistema y no se purificó y caracterizó la proteína. Por ejemplo, Lee y cols reportaron la remoción de los primeros trece aminoácidos del extremo amino de la SKC y su fusión al péptido señal de la OmpA de *E. coli*⁴⁶. La SKC mutante fue activa y se detectó en el periplasma y en el medio extracelular y los rendimientos se duplicaron respecto a la SKC intacta. En otro estudio se informó el procesamiento de la SKC por la SPase LepB de *E. coli* y

la eficiencia de secreción cuando la SKC fue fusionada a cuatro péptidos señales conocidos por dirigir eficientemente la secreción de proteínas en *E. coli*: OmpA, MalE, LamB y PelB⁴⁷. Se incluyó también al péptido señal nativo de *S. equisimilis*. El extremo amino de la SKC se mantuvo intacto cuando ella fue fusionada al péptido señal nativo o al de las proteínas PelB o LamB, pero cuando la SKC fue fusionada a los péptidos señales de las proteínas OmpA o MalE, el segundo aminoácido (Ala) de la SKC madura fue preferido como sitio de corte por la SPase. Estos resultados fueron explicados por la naturaleza de la estructura secundaria en la zona de corte de la pre-SKC, la cual moduló la especificidad de corte de la SPase⁴⁷. Posteriormente se informó sobre un incremento de diez veces en la productividad de la SKC al utilizar la cepa de *E. coli* BL21(DE3) (deficiente en los genes de las proteasas OmpT e Ion) y un esquema de cultivo por pulsos⁴⁸.

La SKC fue también secretada al medio de cultivo por *P. pastoris* recombinante pero fue modificada por N-glicosilación⁵². En otro estudio se informó sobre la expresión de SKC y su secreción en la fracción periplasmática cuando se utilizó a *S. pombe* como hospedero. La SKC recombinante fue obtenida sin modificaciones por glicosilación o degradación significativa cuando se utilizó el mutante *epp1*, deficiente en una proteasa extracelular. Sin embargo, se detectó co-fraccionamiento de proteínas del hospedero de tamaño similar a la SKC en varios procedimientos cromatográficos convencionales, lo cual interfirió en la purificación de la proteína⁵³.

En el caso de la proteína SKC-2 mutante, su expresión secretoria sólo se ha ensayado en *E. coli*^{45,54,55} y en *P. pastoris*⁵⁶. Los estudios de la secreción de la SKC-2 en *E. coli* estuvieron orientados hacia la parte biológica del sistema o su productividad y no se purificó y caracterizó la proteína recombinante. Por ejemplo, Lee y cols informaron que la secreción de la SKC-2 en *E. coli* K-12 indujo la síntesis del ácido colánico del polisacárido capsular, lo cual provocó la formación de colonias de fenotipo mucoso⁵⁵. En otro estudio, la cantidad de la SKC-2 secretada aumentó cuando se sustituyó el péptido señal nativo por el de la proteína OmpA de *E. coli* y se utilizó el promotor *tac*. El 95% de la SKC-2 expresada fue secretada principalmente a la fracción periplasmática con una actividad de 5000 UI ml⁻¹⁴⁵. En el caso de la expresión extracelular de la SKC-2 en *P. pastoris*, ésta fue obtenida a altos niveles (1-1,2 g l⁻¹), pero fue modificada por glicosilación⁵⁶.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas empleadas

Las cepas bacterianas usadas en este trabajo con sus características fenotípicas y genotípicas más importantes se presentan en la Tabla 1. Las cepas de *E. coli* se conservaron por congelación a -70°C en LB (caldo de Luria-Bertani) con glicerol al 20%²¹⁹. Las cepas de *Streptomyces* se conservaron como suspensiones de esporas o de micelio por congelación a -70°C en glicerol al 20%¹³ y la cepa de *Streptococcus equisimilis* ATCC9542 se conservó por liofilización y almacenamiento a 4°C .

Tabla 1. Cepas y plasmidios utilizados en este trabajo

Cepa/Plasmidio	Genotipo o Fenotipo	Origen/Referencia
Cepa		
<i>Escherichia coli</i> TG1	[K12, <i>lac-pro supE thi hsdD5</i> (F' <i>traD36 proA⁺B⁺ lacI^d lacZ M15</i>)]	219
<i>Streptomyces lividans</i> TK24	<i>str-6 SLP2⁻ SLP3⁻</i>	13
<i>Streptomyces lividans</i> TK 24 Δ <i>tatB</i>	Δ <i>tatB</i> , <i>acc(3)IV</i>	220
<i>Streptomyces lividans</i> TK 24 Δ <i>tatC</i>	Δ <i>tatC</i> , <i>neo</i>	21
<i>Streptococcus equisimilis</i> ATCC 9542	Aislado clínico β hemolítico, grupo C	Instituto Rega, Bélgica
Plasmidio		
<i>pGEM®-T Easy vector</i>	Vector para la clonación de productos de PCR, <i>amp-r</i> , con sitio múltiple de clonación y selección por colonias blancas y azules en <i>E. coli</i>	Promega
pUC19	Vector para clonación de uso general, <i>amp-r</i> , con sitio múltiple de clonación en <i>E. coli</i>	221
pB93	Plasmidio replicativo en <i>E. coli</i> derivado de pIJ2925 con un fragmento <i>Bgl</i> II (4509 pb) de pB94, que contiene a los genes <i>lipA</i> y <i>lipR</i> , clonados en el mismo sitio del vector	20
pAGUA-4	Plasmidio replicativo en <i>E. coli</i> derivado de pAG11-3 con un fragmento <i>Cla</i> I- <i>Pst</i> I (500pb), que contiene al gen <i>ifnα2b</i> , clonado en los mismos sitios del vector	174
pIJ4090	Plasmidio replicativo en <i>Streptomyces</i> derivado de pIJ487 con un fragmento de 280 pb, que contiene el promotor mutante <i>ermE*</i> , clonado en el sitio <i>Bgl</i> II del vector	13
pALTERM	Plasmidio replicativo en <i>E. coli</i> derivado de pALTER Ex2 con un fragmento de 440 pb, que contiene el terminador de la transcripción <i>fd</i> , clonado en los sitios <i>Pst</i> I y <i>Hpa</i> I del vector.	Hong B, no publicado
pBS-CBSS	Plasmidio replicativo en <i>E. coli</i> derivado de pBluescript KS(+) con un fragmento <i>Sma</i> I (600 pb), que contiene el promotor <i>vsI</i> de <i>S. venezuelae</i> , la secuencia señal y los dos primeros codones del gen <i>vsI</i>	17
pBSVX	Plasmidio replicativo en <i>E. coli</i> derivado de pBluescript KS(+) con un fragmento <i>Eco</i> RI (506 pb) que contiene el promotor <i>vsI</i> de <i>S. venezuelae</i> , la secuencia señal <i>xlnC</i> de <i>S. lividans</i> y los tres primeros codones del gen <i>xlnC</i> maduro	23
pUWL218	Plasmidio bifuncional <i>E. coli</i> - <i>Streptomyces</i> , <i>amp-r</i> , <i>tsr-r</i> , con sitio múltiple de clonación	222
pOW15	Plasmidio bifuncional <i>E. coli</i> - <i>Streptomyces</i> derivado de pUWL218 con un fragmento <i>Pst</i> I (760 pb) que contiene la región <i>oriT</i> para la conjugación de ADN entre especies.	Rosabal G, no publicado

3.2 Medios de cultivo para el crecimiento bacteriano y procedimientos utilizados en el trabajo con *S. lividans*

Se utilizó caldo LB como medio rico²¹⁹ para propagar a *E. coli*. El LB sólido se preparó añadiendo agar al 1,7%. Cuando fue necesario, al medio LB se le añadió ampicilina (amp) a una concentración final de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. El caldo de infusión cerebro-corazón (Invitrogen) fue utilizado para la propagación de *Streptococcus equisimilis* ATCC9542²²³. Cuando no se especifica la fuente, los componentes de los medios de cultivos fueron adquiridos de Oxoid (RU), Merck (Alemania) o FLUKA (EE. UU.).

3.2.1 Medios de cultivo, soluciones y procedimientos utilizados en el trabajo con *S. lividans*

Soluciones, medios de cultivo y procedimientos utilizados para la formación y transformación de protoplastos de *S. lividans* TK24 o sus derivados.

La solución P se utilizó como solución isotónica para la formación y transformación de los protoplastos¹³. En su preparación se disolvió: sacarosa, 10,3%; K_2SO_4 , 0,025%; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,01%; 0,2 ml de una solución traza de elementos (ZnCl_2 , 40 mg l^{-1} ; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 200 mg l^{-1} ; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg l^{-1} ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 mg l^{-1} ; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 10 mg l^{-1} y $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 mg l^{-1}) en agua destilada hasta un volumen final de 80 ml. Después de su esterilización, previo al uso, se le adicionó en el siguiente orden: 1ml de una solución de KH_2PO_4 al 0,5%; 10 ml de una solución de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 3,68% y 10 ml de tampón TES al 5,73% ajustado a pH 7,2.

Para la obtención de los protoplastos se inoculó una alícuota de 10^4 esporas de *S. lividans* TK24 (o sus derivados) en 50 ml de caldo YEME¹³ (sacarosa, 34%; extracto de levadura, 0,3%; peptona, 0,5%; extracto de malta, 0,3%; glucosa, 1%; ajustado a pH 7,2) suplementado con 0,5% de glicina y 5 mM de MgCl_2 en erlenmeyers de 500 ml y se incubó por 36 - 40 h a 28°C en una zaranda orbital termostataada (Info HT) con agitación de 240 rpm. Al cultivo se le adicionó 25 ml de agua destilada estéril y se centrifugó por 10 min a $5\,000 \times g$. La biomasa obtenida fue lavada en una solución de sacarosa al 10,3% y se centrifugó por 10 min a $5\,000 \times g$. A continuación, la biomasa fue resuspendida en 5 ml de solución P que contenía lisozima a una concentración de 1 mg ml^{-1} y fue incubada a 30°C en un baño termostatado (RETOMED BM.02) durante 30 min con agitaciones suaves cada 10 min. Al cabo de ese tiempo se verificó la formación de protoplastos en un microscopio óptico (Opton) y posteriormente se adicionó a la mezcla 5 ml de solución P. Los restos de micelio fueron separados de los protoplastos mediante centrifugación a $300 \times g$ durante 5 min. Los protoplastos fueron recuperados en el sobrenadante de centrifugación y a continuación fueron

precipitados mediante centrifugación a $1\ 000 \times g$ durante 10 min. El precipitado fue resuspendido en 2 ml de solución P y se alicuotó un volumen de 0,2 ml de protoplastos en viales estériles, los cuales fueron conservados a -70°C (ultracongelador HARRIS) hasta su uso.

El agar MRYE fue utilizado para regenerar los protoplastos de *S. lividans* TK24 o sus derivados, luego del procedimiento de transformación¹³. Este medio se preparó en varias etapas. Inicialmente, se pesaron los ingredientes: sacarosa, 10,3%; K_2SO_4 , 0,025%; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,0%; glucosa, 1%; hidrolizado ácido de la caseína, 0,01%; extracto de levadura, 0,1%; extracto de carne, 0,5%; tampón TES, 0,57%. Después de la disolución de los componentes en agua destilada se ajustó el pH a 7,2 y se enrasó el volumen final a 90 ml. Posteriormente, se repartió 80 ml del caldo en erlenmeyers de 250 ml y se le adicionó 2,2 g de agar a cada uno. Después de la esterilización, previo al uso, se le adicionó en el siguiente orden: 1 ml de una solución de KH_2PO_4 al 0,5%; 8 ml de una solución de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 3,68%; 1,5 ml de una solución de L-prolina al 20%; 0,2 ml de una solución traza de elementos (ZnCl_2 , 40 mg l^{-1} ; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 200 mg l^{-1} ; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg l^{-1} ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 mg l^{-1} ; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 10 mg l^{-1} y $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 mg l^{-1}) y 0,5 ml de una solución de NaOH 1N.

El procedimiento de transformación de los protoplastos de *S. lividans* TK24 o sus derivados se realizó en presencia de polietilenglicol (PEG)¹³. El ADN plasmídico se mezcló con 0,5 ml de PEG 6 000 al 33,3% en solución P e inmediatamente se le añadió 0,2 ml de protoplastos, se incubó 2 min a temperatura ambiente y se sembró en placas *petri* que contenían 25 ml de medio MRYE agarizado. Al cabo de 16-20 horas de incubación a 28°C se adicionaron 3 ml de una solución de tioestreptona en agua destilada estéril. La concentración final del antibiótico fue $50 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Medios de cultivo para la propagación de *S. lividans* TK24. El agar MS (manitol, 2%; harina de soya, 2%) fue utilizado para propagar a *S. lividans* TK24 o sus derivados¹³. El caldo BTBSB (sacarosa, 10%; extracto de levadura, 1%; glucosa, 1%; NaCl; 0,5%; harina de soya; 0,3%; triptona, 1,7%; K_2HPO_4 , 0,25%)²⁹ fue utilizado para propagar a *S. lividans* o sus derivados y como medio de expresión del IFN α 2b y la SKC-2. Cuando fue necesario, a los medios se les añadió tioestreptona (tsr), a una concentración final de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ en medio líquido o $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ en medio sólido.

Medios de cultivo para evaluar la producción secretoria de la SKC-2. Los medios de cultivo ensayados fueron: caldo BTBSB²⁹, caldo TSB (glucosa, 1%; NaCl; 0,5%; harina de soya; 0,3%; triptona, 1,7%; K_2HPO_4 , 0,25%)¹⁸ y medio de la caseína (glucosa, 3%; extracto de

levadura, 1%; hidrolizado enzimático de la caseína; 2% y solución traza de elementos, 1% (v/v) ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02%; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1%; $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,0025%; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1%; H_3BO_3 , 0,0006%; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,01% y $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,0019%)²⁵.

Cultivo de *S. lividans* TK24 para evaluar la expresión del IFN α 2b y la SKC-2 en zaranda orbital. Una alícuota de 10^4 esporas se inoculó en 20 ml de caldo B₁TSB en erlenmeyers de 125 ml y se incubó por 72 horas a 30°C en una zaranda orbital termostataada (Info HT) con agitación de 240 rpm. Posteriormente, el 1% del cultivo fue inoculado en 50 ó 100 ml del medio de expresión en erlenmeyers de 500 ml y se incubó con agitación orbital de 240 rpm a 28°C durante 72 horas¹³.

Cultivo de *S. lividans* TK24 en un fermentador a escala de banco. Una alícuota de 10^4 esporas se inoculó en 50 ml de caldo B₁TSB en erlenmeyers de 500 ml y se incubó por 72 horas a 30°C en una zaranda orbital termostataada (Info HT) con agitación de 240 rpm. Posteriormente, la biomasa obtenida por centrifugación fue lavada en una solución isotónica de sacarosa al 10,3%, resuspendida en 50 ml de la misma solución y transferida a un reactor MBR (Suiza) de 2.5 l con una capacidad efectiva de 1.5 l. La fermentación se realizó en caldo B₁TSB o TSB durante 72 horas a 28°C con agitación constante de 350 rpm con 1 vvm de aeración. El pH fue mantenido en 7,0 mediante la adición de NaOH 5N.

Determinación del crecimiento de *S. lividans* TK24. Se realizó por mediciones de peso seco. Para ello, cinco ó diez ml del cultivo se adicionaron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm (Sartorius), previamente tarada en balanza analítica (Sartorius), y el micelio fue separado del SN al aplicar vacío. Posteriormente, el micelio se lavó con dos volúmenes de agua destilada y las membranas se secaron a 37°C por 24 h. El valor de la determinación fue registrado después de alcanzar la membrana un peso constante, para lo cual se utilizó una desecadora que contenía sílica gel previamente activada con cloruro de cobalto. El cálculo del peso seco de la biomasa se realizó por sustracción del peso de cada membrana al peso de la membrana correspondiente que contenía la biomasa y se expresó en mg ml⁻¹. Las determinaciones se realizaron por duplicado o triplicado, siempre considerando no extraer más del 10% del contenido del cultivo para no afectar la relación existente entre el crecimiento de esta bacteria filamentosa y la producción del metabolito de interés¹³.

Recobrado del sobrenadante de cultivo. Los cultivos de 50 ó 100 ml se centrifugaron a $7\ 000 \times g$ por 10 min a 4°C en una centrifuga Hettich Universal 32R (*Sorvall*, rotor 1620a) (Alemania). En el caso de la fermentación en el reactor MBR, el SN fue obtenido mediante la centrifugación del cultivo a $2700 \times g$ en una centrifuga mLW 70D (Alemania) a 4°C por una hora. El SN obtenido fue conservado a -20°C.

Obtención de extractos celulares. Los cultivos de 100 ml se centrifugaron a $7\ 000 \times g$ a 4°C en una centrifuga Hettich Universal 32R (*Sorvall*, rotor 1620a). La biomasa obtenida fue resuspendida en 5 ml de tampón HEMGN (100 mM KCL, 25 mM HEPES pH 7.6, 0,1 mM EDTA pH 8, 12,5 mM MgCl_2 , 10% (v/v) glicerol y 0,1% de Nonidet P-40) suplementado con 1 mM ditiotreititol, $2\ \mu\text{g ml}^{-1}$ de aprotinina, 0,1 mM de PMSF y $1\ \text{mg ml}^{-1}$ de lisozima²²⁴. Posteriormente, la suspensión celular fue sometida a 5 ciclos de sonicación de 1min con intermedio de igual tiempo en hielo. El extracto celular obtenido se conservó a -20°C .

3.3 Procedimientos generales

3.3.1 Procedimientos utilizados en el trabajo con ADN

Reacciones de modificación-restricción del ADN. Las enzimas: *BamH I*, *Bgl II*, *BstE II*, *Dpn I*, *Dra II*, *EcoR I*, *EcoR V*, *Hinc II*, *Hind III*, *Hpa I*, *Nco I*, *Not I*, *Nsi I*, *Pst I*, *Sac I*, *Sph I*, *Xba I*, T4-ADN polimerasa, *Pfu* polimerasa, el fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa de *E. coli*, la T4-ADN ligasa y la Taq ADN-polimerasa fueron adquiridas de las firmas Invitrogen (EE. UU.), Roche Diagnostics (Suiza) o Promega (EE. UU.) y utilizadas según las recomendaciones de los fabricantes. Las reacciones de restricción se realizaron en un volumen de 100 μl , a menos que exista otra indicación. Cuando fue necesario digerir un mismo ADN con más de una enzima de restricción se utilizó un tampón de reacción en el cual las enzimas utilizadas tuvieran una actividad óptima. Cuando esto no fue posible, la digestión se realizó con cada enzima por separado cambiándose el tampón óptimo de reacción entre una digestión y la siguiente mediante precipitación del ADN con 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto y posteriormente se resuspendió en el tampón óptimo de cada enzima. Para ligar fragmentos digeridos de ADN se utilizó la enzima T4-ADN ligasa en su tampón óptimo de reacción. Todas las reacciones de ligamiento se realizaron en un volumen final de 20 μl teniendo en cuenta que la concentración de extremos libres de ADN siempre fuera menor de 1 μM . Se utilizó 1 U de enzima en cada reacción para ligar extremos cohesivos y 5 U para ligar extremos romos. En cada caso la mezcla de reacción se incubó toda la noche a 16°C .

Electroforesis de ADN y purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa. La separación de bandas de ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa de porcentos variables, adecuados para cada caso, en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, 20 mM EDTA) y a una intensidad de $4\ \text{V cm}^{-1}$. Se utilizó bromuro de etidio ($1\ \mu\text{g ml}^{-1}$) para visualizar el ADN mediante la incidencia de radiación UV en un transiluminador del sistema de documentación de geles *Gene Genius* de la casa comercial Syngene (RU). La purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se realizó utilizando el

sistema *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) según el protocolo indicado por el fabricante.

Purificación de ADN total y plasmídico. El aislamiento del ADN total de *S. equisimilis* ATCC9542 se realizó de acuerdo a lo descrito por Hernández y cols²²³. *S. equisimilis* fue crecido en 50 ml de caldo infusión cerebro-corazón por 12 horas a 37°C. La biomasa obtenida por centrifugación fue resuspendida en 6 ml de tampón de STE (glucosa, 50 mM; Tris-HCl, 10 mM; EDTA, 1 mM; pH 8,0) con lisozima a una concentración de 1 mg ml⁻¹ y fue incubada por una hora a 37°C. Las células se lisaron en presencia de SDS al 1%, EDTA 1 mM y 0,5 mg ml⁻¹ de pronasa E durante 3 horas a 55°C. A la preparación se le realizaron extracciones sucesivas con fenol, fenol-cloroformo (1:1) y cloroformo. El ADN se precipitó de la fase acuosa añadiendo 1 volumen de isopropanol y 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M y luego fue lavado con 1 ml de etanol al 70%. Finalmente se resuspendió en 100 µl de agua destilada estéril.

Para la purificación del ADN plasmídico se utilizaron los sistemas *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* y *Wizard Plus Midipreps DNA Purification System*, ambos adquiridos de la firma Promega (EE. UU.). En el caso del aislamiento de ADN plasmídico a partir de *Streptomyces*, el micelio se incubó inicialmente en tampón de resuspensión de células con 2-4 mg de lisozima por ml durante 30 - 45 min a 37°C como tratamiento previo a la lisis celular en presencia de NaOH y SDS.

Reacción en cadena de la polimerasa. Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo en un termociclador PTC150 (MJ Research, EE. UU.). Cada reacción se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía: 50 ng de ADN molde cuando éste era ADN plasmídico o 100 ng cuando el molde era ADN genómico, 5 µl de tampón de reacción 10X, 2,5 µl de una solución de los cuatro desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP (dNTPs) (5 mM), 25 pmol de cada oligonucleótido, 0,4 U de la polimerasa (*SuperTaq*, Roche) y H₂O destilada estéril. La reacción se efectuó de la siguiente forma: 5 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94°C, 1 min a 54°C y un tiempo de extensión variable según la longitud del producto a amplificar (1 min por cada kb) a 72°C. La reacción continuó por 25 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de hibridación a 64°C y un tiempo de extensión que dependió de la longitud del producto a amplificar. El último paso de la reacción fue de extensión a 72°C por 5 min.

Secuenciación automática de ADN. Se realizó mediante el sistema *Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit* (GE Healthcare) según las indicaciones del fabricante. Para la secuenciación de fragmentos de tamaño menor de 550 pb, que habían sido clonados en el

sistema de *pGEM®-T Easy Vector* (Promega) o en el pUC19, se utilizaron los oligonucleótidos comerciales M13F y M13R marcados con fluorescencia. Para la secuenciación de las regiones correspondientes a las fusiones génicas entre las secuencias señales y los genes foráneos se utilizaron los oligonucleótidos vsiPend (Cy5'-GCAAGACTCCTCACCGCAGTCA 3') o ermEp-seq (Cy5'-ACAATCGTGCCGGTTGGTAGGATC 3'), ambos obtenidos de la casa comercial Eurogentec (Bélgica). Las secuencias fueron obtenidas con un secuenciador *ADN ALFexpress* (Amersham Pharmacia Biotech) siguiendo el procedimiento recomendado por los fabricantes.

Transformación de cepas de *E. coli*. Se transformaron células competentes preparadas por tratamiento con CaCl_2 ²¹⁹. Una alícuota de 0,1 ml de células competentes se mezcló con 0,1 μg de plasmidio o con los productos de una reacción de ligamiento, se incubó 30 min a 4°C y se sometió a un choque térmico a 42°C por 2 min. Se adicionó 1 ml de caldo LB y se incubó 1 h a 37°C. Se sembró en LB sólido suplementado con el antibiótico de selección apropiado.

3.3.2 Procedimientos utilizados en el trabajo con proteínas

Determinación de la concentración de proteínas. La concentración de proteínas totales en los sobrenadantes, extractos proteicos o eluatos cromatográficos fue determinada por el método de Bradford²²⁵ y por el método reportado por Zor y cols, que incluye algunas modificaciones del método de Bradford que a continuación se describen²²⁶. Se realizó en placas de 96 pocillos de poliestireno (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca) con la ayuda de una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA) en un rango de concentraciones de 40 a 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Las absorbancias se determinaron a dos longitudes de ondas: 620 y 450 nm; y los valores obtenidos de la relación $\text{Abs}_{620}/\text{Abs}_{450}$ se utilizaron para obtener la ecuación de la recta al ajustar por el método de los mínimos cuadrados los valores de concentración y absorbancias de la curva patrón.

Precipitación de proteínas totales. Las proteínas totales del SN o de eluatos cromatográficos fueron precipitadas siguiendo un protocolo modificado de adición de metanol y cloroformo descrito por Wessel y cols²²⁷. Para ello, se adicionó un volumen de una mezcla de metanol y cloroformo en proporción 3:1 (v/v) a las muestras y se agitaron vigorosamente. Posteriormente se centrifugaron por 5 min a $13\,000 \times g$ y se retiró la fase superior cuidadosamente hasta la interfase formada y se añadió metanol en cantidades equivalentes a dos tercios del volumen inicial de la muestra. Finalmente, se centrifugó por 15 min a $13\,000 \times g$ y el sedimento, que contenía las proteínas, se resuspendió en un volumen adecuado para cada caso.

Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Las electroforesis de proteínas se realizaron según Laemmli, utilizando geles al por ciento de acrilamida adecuado para cada caso²²⁸. Los geles fueron revelados con azul de Coomassie R-250 o con sales de zinc e imidazol²²⁹. Cuando fue necesario, los geles revelados con sales de zinc e imidazol fueron destefidos en tampón de corrida de SDS-PAGE²²⁹. Las imágenes de cada gel fueron capturadas mediante el programa bioinformático *GeneSnap* del sistema de documentación de geles *Gene Genius* de la casa comercial *Syngene* (RU). El análisis de densitometría de imágenes para la predicción de tallas ó porcentos de pureza se realizó mediante el programa bioinformático *GeneTools* de la compañía *SynGene*.

Western blotting. Las muestras de proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a filtros de nitrocelulosa según lo descrito por Towbin y cols²³⁰. Posteriormente, los sitios libres de las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en solución salina tamponada con fosfato (PBS: NaCl, 137 mM; Na₂HPO₄, 9,58 mM; KCl, 2,68 mM; KH₂PO₄, 1,47 mM; pH 7,2) por 1 h a 37°C. En las 2 horas siguientes las membranas se incubaron a 37°C con el anticuerpo primario (IgG sérica de conejo dirigida contra el IFN α 2b a 1 : 1 000¹⁷⁴ ó el anticuerpo monoclonal anti-SKC-2 a 0,4 μ g ml⁻¹, comercializado por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Sancti Spiritus, Cuba), en PBS/leche 2% y a continuación se lavaron tres veces en una solución de PBS con Tween al 0,05% (PBS-T) y se incubaron con anticuerpos anti-IgG de conejo o de ratón conjugados con peroxidasa (Promega). Las membranas se revelaron por incubación en H₂O₂ al 0,012% disuelto en PBS en presencia de 3,3-diaminobenzidina (0,5 mg ml⁻¹).

3.4 Procedimientos para obtener cepas recombinantes de *S. lividans* TK24

3.4.1 Procedimientos para obtener plasmidios replicativos que codifiquen para el IFN α 2b fusionado al LipA-sp o al Vsi-sp o al XInC-sp

3.4.1.1 Procedimientos para obtener plasmidios que codifiquen para el IFN α 2b fusionado al LipA-sp

Para obtener plasmidios que codifiquen para el IFN α 2b fusionado al LipA-sp fue necesario previamente construir un vector plasmídico que permitiera la clonación del gen *ifn α 2b*, u otros genes, cadena abajo y en el marco de lectura de la secuencia señal (*lipA-ss*). Para ello, cinco microgramos de pB93 (Figura 5) fueron linealizados por digestión con *Not* I y los extremos protuberantes generados se rellenaron con *Klenow* en presencia de los cuatro dNTPs a una concentración de 0,16 mM cada uno. El producto de la reacción fue tratado con fenol - cloroformo 1:1 (v/v) y posteriormente fue precipitado, según se describió en 3.3.1. El ADN obtenido fue digerido con *Hind* III y el fragmento de menor talla (0,424 kb), contentivo del

promotor, RBS y secuencia señal de la *lipA*, se extrajo de un gel de agarosa, como se describe en la sección 3.3.1. En paralelo, 1 µg de pUC19 se digirió con *HincII* y *Hind III*. Una alícuota de 0,1 µg de pUC19 digerido y 0,05 µg del fragmento purificado se mezclaron con T4-ADN ligasa y se incubaron en tampón de ligamiento toda una noche a 16°C. Una alícuota de células competentes de *E. coli* TG1 (Tabla 1) se transformó con el producto resultante y el ADN plasmídico se extrajo de los transformantes.

Debido a que el plasmidio pB93 tiene dos sitios superpuestos de reconocimiento por la endonucleasa *Not I* (GCGGCCGCGGCCGC) (Figura 5), localizados en la región que codifica para el dominio C de LipA-sp, se seleccionó un clon en que el corte por *Not I* linearizó el plasmidio obtenido, lo cual indicó que la enzima *Not I* cortó en el segundo sitio en pB93. El plasmidio recombinante derivado de pUC19 que incorporó el inserto, se propagó, se purificó y la secuencia nucleotídica del inserto se verificó. El plasmidio recombinante obtenido se denominó pSTU-13.

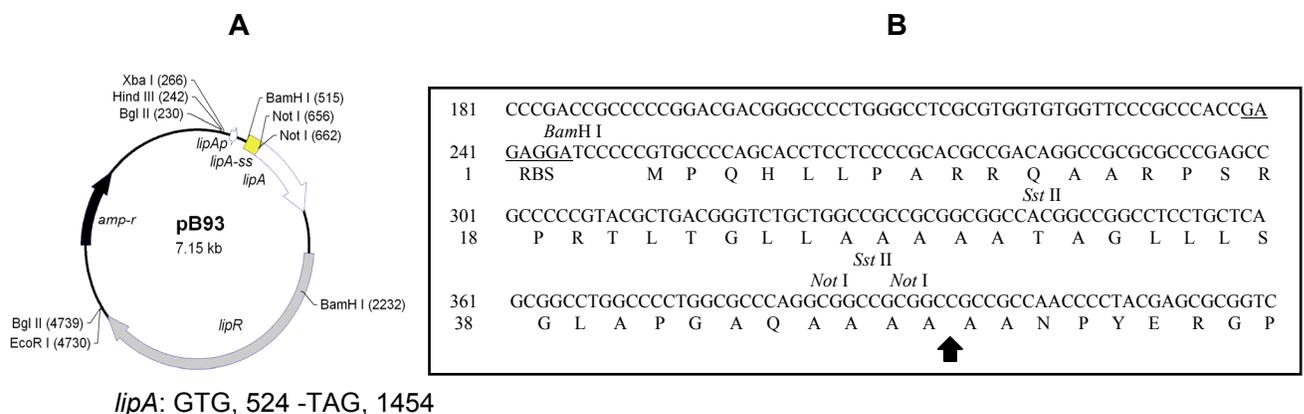


Figura 5. Mapa físico del plasmidio pB93 (A) y secuencia nucleotídica de las señales traduccionales y de secreción de la lipasa A de *S. exfoliatus* M11 (*lipA*) en pB93 (B). El fragmento *Bgl II* de 4,502 kb proviene del plasmidio pB94²⁰. *lipR* codifica para un posible activador transcripcional de *lipA*; *amp-r* es un gen que confiere resistencia a ampicilina. Se indican las coordenadas de los codones de inicio (GTG) y terminación (TAG) de *lipA*. Aparece subrayado el sitio de unión al ribosoma (RBS) y el sitio de procesamiento de la peptidasa señal se indica con una flecha. Tomado de Pérez y cols¹⁹ y modificado por el autor.

El plasmidio pSTU-13 se procesó para extraer las señales reguladoras y la secuencia señal de *lipA* en forma de fragmento *Xba I*. Para ello, 5 µg se digirieron con *Xba I* y el fragmento de menor tamaño (0,404 kb), que contenía al promotor, RBS y la secuencia señal de *lipA*, se extrajo de un gel de agarosa, como se describe en la sección 3.3.1. Paralelamente, 0,5 µg del vector pUWL218 bifuncional *E. coli* - *Streptomyces* (Tabla 1, Anexo 4) se linealizaron con *Xba I* y posteriormente se mezcló con 0,02 µg del fragmento *Xba I*, portador del promotor, RBS y secuencia señal de *lipA*, y se incubaron con T4 ADN-ligasa en tampón de ligamiento como se describe en la sección 3.3.1. Los productos de la reacción se usaron para transformar células

competentes de *E. coli* TG1 y se extrajo el ADN plasmídico de los transformantes y se chequeó con *Xba* I. La orientación del fragmento *Xba* I subclonado en el vector pUWL218 se chequeó con la enzima *Bam*H I. El vector recombinante obtenido por la incorporación del inserto *Xba* I se propagó, purificó y se denominó pSV. Este plasmidio se manipuló para sustituir el promotor de *lipA* por el promotor *ermE** (*ermEp**) de *S. erythraea* en forma de fragmento *Eco*R I - *Bam*H I. Para ello, 0,5 µg se digirieron con *Eco*R I y *Bam*H I. El fragmento *Eco*R I - *Bam*H I de talla mayor (6,93 kb), que correspondió al vector, se extrajo de un gel de agarosa como se describe en la sección 3.3.1. En paralelo, 5 µg del vector pIJ4090 (Figura 6) fue digerido con *Eco*R I y *Bam*H I y el fragmento de 0,28 kb, contentivo del promotor *ermE**, fue purificado a partir de un gel de 1,5% de agarosa como se describe en la sección 3.3.1. Una alícuota de 0,02 µg del fragmento de 0,28 kb se mezcló con 0,1 µg del fragmento de 6,93 kb y se incubó con 1 U de T4 ADN-ligasa en tampón de ligamiento durante 20 h a 16°C. Los productos de la reacción se usaron para transformar células competentes de *E. coli* TG1 y se extrajo el ADN plasmídico de los transformantes y se chequearon con *Eco*R I y *Bam*H I. El vector recombinante obtenido por la incorporación del promotor *ermE** se propagó, purificó y se denominó pEFBR. Esta manipulación delecionó tres de las siete bases del RBS de *lipA* (*rbs-lipA*).

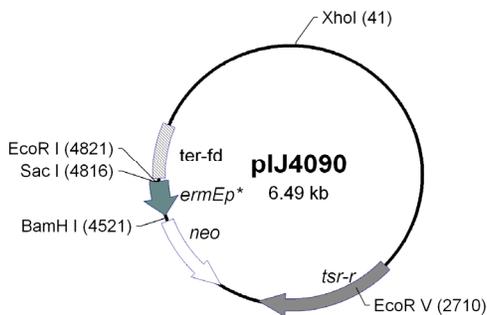


Figura 6. Mapa genético del plasmidio pIJ4090¹³. El fragmento *Eco*R I - *Bam*H I de 0,28 kb contiene el promotor mutante de resistencia a eritromicina de *Saccharopolyspora erythraea* *ermE** (*ermEp**) con actividad constitutiva incrementada. *neo*, gen *neo* sin promotor, *tsr-r*, gen de resistencia a tioestreptona, *ter-fd*, terminador de la transcripción del fago fd.

Para restablecer el *rbs-lipA* se utilizó un adaptador de doble cadena formado por los oligonucleótidos ABV1 (5' GATCCATGGCCCACCGAGAG 3') y ABV2 (5' GATCCTCTCGGTGGGCCATG 3') que introdujo un sitio de reconocimiento para *Nco* I. Los extremos del adaptador de doble cadena obtenido fueron protuberantes para el reconocimiento por *Bam*H I. Para ello, 10 pmol de cada uno de los oligonucleótidos fue mezclado en un volumen total de 100 µL de agua destilada estéril y se desnaturalizaron por 5 min a 95°C en un termociclador PTC150 (MJ Research, EE. UU.). La temperatura de la reacción fue disminuyendo lentamente a razón de 1°C por cada 50 seg hasta arribar a 25 °C. 1 µL de esa reacción fue ligado a 0,1 µg del plasmidio pEFBR, el cual había sido previamente

digerido con *Bam*H I. La reacción se incubó 16 h a 16°C y el producto se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* TG1. La mezcla de transformación se sembró en placas de LB-amp y se incubó 16 h a 37°C. Las preparaciones plasmídicas se chequearon por digestión con *Nco* I mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y un clon que adquirió el inserto se propagó, se purificó y se verificó la secuencia en la vecindad del *rbs-lipA*, según lo descrito en el acápite 3.3.1. Este se denominó pHFPG. Posteriormente, una alícuota de 1 µg del plasmidio pHFPG se digirió con *Eco*R I y *Hind* III. Los productos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% y el fragmento de 0,484 kb, contenido del casete *ermEp*lipA-ss*, se extrajo de un gel de agarosa como se describe en la sección 3.3.1. Una alícuota de 0,1 µg de pUC19 digerido con *Eco*R I y *Hind* III se incubó con 0,05 µg del fragmento de 0,484 kb en tampón de ligamiento en presencia de 1 U de T4-ADN ligasa. Una alícuota de células competentes de la cepa *E. coli* TG1 se transformó con el producto de la reacción y el ADN plasmídico se extrajo de los transformantes y se chequeó con *Eco*R I y *Hind* III. El plasmidio recombinante que tuvo el inserto se propagó, purificó y se denominó pUCA y tiene como sitio único a *Not* I para permitir la clonación de genes heterólogos en el marco de lectura cadena abajo de *lipA-ss*.

Procedimiento para obtener un plasmidio que codifique para IFN α 2b fusionado por un péptido espaciador al LipA-sp. El plasmidio pAGUA-4 (Figura 7, Tabla 1) se manipuló para extraer el gen *ifn α 2b* seguido del terminador de la transcripción del gen 32 del bacteriófago T4 (ter-T4) en forma de fragmento *Hind* III. Para ello, 5 µg de pAGUA-4 se digirieron con *Hind* III. El fragmento *Hind* III de talla menor (0,65 kb), que contenía el gen *ifn α 2b* seguido del ter-T4, se extrajo de un gel de agarosa como se describe en la sección 3.3.1. Paralelamente, 0,5 µg del plasmidio pHFPG se linealizaron con *Hind* III y a continuación el producto de la reacción se mezcló con 0,03 µg del fragmento *Hind* III, portador del gen *ifn α 2b* y del ter-T4, y se expuso a 1 U de T4-ADN ligasa en tampón de ligamiento durante 16 h a 16°C. Los productos de la reacción se usaron para transformar células competentes de *E. coli* TG1 y se extrajo el ADN plasmídico de los transformantes y se chequearon con *Hind* III, *Bam*H I y *Pst* I. El vector recombinante bifuncional obtenido por la incorporación del inserto *ifn α 2b/ter-T4* se propagó, purificó y se denominó pABRIL. Este plasmidio codificó para una proteína de fusión LipA-sp/IFN α 2b con la secuencia espaciadora DSRVDLQACKLM entre LipA-sp y el IFN α 2b, la cual fue codificada por la región de clonación múltiple procedente del vector pUC19. La metionina fue codificada por el codón ATG de inicio de la traducción aportado por el plasmidio pAGUA-4.

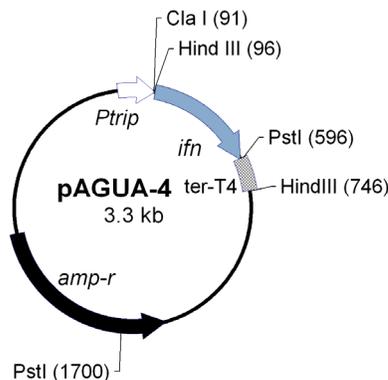


Figura 7. Mapa genético del plasmidio pAGUA-4¹⁷⁴. El fragmento *Cla* I–*Pst* I de 0,5 kb contiene al gen *ifn*α2b (*ifn*) y el fragmento *Pst* I–*Hind* III de 0,15 kb contiene el terminador de la transcripción del gen 32 del fago T4 (*ter*-T4). *Ptrip*: promotor triptófano y *amp-r*: gen que confiere resistencia a ampicilina.

Este plasmidio fue manipulado para reducirle la secuencia espaciadora en la unión entre el LipA-sp y el IFNα2b (DSRVDLQACKLM) por la secuencia DSSKLM. Para ello fue digerido con *Sph* I y *Xba* I y los extremos protuberantes generados se removieron o rellenaron con la enzima T4-ADN polimerasa y 0,1 mM de los cuatro dNTPs. La mezcla se incubó 15 minutos a 12°C. Seguidamente, 0,1 μg del ADN obtenido se incubaron con 5 U de T4 ADN-ligasa durante 16 h a 16°C. Células competentes de *E. coli* TG1 se transformaron con los productos de la reacción y el ADN plasmídico de los transformantes se extrajo y se chequeó por digestión con *Pst* I. El plasmidio obtenido se propagó y purificó, y la secuencia nucleotídica que codificó para DSSKLM se verificó empleando el oligonucleótido ermEp-seq como se describe en la sección 3.3.1. El plasmidio obtenido se denominó pΔXS.

Procedimiento para obtener un plasmidio que codifique para el IFNα2b fusionado directamente al LipA-sp. Se realizó una amplificación por PCR, esencialmente como se describe en 3.3.1. Como ADN molde se utilizó al plasmidio pAGUA-4 (Figura 7) y como cebadores los oligos JC-5344 (5' GCGGCCTGTGATCTGCCTCAAACCC 3') y JC-5345 (5' AAAACTGCAGTTTTTATTCCTTACTTCTTAAAC 3'). El fragmento amplificado fue purificado de un gel como se describe en la sección 3.3.1. En paralelo, 2 μg del plasmidio pUCA fue digerido con *Not* I y los extremos protuberantes fueron rellenados con la enzima *Klenow* en presencia de los cuatro dNTPs a una concentración de 0,16 mM cada uno. El producto de la reacción fue precipitado con fenol cloroformo 1:1 (v/v) y posteriormente fue precipitado, según se describió en 3.3.1. El ADN obtenido fue digerido con *Pst* I y posteriormente ligado en presencia de 5 U de T4-ADN ligasa (3.3.1) a 0,06 μg del producto purificado de la PCR. Una alícuota de células competentes de la cepa *E. coli* TG1 (Tabla 1) se transformó con el producto resultante, el ADN plasmídico se extrajo de los transformantes y se chequeó con *Not* I, *EcoR* I y *Pst* I. El plasmidio recombinante que incorporó el inserto, se propagó, se purificó y la secuencia nucleotídica entre *lipA*-ss y el *ifn*α2b fue verificada por secuencia empleando el

oligonucleótido ermEp-seq como se describe en 3.3.1. El plasmidio obtenido se denominó pUCAI. Seguidamente se digirieron 3 μg del plasmidio pUCAI con *EcoR* I y *Pst* I y se obtuvieron dos fragmentos, uno de 2,6 kb correspondiente al vector y otro de 0,95 kb que contenía un casete “*ermEp*lipA-sslifn α 2b*”. Este casete se purificó a partir de un gel, de acuerdo a lo que se describió en la sección 3.3.1. Paralelamente, 1 μg del plasmidio pABRIL fue digerido con las enzimas *EcoR* I y *Pst* I y el fragmento mayor de 6,9 kb que contenía el ter-T4 y el resto del vector bifuncional *E. coli* – *Streptomyces* pUWL218, fue ligado a 0,04 μg del fragmento de ADN de este casete “*ermEp*lipA-sslifn α 2b*” como se describe en 3.3.1. La cepa de *E. coli* TG1 se transformó con el producto de la reacción y se seleccionó un clon que contenía el vector con el fragmento de 0,95 kb, contentivo del casete “*ermEp*lipA-sslifn α 2b*” que codifica para el IFN α 2b fusionado directamente al LipA-sp. El plasmidio obtenido se denominó pUCIAS.

3.4.1.2 Procedimientos para obtener plasmidios que codifiquen para el IFN α 2b fusionado al Vsi-sp o al XInC-sp

Procedimiento para obtener una construcción genética que permita fusionar el gen *ifn α 2b* en el marco de lectura de *vsi-ss* o *xInC-ss*. Se diseñaron los oligonucleótidos IFNA2B-F1 (5' CCAATGCATGTGATCTGCCTCAAACCC 3') e IFNA2B-R1 (5' AACTGCAGTTTTTATTCCTTACTTCTTAAAC 3') para amplificar el gen *ifn α 2b* mediante una PCR, básicamente como se describió en la sección 3.3.1. En los extremos 5' de los cebadores se incorporaron sitios de reconocimiento (en cursiva) para *Nsi* I (IFNA2B-F1) y *Pst* I (IFNA2B-R1). El sitio *Nsi* I, seguido de un tratamiento de remoción de sus extremos protuberantes, permitirá la fusión del primer codon del *ifn α 2b* (TGT) a las secuencias señales. El fragmento amplificado fue purificado de un gel de agarosa al 1,5% y 0,05 μg de éste se mezclaron con 0,02 μg de *pGEM®-T Easy Vector* (Promega). A la mezcla se le adicionó T4-ADN ligasa según se indicó en 3.3.1. Seguidamente el ADN ligado fue introducido en células competentes de *E. coli* TG1 y las células transformadas fueron seleccionadas en medio LB sólido suplementado con amp, IPTG (1 mM) y Xgal (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Se analizaron varios clones de la transformación –que provenían de colonias blancas– mediante las enzimas *Nsi* I y *Pst* I. Se seleccionó un clon que contenía el *pGEM®-T Easy Vector* con el fragmento de 0,501 kb clonado y se propagó, se purificó y la secuencia del gen *ifn α 2b* fue verificada como se describió en 3.3.1. El plasmidio obtenido se denominó pGEM-IFN.

Posteriormente, el gen *ifn α 2b* fue extraído del pGEM-IFN como un fragmento de 0,501 kb digerido previamente con las enzimas *Nsi* I y *Pst* I. En paralelo, 1 μg del plasmidio pALTERM

(Tabla 1) fue digerido con *Nsi* I y *Pst* I. Una alícuota de 0,1 µg de pALTERM y 0,02 µg del fragmento purificado se mezclaron con 1 U de T4-ADN ligasa y se incubaron en tampón de ligamiento toda una noche a 16°C. Una alícuota de células competentes de la cepa *E. coli* TG1 se transformó con el producto resultante, el ADN plasmídico se extrajo de los transformantes y se chequeó con *Nsi* I, *Pst* I, *EcoR* I y *Bgl* II. El plasmidio recombinante que incorporó el inserto compuesto por el gen *ifnα2b* fusionado al terminador de la transcripción del fago fd (ter-fd) se propagó, purificó y se denominó pALTIFN.

Procedimiento para obtener un plasmidio que codifique para el IFN α 2b fusionado al Vsi-sp. Cinco microgramos del plasmidio pALTIFN fueron linealizados por digestión con *Nsi* I y seguidamente los extremos protuberantes generados se removieron con la enzima T4-ADN polimerasa en presencia de 0,1 mM de los 4 dNTPs. El producto de la reacción se purificó por extracción con fenol - cloroformo y luego fue precipitado, de acuerdo a lo indicado en la sección 3.3.1. Seguidamente, el ADN obtenido fue digerido con *EcoR* I y el fragmento de menor tamaño (0,945 kb), contentivo del gen *ifnα2b* y del ter-fd, se extrajo de un gel de agarosa como se describe en la sección 3.3.1. En paralelo, 2 µg del plasmidio pBS-CBSS (Figura 8) se digirió con *Dra* II y los extremos protuberantes generados se rellenaron con la enzima *Klenow* en presencia de los cuatro dNTPs a una concentración de 0,16 mM cada uno. El producto de la reacción se purificó por extracción con fenol cloroformo y fue precipitado, de acuerdo a lo descrito en la sección 3.1.1, y posteriormente se digirió con *EcoR* I. El único sitio *Dra*II en el plasmidio pBS-CBSS permite la fusión de genes dos codones cadena abajo de la región que codifica para el sitio de corte de la peptidasa señal. Una alícuota de 0,1 µg de pBS-CBSS digerido y 0,08 µg del fragmento purificado contentivo del gen *ifnα2b* seguido del ter-fd se mezclaron con 5 U de T4-ADN ligasa y se incubaron en tampón de ligamiento toda una noche a 16°C. Una alícuota de células competentes de la cepa *E. coli* TG1 se transformó con el producto resultante, el ADN plasmídico se extrajo de los transformantes y se chequeó con las enzimas *EcoR* I y *BamH* I. El plasmidio recombinante derivado de pBS-CBSS que incorporó el inserto se propagó, se purificó y la secuencia nucleotídica de la fusión entre *vsi-ss* y el *ifnα2b* se verificó empleando el oligonucleótido vsiPend, como se describe en la sección 3.3.1. El plasmidio obtenido se denominó pVsiIFN. Este plasmidio se procesó para extraer las señales reguladoras y la secuencia señal de *vsi* fusionadas al *ifnα2b* y al ter-fd en forma de fragmento *EcoR* I-*BamH* I. Para ello, 5 µg se digirieron con *EcoR* I y *BamH* I y el fragmento de menor tamaño (1,419 kb), que contenía el casete “*vsip/vsi-ss/ifnα2b/ter-fd*”, se extrajo de un gel de agarosa como se describe en la sección 3.3.1. Paralelamente, 0,5 µg del

vector pOW15 bifuncional *E. coli-Streptomyces* (Anexo 5, Tabla 1) se linealizaron con *EcoR* I y *BamH* I. A continuación el producto de la reacción se mezcló con 0,06 µg del fragmento *EcoR* I - *BamH* I portador del casete “*vsip/vsi-sslifnα2b/ter-fd*”, y se incubaron con 1 U de T4 ADN-ligasa en tampón de ligamiento durante 16 h, como se describe en la sección 3.3.1. Los productos de la reacción se usaron para transformar células competentes de *E. coli* TG1 y se extrajo el ADN plasmídico de los transformantes y se chequearon con *Pst* I, *EcoR* I, *BamH* I y *Bgl* II. El vector bifuncional *E. coli - Streptomyces* obtenido por la incorporación del casete “*vsip/vsi-sslifnα2b/ter-fd*” se propagó, purificó y se denominó pOVsilFN. El vector pOVsilFN codifica para una proteína de fusión Vsi-sp/IFNα2b espaciada por los aminoácidos EA entre el Vsi-sp y el IFNα2b. Los residuos de aminoácidos EA son los dos primeros aminoácidos de la proteína nativa Vsi.

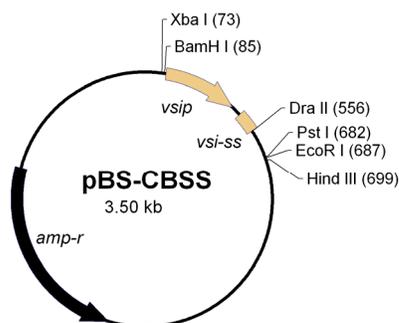


Figura 8. Mapa genético del plasmidio pBS-CBSS¹⁷. pBS-CBSS es un derivado de pBluescript KS(+) con un fragmento *Sma*I (600 pb) del cromosoma de *S. venezuelae* CBS762.70, que contiene el promotor *vsi* (*vsip*) y la secuencia señal del inhibidor de subtilisina de *S. venezuelae* CBS762.70 (*vsi-ss*). *amp-r* es un gen que confiere resistencia a ampicilina. Se indican la localización de *vsi-ss*.

vsi-ss: 466 - 556

Procedimiento para obtener un plasmidio que codifique para el IFNα2b fusionado al XInC-sp. Con el objetivo de disponer de un sitio único *EcoR* I en el vector pBSVX (Figura 9, Tabla 1), que permita clonar el gen *ifnα2b* cadena abajo de la *xInC-ss*, se inactivó el otro sitio *EcoR* I situado en la posición 2964 del vector (Figura 9). Se realizó una mutagénesis dirigida a uno de los nucleótidos T del sitio *EcoR* I mediante el sistema *Quik Change Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene). Para ello se realizó una PCR con 2,5 U de la polimerasa *Pfu*, 125 ng de cada uno de los oligonucleótidos PBSXyIEF (5' CCGGGCTGCAGGAAGTCGATTCGGGAGCG 3') y PBSXyIER (5' CGCTCCCGAATCGACTTCCTGCAGCCCGG 3') (contienen la base G o C en mutación por T o A, respectivamente), 2 µl de una solución de dNTPs (5 mM), 5 µl de tampón de reacción 10X, 50 ng del plasmidio pBSVX (ADN metilado, aislado de *E. coli* TG1) y H₂O destilada estéril hasta completar 50 µl. La mezcla de reacción se sometió a: 12 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 1 min de unión a 65°C y 7 min de extensión a 68°C en un termociclador PTC150 (MJ Research, EE. UU.). La amplificación fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa y posteriormente se adicionaron 10 U de la enzima *Dpn* I y se

incubó a 37°C por 1 hora para digerir el ADN parental de doble cadena. Una alícuota de la reacción (5 µl) fue utilizada para transformar células competentes de la cepa *E. coli* TG1. El ADN plasmídico de los transformantes se aisló y se chequeó por digestión con *EcoR* I. El plasmidio obtenido mediante este procedimiento fue propagado y purificado. La secuencia nucleotídica cadena arriba del promotor *vsip* fue verificada empleando el oligonucleótido universal (sentido), como se describe en la sección 3.3.1. El derivado de pBSVX obtenido tuvo un solo sitio *EcoR* I, útil para la clonación de genes heterólogos cadena abajo de la secuencia señal de *xlnC* de *S. lividans*. Este plasmidio se denominó pBSVXM y tiene como sitios únicos a *Nsi* I y *EcoR* I para la clonación de los genes *ifnα2b* y *skc-2* cadena abajo de *xlnC-ss* y en su marco de lectura.

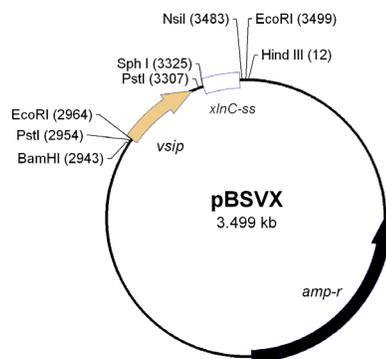


Figura 9. Mapa físico del plasmidio pBSVX²³. El fragmento *EcoR* I de 0,5 kb proviene del pBSvsixyl²²⁵. *amp-r*: gen que confiere resistencia a ampicilina, *vsip*: promotor del inhibidor de subtilisina de *S. venezuelae* CBS762.70, *xlnC-ss*: secuencia señal de la xilanasasa C de *S. lividans*. Se indican la localización del promotor *vsip* y del codón de inicio (GTG) de *xlnC*.

vsip: 2964-3280

xlnC-ss: GTG, 3328-3474

El plasmidio pALTIFN fue linealizado con *Nsi* I y los extremos protuberantes se removieron con T4-ADN polimerasa en presencia de 0,1 mM de los 4 dNTPs. Luego, el ADN obtenido fue digerido con *EcoR* I y el fragmento de 0,945 kb, contentivo del gen *ifnα2b* y del ter-fd, se extrajo de un gel de agarosa al 1%. En paralelo, 2 µg del plasmidio pBSVXM se digirió con *Nsi* I y los extremos protuberantes generados se removieron con la enzima T4-ADN polimerasa en presencia de 0,1 mM de los 4 dNTPs. Seguidamente, el ADN obtenido fue digerido con *EcoR* I. Una alícuota de 0,1 µg del plasmidio pBSVXM digerido y 0,08 µg del fragmento purificado, contentivo del gen *ifnα2b* seguido del ter-fd, se mezclaron con 5 U de T4-ADN ligasa y se incubaron en tampón de ligamiento toda una noche a 16°C. Una alícuota de células competentes de *E. coli* TG1 se transformó con el producto resultante y el ADN plasmídico se extrajo de los transformantes y se chequeó con *Pst* I, *EcoR* I y *BamH* I. El plasmidio recombinante que incorporó el gen *ifnα2b* seguido del ter-fd se propagó, se purificó y la secuencia nucleotídica de la fusión entre *xlnC-ss* y el *ifnα2b* se verificó empleando el oligonucleótido vsiPend, como se describe en la sección 3.3.1. Este plasmidio se denominó

pXInCIFN. Posteriormente, pXInCIFN se procesó para extraer el promotor *vsi*, las señales traduccionales y de secreción de *xInC* fusionadas al *ifn α 2b* y a *ter-fd* en forma de fragmento *EcoR* I - *BamH* I. Para ello, 5 μ g se digirieron con *EcoR* I y *BamH* I y el fragmento de menor talla (1,486 kb), que contenía el casete “*vsip/xInC-ss/ifn α 2b/ter-fd*”, se extrajo de un gel de agarosa como se describe en la sección 3.3.1. Paralelamente, 0,5 μ g del vector bifuncional *E. coli* - *Streptomyces* pOW15 se linealizaron con *EcoR* I y *BamH* I. A continuación el producto de la reacción se mezcló con 0,06 μ g del fragmento *EcoR* I - *BamH* I portador del casete “*vsip/xInC-ss/ifn α 2b/ter-fd*”, y se incubaron con 1 U de T4 ADN-ligasa, como se describe en la sección 3.3.1. Los productos de la reacción se usaron para transformar células competentes de *E. coli* TG1 y se extrajo el ADN plasmídico de los transformantes y se chequearon con *Pst* I, *EcoR* I, *BamH* I y *Bgl* II. El vector recombinante obtenido por la incorporación del casete “*vsip/xInC-ss/ifn α 2b/ter-fd*” se propagó, purificó y se denominó pOXInCIFN. El plasmidio pOXInCIFN codifica para una proteína de fusión XInC-sp/IFN α 2b espaciada por los aminoácidos ATT entre el XInC-sp y el IFN α 2b. Los residuos de aminoácidos ATT son los tres primeros aminoácidos de la xilanasa C nativa.

3.4.2 Procedimientos para obtener plasmidios replicativos que codifiquen para la SKC-2 fusionada al LipA-sp o al Vsi-sp o al XInC-sp

3.4.2.1 Procedimiento para obtener una construcción genética que permita fusionar el gen *skc-2* en el marco de lectura de *lipA-ss*, *vsi-ss* o *xInC-ss*

El gen *skc-2* fue amplificado a partir del cromosoma de *S. equisimilis* ATCC9542 mediante una PCR con los oligonucleótidos SK-F1 (5' *GATATCGCTGGACCTGAGTGGCTG* 3') y SK-R1 (5' *AGATCTTTATTTGTCGTTAGGGTTATCAG* 3') en las condiciones que se indicaron en 3.3.1. El oligonucleótido SK-F1 se sintetizó con un sitio *EcoRV* (en *itálica*) en el extremo 5' para permitir la fusión del gen *skc-2* de 1245 pb cadena abajo de las secuencias señales en su marco de lectura. Por lo que se introdujo una mutación silente en el primer codón (ATT) del gen *skc-2* al ser reemplazado por el codón ATC. Ambos codones codifican para el aminoácido isoleucina.

El fragmento amplificado de 1,251 kb fue purificado de un gel de agarosa al 1,5% y 0,02 μ g de éste se mezclaron con 0,02 μ g de *pGEM®-T Easy Vector* (Promega). A la mezcla se le adicionó T4-ADN ligasa según se indicó en 3.3.1. Seguidamente el ADN ligado fue introducido en células competentes de la cepa de *E. coli* TG1 y las células transformadas fueron seleccionadas en medio LB sólido suplementado con amp, IPTG (1 mM) y Xgal (50 μ g ml⁻¹). Se analizaron varios clones de la transformación con las enzimas *EcoR* V y *Bgl* II. Se

seleccionó un clon que contenía el vector *pGEM®-T Easy* con el fragmento de 1,251 kb clonado y se propagó, se purificó y se denominó pGEM-SK.

Para obtener la secuencia completa del gen *skc-2*, un clon fue seleccionado arbitrariamente para subclonar dos fragmentos del gen en el vector pUC19. Para ello, 2 µg del plasmidio fue digerido con *EcoR V* y *Hind III*. El fragmento *EcoR V-Hind III* de talla menor (0,749 kb), se extrajo de un gel de agarosa como se describe en la sección 3.3.1. Paralelamente, 1 µg del vector pUC19 se linealizaron con *Hinc II* y *Hind III*. A continuación el producto de la reacción se mezcló con 0,08 µg del fragmento *EcoR V-Hind III*, portador del fragmento 5' del gen *skc-2*, y se expuso a 1 U de T4 ADN-ligasa en tampón de ligamiento durante 16 h a 16°C. Los productos de la reacción se usaron para transformar células competentes de *E. coli* TG1 y se extrajo el ADN plasmídico de los transformantes y se chequearon con *EcoR I* y *Hind III*.

Para obtener la secuencia del extremo 3' del gen *skc-2* fue necesario subclonar el fragmento *Hind III* y *Bgl II* de 0,496 kb en el vector pUC19, lo cual se realizó como sigue: 2 µg del pGEM-SK fue digerido con *Hind III* y *Bgl II*, y el fragmento *Hind III-Bgl II* de menor tamaño (0,496 kb) se extrajo de un gel de agarosa como se describe en la sección 3.3.1. Paralelamente, 1 µg del vector pUC19 se digirió con *Hind III* y *BamH I* y a continuación, el producto de la reacción se mezcló con 0,06 µg del fragmento *Hind III-Bgl II* de 0,496 kb y se expuso a 1 U de T4-ADN ligasa en tampón de ligamiento durante 16 horas a 16°C. Los productos de la reacción se usaron para transformar células competentes de *E. coli* TG1 y se extrajo el ADN plasmídico de los transformantes y se chequeó con *EcoR I* y *Hind III*.

Cada fragmento clonado se secuenció por ambas cadenas con los oligonucleótidos universal (sentido) y reverso, los cuales hibridan con el vector pUC19 dirigidos hacia el inserto, según lo descrito en el acápite 3.3.1.

3.4.2.2 Procedimiento para obtener un plasmidio que codifique para la SKC-2 fusionada al LipA-sp

Cinco microgramos del plasmidio pGEM-SK (sección 3.4.2.1) fueron cortados con las enzimas *EcoR V* y *Pst I*, y el fragmento de 1,293 kb -contentivo del gen *skc-2*- fue extraído de un gel de 1% de agarosa, de acuerdo a lo indicado en la sección 3.3.1. En paralelo, 1 µg del plasmidio pUCA (3.4.1.1) fue digerido con *Not I* y los extremos protuberantes fueron rellenados con la enzima *Klenow* en presencia de los cuatro dNTPs (0,16 mM). El producto de la reacción se purificó mediante fenol - cloroformo y posteriormente fue precipitado de acuerdo a lo descrito en la sección 3.3.1. El ADN obtenido fue digerido con *Pst I* y posteriormente ligado en presencia de 5 U de T4-ADN ligasa (3.3.1) a 0,12 µg del fragmento contentivo del gen *skc-2*. Una alícuota de células competentes de la cepa *E. coli* TG1 se

transformó con el producto resultante, el ADN plasmídico se extrajo de los transformantes y se chequeó con *Hind* III, *Sac* I y *Pst* I. El plasmidio recombinante que incorporó el inserto, se propagó, se purificó y se verificó la secuencia nucleotídica en la vecindad entre *lipA*-ss y el gen *skc-2* empleando el oligonucleótido ermEp-seq, como se describe en 3.3.1. El plasmidio obtenido se denominó plipA1SK. Este plasmidio se procesó para extraer el promotor *ermEp**, las señales traduccionales y de secreción de *lipA* fusionadas al gen *skc-2* en forma de fragmento *Sac* I-*Pst* I. Para ello, 5 µg se digirieron con *Sac* I y *Pst* I y el fragmento de menor tamaño (1,731 kb), que contenía el casete “*ermEp**//*lipA*-ss/*skc-2*”, se extrajo de un gel de agarosa como se describe en la sección 3.3.1. Paralelamente, 0,5 µg del vector bifuncional *E. coli* - *Streptomyces* pUWL218 (Anexo 4, Tabla 1) se linealizaron con *Sac* I y *Pst* I. A continuación el producto de la reacción se mezcló con 0,07 µg del fragmento *Sac* I-*Pst* I, portador del casete “*ermEp**//*lipA*-ss/*skc-2*”, y se incubaron con 1 U de T4 ADN-ligasa en tampón de ligamiento durante 16 h, como se describe en la sección 3.3.1. Los productos de la reacción se usaron para transformar células competentes de *E. coli* TG1 y se extrajo el ADN plasmídico de los transformantes y se chequearon con *Hind* III, *EcoR* I y *Pst* I. El vector recombinante obtenido por la incorporación del casete “*ermEp**//*lipA*-ss/*skc-2*” se propagó, purificó y se denominó pOlipA1SK.

3.4.2.3 Procedimiento para obtener un plasmidio que codifique para la SKC-2 fusionada al Vsi-sp

Cinco microgramos del plasmidio pGEM-SK (sección 3.4.2.1) fueron digeridos con las enzimas *EcoR* V y *EcoR* I, y el fragmento de 1,257 kb -contentivo del gen *skc-2*- fue extraído de un gel de 1% de agarosa, de acuerdo a lo indicado en la sección 3.3.1. En paralelo, 2 µg del plasmidio pBS-CBSS se digirió con *Dra* II y los extremos protuberantes generados se completaron con la enzima *Klenow* en presencia de los cuatro dNTPs (0,16 mM). El producto de la reacción se purificó por extracción con fenol - cloroformo y posteriormente fue precipitado de acuerdo a lo descrito en la sección 3.3.1. A continuación fue digerido con *EcoR* I. Una alícuota de 0,1 µg de pBS-CBSS digerido y 0,1 µg del fragmento purificado, contentivo del gen *skc-2*, se mezclaron con 5 U de T4-ADN ligasa y se incubaron en tampón de ligamiento toda una noche a 16°C. Una alícuota de *E. coli* TG1 en estado de competencia se transformó con el producto resultante, el ADN plasmídico se extrajo de los transformantes y se chequeó con *Hind* III, *EcoR* I y *Bam*H I. El plasmidio recombinante derivado de pBS-CBSS que incorporó el inserto se propagó, se purificó y la secuencia nucleotídica de la fusión entre *vsi*-ss y el *skc-2* fue verificada empleando el oligonucleótido vsiPend, como se describe en la sección 3.3.1. El plasmidio obtenido se denominó pVsiSK. Este plasmidio se procesó para

extraer las señales reguladoras y la secuencia señal de *vsi* fusionadas al *skc-2* en forma de fragmento *EcoR* I - *BamH* I. Para ello, 5 µg se digirieron con *EcoR* I y *BamH* I y el fragmento de menor tamaño (1,723 kb), que contenía el casete “*vsip/vsi-ss/skc-2*”, se extrajo de un gel de agarosa como se describe en la sección 3.3.1. Paralelamente, 0,5 µg del vector bifuncional *E. coli* - *Streptomyces* pOW15 (Tabla 1) se linealizaron con *EcoR* I y *BamH* I. A continuación el producto de la reacción se mezcló con 0,08 µg del fragmento *EcoR* I - *BamH* I, portador del casete “*vsip/vsi-ss/skc-2*”, y se incubaron con 1 U de T4 ADN-ligasa en tampón de ligamiento durante 16 h, como se describe en la sección 3.3.1. Los productos de la reacción se usaron para transformar células competentes de *E. coli* TG1 y se extrajo el ADN plasmídico de los transformantes y se chequearon con *Hind* III, *EcoR* I y *BamH* I. El vector obtenido por la incorporación del casete “*vsip/vsi-ss/skc-2*” se propagó, purificó y se denominó pOVsiSK.

3.4.2.4 Procedimiento para obtener un plasmidio que codifique para la SKC-2 fusionada al XInC-sp

Cinco microgramos del plasmidio pGEM-SK (sección 3.4.2.1) fueron digeridos con las enzimas *EcoR* V y *EcoR* I, y el fragmento de 1,257 kb -contentivo del gen *skc-2*- fue extraído de un gel de 1% de agarosa, de acuerdo a lo indicado en la sección 3.3.1. En paralelo, 2 µg del plasmidio pBSVXM (3.4.1.2) se digirió con *Nsi* I y los extremos protuberantes generados se removieron con la enzima T4-ADN polimerasa en presencia de los 4 dNTPs (0,1 mM). El producto de la reacción se purificó por extracción con fenol - cloroformo y posteriormente fue precipitado, de acuerdo a lo descrito en la sección 3.3.1. Seguidamente, el ADN obtenido fue digerido con *EcoR* I. Una alícuota de 0,1 µg del plasmidio pBSVXM digerido y 0,08 µg del fragmento purificado contentivo del gen *skc-2* se mezclaron con 5 U de T4-ADN ligasa y se incubaron en tampón de ligamiento toda una noche a 16°C. Una alícuota de células competentes de *E. coli* TG1 se transformó con el producto resultante y el ADN plasmídico se extrajo de los transformantes y se chequeó con *Hind* III, *EcoR* I y *BamH* I. El plasmidio recombinante que incorporó el gen *skc-2* se propagó, se purificó y la secuencia nucleotídica de la fusión entre *xInC-ss* y *skc-2* fue verificada empleando el oligonucleótido *vsiPend*, como se describe en la sección 3.3.1. Este plasmidio se denominó pXInCSK. Este plasmidio se manipuló para extraer el promotor de *vsi*, las señales traduccionales y de secreción de *xInC* fusionadas al gen *skc-2* en forma de fragmento *EcoR* I - *BamH* I. Para ello, 5 µg se digirieron con *EcoR* I y *BamH* I y el fragmento de menor tamaño (1,791 kb), que contenía el casete “*vsip/xInC-ss/skc-2*”, se extrajo de un gel como se describió anteriormente (3.3.1). Paralelamente, 0,5 µg del vector bifuncional *E. coli* - *Streptomyces* pOW15 se linealizaron con *EcoR* I y *BamH* I. A continuación el producto de la reacción se mezcló con 0,08 µg del

fragmento *EcoR* I - *Bam*H I, contenido del casete “*vsip/xInC-ss/skc-2*”, y se incubaron con 1 U de T4 ADN-ligasa en tampón de ligamiento durante 16 h. Los productos de la reacción se usaron para transformar células competentes de *E. coli* TG1 y se extrajo el ADN plasmídico de los transformantes y se chequearon con *Hind* III, *Sph* I y *Bam*H I. El vector obtenido por la incorporación del casete “*vsip/xInC-ss/skc-2*” se propagó, purificó y se denominó pOXInCSK.

3.4.3 Introducción de los plasmidios recombinantes en *S. lividans* TK24

Los plasmidios bifuncionales *E. coli* - *Streptomyces* que codifican para el IFN α 2b (sección 3.4.1) o la SKC-2 (sección 3.4.2) se introdujeron por separado en protoplastos de *S. lividans* TK24, según lo descrito en el acápite 3.2.1. Varios transformantes de *S. lividans* TK24 de cada transformación fueron propagados en medio MS suplementado con tioestreptona y aquellos que mostraron fenotipo de resistencia a tioestreptona fueron conservados en glicerol al 20% a -70°C.

El plasmidio bifuncional *E. coli* - *Streptomyces* p Δ XS (3.4.1.1) fue introducido en protoplastos de *S. lividans* TK24 mutantes en los genes *tatB* o *tatC* (Tabla 1). Varios transformantes de cada cepa mutante fueron propagados en medio MS suplementado con tioestreptona y aquellos que manifestaron fenotipo resistente a tioestreptona fueron conservados en glicerol al 20% a -70°C.

3.5 Procedimientos para evaluar la expresión y secreción del IFN α 2b o la SKC-2 por las cepas de *S. lividans* recombinantes

3.5.1 Procedimientos para evaluar la expresión y secreción del IFN α 2b

Detección inmunoquímica del IFN α 2b. La presencia de IFN α 2b en los extractos proteicos (sección 3.2.1) y sobrenadantes de cultivo se analizó por *Western blotting* usando geles de 12,5% de poliacrilamida como se describió en 3.3.2.

Ensayo tipo ELISA para la cuantificación del IFN α 2b. La cuantificación de IFN α 2b en los sobrenadantes de cultivo se realizó mediante un sistema inmunoenzimático tipo sándwich²³¹. Se usaron placas Maxisorp de 96 pocillos y fondo plano, las cuales se incubaron 12 horas a 4°C con anticuerpo monoclonal CB-IFN 2.3²³² preparado a 10 μ g ml⁻¹ en tampón de recubrimiento (carbonato de sodio, 15,9 g l⁻¹; bicarbonato de sodio, 23,9 g l⁻¹; pH 9,6). La solución anterior se sustituyó por leche descremada (Oxoid) al 2% en PBS-T y se incubó 1 hora a 37°C. Se lavó tres veces con PBS-T y las muestras se añadieron e incubaron durante 1 hora a 37°C. Se realizaron al menos cuatro diluciones seriadas de cada muestra. En cada placa se incluyeron diluciones seriadas 1:2 del IFN α 2b (rango, 10 - 0,625 ng ml⁻¹) como patrón de cuantificación (patrón de referencia IFN α 2b-05-0701, CIGB, La Habana) en tampón PBS-T con 0,5% de leche descremada. Las placas se lavaron cinco veces con PBS-T y se

incubaron 1 hora a 37°C con el anticuerpo monoclonal CB-IFN 2.4 conjugado a peroxidasa²³³ en una dilución de 1:10 000 en tampón PBS-T con 0,5% de leche descremada. Las placas se lavaron ocho veces con PBS-T y la reacción de revelado se efectuó durante 15 - 20 minutos empleando 0,5 mg ml⁻¹ del O-fenilendiamina como cromógeno en tampón citrato 0,1 M, pH 5,5 con H₂O₂ al 0,015%. La reacción se detuvo por adición de 50 µl de H₂SO₄ 2,5 N en cada pozo y las absorbancias se leyeron en un lector de placas (Titertek Multiskan® PLUS) a 492 nm. Para aceptar el ensayo se consideró que el coeficiente de regresión lineal de la recta fuera mayor del 98% y el coeficiente de variación de los valores de la curva patrón y de las muestras fuese menor del 10%. Debido a que el límite de detección de este ELISA es 0,5 ng ml⁻¹²³¹, las muestras donde no se detectó IFNα2b se les asignó arbitrariamente el valor de 0,5 ng ml⁻¹.

Cuantificación de la actividad antiviral del IFNα2b. La actividad antiviral del IFNα2b fue ensayada por la inhibición del efecto citopático producido por el virus Mengo (Picornavirus de ratón) sobre las células Hep-2 (Carcinoma laríngeo humano, ATCC No. CCL23)²³⁴. Para ello se contrataron los servicios de la División de Control de la Calidad del CIGB. Se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano con células Hep-2 crecidas formando una monocapa confluyente. Las muestras, el material de referencia de laboratorio, una muestra control de IFNα2b purificado, controles del virus y controles de las células se diluyeron seriadamente 1:2 en medio mínimo esencial con 2% de suero fetal bovino y se incubaron por 24 horas a 37°C, 3% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Posteriormente, se adicionó el virus Mengo a una dilución previamente seleccionada, en la cual se obtuvo el título esperado del material de referencia y 100% de lisis celular en los controles de virus y se añadió medio *MEM CANE* con gentamicina a 40 µg ml⁻¹ en los cuatro pocillos correspondientes a los controles de células. Después de incubar por un período de 18-20 horas a 37°C con CO₂ al 3% y humedad relativa de 95% y comprobar al microscopio la lisis total de las células en los controles del virus, se adicionó el colorante violeta cristal al 0,5% a cada pocillo de la placa y se incubó por 3 minutos. El grado de protección de la monocapa de células se evaluó visualmente, de acuerdo con la absorción del colorante violeta cristal por las células. El título antiviral de una muestra fue el inverso de la dilución de la muestra, en la cual se observó una protección del 50% de las células, tomando como 100% al control de células y 0% al control de virus. La lectura de la densidad óptica de los pocillos teñidos se realizó a 578 nm en un equipo SUMA (Cuba) y luego se realizó el cálculo de los títulos según un programa diseñado para este propósito. El título de una muestra fue expresado como UI l⁻¹²³⁵.

3.5.2 Procedimientos para evaluar la expresión y secreción de la SKC-2

Detección inmunoquímica de la SKC-2. La presencia de la SKC-2 en los extractos proteicos (sección 3.2.1), sobrenadantes de cultivo y eluatos cromatográficos se analizó por *Western blotting* usando geles de 10% de poliacrilamida en condiciones no reductoras (sección 3.3.2).

Ensayo tipo ELISA para la cuantificación de la SKC-2. La SKC-2 presente en los sobrenadantes de cultivo fue cuantificada por un sistema inmunoenzimático tipo sándwich²³⁶. Para ello, se recubrieron placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (MaxiSorp, Nunc) con el anticuerpo monoclonal SK-1 (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Sancti Spiritus, Cuba) a una concentración final de 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en tampón de recubrimiento y se incubaron en cámara húmeda a 4°C por 16-18 horas. Después de lavar por dos veces las placas con tampón TBS-T se bloquearon los sitios libres con leche descremada al 2% en tampón TBST y se incubó la placa una hora a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente, se aplicaron dos lavados con tampón TBST para luego aplicar las muestras diluidas apropiadamente y por duplicado. Se realizaron al menos cuatro diluciones seriadas de cada muestra. Las muestras correspondientes a la curva patrón de la SKC-2 fueron aplicadas en diluciones seriadas 1:2 (rango 80 - 5 ng ml^{-1}) y por duplicado en tampón TBST-leche 1%. Las placas fueron incubadas por una hora a 37°C. Al cabo de ese tiempo, se aplicaron seis lavados con tampón TBST y posteriormente se añadió el conjugado IgG de conejo anti-SKC-2/peroxidasa a una dilución de 1:5000 en TBST-leche 1% y se incubó por una hora a 37°C. Después de seis lavados sucesivos con tampón TBST se aplicó el sustrato ortofenilendiamida al 0.05% y peróxido de hidrógeno al 0,05% diluido en tampón fosfato-citrato (164mM Na_2HPO_4 , 92mM ácido cítrico) pH 5,5. La reacción fue detenida por la adición de 50 μl de solución de H_2SO_4 2.5 N en cada pozo. Se determinó la absorbancia a 492 nm en un lector de placas de ELISA (Titertek Multiskan® PLUS). Para aceptar los resultados del ensayo se consideró que el coeficiente de regresión lineal de la recta fuese mayor del 98% y el coeficiente de variación de los valores de la curva patrón y de las muestras fuese menor del 10%. Debido a que el límite de detección de este ELISA es 0,3 ng ml^{-1} ²³⁶, las muestras donde no se detectó SKC-2 se les atribuyó arbitrariamente el valor de 0,3 ng ml^{-1} .

Zimografía. Este método fue utilizado para determinar cualitativamente la actividad activadora del Plg de la SKC-2 presente en sobrenadantes de cultivo o en muestras del proceso de purificación (sección 3.6.1.1 y 3.6.1.2)²³⁷. Para ello, las muestras proteicas fueron separadas en geles de SDS-PAGE al 10% de acrilamida. Al terminar la electroforesis, el gel fue lavado dos veces en 2% de triton X-100 para remover los restos de SDS y posteriormente fue lavado tres veces en tampón ST (NaCl, 150 mM; Tris-HCl, 50 mM pH 8,1) para eliminar el

triton X-100. El gel fue cubierto con una fina capa de agarosa al 0,9% en tampón ST que contenía leche descremada al 2,5% y Plg humano (Sigma) a 0,5 mg ml⁻¹. Después de la incubación del gel a 37°C por 2-3 horas, las bandas de la SKC-2 activa se visualizaron como bandas transparentes debido a que la SKC-2 activó al Plg en su paso a plasmina y ésta posee actividad proteolítica y degrada las proteínas de leche.

3.6 Procedimientos para la purificación y caracterización de la SKC-2 recombinante

3.6.1 Purificación de la SKC-2 recombinante

El SN de la fermentación de *S. lividans* recombinante se filtró a través de papel Whatman N°2 para remover partículas y células. Posteriormente, al SN filtrado se le añadió un décimo de volumen de Tris-HCl 1 M pH 8 y a continuación se le agregó lentamente sulfato de amonio sólido hasta obtener 45% de saturación. La precipitación se realizó en un baño de hielo con agitación lenta y se dejó en reposo toda la noche a 4°C. Pasado ese tiempo se centrifugó a 700 × g en una centrifuga mLW 70D (Alemania) a 4°C durante una hora. Al precipitado obtenido se le añadió 20 ml de tampón A (Tris-HCl 20 mM pH 6) y se dejó hidratar a 4°C durante la noche. Posteriormente, el material hidratado fue dializado frente a tampón A (1: 1 000) en una membrana de diálisis de límite de exclusión de 25 kDa, durante 30 horas a 4°C. Se realizaron tres cambios del tampón en un periodo de 30 horas. El producto de la diálisis se centrifugó a 8 500 × g por 30 min a 4°C y se conservó a 4°C para realizar una cromatografía de intercambio aniónico.

3.6.1.1 Cromatografía de intercambio aniónico

Cromatografía de intercambio aniónico con elución en gradiente lineal de NaCl. El material dializado fue aplicado en una columna empacada con matriz de DEAE Sepharose® *Fast Flow* (Pharmacia, Suecia) (1,45 x 4,82 cm; d.i. x h), previamente equilibrada en tampón A (Tris-HCl 20 mM pH 6) a un flujo volumétrico constante de 1 ml min⁻¹ mediante el uso de una bomba peristáltica (Pump P-1, Pharmacia). El perfil cromatográfico fue seguido por el registro de las absorbancias a 280 nm (detector: *single path monitor* UV-1) en un procesador de datos C-R4A (CROMATOPAC SHIMADZU). Las proteínas no enlazadas al gel se removieron de la columna con tampón de equilibrio hasta que la señal de absorbancia llegó a la línea base de partida. Las proteínas absorbidas eluyeron del gel al aplicar 10 volúmenes de columna de un gradiente lineal de concentraciones crecientes de NaCl (0 a 1 M), el cual fue generado con un mezclador (Pharmacia, Suecia) en el tampón de equilibrio a un flujo de 1 ml min⁻¹. Se colectaron fracciones de 1,3 ml. La molaridad de NaCl en las fracciones fue estimada mediante un refractómetro manual S-10 (Whatman, EE. UU.). La elución del material

contaminante se realizó mediante la corrida de 25 ml de una solución de NaCl 2 M. La columna se conservó en etanol al 20%.

Cromatografía de intercambio aniónico con elución a molaridad constante de NaCl. El material dializado fue aplicado en una columna empacada con matriz de DEAE Sepharose® *Fast Flow* (1 x 6,8 cm; d.i. x h) previamente equilibrada en tampón A (Tris-HCl 20 mM pH 6) a un flujo de 1 ml min⁻¹. Las proteínas no enlazadas al gel se removieron con tampón de equilibrio hasta que la señal de absorbancia llegó a la línea base. La elución de las proteínas de la columna se realizó en un solo paso por incremento de la fuerza iónica con 80 ml de tampón B (20 mM Tris-HCl, 160 mM NaCl, pH 6.0) a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹. Se colectaron fracciones de 5 ml que fueron conservadas a -20°C. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE (sección 3.3.2) y la actividad amidolítica de la SKC-2 fue determinada cualitativamente por zimografía (sección 3.5.2). Se unieron aquellas fracciones donde la SKC-2 de 47 kDa fue activa y mayoritaria. La elución del material contaminante se realizó mediante la corrida de 60 ml de una solución de NaCl 2 M y la columna fue conservada en etanol al 20%.

3.6.1.2 Cromatografía de interacciones hidrofóbicas

A la colecta de las fracciones de la cromatografía de intercambio aniónico (con elución por paso) se le adicionó sulfato de amonio 2 M hasta igualar la conductividad del tampón 1 (20 mM Tris-HCl, sulfato de amonio 0,5 M, pH 7). Posteriormente, el pH de la colecta se ajustó a 7 con NaOH 3 M. En estas condiciones, la SKC-2 fue absorbida por un gel de TSK butilo (Tosohaas Technical Center, EE. UU), previamente empacado en columna (1,45 x 4 cm; d.i. x h) y equilibrado en tampón 1 a un flujo de 1 ml min⁻¹ a temperatura de laboratorio (~22°C). Las proteínas no enlazadas al gel fueron removidas de la columna en tampón 1 hasta que la señal de absorbancia llegó a la línea base. El perfil cromatográfico fue seguido por el registro de las absorbancias a 280 nm (detector: *single path monitor* UV-1) mediante un procesador de datos C-R4A (CROMATOPAC SHIMADZU). Para eluir a la SKC-2 se aplicaron quince volúmenes de columna de un gradiente lineal de concentraciones decrecientes de 0,5 a 0 M de sulfato de amonio producido por un mezclador (Pharmacia, Suecia) en tampón 2 (20 mM Tris-HCl, pH 7). Se colectaron fracciones de 1 ml que fueron conservadas a -20°C. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE (sección 3.3.2) y la actividad amidolítica de la SKC-2 fue determinada cualitativamente por zimografía (sección 3.5.2). Se unieron las fracciones en que se detectó la SKC-2 por ambos ensayos. El material colectado fue esterilizado con un filtro de 0,22 µm (Millipore) y conservado a -20°C. La elución del material contaminante de la columna

se realizó mediante la aplicación de 20 ml de una solución de isopropanol al 20%, seguido de 40 ml de agua destilada. La columna fue conservada en etanol al 20%.

3.6.2 Procedimientos para la caracterización de la SKC-2 purificada

Método del sustrato cromogénico. La actividad de SKC-2 (UI ml⁻¹) en los eluatos cromatográficos fue determinada por el método del sustrato cromogénico S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA)²²³. Este método está basado en la diferencia en la absorbancia entre el pNA (*p-nitroaniline dihydrochloride*) que se libera por el corte de la plasmina entre Lys-pNA y el sustrato original. El incremento en la absorbancia a 405 nm es proporcional a la actividad biológica. En pozos de placas de poliestireno (Nunc) se mezclaron 50 µl de Plg humano a 25 µg ml⁻¹ y 50 µl de cada muestra, incluyendo la curva patrón de la SKC-2 (600 - 200 UI ml⁻¹) y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 50 µl de S-2251 y pasados diez minutos se detuvo la reacción con 25 µl de una solución de ácido acético al 20%. En todas las determinaciones se incluyeron controles negativos, en los cuales la muestra fue sustituida por el tampón de elución de los pasos cromatográficos. Las placas se leyeron en un lector *Multiskan* (Titertek, Finlandia) a 405 nm y con los valores de absorbancia obtenidos se realizó el ploteo de la recta de regresión contra las unidades internacionales de un patrón de Heberkinasa®. El cálculo de la actividad específica de las muestras se realizó según la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{Actividad de la SKC-2 (UI ml}^{-1}\text{)}}{\text{Concentración de proteínas (mg ml}^{-1}\text{)}} = \text{Actividad específica (UI mg}^{-1}\text{)}$$

Donde la concentración de proteínas fue determinada por el método de Zor y cols²²⁶.

Ensayo *in vitro* de lisis del coágulo de fibrina. Este método fue utilizado para medir la actividad del producto final del proceso de purificación y para ello se contrataron los servicios de la División de Control de la Calidad del CIGB. El método se fundamenta en la formación *in vitro* de un coágulo y su posterior lisis provocada por la SKC-2. La potencia de la SKC-2 purificada se determinó al comparar su capacidad de activar la conversión del Plg en plasmina con la capacidad de un material de referencia calibrado, en unidades internacionales, contra el tercer material de referencia internacional de la SKC del NIBSC (00/464)²³⁸.

En tubos de cristal de 0,8 mm de diámetro interno, que contenían un coágulo, se adicionaron 200 µl de las muestras con una potencia de aproximadamente 500 UI ml⁻¹, calculada previamente por el método del sustrato cromogénico. Posteriormente se adicionaron 200 µl

de tampón fosfato pH 7,2, que contenía albúmina bovina al 3% y 100 μ l de una solución de trombina humana (20 UI ml^{-1}). Los tubos fueron incubados estáticos en un baño de agua a 37°C por 2 min. Se utilizó una pipeta automática para adicionar y mezclar 500 μ l de una solución de euglobinas humanas al 1% en el fondo del tubo. Se midió el tiempo en segundos que transcurrió entre la adición de la solución de euglobinas y la lisis del coágulo en cada tubo. El método define la unidad internacional de la SKC-2 utilizando la concentración de material de referencia de la SKC-2 (UI ml^{-1}) contra el logaritmo del tiempo de la lisis del coágulo²³⁹.

Espectrofotometría UV. La determinación del espectro de absorción de la SKC-2 se realizó en un espectrofotómetro UV-visible de la casa comercial Shimadzu (UV-160A) en el rango entre 200 y 800 nm.

Identificación de proteínas mediante secuenciación del extremo amino. La identificación de las proteínas mediante la secuenciación de su extremo amino fue realizada como sigue. Las proteínas de los eluatos de la cromatografía de intercambio iónico se separaron mediante SDS-PAGE y fueron electrotransferidas hacia membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) según lo descrito por Ausubel y cols²²⁴. Después de la transferencia, las membranas fueron teñidas con azul de Coomassie (0,1% en metanol al 50%) durante 5 min y desteñidas con metanol al 50% agitando hasta que las bandas de proteínas fueron claramente visibles (5-10 min). Seguidamente, las membranas desteñidas fueron lavadas dos veces con agua destilada durante 5 min y la banda correspondiente a la proteína de interés fue recortada con un bisturí nuevo. El fragmento de membrana recortada fue utilizado para secuenciar el extremo amino terminal de la proteína mediante el método de degradación de Edman utilizando un secuenciador automático 477A-1201 (Applied Biosystems) según lo descrito por Geisow y Aitken²⁴⁰.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención de cepas de *S. lividans* TK24 que portan plasmidios replicativos que codifican para el IFN α 2b o la SKC-2

4.1.1 Obtención de plasmidios replicativos que codifican para el IFN α 2b en *S. lividans*

4.1.1.1. Obtención de plasmidios que codifican para el IFN α 2b fusionado al LipA-sp

Para obtener plasmidios que codifiquen para el IFN α 2b fusionado al LipA-sp fue necesario primero construir un vector plasmídico que permitiera la clonación de genes heterólogos en el marco de lectura cadena abajo de la secuencia señal de la Lipasa A de *S. exfoliatus* M11¹⁹, la cual no había sido explorada anteriormente con este fin. Se seleccionó el promotor de resistencia a eritromicina *ermE** de *S. erythraea*, debido a que ha sido eficiente en iniciar la transcripción de secuencias de origen heterólogo en *Streptomyces*^{24,126}.

La estrategia para construir este vector se realizó en varias etapas: 1) aislar el fragmento *Not* I-*Hind* III, que contiene las señales transcripcionales, traduccionales y de secreción de la lipasa A de *S. exfoliatus* M11, del plasmidio pB93 y subclonarlo en el vector pUC19, 2) subclonar dicha región en el plasmidio bifuncional pUWL218, 3) Retirar el promotor *lipA* del plasmidio obtenido en el paso anterior e introducir el promotor *ermE** de *S. erythraea*, 4) Regenerar el *rbs-lipA* parcialmente deletado en el paso anterior, 5) subclonar el casete "*ermEp*//lipA-ss*" del plasmidio obtenido en el paso 4 en el vector pUC19. Como resultado se obtuvo la construcción genética pUCA (Figura 10A), la cual porta un sitio único *Not* I para la clonación del *ifn α 2b* en el marco de lectura cadena abajo de *lipA-ss*. La secuencia nucleotídica que porta las señales traduccionales y de secreción de *lipA* fue verificada.

En la Figura 10B se muestran los resultados del análisis de restricción del vector pUCA. La enzima *Not* I tiene sitio de corte único en el nucleótido 134 de *lipA-ss* y produjo la forma lineal de pUCA, consistente en una banda de ~3,1 kb (Figura 10B, carril 2). La combinación de las enzimas *EcoR* I y *Hind* III produjo una banda que correspondió al inserto de 0,484 kb, contenido del promotor *ermE** y las señales traduccionales y de secreción de *lipA*, y otra de ~2,6 kb que correspondió al resto del vector (Figura 10B, carril 3). En cambio, con la combinación de las enzimas *EcoR* I y *BamH* I se produjo una banda de 0,28 kb, y otra de 2,8 kb producto del corte *EcoR* I y *BamH* I en los extremos 5' y 3' del promotor *ermE**, respectivamente (Figura 10B, carril 4). Las enzimas *Nco* I y *Pst* I, que cortan en el plasmidio pUCA en las regiones del adaptador que restituye el *rbs-lipA* y el sitio múltiple de clonación, respectivamente; dieron lugar a dos bandas: una de 0,189 kb contentiva de *lipA-ss* y otra de 2,9 kb correspondiente al resto del vector (Figura 10B, carril 5).

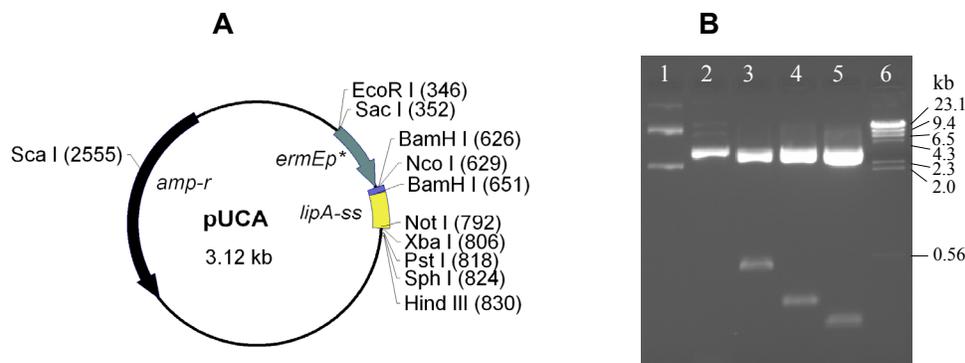


Figura 10. Mapa físico del vector pUCA para la inserción de genes fusionados a la secuencia señal de la lipasa A de *S. exfoliatus* M11 (A) y electroforesis en gel de agarosa al 1,3 % del plasmidio pUCA nativo y analizado por restricción (B). El sitio de restricción *Not* I es útil para introducir genes fusionados a la *lipA-ss*. En (B) se aplicaron las muestras de ADN siguientes: 1, pUCA nativo; 2, pUCA *Not* I; 3, pUCA *EcoR* I/*Hind* III; 4, pUCA *EcoR* I/*Bam* H I; 5, pUCA *Nco* I/*Pst* I; 6, Lambda *Hind* III, se indican las tallas. Abreviaturas: *lipA*, *lipAp*, *lipA-ss*, *amp-r*, *ermEp**, *tsr-r*, *neo*, *ter-fd*, *lacZ* y los ori de pIJ101 y pUC19 conservan el mismo significado que en las Figuras 5 y 6.

A continuación se construyeron dos vectores plasmídicos que se diferenciaron en la forma de fusionar el *ifn α 2b* a la *lipA-ss*. Una construcción genética codificó para una proteína de fusión LipA-sp/IFN α 2b espaciada por seis residuos de aminoácidos entre el LipA-sp y el IFN α 2b, mientras que la otra codificó para una fusión directa entre el LipA-sp y el IFN α 2b. En ambas construcciones se verificaron las secuencias nucleotídicas correspondientes a las fusiones entre la *lipA-ss* y el *ifn α 2b*.

La construcción genética que codificó para una proteína de fusión LipA-sp/IFN α 2b espaciada por seis aminoácidos entre el LipA-sp y el IFN α 2b se denominó p Δ XS (Figura 11A). Esta construcción se obtuvo teniendo como antecedente lo informado por Palva y cols⁴². En nuestro caso no se incluyeron los primeros aminoácidos del extremo amino de la lipasa A (AANPYE) debido a que los dos primeros aminoácidos son dos Ala, los cuales aportarían dos nuevos sitios probables de procesamiento de las SPases y aumentaría la probabilidad de que se obtuviera el IFN α 2b con heterogeneidad en su extremo amino. En su lugar, se utilizó la secuencia espaciadora DSSKLM, compuesta por aminoácidos principalmente no hidrofóbicos, la cual no posee los tripéptidos APA, APM o APS, sustratos de la peptidasa Tap de *S. lividans*. Otro antecedente valorado para utilizar el espaciador fue que el primer aminoácido del IFN α 2b es una cisteína. Se ha informado que cuando las cisteínas están localizadas en o cerca del extremo amino de las proteínas pueden causar bajos niveles de secreción de las proteínas en *Streptomyces*. En esos casos, la utilización de un péptido espaciador de tres o seis aminoácidos fue útil para aumentar los niveles de secreción de las proteínas IL-7, EPO y SCF^{136,137}.

La construcción genética que codificó para una fusión directa entre el LipA-sp y el IFN α 2b se denominó pUCIAS (Figura 11B) y se obtuvo teniendo en consideración que el IFN α 2b es una proteína de uso terapéutico y se necesita que sea idéntica a su forma natural.

En ambas construcciones se subclonó el terminador de la transcripción del gen 32 del fago T4 cuesta abajo del gen *ifn α 2b* teniendo en consideración lo reportado por Pulido y cols sobre el incremento de cuatro veces en la producción intracelular de IFN α 2b atribuido al efecto estabilizador del terminador de la transcripción del gene *aph* sobre la estabilidad del ARNm¹⁷⁵. En la Figura 11C se observa el resultado de varias digestiones analíticas realizadas a los plasmidios pA Δ XS y pUCIAS. Con las enzimas *EcoR* I y *Pst* I se obtuvieron dos bandas derivadas de pA Δ XS: una de 0,968 kb, correspondiente al casete de expresión *ermEp**/*lipA-ss*/*ifn α 2b*, y otra de ~6,9 kb del resto del vector (Figura 11C, carril 2). La digestión de pA Δ XS con la enzima *Hind* III originó dos fragmentos: uno de 0,65 kb, contenido del *ifn α 2b* fusionado a ter-T4, y otro de ~7,2 kb del resto del vector (Figura 11C, carril 3). La digestión comprobatoria con *Bgl* II, que tiene sitios de corte en las posiciones 193 y 454 del gen *ifn α 2b*, originó dos fragmentos: uno de 0,26 kb y otro de ~7,6 kb, correspondiente al resto del vector (Figura 11C, carril 4).

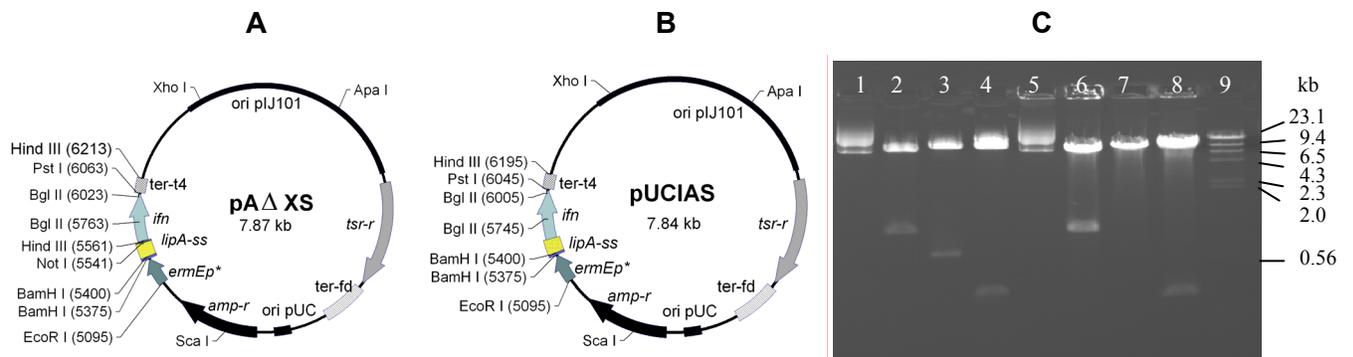


Figura 11. Construcción de los vectores pA Δ XS (A) y pUCIAS (B) y electroforesis en gel de agarosa al 1,3 % de los plasmidios nativos y analizados por restricción (C). En (C) se aplicaron las muestras de ADN siguientes: 1, pA Δ XS nativo; 2, pA Δ XS *EcoR* I/*Pst* I; 3, pA Δ XS *Hind* III; 4, pA Δ XS *Bgl* II; 5, pUCIAS nativo; 6, pUCIAS *EcoR* I/*Pst* I; 7, pUCIAS *Hind* III; 8, pUCIAS *Bgl* II y 9, λ *Hind* III, se indican las tallas. Las abreviaturas: *lipA-ss*, *amp-r*, *ermEp**, *tsr-r*, *neo*, *ter-fd*, *Ptrip*, *ifn*, *ter-t4* y *lacZ* conservan el mismo significado que en las Figuras 5-7 y el Anexo 4.

El análisis mediante restricción de pUCIAS con las enzimas *EcoR* I y *Pst* I originó dos fragmentos: uno de 0,95 kb que contenía el fragmento “*ermEp**/*lipA-ss*/*ifn α 2b*” y otro de ~6,9 kb que co-migró con el resto del vector pA Δ XS cortado con las mismas enzimas (Figura 11C, carril 6). La enzima *Hind* III linealizó el plasmidio pUCIAS por su único sitio dando lugar a una sola banda de 7,8 kb (Figura 11C, carril 7). La digestión comprobatoria de pUCIAS con *Bgl* II originó dos cortes en el gen *ifn α 2b* y dió lugar a dos fragmentos: uno de 0,26 kb, que co-migró

con la banda de menor tamaño de pAΔXS digerido con la misma enzima, y otra de 7,6 kb, correspondiente al resto del vector (Figura 11C, carril 8).

4.1.1.2 Obtención de un plasmidio que codifica para el IFN α 2b fusionado al Vsi-sp

Con la finalidad de estudiar la secreción del IFN α 2b a través del proceso de secreción Sec se seleccionaron las secuencias reguladoras del inhibidor de subtilisina de *S. venezuelae* CBS762.70 (*vsi*), las cuales han sido eficientes en dirigir la expresión secretoria del mTNF α y la xiloglucanasa de *Jonesia* sp. en *S. lividans* TK24^{8,17}. Para ello se obtuvo el vector plasmídico pOVsilFN que codifica para una proteína de fusión Vsi-sp/IFN α 2b espaciada por los aminoácidos EA entre el Vsi-sp y el IFN α 2b (Figura 12A). Los residuos EA son los dos primeros residuos de aminoácidos del Vsi y se mantuvieron en la construcción para conservar el sitio de corte proteolítico nativo de Vsi y favorecer el procesamiento de la pre-proteína Vsi-sp/IFN α 2b por las SPases. La secuencia nucleotídica correspondiente a la fusión entre la *vsi-ss* y el *ifn α 2b* fue verificada.

En la Figura 12B se puede observar el resultado de un análisis de restricción realizado a pOVsilFN. La digestión con las enzimas *Bam*H I y *Eco*R I dió lugar a dos bandas: una de 1,419 kb, correspondiente al casete *vsip/vsi-ss/ifn α 2b/ter-fd*, y otra de ~7,5 kb (Figura 12B, carril 3). La enzima *Pst* I tiene tres sitios de corte en pOVsilFN y produjo una banda de 0,76 kb, correspondiente a la región *oriT*, otra de 0,988 kb, contentiva del casete de expresión *vsip/vsi-ss/ifn α 2b*, y otra de 7,2 kb, correspondiente al resto de vector con la región del *ter-fd* incorporada (Figura 12B, carril 4). La digestión de pOVsilFN con *Bgl* II dió lugar a una banda de 0,26 kb, producto del corte de la enzima *Bgl* II en las bases 193 y 454 del gen *ifn α 2b*, y otra de ~8,7 kb, correspondiente al resto del vector digerido con *Bgl* II (Figura 12B, carril 5).

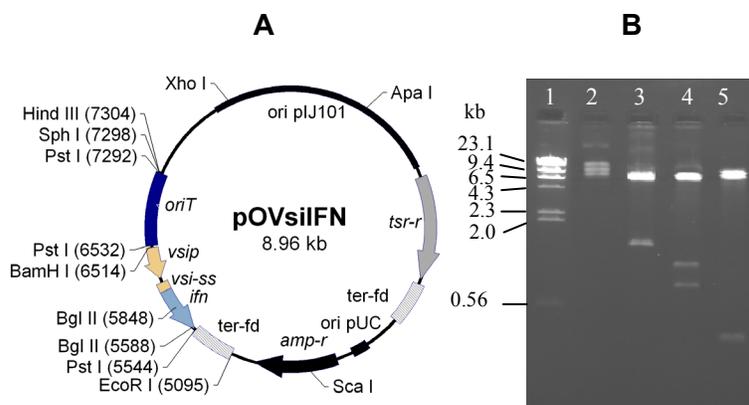


Figura 12. Construcción del vector pOVsilFN (A) y electroforesis en gel de agarosa (1,2 %) del plasmidio nativo y analizado por restricción (B). En (B) se aplicaron las muestras de ADN siguientes: 1, Lambda *Hind* III (se indican las tallas); 2, pOVsilFN nativo; 3, pOVsilFN *Bam*H I/*Eco*R I; 4, pOVsilFN *Pst* I; 5, pOVsilFN *Bgl* II. Abreviaturas: *amp-r*, *tsr-r*, *ter-fd*, *ifn*, *vsip*, *vsi-ss* y *oriT* conservan el mismo significado que en las Figuras 7 y 8 y el Anexo 5.

4.1.1.3 Obtención de un plasmidio que codifica para el IFN α 2b fusionado al XlnC-sp

Con la finalidad de estudiar la secreción del IFN α 2b por la vía Tat se seleccionaron las secuencias traducionales y de secreción de la xilanasa C de *S. lividans* (*xlnC*). La señal de secreción de la xilanasa C media la translocación de proteínas exclusivamente a través de la vía Tat²² y ha sido utilizada para evaluar la expresión secretoria de las proteínas humanas IL-10 y hTNF α en *S. lividans* TK24²³. Para iniciar la transcripción se seleccionó el promotor *vsip* de *S. venezuelae* CBS762.70, debido a que ha sido eficiente en iniciar la transcripción de varias secuencias heterólogas en *S. lividans*¹⁴.

Para fusionar el gen *ifn α 2b* a la secuencia señal *xlnC* fue necesario modificar el plasmidio pBSVX (Tabla 1, Figura 9) para disponer de un sitio de clonaje adecuado. Por lo que se inactivó el sitio *EcoR* I localizado 364 nucleótidos cadena arriba del sitio de inicio de la traducción de la xilanasa C (posición 2964 en pBSVX, Figura 9) y se obtuvo un vector plasmídico, denominado pBSVXM, con un sitio único *EcoR* I localizado 25 nucleótidos cadena abajo del ultimo codón de *xlnC-ss* (Figura 13A).

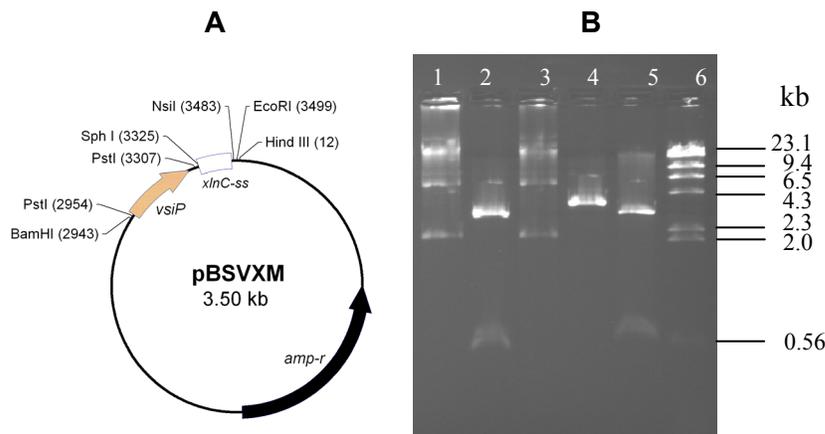


Figura 13. Mapa físico del plasmidio pBSVXM (A) y electroforesis en gel de agarosa al 1 % del pBSVXM nativo y chequeado por restricción (B). En (B) se aplicaron las muestras de ADN siguientes: 1, pBSVX nativo; 2, pBSVX *EcoR* I; 3, pBSVXM nativo; 4, pBSVXM *EcoR* I; 5, pBSVXM *EcoR* I/*BamH* I; 6, Lambda *Hind* III, se indican las tallas. Las abreviaturas: *vsip*, *xlnC-ss* y *amp-r* conservan el mismo significado que en la Figura 9.

Al realizarle una digestión comprobatoria a pBSVXM, este fue linealizado por el sitio *EcoR* I (Figura 13B, carril 4), mientras que el vector original al ser cortado con *EcoR* I dió lugar a dos bandas, una de 0,535 kb y otra de ~2,9 kb (Figura 13B, carril 2). La combinación de las enzimas *EcoR* I – *BamH* I al digerir a pBSVXM dieron lugar a una banda de 0,556 kb, contentiva del casete de expresión *vsip/xlnC-ss*, y otra de 2,9 kb, correspondiente al resto del vector digerido en las mismas condiciones (Figura 13B, carril 5). Para verificar la localización del sitio único *EcoR* I presente en pBSVXM se secuenció el extremo 5' del *vsip* y se verificó la secuencia nucleotídica correspondiente a las señales traducionales y de secreción de *xlnC-ss* presentes en pBSVXM.

Posteriormente se construyó el plasmidio pOXInCIFN, que codificó para la proteína de fusión XInC-sp/IFN espaciada por los aminoácidos ATT entre el XInC-sp y el IFN α 2b (Figura 14A). Los residuos ATT son los tres primeros aminoácidos de la XInC y se mantuvieron en la construcción con la finalidad de conservar el sitio de corte proteolítico nativo y favorecer el procesamiento de la pre-proteína XInC-sp/IFN α 2b por las SPases de *S. lividans*. La secuencia nucleotídica correspondiente a la fusión entre la *xInC-ss* y el *ifn α 2b* fue verificada.

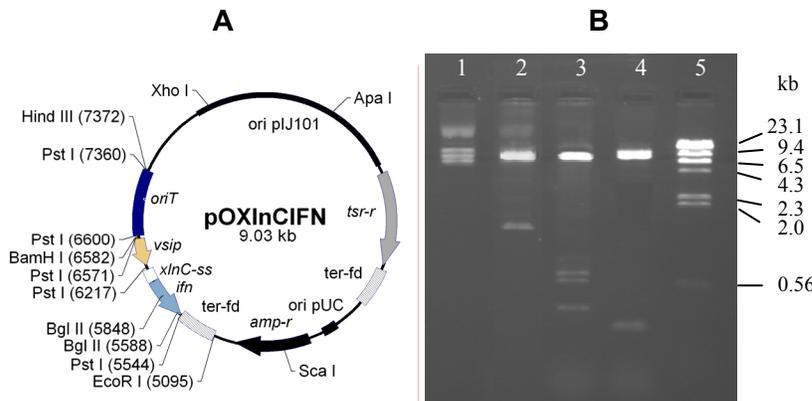


Figura 14. Mapa genético del plasmidio pOXInCIFN (A) y electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % del plasmidio nativo y analizado por restricción (B). En (B) se aplicaron las muestras de ADN siguientes: 1, pOXInCIFN nativo; 2, pOXInCIFN *BamH I/EcoR I*; 3, pOXInCIFN *Pst I*; 4, pOXInCIFN *Bgl II*; 5, Lambda *Hind III*, se indican las tallas. Las abreviaturas: *vsip*, *xInC-ss*, *ifn*, *ter-fd*, *oriT*, *tsr-r* y *amp-r* conservan el mismo significado que en las Figuras 7 y 9 y el Anexo 5.

En la Figura 14 se muestran los resultados de un análisis por restricción de pOXInCIFN. Las enzimas *BamH I* y *EcoR I* dieron lugar a una banda de 1,486 kb, contentiva del casete *vsip/xInC-ss/ifn α 2b/ter-fd*, y otra de 7,5 kb correspondiente al resto de vector digerido con las mismas enzimas (Figura 14B, carril 2). La enzima *Pst I* dió lugar a cuatro fragmentos: uno de 0,354 kb, correspondiente a *vsip*, otro de 0,673 kb, contentivo de la *xInC-ss* fusionada al *ifn α 2b*, otro de 0,76 kb, correspondiente a la región *oriT* para la transferencia conjugativa de ADN entre especies, y otro de ~7,3 kb, correspondiente al resto de vector con la región del *ter-fd* incorporada (Figura 14B, carril 3). La digestión de pOXInCIFN con *Bgl II* dió lugar a una banda de 0,26 kb, producto del corte de la enzima en las posiciones 193 y 454 del *ifn α 2b*, y otro de ~8,8 kb, perteneciente al resto del vector digerido con *Bgl II* (Figura 14B, carril 4).

4.1.2 Obtención de plasmidios replicativos que codifican para la SKC-2 en *S. lividans*

4.1.2.1. Obtención de un plasmidio que codifica para la SKC-2 fusionada al LipA-sp

Con la finalidad de obtener una construcción plasmídica que codifique para una proteína de fusión LipA-sp/SKC-2, el gen *skc-2* se insertó cadena abajo del codón 46 de la *lipA-ss* portada por el vector plasmídico pUCA (epígrafe 4.1.1.1). El plasmidio obtenido se denominó pOlipA1SK (Figura 15A) y la secuencia nucleotídica correspondiente a la fusión entre la *lipA-ss* y el *skc-2* fue verificada.

En la Figura 15D se muestra el resultado obtenido de un análisis por restricción de pOlipA1SK. Con la enzima *Hind* III, que tiene un sitio de corte en la posición 749 del gen *skc-2* y otro en la región de clonación múltiple del vector, se produjo una banda de 0,550 kb correspondiente a la región 3' del gen *skc-2* y otra de ~8,0 kb, perteneciente al resto de vector (Figura 15D, carril 2). La digestión de pOlipA1SK con la enzima *Eco*R I dió lugar a una banda de 1,701 kb, contentiva del casete de expresión-secreción *ermEp*//lipA-ss/skc-2*, y otra de ~6,8 kb, perteneciente al resto del vector digerido con *Eco*R I (Figura 15D, carril 3). En cambio, la enzima *Bam*H I, que tiene dos sitios de corte muy cercanos (25 pb) en la región -10 del promotor *ermE** y en el *rbs-lipA*, dió lugar a una banda de ~8,5 kb, correspondiente al resto del vector (Figura 15D, carril 4).

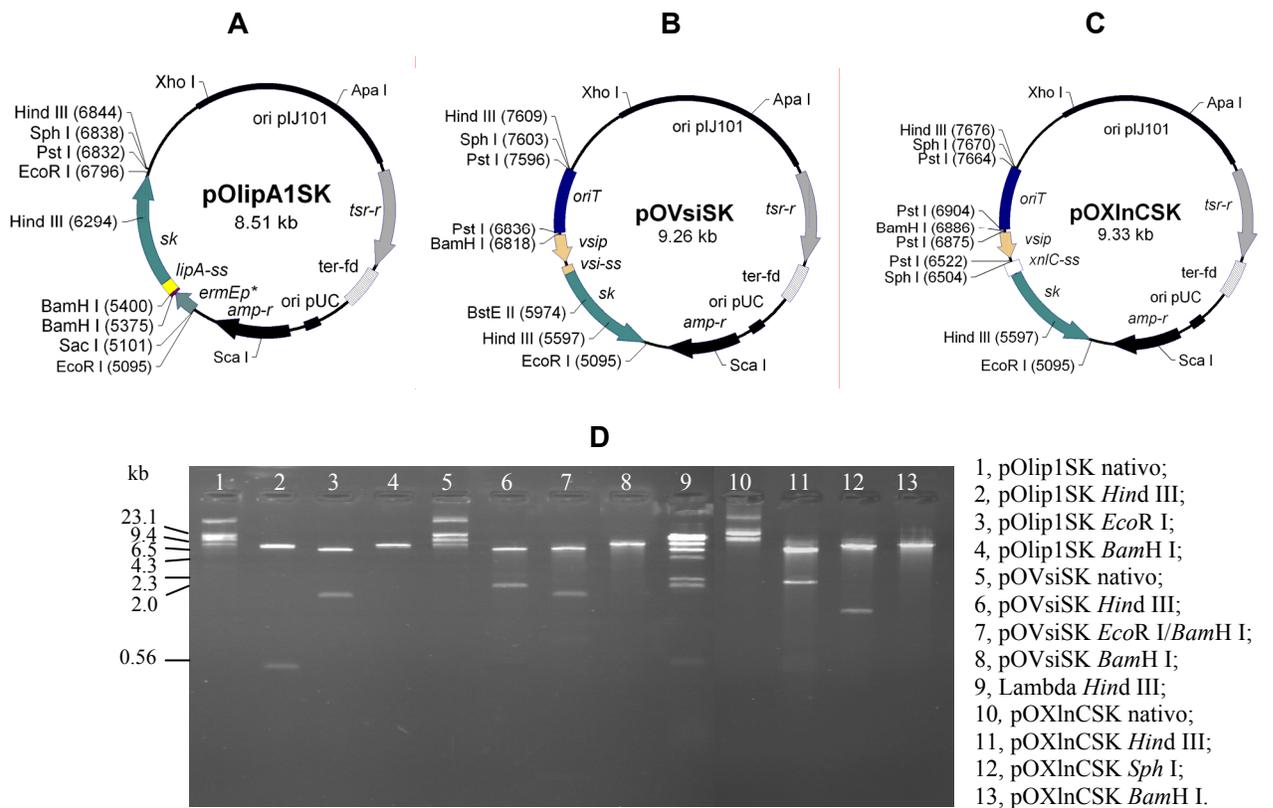


Figura 15. Construcción de los vectores pOlipA1SK (A), pOVsiSK (B) y pOXlnCSK (C) y electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los plasmidios nativos y analizados por restricción (D). Abreviaturas: *lipA*, *amp-r*, *ermEp**, *tsr-r*, *ter-fd*, *sk*, *lacZ*, *oriT*, *vsip*, *vsi-ss*, *xlnC-ss* y los ori de pIJ101 y pUC19 conservan el mismo significado que en las Figuras 5,6,8 y 9 y los Anexo 4 y 5. En D cada carril se identificó con el nombre de la molécula aplicada y se indican las tallas de los fragmentos de ADN del fago λ digerido con *Hind* III.

4.1.2.2 Obtención de un plasmidio que codifica para la SKC-2 fusionada al Vsi-sp

Con la finalidad de estudiar la translocación de la SKC-2 a través de la vía Sec se seleccionaron las secuencias reguladoras y de secreción del *vsi*, de forma similar al diseño

experimental seguido con el IFN α 2b. El vector plasmídico construido se denominó pOVsiSK, el cual codifica para una proteína de fusión Vsi-sp/SKC-2 espaciada por los aminoácidos EA (Figura 15B). En la Figura 15D se muestra el resultado obtenido de un análisis de restricción de pOVsiSK mediante la digestión con la enzima *Hind* III, la cual tiene un sitio de corte en la posición 749 del gen *skc-2* y otro en el sitio múltiple de clonación del vector. Como resultado se produjo una banda de 2,012 kb, correspondiente a la región 5' del gen *skc-2* fusionada a las secuencias reguladoras de *vsi* y a la región *oriT*, y otra banda de ~7,2 kb, perteneciente al resto de vector (Figura 15D, carril 6). Realizando otro análisis por restricción del plasmidio pOVsiSK con las enzimas *Bam*H I y *Eco*R I se obtuvieron dos bandas, donde la menor de ellas, de 1,723 kb, contenía el casete *vsip/vsi-ss/skc-2*. La otra banda de ~7,5 kb correspondió al resto del vector digerido con las mismas enzimas (Figura 15D, carril 7). En cambio, la enzima *Bam*H I, que tiene sitio único en la posición 6818 de pOVsiSK (Figura 15B), linealizó al plasmidio permitiendo estimar su tamaño de 9,3 kb (Figura 15D, carril 8).

4.1.2.3 Obtención de un plasmidio que codifica para la SKC-2 fusionada al XInC-sp

Se construyó el vector plasmídico pOXInCSK mediante la fusión del gen *skc-2* cadena abajo de la *xInC-ss*, la cual codifica para el péptido señal XInC-sp, que media la translocación de las proteínas exclusivamente por la vía Tat en *Streptomyces*²². El vector pOXInCSK codifica para una proteína de fusión XInC-sp/SKC-2 espaciada por los aminoácidos ATT (Figura 15C). En la Figura 15D se muestra el resultado de un análisis de restricción de pOXInCSK. La enzima *Hind* III tiene un sitio de corte en la posición 749 del gen *skc-2* y otro en la región de clonación múltiple del vector. Como resultado se produjo una banda de 2,079 kb, correspondiente a la región 5' del gen *skc-2* fusionada al *vsip*, a *xInC-ss* y la región *oriT*, y otra banda de ~7,2 kb, perteneciente al resto de vector pOXInCSK (Figura 15D, carril 11). En cambio, cuando el plasmidio pOXInCSK fue digerido con la enzima *Sph* I, que tiene sitio de corte en la región de clonación múltiple del vector y en el primer codón de *xInC-ss*, se originaron dos bandas: una de 1,166 kb, que contenía la región *oriT* y el promotor *vsi*, y otra banda de 8,2 kb, que correspondió al resto del vector digerido (Figura 15D, carril 12). La enzima *Bam*H I linealizó a pOXInCSK por el sitio único de corte en la posición 6886 del plasmidio (Figura 15C) y permitió verificar su talla de 9,3 kb (Figura 15D, carril 13).

4.1.3 Obtención de las cepas de *S. lividans* TK24 recombinantes

Los vectores plasmídicos pA Δ XS, pUCIAS, pOVsilFN y pOXInCIFN se introdujeron por separado en protoplastos de *S. lividans* TK24 y se obtuvieron cepas recombinantes que codifican para proteínas de fusión con el IFN α 2b, cuyas características se presentan en la Tabla 2. Se seleccionó a *S. lividans* TK24 como hospedero heterólogo debido a que, entre los

derivados de *S. lividans* 66, es la cepa que secreta menos cantidad de proteasas al medio extracelular¹¹⁸.

Tabla 2. Características genéticas de las cepas recombinantes de *S. lividans* TK24 obtenidas

Cepa	Fusión génica que porta	Promotor	RBS	Terminador de la transcripción
<i>S. lividans</i> TK24 [pAΔXS]	<i>lipA-ss/E₆/ifnα2b</i>	<i>ermEp*</i>	<i>lipA</i>	ter-T4
<i>S. lividans</i> TK24 [pUCIAS]	<i>lipA-ss/ifnα2b</i>	<i>ermEp*</i>	<i>lipA</i>	ter-T4
<i>S. lividans</i> TK24 [pOVsiIFN]	<i>vsi-ss/ifnα2b</i>	<i>vsi</i>	<i>vsi</i>	ter-fd
<i>S. lividans</i> TK24 [pOXInCIFN]	<i>xInC-ss/ifnα2b</i>	<i>vsi</i>	<i>xInC</i>	ter-fd
<i>S. lividans</i> TK24 [pOlipA1SK]	<i>lipA-ss/skc-2</i>	<i>ermEp*</i>	<i>lipA</i>	n.u.
<i>S. lividans</i> TK24 [pOVsiSK]	<i>vsi-ss/skc-2</i>	<i>vsi</i>	<i>vsi</i>	n.u.
<i>S. lividans</i> TK24 [pOXInCSK]	<i>xInC-ss/skc-2</i>	<i>vsi</i>	<i>xInC</i>	n.u.

Abreviaturas: *ifnα2b*, gen del interferón α 2b humano; *skc-2*, gen de la estreptoquinasa de *S. equisimilis* ATCC9542; *lipA*, gen de la lipasa A de *S. exfoliatus* M11; *vsi*, gen del inhibidor de subtilisina de *S. venezuelae* CBS762.70; *xInC*, gen de la xilanaso C de *S. lividans*; “-ss”: secuencia señal; E₆: espaciador que codifica para los aminoácidos DSSKLM; *ermEp**, promotor de resistencia a eritromicina de *S. erythraea*; ter-T4, terminador de la transcripción del gen 32 del bacteriófago T4; ter-fd, terminador de la transcripción del fago fd; n.u., no utilizado.

Los vectores plasmídicos pOlipA1SK, pOVsiSK y pOXInCSK se introdujeron por separado en protoplastos de *S. lividans* TK24 y se obtuvieron cepas recombinantes (Tabla 2) que fueron posteriormente útiles para evaluar la secreción de la SKC-2 al sobrenadante de cultivo.

4.2 Evaluación de la secreción del IFNα2b o la SKC-2 por *S. lividans*

4.2.1 Expresión secretoria del IFNα2b en *S. lividans*

La cantidad de IFNα2b presente en los SN de las cepas de *S. lividans* TK24 [pAΔXS], *S. lividans* TK24 [pUCIAS], *S. lividans* TK24 [pOVsiIFN] y *S. lividans* TK24 [pOXInCIFN], cultivadas en caldo BTSB, fue cuantificada mediante la técnica de ELISA a intervalos de 24 horas por cuatro días. Los valores máximos de IFNα2b secretado al SN por las cepas de *S. lividans* TK24 [pAΔXS], *S. lividans* TK24 [pUCIAS] y *S. lividans* TK24 [pOVsiIFN] fueron detectados a las 72 horas de cultivo, etapa que coincidió con el final de la fase exponencial de crecimiento de las cepas, la cual se caracteriza por el incremento de la actividad proteolítica asociada al metabolismo secundario¹²² (Figura 16, A-C). La concentración mayor de IFNα2b secretado al SN se obtuvo cuando el IFNα2b fue fusionado al péptido señal LipA-sp (582 ± 20 μg l⁻¹).

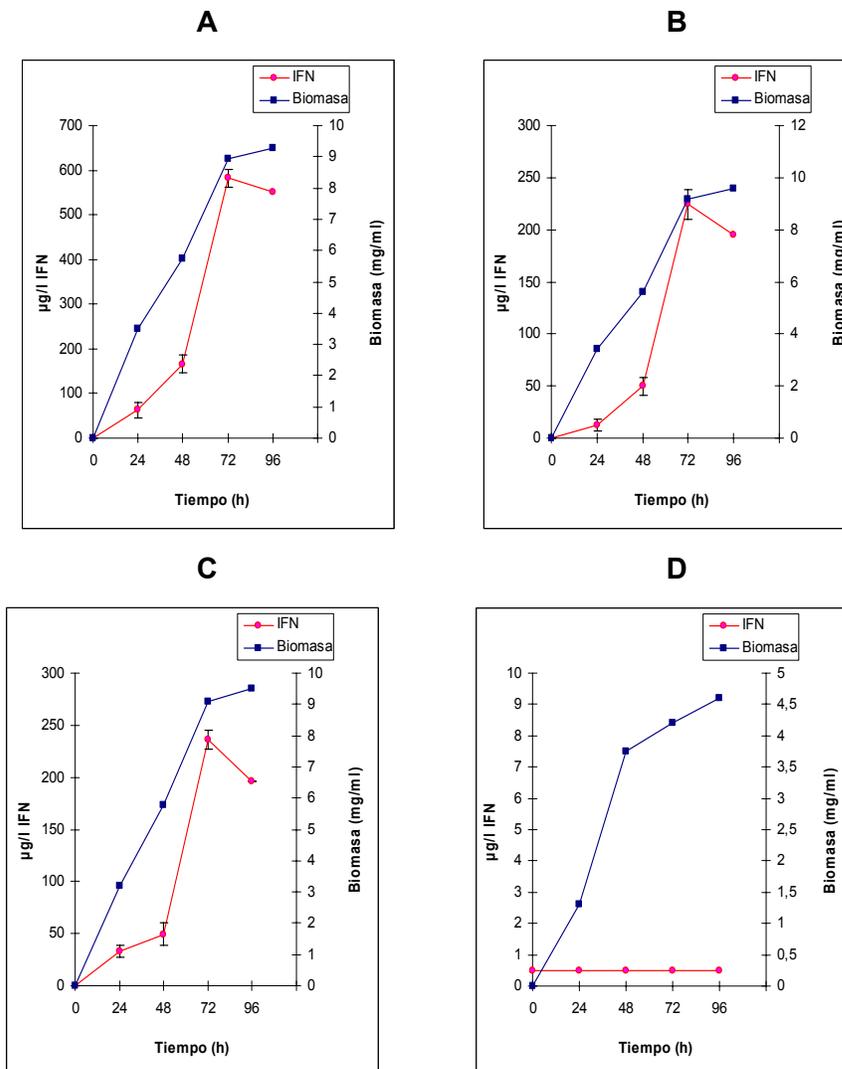


Figura 16. Cinética de la secreción del IFN α 2b en correspondencia con el crecimiento de las cepas de *S. lividans* TK24 [pΔXS] (A), *S. lividans* TK24 [pUCIAS] (B), *S. lividans* TK24 [pOVsilIFN] (C) y *S. lividans* TK24 [pOXInCIFN] (D) cultivadas en BTSB en zaranda por 96 horas. La concentración de IFN α 2b (IFN) en los sobrenadantes de cultivo se determinó mediante la técnica de ELISA, límite de detección: 0,5 $\mu\text{g l}^{-1}$ ²³¹. Los valores de concentración de IFN α 2b fueron el promedio de tres estudios cinéticos donde cada cepa fue cultivada por duplicado. El crecimiento fue estimado por mediciones del peso seco de la biomasa (mg ml^{-1}), los valores de error estándar estuvieron entre 0.1 y 0.2.

Las señales reguladoras del inhibidor de subtilisina de *S. venezuelae* CBS762.70 han sido eficientes en dirigir la secreción de proteínas heterólogas a través del proceso Sec a altos niveles en *S. lividans* como es el caso del mTNF α o la xiloglucanasa de *Jonesia* sp.^{8,17}. Sin embargo, el IFN α 2b fue expresado a bajos niveles ($236 \pm 9 \mu\text{g l}^{-1}$) cuando las señales reguladoras del Vsi fueron utilizadas para dirigir su expresión. Además, los niveles fueron comparables a los obtenidos cuando el IFN α 2b fue fusionado directamente al péptido señal de la lipasa A de *S. exfoliatus* M11.

El IFN α 2b no fue detectado en las fracciones del SN de *S. lividans* TK24 [pOXInCIFN] (Figura 16D), lo cual indicó que el IFN α 2b no se secretó cuando fue fusionado al péptido señal de la xilanasas C de *S. lividans* a niveles mayores que los que detecta el ELISA (0,5 μ g l⁻¹)²³¹. Este resultado sugiere que esta proteína probablemente no es compatible con el sistema de secreción Tat, por donde la debe translocar el péptido señal de la xilanasas C. El IFN α 2b posee cuatro cisteínas involucradas en la formación de dos puentes disulfuro intramoleculares, donde el puente Cys29 - Cys138 es esencial para su actividad biológica y necesario para su correcto plegamiento. Es probable que en las condiciones reductoras del citoplasma, la formación de los puentes disulfuros del IFN α 2b no este favorecida, la molécula no se pliegue adecuadamente y no este en un estado competente para la translocación Tat. Como consecuencia, la proteína de fusión XInC-sp/IFN α 2b pudiera ser más propensa a la degradación por proteasas o peptidasas del hospedero.

La integridad del IFN α 2b secretado al medio de cultivo por las cepas de *S. lividans* TK24 [pA Δ XS], *S. lividans* TK24 [pUCIAS] y *S. lividans* TK24 [pOVsilFN] fue evaluada a las 48 y 72 horas de cultivo en caldo BTSB mediante la técnica de *Western blotting* empleando un anticuerpo policlonal anti-IFN α 2b. Bandas de aproximadamente 20 kDa fueron detectadas en los sobrenadantes de cultivo de *S. lividans* TK24 [pA Δ XS], *S. lividans* TK24 [pUCIAS] y *S. lividans* TK24 [pOVsilFN] a las 48 y 72 horas (Figura 17A, carriles 3,4,6,7,8 y 10), lo que indicó que dichas cepas secretaron el IFN α 2b al SN con una talla adecuada. No se detectaron bandas de menor tamaño en las fracciones extracelulares de las cepas recombinantes. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Pulido y cols sobre la estabilidad del IFN α 2b cuando fue expresado intracelularmente en *S. lividans*¹⁷⁵.

No se detectaron bandas en las fracciones correspondientes al SN o a los extractos celulares de *S. lividans* [pOXInCIFN], lo cual indicó que la proteína cuando se fusionó al XInC-sp no se expresó a niveles mayores que los que detecta el *Western blotting* (Figura 17A y B, carriles 5 y 9). En general, no se detectaron especies precursoras o procesadas del IFN α 2b en los extractos celulares de las cepas de *S. lividans* construidas, considerando que la cantidad aplicada en cada carril fue equivalente a 1ml de cultivo (Figura 17B, carriles 3-10). Esto indicó que la proteína no se acumuló en el citoplasma de las cepas recombinantes a niveles mayores que los que detecta el *Western blotting* y en el caso de *S. lividans* TK24 [pA Δ XS], *S. lividans* TK24 [pUCIAS] y *S. lividans* TK24 [pOVsilFN], las pre-proteínas fueron correctamente procesadas y el IFN α 2b fue eficientemente translocado a través de la membrana celular. Estos resultados difieren de los obtenidos por Schein y cols cuando estudiaron la expresión

secretoria del IFN α 2b fusionado al péptido señal de la α amilasa de *B. amyloliquefaciens* en *B. subtilis* IH6140. En ese estudio encontraron una proporción superior de moléculas de IFN α 2b precursoras y procesadas en el citoplasma (entre 30 y 40%) respecto a la cantidad de IFN α 2b detectado en el medio extracelular durante la fase estacionaria temprana de crecimiento, antes de que la actividad de proteasas del hospedero fuera significativa¹⁷⁸.

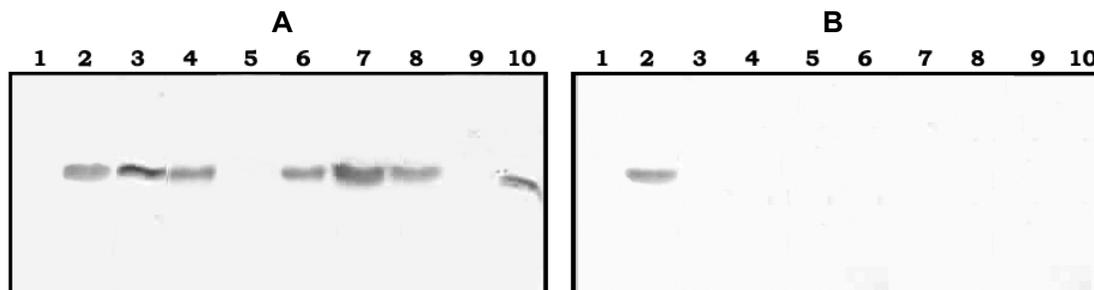


Figura 17. Análisis mediante Western blotting de la expresión de IFN α 2b por las cepas de *S. lividans* transformadas con los plasmidios pA Δ XS, pUCIAS, pOVsilFN o pOXInCIFN cultivadas en caldo BTB. (A) Muestras de sobrenadantes de cultivo (SN) y (B) Muestras de extractos celulares (Ec). En cada carril se aplicó 25 μ L de los SN de cada cepa. En el caso de los Ec fueron precipitadas cantidades equivalentes a 1 ml de cultivo con una mezcla de metanol-cloroformo (1:3, v/v). 1, *S. lividans* 72h; 2, 50 ng IFN α 2b patrón; 3, *S. lividans* [pA Δ XS] 48h; 4, *S. lividans* [pUCIAS] 48h; 5, *S. lividans* [pOXInCIFN] 48h; 6, *S. lividans* [pOVsilFN] 48h; 7, *S. lividans* [pA Δ XS] 72h; 8, *S. lividans* [pUCIAS] 72h; 9, *S. lividans* [pOXInCIFN] 72h; 10, *S. lividans* [pOVsilFN] 72h.

La actividad biológica del IFN α 2b se estimó a partir de su potencia antiviral. A las 72 horas de cultivo la potencia antiviral promedio presente en el medio de cultivo de *S. lividans* TK24 [pA Δ XS] fue mayor que la de *S. lividans* TK24 [pOVsilFN] y *S. lividans* TK24 [pUCIAS], mientras que la cepa hospedero *S. lividans* TK24 no produjo actividad detectable (Tabla 3, columna 2). Ello permite concluir que el IFN α 2b secretado al medio de cultivo es biológicamente activo.

Aunque la actividad antiviral promedio del cultivo de *S. lividans* TK24 [pA Δ XS] fue aparentemente 8 veces mayor que la del de *S. lividans* TK24 [pUCIAS], la cantidad de IFN α 2b detectada en el medio de cultivo es todavía subóptima para acometer el escalado para la producción con fines industriales de esta biomolécula (Tabla 3, columna 3).

La actividad antiviral secretada por *S. lividans* [pA Δ XS] a las 72 horas de cultivo es comparable con la detectada por Pulido y cols (4×10^6 UI l⁻¹) al expresar el gen *ifn α 2b* controlado por el promotor de la *aph*, el RBS de la lipoproteína de membrana de *E. coli* y la secuencia del terminador transcripcional del gen *aph*¹²⁵. Sin embargo, la ventaja del resultado actual es que el producto génico se secretó al medio de cultivo. El vector pA Δ XS contiene señales de expresión-secretión diferentes, tales como el promotor *ermEp**, la *lipA*-ss, las señales traduccionales de *lipA* y el terminador de la transcripción del fago T4 (Figura 11A).

Dadas las diferencias existentes entre las secuencias reguladoras de ambas construcciones, vale señalar que la eficiencia de transcripción de los promotores *ermEp** y *aph* ha sido comparada en varios estudios y los niveles de expresión dependieron del gen en estudio^{114,126}.

Tabla 3. Titulación antiviral y concentración del IFN α 2b en el sobrenadante de cultivo de *S. lividans* TK24 [pA Δ XS], *S. lividans* TK24 [pUCIAS] y *S. lividans* TK24 [pOVsilFN] a las 72 horas de crecimiento en caldo BTSB.

Sobrenadantes de cultivo	Potencia Antiviral (UI l ⁻¹)	Concentración ELISA (μ g l ⁻¹)
<i>S. lividans</i> TK24 [pA Δ XS]	6,91 \pm 2,14 x 10 ⁷	582 \pm 20
<i>S. lividans</i> TK24 [pUCIAS]	3,48 \pm 1,02 x 10 ⁶	226 \pm 13
<i>S. lividans</i> TK 24 [pOVsilFN]	3,69 \pm 0,52 x 10 ⁷	236 \pm 9
<i>S. lividans</i> TK24	< 10 ³	< 0,5

La actividad antiviral inducida por el IFN α 2b fue determinada por la inhibición del efecto citopático del virus Mengo sobre las células Hep-2, límite de detección: 1000 UI l⁻¹²³⁵. La concentración del IFN α 2b fue medida por ELISA, límite de detección: 0,5 μ g l⁻¹²³¹. Los valores de actividad antiviral y concentración de IFN α 2b fueron el promedio de tres estudios cinéticos.

El nivel de expresión del IFN α 2b secretado por *S. lividans* [pA Δ XS] fue también comparable con el reportado por Schein y cols al estudiar la expresión secretoria de IFN α 2b fusionado al péptido señal de la α amilasa de *B. amyloliquefaciens* en *B. subtilis* IH6140 (0,5 -1 mg l⁻¹ de IFN α 2b, 1 x 10⁸ UI l⁻¹)⁴². Sin embargo, el nivel de expresión del IFN α 2b producido por *S. lividans* en este trabajo fue mucho menor que el reportado por Shi y cols para la fusión el gen *ifn α 2b* nativo a la secuencia señal del factor α -mating de *S. cerevisiae* bajo el control del promotor *pAOX-1* en *P. pastoris*. En aquel estudio, el IFN α 2b fue purificado con un rendimiento de 298 mg l⁻¹ y fue caracterizado satisfactoriamente²⁴¹. Teniendo en consideración lo antes expuesto, un sistema atractivo de obtención del IFN α 2b en *S. lividans* tendría que alcanzar niveles de expresión en el orden de los 400 mg l⁻¹, equivalentes a los niveles secretados por *P. pastoris*, para ser competitivo y elegible para evaluar un proceso de purificación y caracterización de la proteína recombinante. De forma similar, el nivel de expresión del IFN α 2b secretado por *S. lividans* no es superior al obtenido a partir de *E. coli* (30 mg l⁻¹)¹⁷⁴. Sin embargo, tiene la ventaja de que la proteína se obtiene biológicamente activa en el medio de cultivo.

En el futuro pudieran evaluarse otras señales de secreción de proteínas abundantemente secretadas por *Streptomyces* y secuencias espaciadoras para la expresión del IFN α 2b. En *S. lividans*, se han informado varios estudios de secreción de proteínas de mamíferos donde la

estrategia que fue óptima para su producción fue la fusión a una secuencia señal²⁴². En algunos casos, el proceso de secreción afectó positivamente los procesos de transcripción y traducción del producto génico^{17,132}. Entre las proteínas producidas a partir de *S. lividans* se encuentran el GM-CSF, la hormona de crecimiento humano y el mTNF α ^{18,136}. Por lo antes analizado es posible que los niveles de expresión del *ifn α 2* aumenten cuando éste se fusione a una secuencia señal que sea más favorable para su translocación y esto influya positivamente en la dinámica de producción del IFN α 2b en *S. lividans*.

4.2.1.1 Proceso de secreción que utiliza el LipA-sp para mediar la translocación del IFN α 2b en *S. lividans*

De acuerdo al estado del arte actual, el LipA-sp tiene una estructura tripartita característica de un péptido señal dependiente del mecanismo Sec (ver Figura 5). Su región H es considerablemente hidrofóbica y no posee la secuencia motivo característica de los péptidos señales dependientes del mecanismo Tat [(S/T)-R-R-X-F-L-K] localizada en la vecindad entre las regiones N y H.

Con la finalidad de conocer el mecanismo que utiliza el LipA-sp para dirigir la secreción del IFN α 2b en *S. lividans* se utilizaron las cepas de *S. lividans* TK24 mutantes en los genes *tatB* o *tatC*, por ser las únicas cepas existentes de *Streptomyces* mutantes en genes de una de las dos vías de secreción de proteínas dependiente de péptido señal. *S. lividans* TK24 Δ *tatC* fue anteriormente utilizado para dilucidar que la tirosinasa de *S. antibioticus* y la xilanaso C de *S. lividans* son proteínas exclusivamente translocadas por la vía Tat en *S. lividans*, debido a que TatC es un componente esencial para la translocación Tat en *Streptomyces*^{21,22}. Se seleccionó el plasmidio pA Δ XS para introducirlo en protoplastos de *S. lividans* TK24 Δ *tatC* y *S. lividans* TK24 Δ *tatB* y posteriormente evaluar la expresión secretoria del IFN α 2b por las cepas obtenidas. Las características de las cepas construidas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Características genéticas de las cepas recombinantes de *S. lividans* TK24 Δ *tatB* y *S. lividans* TK24 Δ *tatC* obtenidas

Cepa	Fusión génica que porta	Promotor	RBS	Terminador de la transcripción
<i>S. lividans</i> TK24 Δ <i>tatB</i> [pA Δ XS]	<i>lipA</i> -ss/E δ / <i>ifnα2b</i>	<i>ermEp</i> *	<i>lipA</i>	ter-T4
<i>S. lividans</i> TK24 Δ <i>tatC</i> [pA Δ XS]	<i>lipA</i> -ss/E δ / <i>ifnα2b</i>	<i>ermEp</i> *	<i>lipA</i>	ter-T4

Abreviaturas: *ifn α 2b*, gen del interferón α 2b humano; *lipA*, gen de la lipasa A de *S. exfoliatus* M11; “-ss”: secuencia señal; E δ : espaciador que codifica para los aminoácidos DSSKLM; *ermEp**, promotor de resistencia a eritromicina de *S. erythraea*; ter-T4, terminador de la transcripción del gen 32 del bacteriófago T4; n.u., no utilizado.

La secreción de IFN α 2b al SN de cultivo de *S. lividans* TK24 Δ *tatB* [pA Δ XS] y *S. lividans* TK24 Δ *tatC* [pA Δ XS], crecidas en el caldo BTSB a las 72 horas de cultivo, se evaluó mediante la

técnica de *Western blotting*. Se seleccionó las 72 horas de cultivo por ser el tiempo en que se detectó mayores niveles de IFN α 2b en el medio extracelular de la cepa parental *S. lividans* TK24 [pA Δ XS]. La producción secretoria de IFN α 2b no se bloqueó en las cepas de *S. lividans* TK24 Δ tatB [pA Δ XS] o *S. lividans* TK24 Δ tatC [pA Δ XS] (Figura 18, carriles 3-8 vs 10). Los niveles de IFN α 2b fueron comparables a los producidos por la cepa parental *S. lividans* TK24 [pA Δ XS], en la cual los dos mecanismos de secreción dependientes de péptido señal están activos. Estos resultados evidencian experimentalmente que el LipA-sp es un péptido señal que promueve la translocación de proteínas a través de un mecanismo no dependiente del proceso Tat en *S. lividans*; lo cual, de acuerdo al estado del arte actual, sugiere que el LipA-sp media la translocación de proteínas a través de la vía Sec en *Streptomyces*.

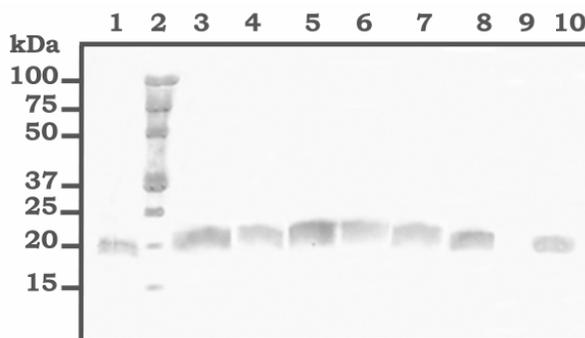


Figura 18. Detección por *Western blotting* de la expresión secretoria de IFN α 2b en *S. lividans* TK24 Δ tatB [pA Δ XS] y *S. lividans* TK24 Δ tatC [pA Δ XS] cultivadas en 100 ml de caldo BTBS por 72h. En cada carril se aplicó la cantidad de sobrenadante correspondiente a 0,5 mg de peso seco. De cada construcción se ensayaron tres transformantes diferentes (T1, T2 y T3). 1, 50 ng IFN α 2b patrón; 2, marcador de tallas moleculares (*Precision Plus proteinTM standards*, BIO-RAD, 100, 75, 50, 37, 25, 20 y 15 kDa); 3, *S. lividans* Δ tatC [pA Δ XS] T1; 4, *S. lividans* Δ tatC [pA Δ XS] T2; 5, *S. lividans* Δ tatC [pA Δ XS] T3; 6, *S. lividans* Δ tatB [pA Δ XS] T1; 7, *S. lividans* Δ tatB [pA Δ XS] T2; 8, *S. lividans* Δ tatB [pA Δ XS] T3; 9, *S. lividans* TK 24; 10, *S. lividans* TK 24 [pA Δ XS].

4.2.2 Expresión secretoria de la SKC-2 en *S. lividans*

La cantidad de la SKC-2 en los sobrenadantes de cultivo de *S. lividans* TK24 [pOlipA1SK], *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] y *S. lividans* TK24 [pOXInCSK], cultivadas en caldo BTBS por 72 horas, fue evaluada mediante la técnica de ELISA. Los niveles máximos de la SKC-2 secretada por *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] y *S. lividans* TK24 [pOXInCSK] fueron detectados a las 40 horas de cultivo, cerca del comienzo de la fase estacionaria (Figura 19A y B). Esta etapa del crecimiento de *S. lividans* se caracteriza por una abundante actividad proteolítica asociada al metabolismo secundario¹²². Hasta 4 mg l⁻¹ de SKC-2 fue cuantificada en el SN de *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] mediante la técnica de ELISA, mientras que sólo 100-150 μ g l⁻¹ de la SKC-2 fue detectada en las fracción extracelular de *S. lividans* TK24 [pOXInCSK]. Este resultado indicó que *S. lividans* transloca la SKC-2 a través de las vías Sec y Tat. Los rendimientos fueron mayores (aproximadamente 27 veces) cuando la SKC-2 se fusionó al Vsi-sp -dependiente de la vía Sec-, comparado con la fusión al XInC-sp -dependiente de la vía

Tat-. Después de las 40 horas de crecimiento, la cantidad de la SKC-2 disminuyó a niveles no detectables (Figura 19A y B).

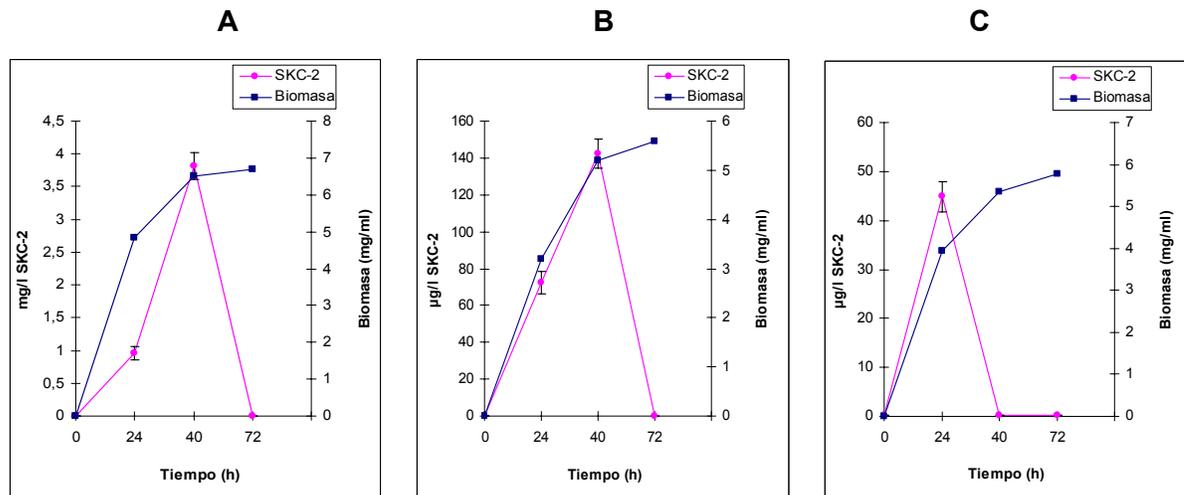


Figura 19. Cinética de secreción de la SKC-2 en correspondencia con el crecimiento de las cepas de *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] (A), *S. lividans* TK24 [pOXlnCSK] (B) o *S. lividans* TK24 [pOlipA1SK] (C) cultivadas en BTSB en zaranda por 72 horas. La concentración de SKC-2 en los sobrenadantes de cultivo fue determinada mediante la técnica de ELISA, límite de detección: $0,3 \mu\text{g l}^{-1}$ ²³⁶. Los valores de concentración de SKC-2 fueron el promedio de tres estudios cinéticos donde cada cepa fue cultivada por duplicado. El crecimiento fue estimado por mediciones del peso seco de la biomasa (mg ml^{-1}), los valores de error estándar estuvieron entre 0.1 y 0.2.

El proceso Tat en *S. lividans* TK24 ha sido utilizado para evaluar la producción secretoria de las proteínas de origen humano $\text{hTNF}\alpha$, la IL-10 y el $\text{IFN}\alpha 2\text{b}$. A esta lista de proteínas evaluadas se añade la SKC-2; un monómero, sin puentes disulfuro, de peso molecular moderado (47 kDa), bajo valor de punto isoelectrico (4,69) y secretada naturalmente al medio extracelular por un género de bacterias grampositivas del cual no se ha informado sobre la existencia de un mecanismo de secreción Tat funcional.

La SKC-2 también se secretó al SN cuando se fusionó al péptido señal de la lipasa A de *S. exfoliatus* M11, pero la cantidad de la SKC-2 detectada por ELISA fue menor que la secretada por las cepas de *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] o *S. lividans* [pOXlnCSK] y sólo se detectó a las 24 horas de cultivo (Figura 19C).

La integridad de la SKC-2 en los sobrenadantes de cultivo de *S. lividans* TK24 [pOlipA1SK], *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] y *S. lividans* TK24 [pOXlnCSK] fue evaluada a las 30 y 40 horas de crecimiento en caldo BTSB mediante la técnica de *Western blotting* empleando el anticuerpo monoclonal SK1. Una banda de aproximadamente 47 kDa fue detectada claramente en el SN de *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] a las 30 y 40 h. Bandas de menor tamaño, aproximadamente 44 y 32 kDa, también se observaron en los SN de *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] (Figura 20A, carriles 3 y 4). Este patrón de fragmentación de la SKC-2 coincidió

con el reportado para la SKC secretada por su hospedero natural^{218,243}. *S. equisimilis* secreta dos formas mayoritarias de la SKC: la SKC madura intacta con una masa molecular de 47 kDa y un producto de esta de 44 kDa. Este producto carece de 31 o 32 residuos de aminoácidos por el extremo carboxilo terminal y conserva la capacidad de activar al Plg²¹⁸. *S. equisimilis* también secreta un producto de 32 kDa, del cual se ha informado que se une al Plg pero no conserva la habilidad de activarlo²⁴³. En este sentido, Fay y Bokka informaron que las proteínas derivadas de la SKC, que carecían de 51 ó más residuos de aminoácidos por el extremo carboxilo, no fueron agentes trombolíticos efectivos²⁰³.

La SKC madura de 47 kDa también ha sido procesada a productos de 44 y 32 kDa cuando fue secretada por hospederos heterólogos como: *E. coli*^{45,210}, *S. sanguis*²¹⁸, *B. subtilis*⁵⁰, *L. lactis*⁵¹ y *P. mirabilis*²⁴⁴. Jackson y cols informaron que la modificación post-traduccional por el extremo carboxilo de la SKC, producida por *S. equisimilis* y *S. sanguis*, fue causada por actividad tipo quimotripsina²¹⁸. Este tipo de actividad y varios genes que codifican para serino proteasas tipo quimotripsina han sido reportados en *S. lividans*^{118,245}.

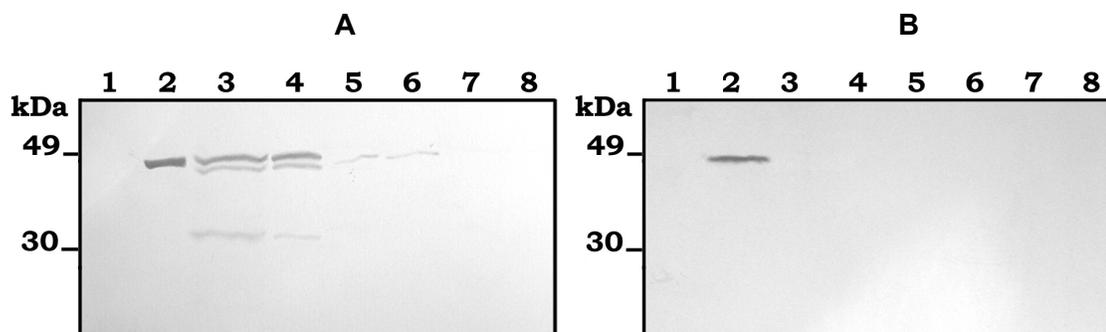


Figura 20. Detección por Western blotting de la expresión de la SKC-2 por las cepas de *S. lividans* portadoras de los plasmidios pOVsiSK, pOXInCSK o pOlipA1SK cultivadas en caldo BTSB. (A) Muestras de sobrenadantes de cultivo y (B) Muestras de extractos celulares. En cada carril se aplicaron las proteínas totales correspondientes a 100 μ L de los sobrenadante de cultivo de cada cepa y en el caso de los extractos celulares se aplicaron cantidades equivalentes a 1 ml de cultivo. Todas las muestras fueron precipitadas con una mezcla de metanol-cloroformo (1:3, v/v). 1, *S. lividans* 40h; 2, 60 ng SKC-2 patrón; 3, *S. lividans* [pOVsiSK] 30h; 4, *S. lividans* [pOVsiSK] 40h; 5, *S. lividans* [pOXInCSK] 30h; 6, *S. lividans* [pOXInCSK] 40h; 7, *S. lividans* [pOlipA1SK] 30h; 8, *S. lividans* [pOlipA1SK] 40h.

Cuando la SKC-2 fue fusionada al XInC-sp sólo se detectaron bandas tenues en los carriles correspondientes al SN de 30 y 40 h de cultivo de la cepa recombinante (Figura 20A, carriles 5 y 6). No se detectó la SKC-2 en las muestras correspondientes a las fracciones extracelulares de *S. lividans* TK24 [pOlipA1SK] a las 30 ó 40 horas de cultivo (Figura 20A, carriles 7 y 8), lo cual está en correspondencia con las bajas cantidades de la SKC-2 cuantificada por ELISA.

La SKC-2 no fue detectada en los extractos celulares de *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] o *S. lividans* TK24 [pOXInCSK] o *S. lividans* TK24 [pOlipA1SK], en cantidades equivalentes a 1 ml

de cultivo, a las 30 ó 40 horas de cultivo (Figura 20B, carriles 3-8). La ausencia de las pre-proteínas Vsi-sp/SKC-2 y XInC-sp/SKC-2 o las respectivas proteínas procesadas de los extractos celulares indicó que dichas especies no se acumularon en el interior celular a niveles mayores que los que detecta el *Western blotting* y por ende, fueron eficientemente translocadas a través de la membrana celular.

La actividad biológica de la SKC-2 secretada al SN por *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] y *S. lividans* TK24 [pOlipA1SK] fue determinada cualitativamente cuando las proteínas totales del SN fueron separadas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) que posteriormente fue sometido a un revelado por zimografía (3.5.2). La SKC-2 secretada por *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] y *S. lividans* TK24 [pOlipA1SK] activó al Plg, el cual es un zimógeno que se activa a plasmina y esta tiene propiedades de serino proteasa y degrada las proteínas de la leche (Figura 21, carriles 1 y 2). No se detectó actividad en la muestra correspondiente al SN de la cepa parental crecida en las mismas condiciones que las cepas recombinantes, lo cual evidenció la especificidad del ensayo (Figura 21, carril 3).

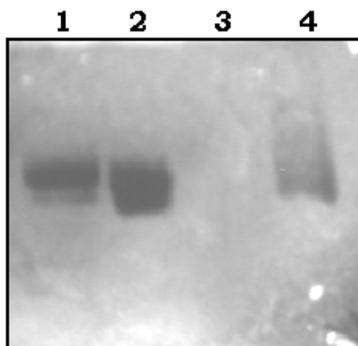


Figura 21. Detección por zimografía²³⁷ de la actividad biológica de la SKC-2 en el sobrenadante de cultivo de *S. lividans* TK24 [pOlipA1SK] y *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] crecidas en caldo BTSB. En cada carril se aplicaron las proteínas totales correspondientes a 100 μ L del sobrenadante de cultivo de cada cepa, el cual fue precipitado con una mezcla de metanol-cloroformo (1:3, v/v). 1, *S. lividans* TK24 [pOlipA1SK] 24 h; 2, *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] 40 h; 3, *S. lividans* TK24 40 h; 4, 1 μ g SKC-2 patrón purificada de *E. coli*.

4.3 Purificación de la SKC-2 secretada por *S. lividans*

Dado que los niveles de expresión del IFN α 2b secretado por las cepas de *S. lividans* TK24 construidas fue $< 2 \text{ mg l}^{-1}$ y la cantidad de SKC-2 secretada por *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] fue $> 2 \text{ mg l}^{-1}$ se seleccionó *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] para purificar la SKC-2 a partir del medio de cultivo.

4.3.1 Selección de un medio de cultivo adecuado para la producción secretoria y purificación de la SKC-2

Con la finalidad de seleccionar un medio de cultivo adecuado para la expresión y purificación de la SKC-2 se evaluó el desempeño de la cepa en los siguientes medios de cultivo: BTSB – utilizado en la sección 4.2.2 para evaluar la expresión y secreción de la SKC-2-, medio de la caseína y el TSB (sección 3.2.1). La cantidad de la SKC-2 secretada por *S. lividans* TK24

[pOVsiSK], cultivado en condiciones similares (inóculo, temperatura y agitación) por 72 horas en zaranda, fue determinada mediante la técnica de ELISA. Los valores máximos de SKC-2 secretada por *S. lividans* crecido en caldo TSB se detectaron a las 40 horas de cultivo ($3,7 \pm 0,04 \text{ mg l}^{-1}$) y fueron comparables a los secretados por la cepa recombinante cultivada en caldo BTSB ($3,82 \pm 0,1 \text{ mg l}^{-1}$) (Figura 22A y B). En cambio, la SKC-2 no se detectó en el SN de la cepa recombinante crecida en el medio de la caseína (Figura 22C), el cual fue utilizado satisfactoriamente para la expresión y purificación de la calcitoina de salmón a partir del medio de cultivo de *S. lividans*²⁵.

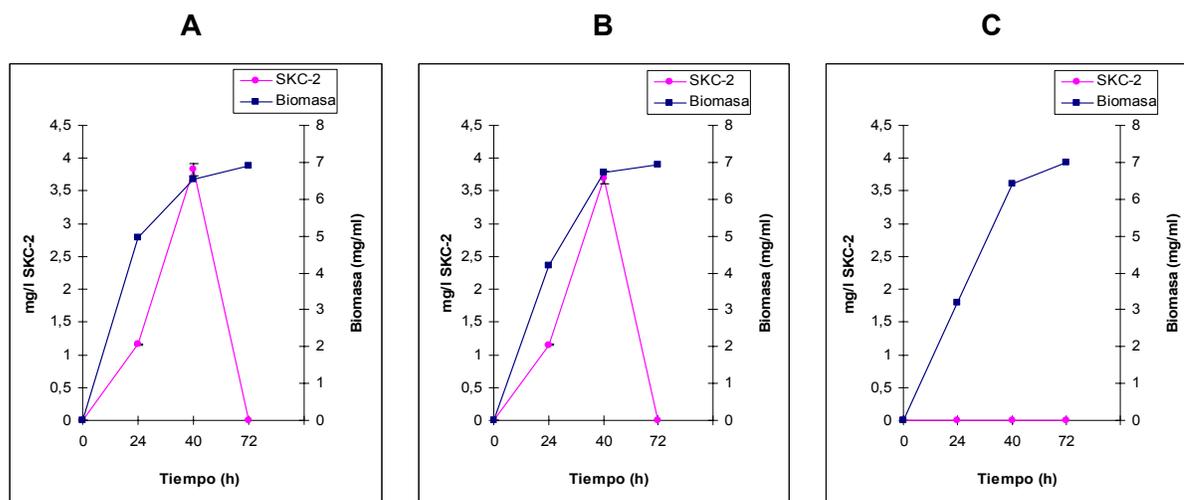


Figura 22. Cinética de secreción de la SKC-2 en correspondencia con el crecimiento de *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] cultivado en caldo BTSB (A), en TSB (B) y en medio de la caseína (C) en zaranda por 72 horas. La concentración de SKC-2 en los sobrenadantes de cultivo fue determinada mediante la técnica de ELISA, límite de detección: $0,3 \mu\text{g l}^{-1}$ ²³⁶. Los valores de concentración de SKC-2 fueron el promedio de dos estudios cinéticos donde cada cepa fue cultivada por triplicado. El crecimiento fue estimado por mediciones del peso seco de la biomasa (mg ml^{-1}), los valores de error estándar estuvieron entre 0.1 y 0.2.

La integridad de la SKC-2 secretada fue analizada por *Western blotting*, por ser una técnica que permite evaluar el patrón y la extensión de la fragmentación de la SKC-2 recombinante. Se detectó un patrón similar de fragmentación de la SKC-2 de 47 kDa en las especies moleculares de 44 y 32 kDa a las 40 horas de crecimiento de *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] cultivado tanto en el caldo BTSB como en el medio TSB (Figura 23, carriles 3-5 versus 6-8). El análisis densitométrico mostró que la especie molecular de 47 kDa fue mayoritaria en ambos casos (55-60%), en relación con las especies moleculares de 44 y 32 kDa. Estos resultados son favorables al compararlos con los informados por Balagurunathan y cols, que reportaron que la SKC secretada por *E. coli* sufrió una extensa degradación proteolítica y la especie molecular de 47 kDa representó solamente el 30 - 35% de la estreptoquinasa total producida²¹⁴.

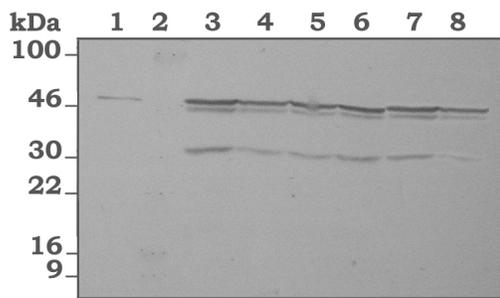


Figura 23. Detección mediante *Western blotting* de la expresión de la SKC-2 en el medio de cultivo de *S. lividans* [pOVsiSK] crecido en caldo BTSB y TSB por 40 horas. En cada carril fueron aplicadas las proteínas totales de 100 μg de sobrenadantes de cultivo de *S. lividans* [pOVsiSK] cultivado por triplicado (E1, E2 y E3). 1, 60 ng SKC-2 patrón; 2, marcador de tallas moleculares *Prestained SDS-PAGE standards broad range, BIO-RAD*, cuyas tallas aparecen en la izquierda; 3, BTSB E1; 4, BTSB E2; 5, BTSB E3, 6, TSB E1, 7, TSB E2; 8, TSB E3.

Resultados adicionales de este estudio fueron que el caldo BTSB fue significativamente pigmentado y que *S. lividans* secretó cantidades apreciables de pigmentos melanoides al medio extracelular cuando fue cultivado en caldo BTSB. De ambos tipos de pigmentos se ha descrito que pueden interferir en los procesos cromatográficos¹⁸.

Teniendo en consideración los resultados antes expuestos y que:

- (a) el caldo TSB fue óptimo para la expresión secretoria del mTNF α , la xiloglucanasa de *Jonesia* sp. y el receptor de eritropoietina humano soluble y las tres proteínas fueron purificadas y caracterizadas satisfactoriamente^{8,18,246},
- (b) el medio TSB es más económico (sección 3.2.1)

se seleccionó al caldo TSB para cultivar a *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] en zaranda y realizar estudios de purificación de la SKC-2 a partir del medio de cultivo.

4.3.2 Purificación de la SKC-2

Teniendo definidas las condiciones de fermentación de *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] para la expresión secretoria de la SKC-2, la proteína se purificó a partir del sobrenadante de cultivo de la cepa crecida por 40 horas en caldo TSB en zaranda. El esquema establecido para la purificación de la SKC-2 incluyó, como primera etapa, una precipitación diferencial de las proteínas con sulfato de amonio al 45% de saturación. Para desalinizar el material proteico se realizó una diálisis con una membrana de límite de exclusión de 25 kDa; lo cual permitió la eliminación del inhibidor de subtilisina de *S. lividans* -el principal contaminante- y de otras proteínas de bajo peso molecular^{247,248}. Seguidamente, se realizó una cromatografía de intercambio aniónico en gel de DEAE Sepharose[®] *Fast Flow*. Como última etapa del proceso se utilizó una cromatografía de interacciones hidrofóbicas en matriz de TSK butilo. Se seleccionaron estas dos cromatografías por las experiencias previas informadas acerca de su efectividad en la purificación de las estreptoquinas SKC y SKC-2 nativas y recombinantes^{41,183,249,250}.

Inicialmente, la cromatografía de intercambio aniónico se realizó con elución de las proteínas en un gradiente lineal de NaCl a pH 6, según se describió en el epígrafe 3.6.1.1 de Materiales y Métodos. Al analizar el perfil proteico de los eluatos por SDS-PAGE se observaron bandas de 47 y 44 kDa que migraron conjuntamente a la SKC-2 patrón (Heberkinasa®) (Figura 24A, carriles 3-9). Estas bandas comenzaron a eluir a baja fuerza iónica y, en estas condiciones, se separaron apreciablemente de las proteínas del hospedero (Figura 24A, carriles 3-6; Figura 24C). En cambio, las proteínas no relacionadas del hospedero eluyeron principalmente por encima de 200 mM de NaCl (Figura 24A, carriles 7-9; Figura 24C). Para conocer si las bandas de 47 y 44 kDa, detectadas en los eluatos, eran especies moleculares de la SKC-2 se realizó un ensayo zimográfico. Se observaron bandas traslucidas de degradación de las proteínas de la leche en los eluatos 14 al 20, que migraron junto con la banda correspondiente a la SKC-2 patrón; lo cual indicó que las bandas de 47 y 44 kDa fueron capaces de activar el plasminógeno en su paso a plasmina (Figura 24B, carriles 3-9).

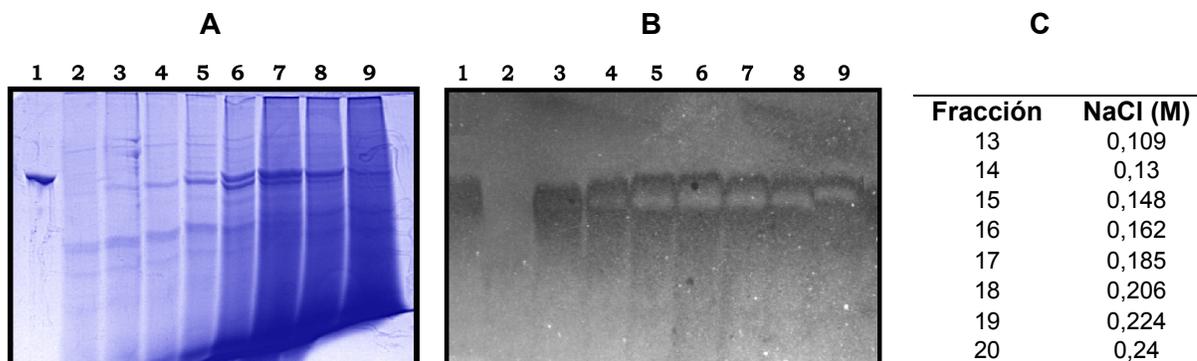


Figura 24. Análisis de una cromatografía de intercambio iónico en matriz de DEAE Sepharose® Fast Flow con elución en gradiente lineal de NaCl. (A) Electroforesis en gel de 10% SDS-PAGE visualizado con azul de Coomassie R-250, (B) Ensayo zimográfico²³⁷ y (C) Concentración de NaCl (M) en los eluatos. En cada pocillo se aplicó 40 µL de cada eluato. 1, 3 µg de SKC-2 patrón; 2-9: fracciones de la 13 a la 20. La estimación de la concentración de NaCl se realizó mediante un refractómetro manual S-10 (Whatman) y los datos representan la media de dos purificaciones.

Teniendo en consideración que sólo por debajo de 200 mM de NaCl hubo una separación aceptable de la SKC-2 de las proteínas del hospedero se seleccionó una concentración de NaCl cercana a la del eluato 16 (162 mM, Figura 24C) para realizar una cromatografía de intercambio aniónico con elución por paso. En el eluato 16 hubo mejor separación de la SKC-2 de las proteínas del hospedero que en los eluatos siguientes (17-20) (Figura 24A) y una banda de actividad amidolítica más intensa que en los eluatos anteriores (14-15) (Figura 24B). Se seleccionó 160 mM de NaCl para ensayar la cromatografía de intercambio aniónico con elución por paso, el cual es un valor cercano a los reportados para la elución de las estreptoquinasas SKC-2 y SKC recombinantes de matrices de intercambio aniónico^{204,215}.

El análisis por SDS-PAGE de una cromatografía representativa de intercambio aniónico con elución a 160 mM de NaCl se muestra en la Figura 25A. Una banda de 47 kDa, que co-migró con la SKC-2 patrón, comenzó a eluir apreciablemente a partir de los 30 ml de volumen de elución (Figura 25A, carril 11), a diferencia de una especie molecular de 44 kDa que eluyó fundamentalmente en las primeras fracciones (Figura 25A, carriles 6-10). Con la finalidad de verificar la identidad de las bandas de 47 y 44 kDa se realizó un ensayo zimográfico en el gel A, el cual fue previamente desteñido de acuerdo a lo descrito en el epígrafe 3.3.2 de Materiales y Métodos. Se analizaron muestras correspondientes al SN inicial, la fracción precipitada con 45% de sulfato de amonio y en los eluatos, teniendo como patrón a la SKC-2 purificada de *E. coli*. Este ensayo detectó zonas traslucidas de actividad amidolítica en las muestras correspondientes al SN y al material precipitado con sulfato de amonio y verificó que las especies moleculares de 47 y 44 kDa tuvieron actividad amidolítica (Figura 25B, carriles 2-3 y 6-10). Este resultado indicó que la especie molecular de 44 kDa es un producto derivado de la SKC-2 intacta de 47 kDa; lo cual coincide con lo informado por Jackson y cols sobre la naturaleza del producto de 44 kDa secretado por *S. equisimilis* H46A y *S. sanguis*²¹⁸. La proteína de 32 kDa no activó al Plg en el ensayo zimográfico (Figura 25B), lo cual también coincide con los resultados reportados por Jackson y cols y Avilán y cols, entre otros^{210,218}.

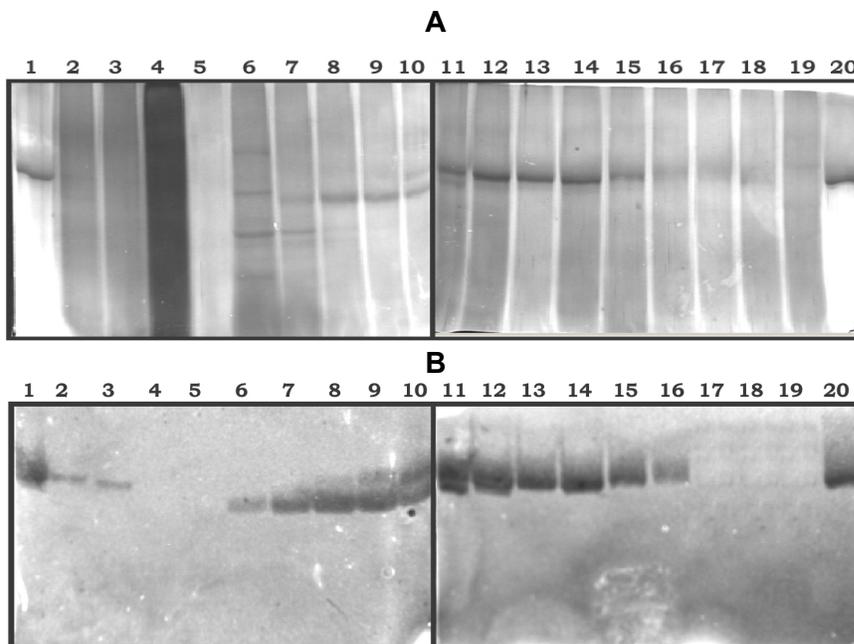


Figura 25. Análisis de la cromatografía en matriz de DEAE Sepharose® Fast Flow con elución a 160 mM de NaCl. (A) Electroforesis en gel de 10% SDS-PAGE visualizado con Zn-imidazol y (B) Detección de la actividad de SKC-2 mediante zimografía en el gel A²³⁷. 1 y 20, 2 µg de SKC-2 patrón; 2, 22 µL de sobrenadante de cultivo de *S. lividans* TK24 [pOVsiSK]; 3, 2 µL de material precipitado con sulfato de amonio; 4, 400 µL de material no enlazado a la matriz (precipitado con una mezcla de metanol-cloroformo (1:3, v/v)); 5, 400 µL de lavado de la columna (precipitado con una mezcla de metanol-cloroformo (1:3, v/v)); 6-19, Fracciones 2-15, en cada pocillo se aplicó 40 µL de las fracciones, (volumen de las fracciones: 5 ml).

Posteriormente se colectaron las fracciones 7-11 de la cromatografía de DEAE Sepharose® *Fast Flow* debido a que en esos eluatos la SKC-2 de 47 kDa fue la especie molecular mayoritaria (Figura 25A, carriles 11-15). La colecta obtenida fue aplicada en una columna de TSK butilo, según se describió en el epígrafe 3.6.1.2 de Materiales y Métodos.

En el perfil característico de la cromatografía de interacciones hidrofóbicas se puede apreciar la elución de los componentes no fijados a la matriz en las condiciones iniciales empleadas y en la etapa de lavado con tampón de equilibrio (Figura 26). Los componentes que no se fijaron se corresponden probablemente con proteínas del hospedero.

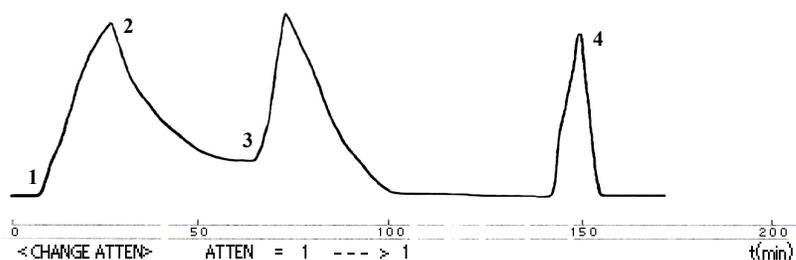


Figura 26. Perfil de la cromatografía de interacciones hidrofóbicas para la purificación de la SKC-2.

Columna: TSK butilo (1,45 x 4 cm; D.I. x L); volumen de la columna (VC): 6,6 ml; velocidad de flujo: 1 ml/min; volumen de las fracciones: 1ml; detección a 280 nm; 1, aplicación de la colecta de DEAE Sefarosa (25 ml); 2, lavado con tampón de equilibrio (20 mM Tris-HCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 M, pH 7); 3, elución en gradiente lineal con 15 VC de 0,5-0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 4, segundo pico de elución.

Cerca de los 150 min de la corrida cromatográfica se registró un pico de elución (4) (Figura 26). El análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones comprendidas en ese pico detectó una banda homogénea de 47 kDa (Figura 27A, carriles 5-9 y 11-17) y no se observaron otras especies moleculares de menor tamaño (Figura 27A). Mediante un análisis zimográfico, realizado al gel A, se verificó que la banda de 47 kDa activó al Plg (Figura 27B, carriles 5- 9 y 11-17). Este ensayo fue más sensible para la detección de la SKC-2 que la tinción con sales de zinc e imidazol, ya que se detectó la SKC-2 en el carril 18 solamente por zimografía.

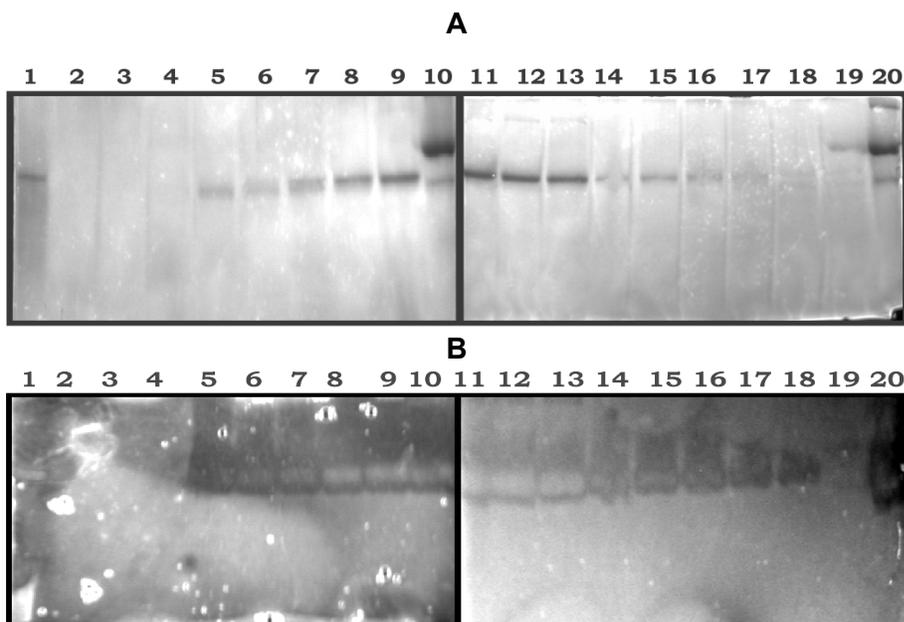


Figura 27. Análisis de la cromatografía de interacciones hidrofóbicas en matriz de TSK butilo. (A) Electroforesis en gel de 10% SDS-PAGE visualizado con Zn-imidazol y (B) Detección de la actividad de la SKC-2 mediante zimografía en los geles de A²³⁷. En cada carril se aplicaron las 100 μ L de cada fracción (F), las cuales fueron precipitados con una mezcla de metanol-cloroformo (1:3, v/v). 1, Colecta de DEAE Sepharose® *Fast Flow*; 2, 400 μ L de material no enlazado a la matriz; 3: 400 μ L de lavado de la columna; 4, F1; 5, F2; 6, F3; 7, F4; 8, F5; 9, F6; 10, SKC patrón (38,5 UI, Sigma); 11, F7; 12, F8; 13, F9; 14, F10; 15, F11; 16, F12; 17, F15; 18, F16; 19, F17; 20, SKC patrón (38,5 UI, Sigma).

Posteriormente se realizó un análisis mediante SDS-PAGE de las colectas de cada paso de la purificación de la SKC-2 a partir del SN de *S. lividans* [pOVsiSK] (Figura 28A). En el carril correspondiente a la colecta de la cromatografía de TSK butilo se detectó una banda homogénea de 47 kDa (Figura 28A, carril 6). El análisis de su pureza, determinado por densitometría al gel de poliacrilamida, reveló un 90%. La identidad de la proteína que comigró con la SKC natural (Sigma) fue corroborada por un análisis por *Western blotting* con el anticuerpo monoclonal SK-1 (Figura 28B).

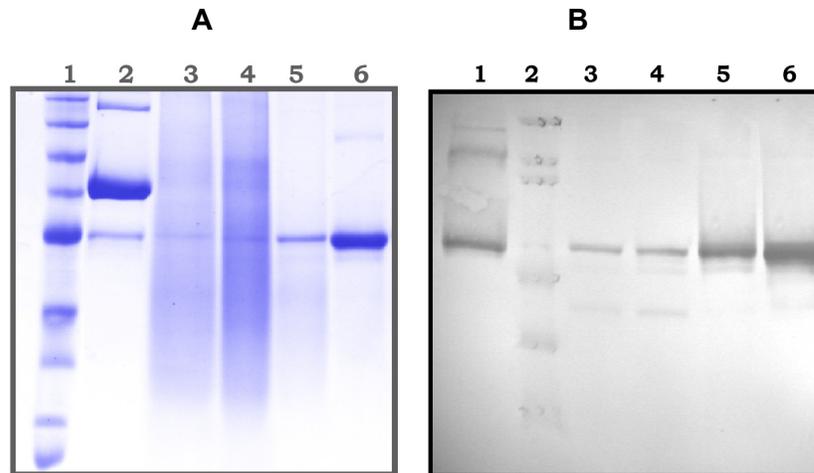


Figura 28. Purificación de la SKC-2 de *S. equisimilis* ATCC9542 expresada y secretada en el sobrenadante de cultivo por *S. lividans* [pOVsiSK]. (A) Electroforesis en gel de SDS-PAGE al 10% en condiciones no reductoras teñido con azul de Coomassie R-250. Se aplicaron 20 μg de proteínas totales procedentes de cada paso de purificación en el carril correspondiente. 1, marcador de tallas moleculares (*SDS-PAGE Broad Range Protein Molecular Weight Markers*- 225, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 15 y 10 kDa); 2, SKC patrón 10 μg (Sigma); 3, sobrenadante de cultivo inicial (SN); 4, proteínas del SN precipitadas con sulfato de amonio 5, colecta de DEAE Sepharose® *Fast Flow*; 6, colecta de TSK butilo. (B) Análisis por *Western blotting*. Se utilizó el anticuerpo monoclonal SK-1. 1, SKC patrón 10 μg (Sigma); 2, marcador de tallas moleculares (*Prestained SDS-PAGE standards broad range, BIO-RAD*, 201, 120, 100, 46, 30 y 22 kDa); 3, SN; 4, proteínas del SN precipitadas con sulfato de amonio; 5, colecta de DEAE Sepharose® *Fast Flow*; 6, colecta de TSK butilo.

El análisis cuantitativo de las distintas etapas del proceso de purificación de la SKC-2 reflejó que su actividad específica se incrementó de 2 125 UI mg^{-1} , en la etapa cromatográfica de intercambio iónico, hasta 35 928 UI mg^{-1} con la cromatografía de interacciones hidrofóbicas; lo cual representó un incremento de aproximadamente 17 veces de la actividad específica de la proteína (Tabla 5). Para denotar ese incremento se empleó el término “factor de purificación relativo”, ya que se desconoce el valor inicial de la actividad amidolítica de la SKC-2 en el SN debido a interferencias del SN de *S. lividans* TK24 (cepa parental) en el ensayo del sustrato cromogénico, que fue el método empleado para cuantificar su actividad (Tabla 5).

Dado que hubo un incremento de aproximadamente 17 veces en la actividad específica de la SKC-2 en la última etapa del proceso cromatográfico se puede considerar que la cromatografía de interacciones hidrofóbicas fue efectiva para la purificación de esta proteína, a pesar de que se trabajó con cantidades pequeñas a escala de laboratorio. Estos resultados fueron satisfactorios al compararlos con los informados por Balagurunathan y cols que reportaron que la baja concentración de la SKC secretada por *E. coli* fue responsable de su pobre unión a las matrices de interacciones hidrofóbicas. Por ello, concluyeron que esta cromatografía no fue efectiva para la purificación de la SKC a partir de sistemas de expresión secretoria en *E. coli*²¹⁴.

Tabla 5. Purificación de la SKC-2 de *S. equisimilis* ATCC9542 secretada por *S. lividans* TK24 [pOVsiSK]

Paso de Purificación	Volumen (ml)	Proteínas (mg ml ⁻¹)	mg totales	Actividad Biológica (UI ml ⁻¹)	Actividad total (UI)	Actividad Específica (UI mg ⁻¹)	Factor de purificación relativo
SN inicial	450	1,02	459	nd	nd	nd	
Sulfato de Amonio, 45%	25	9,68	242	nd	nd	nd	
DEAE Sepharose FF	25	0,168	4,2	357	8 925	2 125	1
TSK Butilo	13	0,014	0,182	503	6 539	35 928	16,9

Las proteínas totales fueron cuantificadas por el método de Zor y cols²²⁶. La actividad biológica fue cuantificada por el método del sustrato cromogénico S-2251²²³. La actividad específica de la SKC-2 recombinante fue determinada por la relación entre la actividad de SKC-2/mg de proteínas totales. Los datos representan la media de tres purificaciones. Abreviatura: nd, no determinado.

4.3.3 Análisis físico-químico y biológico de la SKC-2 purificada

El análisis espectroscópico UV-visible de la SKC-2 purificada a partir del SN de *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] mostró un pico característico de absorción a 277 nm, el cual es similar al valor reportado por Kuppusamy y cols cuando analizaron las propiedades de una SKC purificada a partir de *E. coli* (Figura 29)²⁵¹.

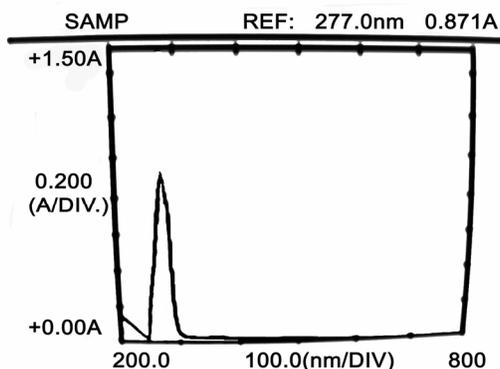


Figura 29. Espectro de absorción UV-visible de la SKC-2 purificada del sobrenadante de cultivo de *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] a una λ entre 200 y 800 nm. La determinación se realizó en un espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu, UV-160A).

Con la finalidad de conocer (a) la especificidad del corte de las peptidasas señales de *S. lividans* en la zona de la fusión entre el Vsi-sp y la SKC-2 y (b) la secuencia de la proteína de 44 kDa derivada de la SKC-2 se secuenció el extremo amino de las proteínas de 47 y 44 kDa. La secuencia de los aminoácidos del extremo amino de ambas proteínas coincidieron con las que se predijeron a partir de la secuencia nucleotídica del gen *skc-2* fusionado a los dos primeros codones de la secuencia que codifica para el Vsi maduro (Tabla 6).

Tabla 6. Secuencia aminoacídica predicha de la región de la fusión de preVsi-SK y secuencias aminoacídicas resultantes de la secuenciación del extremo amino de las proteínas de 44 y 47 kDa presentes en el sobrenadante de cultivo de *S. lividans* TK24 [pOVsiSK].

Proteína	Secuencia de aminoácidos
PreVsi/SKC-2 (región de fusión)	... A Q A ↓ E A I A G P E W L L ...
N-terminal 47-kDa SKC-2	E A I A G P E W L L ...
N-terminal 44-kDa SKC-2	E A I A G P E W L L ...

↓: Sitio de corte de la peptidasa señal. La secuencia de SKC-2 aparece en itálica.

Estos resultados indicaron que el péptido señal Vsi fue correctamente removido por las peptidasas señales de *S. lividans* y el extremo amino de la SKC-2 derivada de *S. lividans* se mantuvo intacto. Estos resultados también indicaron que la proteína de 44 kDa se correspondió con un producto procesado por el extremo carboxilo de la SKC-2, lo cual coincide con lo reportado anteriormente por Jackson y cols²¹⁸, Wong y cols⁵⁰ y Avilán y cols²¹⁰, entre otros sobre la naturaleza del producto de 44 kDa derivado de la SKC.

La potencia del producto final del proceso de purificación de la SKC-2 de *S. lividans* fue confirmada mediante el ensayo *in vitro* de lisis del coágulo de fibrina. Se observó la disolución del coágulo de fibrina en un tiempo que representó una actividad amidolítica de $486 \pm 5,6$ UI ml⁻¹. La confirmación de la actividad biológica de la SKC-2 derivada de *S. lividans* constituye una evidencia que permite inferir que la molécula secretada posee una estructura tridimensional correcta y es adecuada para continuar investigando.

4.3.4 Potencialidades de *S. lividans* como hospedero para la obtención de la SKC-2

Teniendo en consideración que la SKC-2 purificada a partir de *S. lividans* fue biológicamente activa y el análisis físico-químico de esta molécula fue satisfactorio se decidió evaluar, en experimentos de demostración, la influencia que tiene la fermentación a escala de banco de la cepa recombinante, en condiciones controladas de pH, temperatura, agitación y aireación sobre la cantidad de SKC-2 secretada.

La expresión extracelular de la SKC-2, cuantificada por ELISA, alcanzó hasta 15 mg l⁻¹ cuando la cepa recombinante fue cultivada en el medio BSTB en un fermentador a escala de banco; lo cual representó un incremento de aproximadamente cuatro veces en las cantidades de la SKC-2 secretada comparado con los resultados obtenidos en zaranda (Figura 30A). Al cultivar la cepa recombinante en condiciones similares en el caldo TSB, las cantidades secretadas máximas de la SKC-2 alcanzaron hasta 9,6 mg l⁻¹; lo cual representó un

incremento de aproximadamente 2,6 veces en las cantidades de la SKC-2 comparado con los niveles obtenidos en zaranda (Figura 30B).

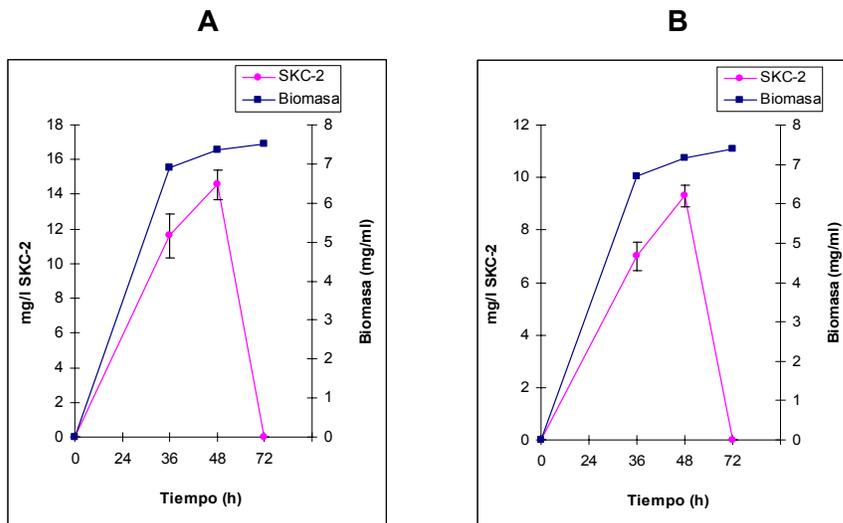


Figura 30. Cinética de la secreción de la SKC-2 en correspondencia con el crecimiento de *S. lividans* TK24 cultivado en BTSB (A) o en TSB (B) por 72 horas en un fermentador MBR de 1,5l de capacidad efectiva. La concentración de la SKC-2 en los sobrenadantes de cultivo fue medida mediante la técnica de ELISA, límite de detección: $0,3 \mu\text{g l}^{-1}$. Los valores de concentración de SKC-2 fueron el promedio de dos estudios cinéticos. El crecimiento fue estimado por mediciones del peso seco de la biomasa (mg ml^{-1}), los valores de error estándar oscilaron entre 0.1 y 0.2.

A pesar de que los niveles de expresión secretoria de la SKC-2 se incrementaron al cultivar *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] en un fermentador a escala de banco, tanto en el medio de cultivo BTSB como en el TSB se apreciaron cantidades significativas de pigmentos de tipo melanoidinas, típicos de la última etapa de la reacción de Maillard. La presencia de estos pigmentos estuvo relacionada con el tipo de esterilización por resistencia directa del fermentador MBR utilizado. Dado que los medios de cultivos pigmentados pueden generar dificultades en la purificación de las proteínas a partir del sobrenadante de cultivo, en el futuro pudieran explorarse fermentadores con un mecanismo de esterilización por vapor.

De forma general, el incremento en las cantidades secretadas de la SKC-2 cuando la cepa recombinante fue cultivada en un fermentador a escala de banco muestra el potencial que tiene la optimización de la fermentación por lote de *S. lividans* para la obtención soluble de la estreptoquinasa SKC-2.

Al comparar los niveles de expresión de la SKC-2 secretada por *S. lividans* con los rendimientos de las estreptoquinasas obtenidas por vía natural o recombinante, es preciso considerar en el análisis la diferencia en la composición aminoacídica entre los productos génicos *skc* y *skc-2*. Al analizar los cinco aminoácidos en que difiere la SKC-2 de la SKC de *S. equisimilis* H46A (Pro71, Thr210, His244⁽⁺⁾, Glu253⁽⁻⁾ y Asn303 en el producto génico *skc-2*

cambiados por Ser71, Asn210, Arg244⁽⁺⁾, Arg253⁽⁺⁾ y Asp303⁽⁻⁾ del producto génico *skc*³⁸, se aprecia que las cargas de las dos moléculas varían en composición y ubicación. La His en la SKC-2 aparece en lugar de Arg y la SKC tiene adicionalmente una Arg. La ubicación de las cargas negativas (Glu y Asp) también varía y la SKC-2 a diferencia de la SKC, tiene el residuo Pro, el cual es un aminoácido apolar. La diferencia en las densidades de carga de las dos moléculas pudiera tener un significado para la eficiencia de translocación de la proteína a través de la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática, la cual está cargada negativamente.

La expresión secretoria de la SKC-2 por vía recombinante ha sido ensayada en *P. pastoris*⁵⁶ y en *E. coli*^{45,54,55}. Cuando *P. pastoris* fue utilizada como hospedero para la expresión extracelular de la SKC-2, ésta fue obtenida a altos niveles (1 - 1,2 g l⁻¹), pero fue modificada post-traduccionalmente por glicosilación, lo que imposibilitó el uso de esta levadura para la obtención recombinante de la SKC-2⁵⁶. En el caso de *E. coli*, los estudios de la secreción de la SKC-2 estuvieron orientados hacia la evaluación fisiológica o la productividad del sistema, pero no se purificó y caracterizó la proteína recombinante. En un solo estudio se reportó la actividad inicial de la SKC-2 secretada principalmente al periplasma de *E. coli* (5 000 UI ml⁻¹)⁴⁵, pero con este único dato no es posible establecer una comparación confiable con la SKC-2 secretada por *S. lividans*, dado que hubo interferencias del SN de *S. lividans* TK24 (cepa parental) en el ensayo del sustrato cromogénico.

Por la misma razón, no fue posible comparar la cantidad de la SKC-2 secretada por *S. lividans* con la cantidad de la SKC secretada al medio de cultivo por *P. pastoris* (3 200 UI ml⁻¹)⁵² o al periplasma de *S. pombe* (2 450 IU ml⁻¹)⁵³. Pratap y cols informaron que la SKC fue modificada por N-glicosilación cuando fue secretada por *P. pastoris*⁵², mientras que Kumar y cols reportaron niveles de 24 mg l⁻¹ de la SKC secretada por *S. pombe*, pero detectaron cofraccionamiento de proteínas del hospedero de tamaño similar a la SKC en varios procedimientos cromatográficos convencionales, lo cual interfirió en la purificación de la proteína⁵³. En este último estudio, los autores reportaron que la desventaja principal de ese sistema fue que la SKC no se secretó al medio extracelular⁵³.

La secreción de la SKC ha sido extensamente estudiada en *E. coli*. En la mayoría de los estudios sólo se reportó la actividad inicial de la SKC secretada (8 – 100 UI ml⁻¹)⁴⁴, (1 000 – 1 500 UI ml⁻¹)⁵², (7 700 UI ml⁻¹)⁴⁶. Avilán y cols reportaron niveles de 120 mg l⁻¹ de la SKC y purificaron la proteína desde el espacio periplasmático de *E. coli*. Sin embargo, la SKC sufrió una extensa degradación y el producto purificado mayoritario fue el derivado de 44 kDa²¹⁰. Este nivel de fragmentación coincidió con el reportado por Balagurunathan y cols, que

informaron que la especie molecular de 47 kDa representó solamente el 30 - 35% de la estreptoquinasa total producida por *E. coli*²¹⁴.

S. equisimilis H46A secreta menores cantidades de SKC al medio de cultivo (100 – 150 UI ml⁻¹)⁴⁴, (400 - 500 UI ml⁻¹)²⁴³ que los hospederos heterólogos antes mencionados. Sin embargo, *S. equisimilis* es su hospedero natural y la SKC ha sido purificada del medio de cultivo con un alto grado de pureza y una actividad específica de 90 000 - 100 000 UI mg⁻¹ ^{183,252}. El proceso industrial de obtención de la SKC tiene la desventaja que *S. equisimilis* secreta moléculas antigénicas como la estreptolisina O y la estreptodornasa al medio de cultivo, que dificultan el proceso de purificación de la SKC y representan riesgos al personal productor^{35,36}. En Cuba, la estreptoquinasa es actualmente producida y comercializada a partir de un sistema de expresión intracelular en *E. coli* (Heberkinasa®). En los últimos años se han reportado mejoras del proceso de purificación de la SKC-2 que han permitido su obtención con una pureza mayor del 99% y el aumento de su actividad específica desde niveles de 52 407³⁸ hasta 70 000 UI mg⁻¹²⁰⁷.

Al comparar el proceso de obtención industrial de la Heberkinasa® con el sistema propuesto en este trabajo, el sistema de producción establecido proporciona mayores niveles de expresión de la proteína (350 mg l⁻¹ de SKC-2)³⁸. Sin embargo, el proceso de obtención a partir de *E. coli* tiene la desventaja que la proteína se obtiene insoluble y biológicamente inactiva en cuerpos de inclusión, lo cual requiere de procesos de ruptura celular, extracción y renaturalización *in vitro* para la solubilización y el replegamiento adecuado de la molécula. Estos procesos ocasionan pérdidas significativas en el rendimiento de la proteína. Además, se pueden obtener moléculas modificadas, agregados moleculares, poblaciones de moléculas con una metionina en el extremo amino, entre otras.

El sistema de obtención de la SKC-2 propuesto en este trabajo permitió la obtención de la proteína biológicamente activa en el medio extracelular, lo cual simplificó el proceso de recobrado de la proteína recombinante y no requirió de modificaciones químicas. Este sistema se fundamenta en un hospedero no patógeno y tiene potencialidades para la obtención de la proteína a mayores niveles mediante la optimización de su fermentación. La obtención de la SKC-2 al 90% de pureza con una actividad específica de 35 928 UI mg⁻¹, a escala de laboratorio, muestra parámetros del sistema que son mejorables. En el futuro pudieran explorarse otras alternativas de procesos de fermentación que ofrezcan rendimientos iniciales mayores del sistema y se simplifique la purificación de la proteína, con la consiguiente reducción del costo del proceso completo.

5 DISCUSIÓN GENERAL

Al considerar la expresión microbiana de proteínas heterólogas, *Escherichia coli* continúa siendo el hospedero más utilizado. Esta posición dominante, sin embargo, nunca ha parado la búsqueda de sistemas de expresión de proteínas alternativos y eficientes, especialmente cuando se requiere que la proteína de interés sea biológicamente activa. En este caso es ventajoso obtener la proteína en el medio de cultivo. Esto permite comenzar el proceso de recobrado a partir de un material en el cual la proteína tiene mayor pureza, se minimizan las interferencias con el metabolismo intracelular y se favorece la formación correcta de los puentes disulfuro.

En este trabajo se evaluó a *S. lividans* TK24 como hospedero para la expresión del IFN α 2b humano y la SKC-2 de *S. equisimilis* ATCC9542 en el medio extracelular. *S. lividans* ha sido un hospedero valioso para la producción de varias proteínas de importancia biofarmacéutica. Entre ellas se encuentran: el factor α de necrosis tumoral murino, la hormona de crecimiento humano y el factor estimulante de colonias de macrófagos-granulocitos^{14,18,57}. En esos casos se consideró el bajo costo asociado a los procesos de recobrado de las proteínas correctamente plegadas desde el medio de cultivo, la inocuidad de este hospedero y un conocimiento extenso de la tecnología de fermentación de *Streptomyces*.

En este trabajo también se estudió la relevancia de la genética de las vías de secreción Sec y Tat de *S. lividans* TK24 en el proceso de producción y se centró la atención en los aspectos fisiológicos del evento productivo. Se seleccionó el proceso de translocación Tat para estudiar la producción secretoria de estas dos proteínas, considerando que esta vía puede ser útil para la producción de proteínas incompatibles con el mecanismo Sec.

El péptido señal Vsi –dependiente de la vía Sec– fue eficiente en dirigir la translocación de la SKC-2 biológicamente activa al medio extracelular de *S. lividans* TK24. Hasta 4 mg l⁻¹ de la SKC-2 fue cuantificada en el medio de cultivo de *S. lividans* [pOVsiSK] crecido en zaranda. Estas cantidades de SKC-2 secretada permitieron purificar la proteína mediante las técnicas cromatográficas de intercambio aniónico e interacciones hidrofóbicas. La SKC-2 se purificó con un 90% de pureza y tuvo una actividad específica de 35 928 UI mg⁻¹. La identidad de la SKC-2 fue verificada mediante la secuenciación de su extremo amino, el cual fue idéntico al esperado por la secuencia nucleotídica. También se determinó el máximo de absorción UV de la SKC-2 purificada, que fue estimado en los 277 nm. Dado que la SKC-2 secretada por *S. lividans* TK24 fue purificada a escala de laboratorio al 90% de pureza existen aún posibilidades de lograr una purificación de la SKC-2 con mayor pureza y con ello incrementar la actividad específica de la proteína. Una alternativa a considerar pudiera ser la transición del

proceso cromatográfico de lecho fijo al modo expandido, que es ya un estándar establecido en la biotecnología moderna.

Los niveles de la SKC-2 secretada alcanzaron hasta 15 mg l⁻¹ cuando la cepa recombinante fue cultivada en el medio BTSB siguiendo un procedimiento de fermentación por lote no optimizado a escala de banco. Queda, por tanto, abierta la posibilidad de continuar incrementando las cantidades de la SKC-2 secretada a través de la optimización de la fermentación de *S. lividans* TK24 [pOVsiSK]. Como antecedente se tiene la experiencia acumulada en el escalado y optimización de la fermentación de *Streptomyces* para la obtención industrial de proteínas nativas y recombinantes de interés biotecnológico.

En Cuba existe un proceso establecido para la producción de la Heberkinasa® a partir de *E. coli*. Sin embargo, este proceso de obtención tiene la desventaja que la SKC-2 se obtiene insoluble y biológicamente inactiva en cuerpos de inclusión, lo cual requiere de procesos de ruptura celular, extracción y renaturalización *in vitro* para la solubilización y el replegamiento adecuado de esta biomolécula. Del material que se recupera del proceso de renaturalización se obtienen moléculas modificadas, agregados moleculares, poblaciones de moléculas con una metionina en el extremo amino, entre otras. Debido a que ocurren pérdidas considerables de las proteínas, estos procesos son reconocidos por la industria biotecnológica como un paso limitante en la obtención de proteínas recombinantes en *E. coli*^{39,40,214}. La expresión intracelular en *E. coli* presenta otra serie de desventajas operacionales. Entre estas se encuentran la presencia de polímeros contaminantes a lo largo del proceso de purificación, como los lipopolisacáridos de la pared celular, los ácidos nucleicos y las proteínas del hospedero. Precisamente, los LPS son moléculas muy inmunogénicas y su presencia aún en cantidades trazas representa un gran problema para la producción de proteínas terapéuticas. En cambio, la obtención de la SKC-2 biológicamente activa en el medio extracelular de *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] permitió purificar la proteína en condiciones no desnaturizantes. Este proceso de purificación de la SKC-2 requirió menor cantidad de etapas al compararlo con el sistema de obtención insoluble de la SKC-2 en *E. coli*^{41,250}. Además, *S. lividans* TK24 es un hospedero no patógeno y no posee LPS en su estructura celular, lo que hace su empleo aún más atractivo. Una vez más, *S. lividans* fue útil para la obtención de un producto biofarmacéutico en forma bioactiva.

Al evaluar la expresión secretoria de la SKC-2 y el IFN α 2b cuando fueron fusionados al péptido señal de la xilanasas C –dependiente de la vía Tat- se determinó que este péptido señal no fue eficiente en promover la secreción de la SKC-2 a niveles significativos, y en el caso del IFN α 2b no se detectó su expresión en *S. lividans*. En el futuro, al disponer de mayor

información sobre análisis de proteínas secretadas por la vía Tat, combinado con un mayor conocimiento de la funcionalidad de este proceso se podrá probablemente esclarecer los requerimientos para una secreción eficiente de ciertas proteínas a través de esta vía de secreción en *Streptomyces*. De esta forma, la posibilidad de secretar algunas proteínas a través de este proceso pueda ser viable; especialmente para aquellas que no puedan plegarse en su conformación activa fuera de la célula o que tengan una estructura de heterodímeros o que contengan cofactores.

En este trabajo también se construyó un vector plasmídico denominado pUCA, que porta el promotor de resistencia a eritromicina de *S. erythraea ermE** y las señales traduccionales y de secreción de la lipasa A de *S. exfoliatus*^{19,20}. Este vector fue utilizado para evaluar la expresión secretoria del IFN α 2b y la SKC-2 en *S. lividans* TK24. Ambas proteínas fueron translocadas al medio extracelular cuando fueron fusionadas al LipA-sp, pero los niveles fueron bajos y en el caso de la SKC-2 sólo se detectó la proteína durante la fase de crecimiento exponencial de la cepa recombinante. Posteriormente se demostró que el péptido señal de la lipasa A promueve la translocación de proteínas a través de un mecanismo no dependiente del proceso Tat; lo cual, de acuerdo al estado del arte actual, sugiere que este péptido señal promueve la secreción de proteínas a través de la vía Sec.

Los niveles del IFN α 2b secretado también fueron bajos cuando se fusionó al péptido señal Vsi -dependiente de la vía Sec-. De forma general, los niveles de expresión del IFN α 2b secretado por *S. lividans* fueron bajos (<1 mg l⁻¹) y es probable que sean varios los factores que contribuyan a este fenómeno. Entre ellos se puede encontrar el uso preferencial de codones. Al analizar la secuencia nucleotídica del gen *ifn α 2b*, se aprecia un fenómeno de uso de codones desfavorable por los hospederos *S. lividans* y *B. subtilis*. Este hecho es más evidente en el caso de *Streptomyces* con 69 codones no óptimos, de acuerdo al análisis del genoma de *S. coelicolor*²⁵³. En el caso de *B. subtilis* se encontraron 20 codones raros²⁵⁴. Sletta y cols también informaron sobre la expresión de gen nativo (con 13 codones raros) por debajo del límite de detección en *E. coli* y como al aumentar las copias de tARN^{Arg}_{AGA/AGG}, los niveles de expresión del IFN α 2b aumentaron significativamente²⁵⁵. Otro factor que puede contribuir son los dos puentes disulfuro intramoleculares que posee el IFN α 2b. A pesar de que *Streptomyces* secreta a altos niveles proteínas nativas que tienen varios puentes disulfuro, puede que se secreten moléculas de IFN α 2b con puentes disulfuro no nativos y con patrones de plegamiento aberrantes y proclives al corte proteolítico. En *S. coelicolor* se ha informado sobre los factores sigma con funciones extra-citoplasmáticas, los cuales responden

a estímulos externos y activan genes involucrados en el estrés por puentes disulfuro, la homeostasis de la pared celular y el desarrollo del micelio aéreo⁶⁷.

No obstante, aún quedan posibilidades por explorar para incrementar los niveles de expresión y secreción del IFN α 2b en *S. lividans*. En el futuro pudiera evaluarse la adaptación de determinados codones del gen *ifn α 2b* al uso de codones de *Streptomyces*. También pudieran evaluarse otras señales de secreción de proteínas altamente secretadas por *Streptomyces* y secuencias espaciadoras para la expresión del IFN α 2b fusionado a los péptidos señales. En *S. lividans*, se han informado varios ejemplos donde la estrategia que fue óptima para la expresión secretoria de la proteína de origen eucariota fue su fusión a un péptido señal y en algunos casos, a un péptido señal cuya secuencia de aminoácidos fue optimizada mediante mutagénesis a la secuencia codificante²⁴².

En general, no existe un sistema heterólogo que sea óptimo para la expresión y producción comercial de todas las proteínas recombinantes. Cada proteína recombinante presenta sus propios problemas para la expresión y secreción en un hospedero particular. Un desafío para el futuro es indudablemente combinar los vectores de expresión de las proteínas con cepas de *Streptomyces* que sobre-expresen componentes del proceso de secreción para producir sistemas de expresión optimizados para cada proteína. Será necesario investigar para cada proteína el o los factores que limiten su acumulación en alguno de los tres estados funcionales del proceso de secreción de proteínas en *Streptomyces*. La eficiencia de la interacción de las pre-proteínas con SecA puede ser un factor importante para determinar la compatibilidad de las proteínas, debido a que SecA es el receptor primario de los sustratos liberados a las membranas por las chaperonas. Una caracterización más profunda, que permita modular proteínas como las tioldisulfuro óxido reductasas puede contribuir a incrementar el rendimiento de las proteínas heterólogas que contengan puentes disulfuro en *Streptomyces*.

6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1. *S. lividans* TK24 [pOVsilFN], *S. lividans* TK24 [pUCIAS] y *S. lividans* TK24 [pAΔXS] secretan interferón alfa 2b biológicamente activo al medio extracelular a niveles $< 1 \text{ mg l}^{-1}$ cuando son cultivadas a escala de laboratorio.
2. *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] secreta estreptoquinasa SKC-2 biológicamente activa al medio extracelular a niveles $\geq 2 \text{ mg l}^{-1}$ en cultivo en zaranda, lo que justifica purificarla del sobrenadante de cultivo y verificar sus propiedades.
3. El péptido señal de la lipasa A de *S. exfoliatus* M11 promueve la secreción de interferón alfa 2b por un mecanismo no dependiente de la vía Tat en *S. lividans*, lo que, de acuerdo al estado del arte actual, representa una fuerte sugerencia de que promueve la secreción de proteínas por la vía dependiente del aparato Sec.
4. La estreptoquinasa SKC-2 purificada del medio de cultivo de *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] con un 90% de pureza tiene una actividad específica de $35\,928 \text{ UI mg}^{-1}$, un extremo amino homogéneo y un máximo de absorción UV característico a 277 nm, elementos que apoyan la utilidad de *S. lividans* para obtener esta biomolécula.
5. La fermentación a escala de banco de *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] incrementó hasta cuatro veces la producción secretoria de la estreptoquinasa SKC-2 comparada con el cultivo en zaranda, lo que evidencia la potencialidades de este hospedero para producir esta proteína.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar otras señales reguladoras y de secreción de proteínas nativas secretadas abundantemente por *Streptomyces* para la expresión secretoria del IFN α 2b a través de los procesos de secreción Sec y Tat en *S. lividans* TK24.
2. Optimizar el medio de cultivo y las condiciones de operación de la fermentación por lote de *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] a escala de banco para incrementar la expresión secretoria de la SKC-2.
3. Explorar la potencialidad del péptido señal de la lipasa A de *S. exfoliatus* M11 para dirigir la secreción de otras proteínas de interés biotecnológico en *S. lividans* utilizando el vector pUCA.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, 72: 211-222.
2. Pissarra P. Recombinant DNA Proteins for the Biopharmaceutical Industry and the Future for *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 2000, 18: 831-833.
3. Itaya H y Kikuchi Y. Secretion of *Streptomyces mobaraensis* pro-transglutaminase by coryneform bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008, 78: 621-625.
4. Villatoro-Hernandez J, Loera-Arias MJ, Gamez-Escobedo A, Franco-Molina M, Gomez-Gutierrez JG, Rodriguez-Rocha H y cols. Secretion of biologically active interferon-gamma inducible protein-10 (IP-10) by *Lactococcus lactis*. *Microb Cell Fact* 2008, 7: 22.
5. Meissner D, Vollstedt A, van Dijk JM y Freudl R. Comparative analysis of twin-arginine (Tat)-dependent protein secretion of a heterologous model protein (GFP) in three different Gram-positive bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, 76: 633-642.
6. Rupa P, Monedero V y Wilkie BN. Expression of bioactive porcine interferon-gamma by recombinant *Lactococcus lactis*. *Vet Microbiol* 2008, 129: 197-202.
7. Van Mellaert L y Anné J. Protein secretion in Gram-positive bacteria with high GC-content. *Recent Res Dev Microbiol* 1999, 3: 425-440.
8. Sianidis G, Pozidis C, Becker F, Vrancken K, Sjoeholm C, Karamanou S y cols. Functional large-scale production of a novel *Jonesia* sp. xyloglucanase by heterologous secretion from *Streptomyces lividans*. *J Biotechnol* 2006, 121: 498-507.
9. Westers L, Westers H y Quax WJ. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1694: 299-310.
10. Anderson AS y Wellington EM. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001, 51: 797-814.
11. Hopwood DA. Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. *Microbiology* 1999, 145 (Pt 9): 2183-2202.
12. Gilbert M, Morosoli R, Shareck F y Kluepfel D. Production and secretion of proteins by streptomycetes. *Crit Rev Biotechnol* 1995, 15: 13-39.
13. Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF y Hopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics*. John Innes Foundation, Norwich, UK, 2000.
14. Binnie C, Cossar JD y Stewart DI. Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. *Trends Biotechnol* 1997, 15: 315-320.
15. Lara M, Servin-Gonzalez L, Singh M, Moreno C, Cohen I, Nimtz M y cols. Expression, secretion, and glycosylation of the 45- and 47-kDa glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans*. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70: 679-685.
16. Ayadi DR, Chouayekh H, Mhiri S, Zerria K, Fathallah DM y Bejar S. Expression by *Streptomyces lividans* of the rat α integrin CD11b A-domain as a secreted and soluble recombinant protein. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2006, 2007: 1-6.
17. Lammertyn E, Van Mellaert L, Schacht S, Dillen C, Sablon E, Van Broekhoven A y cols. Evaluation of a novel subtilisin inhibitor gene and mutant derivatives for the expression and secretion of mouse tumor necrosis factor alpha by *Streptomyces lividans*. *Appl Environ Microbiol* 1997, 63: 1808-1813.

18. Pozidis C, Lammertyn E, Politou AS, Anne J, Tsiftoglou AS, Sianidis G y cols. Protein secretion biotechnology using *Streptomyces lividans*: large-scale production of functional trimeric tumor necrosis factor alpha. *Biotechnol Bioeng* 2001, 72: 611-619.
19. Perez C, Juarez K, Garcia-Castells E, Soberon G y Servin-Gonzalez L. Cloning, characterization, and expression in *Streptomyces lividans* 66 of an extracellular lipase-encoding gene from *Streptomyces* sp. M11. *Gene* 1993, 123: 109-114.
20. Servin-Gonzalez L, Castro C, Perez C, Rubio M y Valdez F. bldA-dependent expression of the *Streptomyces exfoliatus* M11 lipase gene (*lipA*) is mediated by the product of a contiguous gene, *lipR*, encoding a putative transcriptional activator. *J Bacteriol* 1997, 179: 7816-7826.
21. Schaerlaekens K, Schierova M, Lammertyn E, Geukens N, Anne J y Van Mellaert L. Twin-arginine translocation pathway in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* 2001, 183: 6727-6732.
22. Faury D, Saidane S, Li H y Morosoli R. Secretion of active xylanase C from *Streptomyces lividans* is exclusively mediated by the Tat protein export system. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1699: 155-162.
23. Schaerlaekens K, Lammertyn E, Geukens N, De Keersmaecker S, Anne J y Van Mellaert L. Comparison of the Sec and Tat secretion pathways for heterologous protein production by *Streptomyces lividans*. *J Biotechnol* 2004, 112: 279-288.
24. Chang SY y Chang SC. Secretion of heterologous proteins in *Streptomyces lividans*. Congress of Biology of actinomycetes '88. Tokyo, Japan. 103-107.
25. Hong B, Li Y, Li SY y Jiang R. Secretory expression of salmon calcitonin in *Streptomyces lividans*. *Yi Chuan Xue Bao* 1998, 25: 287-293.
26. Widdick DA, Dilks K, Chandra G, Bottrill A, Naldrett M, Pohlschroder M y cols. The twin-arginine translocation pathway is a major route of protein export in *Streptomyces coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103: 17927-17932.
27. Erpicum T, Granier B, Delcour M, Lenzini VM, Nguyen-Disteche M, Dusart J y cols. Enzyme production by genetically engineered *Streptomyces* strains: Influence of culture conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 1990, 35: 719-726.
28. Ali N, Herron PR, Evans MC y Dyson PJ. Osmotic regulation of the *Streptomyces lividans* thioestrepton-inducible promoter, *ptipA*. *Microbiology* 2002, 148: 381-390.
29. Dyson P y Schrempf H. Genetic instability and DNA amplification in *Streptomyces lividans* 66. *J Bacteriol* 1987, 169: 4796-4803.
30. DeSanti CL y Strohl WR. Characterization of the *Streptomyces* sp. strain C5 *snp* locus and development of *snp*-derived expression vectors. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69: 1647-1654.
31. Jonasch E y Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical application, and toxicities. *The Oncologist* 2001, 6: 34-55.
32. Nodarse-Cuni H, Iznaga-Marin N, Viera-Alvarez D, Rodriguez-Gomez H, Fernandez-Fernandez H, Blanco-Lopez Y y cols. Interferon alpha-2b as adjuvant treatment of recurrent respiratory papillomatosis in Cuba: National Programme (1994-1999 report). *J Laryngol Otol* 2004, 118: 681-687.
33. Pentón G, Cervantes M, Cabrera JA, Alonso R, Valenzuela C, Rodríguez R y cols. Treatment with type I interferons induces a regulatory T cell subset in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. *International Immunopharmacology* 2008, 8: 881-886.
34. Sherry S, Fletcher AP y Alkjaersig N. Fibrinolysis and fibrinolytic activity in man. *Physiol Rev* 1959, 39: 343-382.

35. Kunamneni A, Abdelghani TT y Ellaiah P. Streptokinase--the drug of choice for thrombolytic therapy. *J Thromb Thrombolysis* 2007, 23: 9-23.
36. Banerjee A, Chisti Y y Banerjee UC. Streptokinase--a clinically useful thrombolytic agent. *Biotechnol Adv* 2004, 22: 287-307.
37. Silva A, de la FJ, Pérez G, Quiñones Y, Jiménez L, Novoa L y cols. Altos niveles de expresión del gen del interferón alfa-2 humano bajo el control del promotor derecho del fago lambda en *E.coli*. *Interferón y Biotecnología* 1988, 6: 40-46.
38. Estrada MP, Hernandez L, Perez A, Rodriguez P, Serrano R, Rubiera R y cols. High level expression of streptokinase in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 1992, 10: 1138-1142.
39. Beldarrain A, Cruz Y, Cruz O, Navarro M y Gil M. Purification and conformational properties of a human interferon alpha2b produced in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem* 2001, 33: 173-182.
40. Santana H, Martínez E, Sanchez JC, Moya G, Sosa R, Hardy E y cols. Molecular Characterization of Recombinant Human Interferon Alpha-2b Produced in Cuba. *Biotecnología Aplicada* 1999, 16: 154-159.
41. Pérez N, Urrutia E, Camino J, Orta D, Torres Y, Martínez Y y cols. Hydrophobic interaction chromatography applied to purification of recombinant streptokinase. *Minerva Biotecnológica* 1998, 10: 174-177.
42. Palva I, Lehtovaara P, Kaariainen L, Sibakov M, Cantell K, Schein CH y cols. Secretion of interferon by *Bacillus subtilis*. *Gene* 1983, 22: 229-235.
43. Hitzeman RA, Leung DW, Perry LJ, Kohr WJ, Levine HL y Goeddel DV. Secretion of Human Interferons by Yeast. *Science* 1983, 219: 620-625.
44. Malke H y Ferretti JJ. Streptokinase: cloning, expression, and excretion by *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, 81: 3557-3561.
45. Ko JH, Park DK, Kim IIC, Lee SH y Byun SM. High level expression and secretion of streptokinase in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 1995, 17: 119-1024.
46. Lee SH, Kim II C., Bae KH y Byun SM. Enhanced production and secretion of streptokinase into extracellular medium in *Escherichia coli* by removal of 13 N-terminal amino acids. *Biotechnology Letters* 1997, 19: 151-154.
47. Pratap J y Dikshit KL. Effect of signal peptide changes on the extracellular processing of streptokinase from *Escherichia coli*: requirement for secondary structure at the cleavage junction. *Mol Gen Genet* 1998, 258: 326-333.
48. Yazdani SS y Mukherjee KJ. Overexpression of streptokinase using a fed-batch strategy. *Biotechnology Letters* 1998, 20: 923-927.
49. Ramalingam S, Gautam P, Mukherjee KJ y Jaramayan G. Effects of post-induction feed strategies on secretory production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal* 2007, 33: 34-41.
50. Wong SL, Ye R y Nathoo S. Engineering and production of streptokinase in a *Bacillus subtilis* expression-secretion system. *Appl Environ Microbiol* 1994, 60: 517-523.
51. Sriraman K y Jayaraman G. Enhancement of recombinant streptokinase production in *Lactococcus lactis* by suppression of acid tolerance response. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, 72: 1202-1209.
52. Pratap J, Rajamohan G y Dikshit KL. Characteristics of glycosylated streptokinase secreted from *Pichia pastoris*: enhanced resistance of SK to proteolysis by glycosylation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000, 53: 469-475.

53. Kumar R y Singh J. Expression and secretion of a prokaryotic protein streptokinase without glycosylation and degradation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 2004, 21: 1343-1358.
54. Park SK, Lee BR y Byun SM. The leader sequence of streptokinase is responsible for its post-translational carboxyl-terminal cleavage. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, 174: 282-286.
55. Lee SH, Kim IC, Lee WS y Byun SM. RcsC-mediated induction of colanic acid by secretion of streptokinase in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett* 1996, 139: 189-193.
56. Estrada MP, Felipe AP, Chaplen RR, Doce RS, Marrero LF, Collazo P y Ramirez Ac. Methods for the isolation and expression of a gene which codes for streptokinase, nucleotide sequence obtained, recombinant DNA and transformed microorganisms. US5296366, 1994.
57. Lee DL, Sharif I, Kodihalli S, Stewart DI y Tsvetnitsky V. Preparation and characterization of monopegylated human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Interferon Cytokine Res* 2008, 28: 101-112.
58. Tremblay D, Lemay J, Gilbert M, Chapdelaine Y, Dupont C y Morosoli R. High-level heterologous expression and secretion in *Streptomyces lividans* of two major antigenic proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. *Can J Microbiol* 2002, 48: 43-48.
59. Chater KF. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu Rev Microbiol* 1993, 47: 685-713.
60. Thompson CJ, Fink D y Nguyen LD. Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biol* 2002, 3: REVIEWS1020.
61. Watve MG, Tickoo R, Jog MM y Bhole BD. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol* 2001, 176: 386-390.
62. Murakami T, anzai H, Imai S, Satoh A, Nagaoka K y Thompson C. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: Molecular cloning and characterization of the gene cluster. *Mol Gen Genet* 1986, 205: 42-50.
63. Bhosale SH, Rao MB y Deshpande VV. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol Rev* 1996, 60: 280-300.
64. Kansoh AL y Nagieb ZA. Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2004, 85: 103-114.
65. McCarthy AJ y Williams ST. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment--a review. *Gene* 1992, 115: 189-192.
66. Valdez F, Gonzalez-Ceron G, Kieser HM y Servin-Gonzalez L. The *Streptomyces coelicolor* A3(2) lipAR operon encodes an extracellular lipase and a new type of transcriptional regulator. *Microbiology* 1999, 145 (Pt 9): 2365-2374.
67. Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD y cols. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 2002, 417: 141-147.
68. Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T y cols. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* 2003, 21: 526-531.
69. Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H y cols. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol* 2008, 190: 4050-4060.
70. Pugsley AP, Francetic O, Driessen AJ y de L, V. Getting out: protein traffic in prokaryotes. *Mol Microbiol* 2004, 52: 3-11.

71. Delepelaire P. Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1694: 149-161.
72. Gosh P. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, 68: 771-795.
73. Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JD, Bron S y van Dijl JM. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000, 64: 515-547.
74. de Vrije GJ, Batenburg AM, Killian JA y de Kruijff B. Lipid involvement in protein translocation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1990, 4: 143-150.
75. von Heijne G. The signal peptide. *J Membr Biol* 1990, 115: 195-201.
76. von Heijne G. Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* 1985, 184: 99-105.
77. von Heijne G. Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur J Biochem* 1983, 133: 17-21.
78. von Heijne G. Net N-C charge imbalance may be important for signal sequence function in bacteria. *J Mol Biol* 1986, 192: 287-290.
79. von Heijne G y Abrahmsen L. Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Lett* 1989, 244: 439-446.
80. Edman M, Jarhede T, Sjoström M y Wieslander A. Different sequence patterns in signal peptides from mycoplasmas, other gram-positive bacteria, and *Escherichia coli*: a multivariate data analysis. *Proteins* 1999, 35: 195-205.
81. Duong F y Wickner W. Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *EMBO J* 1997, 16: 2756-2768.
82. Economou A. Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol* 1999, 7: 315-320.
83. Thomas JG, Ayling A y Baneyx F. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. *Appl Biochem Biotechnol* 1997, 66: 197-238.
84. van Wely KH, Swaving J, Freudl R y Driessen AJ. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2001, 25: 437-454.
85. Morosoli R, Shareck F y Kluepfel D. Protein secretion in streptomycetes. *FEMS Microbiol Lett* 1997, 146: 167-174.
86. Palomino C y Mellado RP. The *Streptomyces lividans* cytoplasmic signal recognition particle receptor FtsY is involved in protein secretion. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2005, 9: 57-62.
87. Palacin A, de la FR, Valle I, Rivas LA y Mellado RP. *Streptomyces lividans* contains a minimal functional signal recognition particle that is involved in protein secretion. *Microbiology* 2003, 149: 2435-2442.
88. Berks BC, Sargent F y Palmer T. The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* 2000, 35: 260-274.
89. Buchanan G, Sargent F, Berks BC y Palmer T. A genetic screen for suppressors of *Escherichia coli* Tat signal peptide mutations establishes a critical role for the second arginine within the twin-arginine motif. *Arch Microbiol* 2001, 177: 107-112.
90. DeLisa MP, Samuelson P, Palmer T y Georgiou G. Genetic analysis of the twin arginine translocator secretion pathway in bacteria. *J Biol Chem* 2002, 277: 29825-29831.

91. Cristobal S, de Gier JW, Nielsen H y von Heijne G. Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. EMBO J 1999, 18: 2982-2990.
92. Lee PA, Tullman-Ercek D y Georgiou G. The bacterial twin-arginine translocation pathway. Annu Rev Microbiol 2006, 60: 373-395.
93. Bogsch EG, Sargent F, Stanley NR, Berks BC, Robinson C y Palmer T. An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. J Biol Chem 1998, 273: 18003-18006.
94. Weiner JH, Bilous PT, Shaw GM, Lubitz SP, Frost L, Thomas GH y cols. A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. Cell 1998, 93: 93-101.
95. Shanmugham A, Wong Fong Sang HW, Bollen YJ y Lill H. Membrane binding of twin arginine preproteins as an early step in translocation. Biochemistry 2006, 45: 2243-2249.
96. de Leeuw E, Granjon T, Porcelli I, Alami M, Carr SB, Muller M y cols. Oligomeric properties and signal peptide binding by *Escherichia coli* Tat protein transport complexes. J Mol Biol 2002, 322: 1135-1146.
97. Alami M, Luke I, Deitermann S, Eisner G, Koch HG, Brunner J y cols. Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. Mol Cell 2003, 12: 937-946.
98. Oates J, Mathers J, Mangels D, Kuhlbrandt W, Robinson C y Model K. Consensus structural features of purified bacterial TatABC complexes. J Mol Biol 2003, 330: 277-286.
99. Sargent F, Gohlke U, de Leeuw E, Stanley NR, Palmer T, Saibil HR y cols. Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure. Eur J Biochem 2001, 268: 3361-3367.
100. De Keersmaecker S, Van Mellaert L, Schaerlaekens K, Van Dessel W, Vrancken K, Lammertyn E y cols. Structural organization of the twin-arginine translocation system in *Streptomyces lividans*. FEBS Lett 2005, 579: 797-802.
101. De Keersmaecker S, Vrancken K, Van Mellaert L, Anne J y Geukens N. The Tat pathway in *Streptomyces lividans*: interaction of Tat subunits and their role in translocation. Microbiology 2007, 153: 1087-1094.
102. De Keersmaecker S. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Médicas Aplicadas. Biochemical and functional analysis of the twin-arginine translocation complex of *Streptomyces lividans*. Katholieke Universiteit Leuven, 2006.
103. Dalbey RE, Lively MO, Bron S y van Diji JM. The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. Protein Sci 1997, 6: 1129-1138.
104. Koshland D, Sauer RT y Botstein D. Diverse effects of mutations in the signal sequence on the secretion of beta-lactamase in *Salmonella typhimurium*. Cell 1982, 30: 903-914.
105. Dalbey RE y Wickner W. Leader peptidase catalyzes the release of exported proteins from the outer surface of the *Escherichia coli* plasma membrane. J Biol Chem 1985, 260: 15925-15931.
106. Schacht S, Van Mellaert L, Lammertyn E, Tjalsma H, van Diji JM, Bron S y cols. The Sip (Sli) gene of *Streptomyces lividans* TK24 specifies an unusual signal peptidase with a putative C-terminal transmembrane anchor. DNA Seq 1998, 9: 79-88.
107. Parro V y Mellado RP. A new signal peptidase gene from *Streptomyces lividans* TK21. DNA Seq 1998, 9: 71-77.
108. Parro V, Schacht S, Anne J y Mellado RP. Four genes encoding different type I signal peptidases are organized in a cluster in *Streptomyces lividans* TK21. Microbiology 1999, 145 (Pt 9): 2255-2263.

109. Escutia MR, Val G, Palacin A, Geukens N, Anne J y Mellado RP. Compensatory effect of the minor *Streptomyces lividans* type I signal peptidases on the SipY major signal peptidase deficiency as determined by extracellular proteome analysis. *Proteomics* 2006, 6: 4137-4146.
110. Andersen CL, Matthey-Dupraz A, Missiakas D y Raina S. A new *Escherichia coli* gene, *dsbG*, encodes a periplasmic protein involved in disulphide bond formation, required for recycling DsbA/DsbB and DsbC redox proteins. *Mol Microbiol* 1997, 26: 121-132.
111. Qin M, Zhang J y Wang W. Effects of disulfide bonds on folding behavior and mechanism of the beta-sheet protein tendamistat. *Biophys J* 2006, 90: 272-286.
112. Wei Y, Schottel JL, Derewenda U, Swenson L, Patkar S y Derewenda ZS. A novel variant of the catalytic triad in the *Streptomyces scabies* esterase. *Nat Struct Biol* 1995, 2: 218-223.
113. Sommer P, Bormann C y Gotz F. Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnameus*. *Appl Environ Microbiol* 1997, 63: 3553-3560.
114. Van Mellaert L, Lammertyn E, Schacht S, Proost P, Van Damme J, Wroblowski B y cols. Molecular characterization of a novel subtilisin inhibitor protein produced by *Streptomyces venezuelae* CBS762.70. *DNA Seq* 1998, 9: 19-30.
115. Stefankova P, Perecko D, Barak I y Kollarova M. The thioredoxin system from *Streptomyces coelicolor*. *J Basic Microbiol* 2006, 46: 47-55.
116. Gusek TW y Kinsella JE. Review of the *Streptomyces lividans*/vector pIJ702 system for gene cloning. *Crit Rev Microbiol* 1992, 18: 247-260.
117. Henderson G, Krygsman P, Liu CJ, Davey CC y Malek LT. Characterization and structure of genes for proteases A and B from *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 1987, 169: 3778-3784.
118. Aretz W, Koller KP y Riess G. Proteolytic enzymes from recombinant *Streptomyces lividans* TK24. *FEMS Microbiol Lett* 1989, 53: 31-35.
119. Strohl WR. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res* 1992, 20: 961-974.
120. Buttner MJ, Chater KF y Bibb MJ. Cloning, disruption, and transcriptional analysis of three RNA polymerase sigma factor genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 1990, 172: 3367-3378.
121. Vigal T, Gil JA, Daza A, Garcia-Gonzalez MD, Villadas P y Martin JF. Effects of replacement of promoters and modification of the leader peptide region of the *amy* gene of *Streptomyces griseus* on synthesis and secretion of alpha-amylase by *Streptomyces lividans*. *Mol Gen Genet* 1991, 231: 88-96.
122. Brawner ME. Advances in heterologous gene expression by *Streptomyces*. *Curr Opin Biotechnol* 1994, 5: 475-481.
123. Murakami T, Holt TG y Thompson CJ. Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* 1989, 171: 1459-1466.
124. Fornwald JA, Schmidt FJ, Adams CW, Rosenberg M y Brawner ME. Two promoters, one inducible and one constitutive, control transcription of the *Streptomyces lividans* galactose operon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, 84: 2130-2134.
125. Pulido D y Jimenez A. Optimization of gene expression in *Streptomyces lividans* by a transcription terminator. *Nucleic Acids Res* 1987, 15: 4227-4240.
126. Schmitt-John T y Engels JW. Promoter constructions for efficient secretion expression in *Streptomyces lividans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992, 36: 493-498.

127. Taguchi S, Yoshida Y, Kumagai I, Miura K y Momose H. Effect of downstream message secondary structure on the secretory expression of the *Streptomyces* subtilisin inhibitor. *FEMS Microbiol Lett* 1993, 107: 185-189.
128. Ueda Y, Taguchi S, Nishiyama K, Kumagai I y Miura K. Effect of a rare leucine codon, TTA, on expression of a foreign gene in *Streptomyces lividans*. *Biochim Biophys Acta* 1993, 1172: 262-266.
129. Bibb MJ y Cohen SN. Gene expression in *Streptomyces*: construction and application of promoter-probe plasmid vectors in *Streptomyces lividans*. *Mol Gen Genet* 1982, 187: 265-277.
130. Page N, Kluepfel D, Shareck F y Morosoli R. Increased xylanase yield in *Streptomyces lividans*: dependence on number of ribosome-binding sites. *Nat Biotechnol* 1996, 14: 756-759.
131. Wright F y Bibb MJ. Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* 1992, 113: 55-65.
132. Lammertyn E, Van Mellaert L, Bijnens AP, Joris B y Anne J. Codon adjustment to maximise heterologous gene expression in *Streptomyces lividans* can lead to decreased mRNA stability and protein yield. *Mol Gen Genet* 1996, 250: 223-229.
133. Lammertyn E, Desmyter S, Schacht S, Van Mellaert L y Anne J. Influence of charge variation in the *Streptomyces venezuelae* alpha-amylase signal peptide on heterologous protein production by *Streptomyces lividans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1998, 49: 424-430.
134. Page N, Kluepfel D, Shareck F y Morosoli R. Effect of signal peptide alterations and replacement on export of xylanase A in *Streptomyces lividans*. *Appl Environ Microbiol* 1996, 62: 109-114.
135. Fornwald JA, Donovan MJ, Gerber R, Keller J, Taylor DP, Arcuri EJ y cols. Soluble forms of the human T cell receptor CD4 are efficiently expressed by *Streptomyces lividans*. *Biotechnology* 1993, 11: 1031-1036.
136. Bartfeld D, Butler MJ, Hadary D, Jenish D, Krieger TJ, Malek LT, Walczyk E y Soostmeyer G. *Streptomyces* proteases and methods for improved secretion of recombinantly-expressed proteins. US5856166, 1999.
137. Garvin RT y Malek LT. Expression system for the secretion of bioactive human granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and other heterologous proteins from *Streptomyces*. US5200327, 1993.
138. Fernandez-Abalos JM, Ruiz-Arribas A, Garda AL y Santamaria RI. Effect of carbon source on the expression of celA1, a cellulase-encoding gene from *Streptomyces halstedii* JM8. *FEMS Microbiol Lett* 1997, 153: 97-103.
139. Harchand RK y Singh S. Catabolite repression of cellulase biosynthesis in *Streptomyces albaduncus*. *J Basic Microbiol* 1994, 34: 371-378.
140. Parro V y Mellado RP. Effect of glucose on agarase overproduction by *Streptomyces*. *Gene* 1994, 145: 49-55.
141. Kim E, Shin DH, Irwin DC y Wilson DB. Fed-batch production of thermomonospora fusca endoglucanase by recombinant *streptomyces lividans*. *Biotechnol Bioeng* 1998, 60: 70-76.
142. Diaz M, Esteban A, Fernandez-Abalos JM y Santamaria RI. The high-affinity phosphate-binding protein PstS is accumulated under high fructose concentrations and mutation of the corresponding gene affects differentiation in *Streptomyces lividans*. *Microbiology* 2005, 151: 2583-2592.
143. Santamaria RI, Leal F, Diaz M y Fernandez-Abalos JM. Morphological and physiological changes in *Streptomyces lividans* induced by different yeasts. *Arch Microbiol* 2002, 177: 259-266.
144. Isiegas C, Parro V y Mellado RP. *Streptomyces lividans* as a host for the production and secretion of *Escherichia coli* TEM beta-lactamase. *Lett Appl Microbiol* 1999, 28: 321-326.

145. Morosoli R, Ostiguy S y Dupont C. Effect of carbon source, growth and temperature on the expression of the sec genes of *Streptomyces lividans* 1326. Can J Microbiol 1999, 45: 1043-1049.
146. Kluepfel D, Shareck F, Mondou F y Morosoli R. Characterization of cellulase and xylanase activities of *Streptomyces lividans*. Appl Microbiol Biotechnol 1986, 24: 230-234.
147. Anne J y Van Mellaert L. *Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production. FEMS Microbiol Lett 1993, 114: 121-128.
148. Krieger TJ, Bartfeld D, Jenish DL y Hadary D. Purification and characterization of a novel tripeptidyl aminopeptidase from *Streptomyces lividans* 66. FEBS Lett 1994, 352: 385-388.
149. Butler MJ, Binnie C, DiZonno MA, Krygsman P, Soltes GA, Soostmeyer G y cols. Cloning and characterization of a gene encoding a secreted tripeptidyl aminopeptidase from *Streptomyces lividans* 66. Appl Environ Microbiol 1995, 61: 3145-3150.
150. Butler MJ, Aphale JS, Binnie C, DiZonno MA, Krygsman P, Soltes G y cols. Cloning and analysis of a gene from *Streptomyces lividans* 66 encoding a novel secreted protease exhibiting homology to subtilisin BPN'. Appl Microbiol Biotechnol 1996, 45: 141-147.
151. Molnar I. Secretory production of homologous and heterologous proteins by recombinant *Streptomyces*: what has been accomplished? Bioprocess Technol 1994, 19: 81-104.
152. Bender E, Koller KP y Engels JW. Secretory synthesis of human interleukin-2 by *Streptomyces lividans*. Gene 1990, 86: 227-232.
153. Bender E, Vogel R, Koller KP y Engels J. Synthesis and secretion of hirudin by *Streptomyces lividans*. Appl Microbiol Biotechnol 1990, 34: 203-207.
154. Haas-Lauterbach S, Scharf M, Sprunkel B, Neeb M, Koller KP y Engels JW. High yield fermentation and purification of Tendamistat disulphide analogues secreted by *Streptomyces lividans*. Appl Microbiol Biotechnol 1993, 38: 719-727.
155. Isaacs A y Lindenman J. Virus interference I. The interferon. Proc R Soc 1957, 147: 258-267.
156. Aguet M, Grobke M y Dreiding P. Various human interferon alpha subclasses cross-react with common receptors: their binding affinities correlate with their specific biological activities. Virology 1984, 132: 211-216.
157. Uze G, Lutfalla G y Gresser I. Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. Cell 1990, 60: 225-234.
158. Novick D, Cohen B y Rubinstein M. The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. Cell 1994, 77: 391-400.
159. Streuli M, Nagata S y Weissmann C. At Least Three Human Type alpha Interferons: Structure of alpha2. Science 1980, 209: 1343-1347.
160. Walter MR. Three-dimensional models of interferon-alpha subtypes IFN-con1, IFN-alpha8, and IFN-alpha1 derived from the crystal structure of IFN-alpha2b. Semin Oncol 1997, 24: S9.
161. Padron G, Besada V, Agraz A, Quiñones Y, Herrera L, Shimonishi Y y cols. Mass spectrometric analysis of recombinant human alpha-2 interferon. Analytica Chimica Acta 1989, 223: 361-369.
162. Pestka S. The human interferon alpha species and receptors. Biopolymers 2000, 55: 254-287.
163. Abramovich C, Shulman LM, Ratovitski E, Harroch S, Tovey M, Eid P y cols. Differential tyrosine phosphorylation of the IFNAR chain of the type I interferon receptor and of an associated surface protein in response to IFN-alpha and IFN-beta. EMBO J 1994, 13: 5871-5877.

164. Brierley MM y Fish EN. Review: IFN-alpha/beta receptor interactions to biologic outcomes: understanding the circuitry. *J Interferon Cytokine Res* 2002, 22: 835-845.
165. Goodbourn S, Didcock L y Randall RE. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2000, 81: 2341-2364.
166. López-Saura P. What is interferon good for? Ten years of experience in Cuba. *Biotechnología Aplicada* 1992, 9: 207-227.
167. Cabrera-Gomez JA y Lopez-Saura P. Alpha interferon and Alzheimer's disease. *Rev Neurol* 2000, 30: 54-60.
168. Cabrera-Gomez JA, Echazabal-Santana N, Porrero-Martin P, Valenzuela-Silva C, Rodriguez CA, Fuentes-Suarez I y cols. Interferon-alpha2b recombinant improved the cognitive dysfunction in patients with relapsing remitting multiple sclerosis. *Rev Neurol* 2003, 37: 214-220.
169. Astorga R, Cantero O, Contreras D, Rio-Martin A, Labarta-Beceiro V, Gutierrez-Elvirez A y cols. Intralesional recombinant interferon alpha-2b in Peyronie's disease. *Arch Esp Urol* 2000, 53: 665-671.
170. Maeda S, McCandliss R, Gross M, Sloma A, Familletti PC, Tabor JM y cols. Construction and identification of bacterial plasmids containing nucleotide sequence for human leukocyte interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980, 77: 7010-7013.
171. Nagata S, Taira H, Hall A, Johnsrud L, Streuli M, Ecsodi J y cols. Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity. *Nature* 1980, 284: 316-320.
172. Goeddel DV, Yelverton E, Ullrich A, Heyneker HL, Miozzari G, Holmes W y cols. Human leukocyte interferon produced by *E. coli* is biologically active. *Nature* 1980, 287: 411-416.
173. Silva A, Menéndez A, Ubieta R, Montero M, Torrens I, Morales J y cols. Expresión de interferones humanos en *E. coli*. *Biotechnol Apl* 1991, 8: 400-405.
174. Sanchez JC, Padron G, Santana H y Herrera L. Elimination of an HuIFN alpha 2b readthrough species, produced in *Escherichia coli*, by replacing its natural translational stop signal. *J Biotechnol* 1998, 63: 179-186.
175. Pulido D, Vara JA y Jimenez A. Cloning and expression in biologically active form of the gene for human interferon alpha 2 in *Streptomyces lividans*. *Gene* 1986, 45: 167-174.
176. Mellor J, Dobson MJ, Roberts NA, Kingsman AJ y Kingsman SM. Factors affecting heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 1985, 33: 215-226.
177. Garcia J, Aguiar JA, Gill M, Alvarez A, Morales J, Ferrero J y cols. High level expression of human IFN-alpha2b in *Pichia Pastoris*. *Biotechnología Aplicada* 1995, 12: 152-155.
178. Schein CH, Kashiwagi K, Fujisawa A y Weissmann C. Secretion of Mature IFN-alpha2 and Accumulation of Uncleaved Precursor by *Bacillus subtilis* Transformed with a Hybrid alpha-Amylase Signal Sequence-IFN-alpha2 Gene. *Bio/Technology* 1986, 4: 719-725.
179. Chibber BA y Castellino FJ. Regulation of the streptokinase-mediated activation of human plasminogen by fibrinogen and chloride ions. *J Biol Chem* 1986, 261: 5289-5295.
180. Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med* 1933, 57: 571-595.
181. McClintock DK y Bell PH. The mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1971, 43: 694-702.

182. Brockway WJ y Castellino FJ. A characterization of native streptokinase and altered streptokinase isolated from a human plasminogen activator complex. *Biochemistry* 1974, 13: 2063-2070.
183. De Renzo EC, Siiteri PK, Hutchings BL y Bell PH. Preparation and certain properties of highly purified streptokinase. *J Biol Chem* 1967, 242: 533-542.
184. Damaschun G, Damaschun H, Gast K, Gerlach D, Misselwitz R, Welfle H y cols. Streptokinase is a flexible multi-domain protein. *Eur Biophys J* 1992, 20: 355-361.
185. Radek JT y Castellino FJ. Conformational properties of streptokinase. *J Biol Chem* 1989, 264: 9915-9922.
186. Welfle K, Pfeil W, Misselwitz R, Welfle H y Gerlach D. Conformational properties of streptokinase--differential scanning calorimetric investigations. *Int J Biol Macromol* 1992, 14: 19-22.
187. Misselwitz R, Kraft R, Kostka S, Fabian H, Welfle K, Pfeil W y cols. Limited proteolysis of streptokinase and properties of some fragments. *Int J Biol Macromol* 1992, 14: 107-116.
188. Medved LV, Solovjov DA y Ingham KC. Domain structure, stability and interactions in streptokinase. *Eur J Biochem* 1996, 239: 333-339.
189. Welfle K, Misselwitz R, Schaup A, Gerlach D y Welfle H. Conformation and stability of streptokinases from nephritogenic and nonnephritogenic strains of streptococci. *Proteins* 1997, 27: 26-35.
190. Conejero-Lara F, Parrado J, Azuaga AI, Smith RA, Ponting CP y Dobson CM. Thermal stability of the three domains of streptokinase studied by circular dichroism and nuclear magnetic resonance. *Protein Sci* 1996, 5: 2583-2591.
191. Conejero-Lara F, Parrado J, Azuaga AI, Dobson CM y Ponting CP. Analysis of the interactions between streptokinase domains and human plasminogen. *Protein Sci* 1998, 7: 2190-2199.
192. Parrado J, Conejero-Lara F, Smith RA, Marshall JM, Ponting CP y Dobson CM. The domain organization of streptokinase: nuclear magnetic resonance, circular dichroism, and functional characterization of proteolytic fragments. *Protein Sci* 1996, 5: 693-704.
193. Wang X, Lin X, Loy JA, Tang J y Zhang XC. Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase. *Science* 1998, 281: 1662-1665.
194. Beldarrain A, Lopez-Lacombe JL, Kutysenko VP, Serrano R y Cortijo M. Multidomain structure of a recombinant streptokinase. A differential scanning calorimetry study. *J Protein Chem* 2001, 20: 9-17.
195. Castellino FJ. Recent advances in the chemistry of the fibrinolytic system. *Chem Rev* 1981, 81: 431-446.
196. Nihalani D, Kumar R, Rajagopal K y Sahni G. Role of the amino-terminal region of streptokinase in the generation of a fully functional plasminogen activator complex probed with synthetic peptides. *Protein Sci* 1998, 7: 637-648.
197. Malke H. Polymorphism of the streptokinase gene: implications for the pathogenesis of post-streptococcal glomerulonephritis. *Zentralbl Bakteriol* 1993, 278: 246-257.
198. Lee SH, Jeong ST, Kim IC y Byun SM. Identification of the functional importance of valine-19 residue in streptokinase by N-terminal deletion and site-directed mutagenesis. *Biochem Mol Biol Int* 1997, 41: 199-207.
199. Kim DM, Lee SJ, Kim IC, Kim ST y Byun SM. Asp41-His48 region of streptokinase is important in binding to a substrate plasminogen. *Thromb Res* 2000, 99: 93-98.
200. Wakeham N, Terzyan S, Zhai P, Loy JA, Tang J y Zhang XC. Effects of deletion of streptokinase residues 48-59 on plasminogen activation. *Protein Eng* 2002, 15: 753-761.

201. Kim IC, Kim JS, Lee SH y Byun SM. C-terminal peptide of streptokinase, Met369-Pro373, is important in plasminogen activation. *Biochem Mol Biol Int* 1996, 40: 939-945.
202. Zhai P, Wakeham N, Loy JA y Zhang XC. Functional roles of streptokinase C-terminal flexible peptide in active site formation and substrate recognition in plasminogen activation. *Biochemistry* 2003, 42: 114-120.
203. Fay WP y Bokka LV. Functional analysis of the amino- and carboxyl-termini of streptokinase. *Thromb Haemost* 1998, 79: 985-991.
204. Pupo E, Baghbaderani BA, Lugo V, Fernández J, Páez R y Torrens I. Two streptokinase genes are expressed with different solubility in *Escherichia coli* W3110. *Biotechnology Letters* 1999, 21: 1119-1123.
205. Torrens I, Ojalvo AG, Seralena A, Hayes O y de la FJ. A mutant streptokinase lacking the C-terminal 42 amino acids is less immunogenic. *Immunol Lett* 1999, 70: 213-218.
206. Robinson BR, Liu L, Houng AK, Sazonova IY y Reed GL. The streptokinase beta domain plays a critical role in activator complex formation and substrate docking. *Circulation* 2000, 102: 490.
207. Hernández L y Marrero MA. Estreptoquinasa: a propósito de un agente trombolítico patentado en Cuba. *Biología Aplicada* 2005, 22: 182-190.
208. Marder VJ y Stewart D. Towards safer thrombolytic therapy. *Semin Hematol* 2002, 39: 206-216.
209. Malke H, Roe B y Ferretti JJ. Nucleotide sequence of the streptokinase gene from *Streptococcus equisimilis* H46A. *Gene* 1985, 34: 357-362.
210. Avilan L, Yarzabal A, Jurgensen C, Bastidas M, Cruz J y Puig J. Cloning, expression and purification of recombinant streptokinase: partial characterization of the protein expressed in *Escherichia coli*. *Braz J Med Biol Res* 1997, 30: 1427-1430.
211. Goyal D, Sahoo DK y Sahni G. Hydrophobic interaction expanded bed adsorption chromatography (HI-EBAC) based facile purification of recombinant Streptokinase from *E. coli* inclusion bodies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007, 850: 384-391.
212. Zhang XW, Sun T, Huang XN, Liu X, Gu DX y Tang ZQ. Recombinant streptokinase production by fed-batch cultivation of *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol* 1999, 24: 647-650.
213. Multicenter, randomized, comparative study of recombinant vs. natural streptokinases in acute myocardial infarct (TERIMA). The TERIMA group investigators. Thrombolysis with Recombinant Streptokinase in Acute Myocardial Infarct. *Thromb Haemost* 1999, 82: 1605-1609.
214. Balagurunathan B, Sachin N y Jayaraman G. Enhancement of stability of recombinant streptokinase by intracellular expression and single step purification by hydrophobic interaction chromatography. *Biochemical Engineering Journal* 2008, 39: 84-90.
215. Cherish PV, Srinivas VK, Mohan VK y Krishna E. Renaturation, purification and characterization of streptokinase expressed as inclusion body in recombinant *E. coli*. *Journal of Chromatography B* 2008, 861: 218-226.
216. Hagenson MJ, Holden KA, Parker KA, Wood PJ, Cruze JA, Fuke M y cols. Expression of streptokinase in *Pichia pastoris* yeast. *Enzyme Microb Technol* 1989, 11: 650-656.
217. Malke H, Gerlach D, Kohler W y Ferretti JJ. Expression of a streptokinase gene from *Streptococcus equisimilis* in *Streptococcus sanguis*. *Mol Gen Genet* 1984, 196: 360-363.
218. Jackson KW, Malke H, Gerlach D, Ferretti JJ y Tang J. Active streptokinase from the cloned gene in *Streptococcus sanguis* is without the carboxyl-terminal 32 residues. *Biochemistry* 1986, 25: 108-114.

219. Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
220. Schaerlaekens K, Van Mellaert L, Lammertyn E, Geukens N y Anne J. The importance of the Tat-dependent protein secretion pathway in *Streptomyces* as revealed by phenotypic changes in tat deletion mutants and genome analysis. *Microbiology* 2004, 150: 21-31.
221. Yanisch-Perron C, Vierra J y Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the m13mp18 and PUC19 vectors. *Gene* 1985, 33: 103-109.
222. Wehmeier UF. New multifunctional *Escherichia coli*-*Streptomyces* shuttle vectors allowing blue-white screening on XGal plates. *Gene* 1995, 165: 149-150.
223. Hernández L, Rodríguez P, Castro A, Serrano R, Rodríguez MP, Rubiera R y cols. Determination of streptokinase activity by quantitative assay. *Biotechnol Apl* 1990, 7: 153-160.
224. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Smith JA, Seidman JG y cols. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York, 1994.
225. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72: 248-254.
226. Zor T y Selinger Z. Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. *Anal Biochem* 1996, 236: 302-308.
227. Wessel D y Flugge UI. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 1984, 138: 141-143.
228. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227: 680-685.
229. Hardy E y Castellanos-Serra L. "Reverse-staining" of biomolecules in electrophoresis gels: analytical and micropreparative applications. *Analytical Biochemistry* 2004, 328: 1-13.
230. Towbin H, Staehelin T y Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, 76: 4350-4354.
231. Santana H, Espino Y, Franco A, Furrázola G y Hardy E. A sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of recombinant human interferon alpha- 2b. *Biotechnol Techiques* 1999, 13: 341-346.
232. Duarte CA, Fernández de Cossio ME, Sierra G, Pentón E, Agraz A, Furrázola G y cols. Anticuerpos monoclonales de ratón contra el interferón recombinante alfa 2. Su empleo en la purificación y detección del antígeno. *Interferón y Biotecnología* 1987, 4: 221-232.
233. Cruz S, Duarte CA, Ferra E, Fontirroche G, Vázquez J, Martínez L y cols. Cuantificación de interferón alfa 2b humano recombinante mediante anticuerpos monoclonales. *Biotecnología Aplicada* 1990, 7: 132-141.
234. Ferrero J, Ochagavía M, Aguilera A y Lopez-Saura P. Titulación de la actividad antiviral de interferón utilizando el sistema de equipos Suma. *Biotecnología Aplicada* 1994, 11: 34-42.
235. Ferrero J, Duany L, Milan J, Vega M y Lopez-Saura P. Nuevo programa de cálculo. Cuantificación de la actividad antiviral de interferones mediante la inhibición de efecto citopatogénico utilizando el sistema de equipos Suma. *Biotecnología Aplicada* 1997, 14.
236. Abrahantes MC, Padrón S, Muñoz L, Villamonte G, Cabrales A, Reyes O y cols. Cuantificación de estreptoquinasas recombinantes mediante inmunoensayos tipo ELISA. *Evento Biotecnología Habana* 2003.

237. Giriish S, Kumar R, Chaiti R, Kammara R, Deepak N, Vasudha S y Mahavir Y. Novel clot-specific streptokinase proteins possessing altered plasminogen activation-characteristics and a process for the preparation of said proteins. US 20070287660, 2007.
238. Sands D, Whitton CM y Longstaff C. International collaborative study to establish the 3rd International Standard for Streptokinase. *J Thromb Haemost* 2004, 2: 1411-1415.
239. Farmacopea Británica. 1965-1966.1998.
240. Geisow MJ y Aitken A. Gas-or pulsed liquid-phase sequence analysis. *Protein Sequencing, a Practical Approach* Findlay JBC 1989, 85-98.
241. Shi L, Wang D, Chan W y Cheng L. Efficient expression and purification of human interferon alpha2b in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2007, 54: 220-226.
242. Lammertyn E y Anne J. Modifications of *Streptomyces* signal peptides and their effects on protein production and secretion. *FEMS Microbiol Lett* 1998, 160: 1-10.
243. Muller J y Malke H. Duplication of the streptokinase gene in the chromosome of *Streptococcus equisimilis* H46A. *FEMS Microbiol Lett* 1990, 60: 75-78.
244. Laplace F, Muller J, Gumpert J y Malke H. Novel shuttle vectors for improved streptokinase expression in streptococci and bacterial L-forms. *FEMS Microbiol Lett* 1989, 53: 89-94.
245. Binnie C, Butler MJ, Aphale JS, Bourgault R, DiZonno MA, Krygsman P y cols. Isolation and characterization of two genes encoding proteases associated with the mycelium of *Streptomyces lividans* 66. *J Bacteriol* 1995, 177: 6033-6040.
246. Binnie C, Jenish D, Cossar D, Szabo A, Trudeau D, Krygsman P y cols. Expression and characterization of soluble human erythropoietin receptor made in *Streptomyces lividans* 66. *Protein Expr Purif* 1997, 11: 271-278.
247. Taguchi S, Nishiyama K, Kumagai I y Miura K. Analysis of transcriptional control regions in the *Streptomyces* subtilisin-inhibitor-encoding gene. *Gene* 1989, 84: 279-286.
248. Lammertyn E. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas y de Agricultura Aplicadas. Isolation and charaterisation of a novel subtilisin inhibitor form *Streptomyces venezuelae* and evalation of its regulatory sequences for heterologous protein secretion by *Streptomyces lividans*. Katholieke Universiteit Leuven, 2000.
249. Einarsson M, Larsson T y Gellerbring A. A methods for cleansing streptokinases. EP 0 382 696, 1990.
250. Hernández L, Pérez N, Orta D, Urrutia E, Torres Y y Pujol V. Nuevas alternativas para la producción de estreptoquinasa recombinante. *Biotechnol Apl* 1997, 14: 120-121.
251. Kuppusamy M, Kannappa V, Lahiri S, Ella K y Khatri G. Recombinant streptokinase. US 7105327, 2006.
252. Taylor FB, Jr. y Botts J. Purification and characterization of streptokinase with studies of streptokinase activation of plasminogen. *Biochemistry* 1968, 7: 232-242.
253. Li YD, Li YQ, Chen JS, Dong HJ, Guan WJ y Zhou H. Whole genome analysis of non-optimal codon usage in secretory signal sequences of *Streptomyces coelicolor*. *Biosystems* 2006, 85: 225-230.
254. Gupta SK y Ghosh TC. CUCG: A non-redundant codon usage database from complete genomes. *Current Science* 2000, 78: 28-29.
255. Sletta H, Tondervik A, Hakvag S, Aune TE, Nedal A, Aune R y cols. The presence of N-terminal secretion signal sequences leads to strong stimulation of the total expression levels of three tested medically

important proteins during high-cell-density cultivations of *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 2007, 73: 906-912.

8 AUTOBIBLIOGRAFÍA

AUTOBIBLIOGRAFÍA RELACIONADA CON LA TESIS

Trabajos que contienen los resultados presentados en el documento de tesis.

Publicaciones

1. Pimienta E, Ayala JC, Rodríguez C, Ramos A, Van Mellaert L, Vallín C, Anné J. (2007). Recombinant production of *Streptococcus equisimilis* streptokinase by *Streptomyces lividans*. *Microbial Cell Factories* 6: 20. (factor de impacto₂₀₀₇: 3,36).
2. Pimienta E y Vallín C. (2005). Utilización de *Streptomyces* como hospedero para la producción de proteínas heterólogas. *Revista CENIC (Ciencias Biológicas)*, 36 (2): 97-104. (Referenciada en bases de datos de prestigio internacional).
3. Vallin C, Pimienta E, Ramos A, Rodríguez C, Van Mellaert L, Anné J. (2005). *Streptomyces* as a host for the expression/secretion of heterologous proteins for the production of biopharmaceuticals important proteins. *Journal of Business Chemistry* 2: 107-111. (Referenciada en bases de datos de prestigio internacional).
4. Pimienta E, Fando R, Sánchez JC, Vallín C. (2002). Secretion of human interferon alpha 2b by *Streptomyces lividans*. *Applied Microbiology Biotechnology* 58: 189-194. (factor de impacto₂₀₀₇: 2,475).

Eventos Científicos

1. FEMS 2009 - 3rd Congress of European Microbiologists *Microbes and Man-interdependence and future challenges*. Gothenburg, Sweden, June 28 - July 2, 2009.. Pimienta E, Ayala JC, Rodríguez C, Van Mellaert L, Sarzo M, Anné J, Vallin C. Purification and characterization of *Streptococcus equisimilis* streptokinase from *Streptomyces lividans*. (Aceptado)
2. Congreso Biotecnología Habana 2006, Cuba. Pimienta E, Ayala JC, Rodríguez C, Van Mellaert L, Rosabal G, Schaerlaekens K, Ramos A, Vallín C and Anné J. Secretory production of *Streptococcus equisimilis* streptokinase by *Streptomyces lividans*.
3. 14 Congreso Científico CNIC, 2005, La Habana, Cuba. Pimienta E, Vallín C, Van Mellaert L, Lammertyn E, Schaerlaekens K, Rosabal G, Rodríguez C and Anne J. Secretion of *Streptococcus equisimilis* streptokinase by *Streptomyces lividans*.
4. Congreso Biotecnología Habana 2003, Cuba. Pimienta E, Fando R, Sánchez JC, Franco A, Ferrero J, Duanes L, Vallín C. Biologically active human interferon alpha 2b secreted by *Streptomyces lividans*.

5. II Encuentro Interamericano de Farmacia y Nutrición, 2003, La Habana, Cuba. Vallín C, Pimienta E, Ramos A, Rosabal G, Rodríguez C. *Streptomyces*: Potencialidades como nuevo hospedero para la secreción de proteínas heterólogas de interés farmacéutico.
6. Xth International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 2002, Paris, Francia. Pimienta E, Fando R, Sánchez JC, Vallín C. Biologically active human interferon alpha 2b secreted by *Streptomyces lividans*.

Reconocimientos

- Trabajo de Mayor Originalidad, 2002.
Resultado Relevante del Centro de Química Farmacéutica”, 2002.
“Secreción de Interferón alfa 2b humano por *Streptomyces lividans*. Contribución básica al desarrollo de *Streptomyces* como un nuevo sistema de expresión-secreción”.
- Trabajo de Mayor Originalidad, 2007.
Resultado Relevante del Centro de Química Farmacéutica”, 2007.
“Producción recombinante de Estreptoquinasa de *Streptococcus equisimillis* por *Streptomyces lividans*”.

AUTOBIBLIOGRAFÍA NO RELACIONADA CON LA TESIS.

Trabajos relacionados con la utilización de *Streptomyces* como hospedero para la expresión secretoria de proteínas de interés biofarmacéutico.

Publicaciones

1. Vallín C, Ayala JC, García D, Jones J, Rodríguez C, González L, Hernández I, Pimienta E, Vila A, Sarmientos M E, Acosta A, Van Mellaert L and Anné J. Immune response to *Streptomyces lividans* and the recombinant strain secreting *Mycobacterium tuberculosis* APA as a live vector in mice Balb/C. Open Vaccine Journal (Aceptada).
2. Ayala JC, Rodríguez C, Pimienta E, Anné J, Van Mellaert L and Vallín C. Secretory production of biologically active ESAT-6 antigen of *Mycobacterium tuberculosis* by *Streptomyces lividans*. Enviada a Microbial Cell Factories.
3. Vallín C, Ramos A, Pimienta E, Rodríguez C, Hernández T, Hernández I, Del Sol R, Rosabal G, Van Mellaert L and Anne J. (2006). *Streptomyces* as host for recombinant

production of *Mycobacterium tuberculosis* proteins. Tuberculosis (Edinb) 86 (3-4): 198-202.

4. Pimienta E, Rosabal G, Rodríguez C, Del Sol R, González L, Vallín C. (2002). Búsqueda de nuevos hospederos de Actinomicetos para la secreción de interferón alfa 2b humano recombinante. Reporte preliminar. Revista Cubana de Farmacia (Suplemento Especial) 36 (1): 15-18.
5. Rosabal G, Del Sol R, Rodríguez C, Pimienta E, Marrero K, González L, Otero I, Figarola A, Vallín C. (2001). Vector de clonación para la transferencia conjugativa de ADN de *E. coli* a *Streptomyces*. Revista CENIC (Ciencias Biológicas) 32 (2): 123-126.
6. Pimienta E, Vallín C. (2000). Secreción de proteínas heterólogas por *Streptomyces lividans*. Revista Cubana de Farmacia (Suplemento Especial) 34: 390-393.

Eventos Científicos

1. International Workshop on Tuberculosis Vaccine, 2007, Matanzas, Cuba:
Ramos A, Rodríguez C, Ayala J, García D, Hernández I, Pimienta E, Jones J, González L and Vallín C. Immunological murine response to mycobacterium tuberculosis recombinant APA antigen from *E. coli*, *Streptomyces lividans* and *Streptomyces* recombinant strains with APA gen.
Ramos A, Rodríguez C, Ayala JC, Pimienta E, Vallín C, Van Mellaert L and Anné J. Secretory production of biologically active ESAT-6 antigen of *Mycobacterium tuberculosis* by *Streptomyces lividans*.
2. XXVII Congreso Latinoamericano de Química y VI Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química, 2006, La Habana. Vallín C, Ramos A, Pimienta E, Rodríguez C, Ayala JC, Hernández I, Rosabal G, Van Mellaert L y Anné L. Expresión, secreción y producción de proteínas de *M. tuberculosis* en *Streptomyces lividans*.
3. III Simposium Nacional de Tuberculosis. 2006, La Habana. Cuba. Pimienta E, Rodríguez C, Vallín C, Ayala JC, Milanés MT. Potencialidades de las proteínas Esat-6 y CFP-10 en el serodiagnóstico de la Tuberculosis en Cuba.
4. XVI FORUM DE CIENCIA Y TECNICA Municipio Playa, 2006, La Habana, Cuba. Vallín C, Ramos A, Pimienta E, Rodríguez C, Hdez T, Hdez I, Ayala JC, Rosabal G y Chang S. Clonaje, expresión y secreción en *Streptomyces* y estudios inmunológicos de antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*.
5. 14 Congreso Científico CNIC, 2005, La Habana, Cuba. Pimienta E, Vallín C, Van Mellaert L, Rosabal G, Lammertyn E, Schaerlaekens K, Hernandez T, Rodríguez C

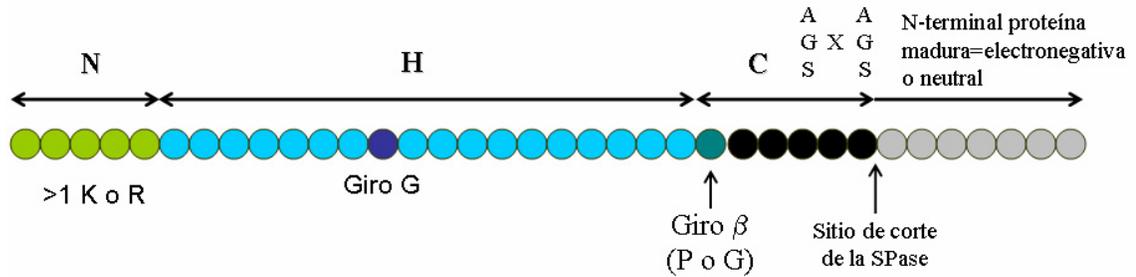
and Anne J. Cloning and secretion of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10 antigen in *Streptomyces lividans*.

6. Cuba Farmacia–Alimentos 2004, VI Encuentro Iberoamericano de las Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias. 2004, La Habana, Cuba. Ruiz R, Pimienta E, Rosabal G, Rodríguez C y Vallín C. Evaluación de la actividad lipolítica extracelular en el proceso de fermentación de varias cepas de Actinomicetos.
7. IV Taller sobre Colecciones de Cultivos Microbianos. 2003, La Habana, Cuba. Pimienta E, Ramos A, Rodríguez C, Rosabal G, Vallin C. Búsqueda de cepas de Actinomicetos secretoras de proteasas. Reporte preliminar.
8. XV Forum de Ciencia y Técnica Base, 1era Etapa, 2003, La Habana, Cuba:
Ramos A, Del Sol R, Rodriguez C, Rosabal G, Pimienta E, Vallín C. Efecto de la glucosa en la secreción por *Streptomyces lividans* 1326 del antígeno APA 45/47 kDa de *Mycobacterium tuberculosis*.
Rosabal G, Rodríguez C, Del Sol R, Pimienta E, Ramos A, Vallín C. Clonaje de la proteína E1(340) del VHC en *Streptomyces lividans* bajo señales de regulación y secreción de la agarasa.
9. IV Taller de Medios de Cultivo y sus aplicaciones en la identificación y propagación de microorganismos y células, Biomedicult' 2003, La Habana, Cuba. Pimienta E, Ramos A, Rodríguez C, Rosabal G, Vallin C. Influencia de las condiciones de cultivo de *Streptomyces lividans* sobre la producción secretoria de interferón alfa 2b humano recombinante.

9 ANEXOS

ANEXO 1

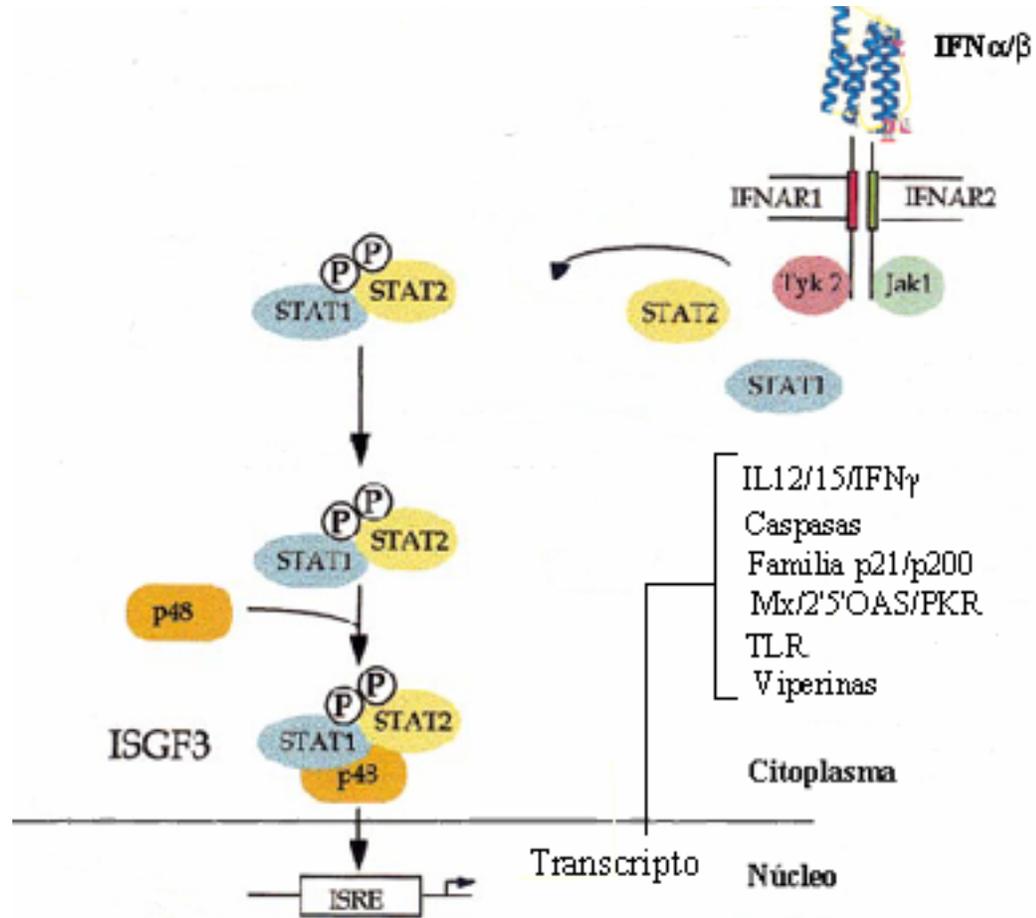
Representación esquemática de un péptido señal



En los péptidos señales se distinguen tres dominios: un dominio amino denominado N, un dominio H central y un dominio C carboxilo. El dominio N tiene generalmente una carga neta positiva debido a la presencia de varios residuos de aminoácidos K o R. El dominio H constituye el centro hidrofóbico del péptido señal y es la parte más importante requerida para la localización e inserción de la pre-proteína en la membrana. Frecuentemente, un residuo interruptor de hélices (G o P) se encuentra en el medio de la región H, lo cual permite al péptido señal formar una estructura tipo horquilla que se puede insertar en la bicapa lipídica. El dominio C incluye el sitio de corte de la peptidasa señal (SPase) y es la única región del péptido señal que demanda cierta especificidad de la secuencia primaria de los aminoácidos. Los residuos en las posiciones -3 y -1, relativos a la proteína madura, generalmente son residuos pequeños y neutros como: A, G y S, con una fuerte preferencia por Ala (Ala-X-Ala).

ANEXO 2

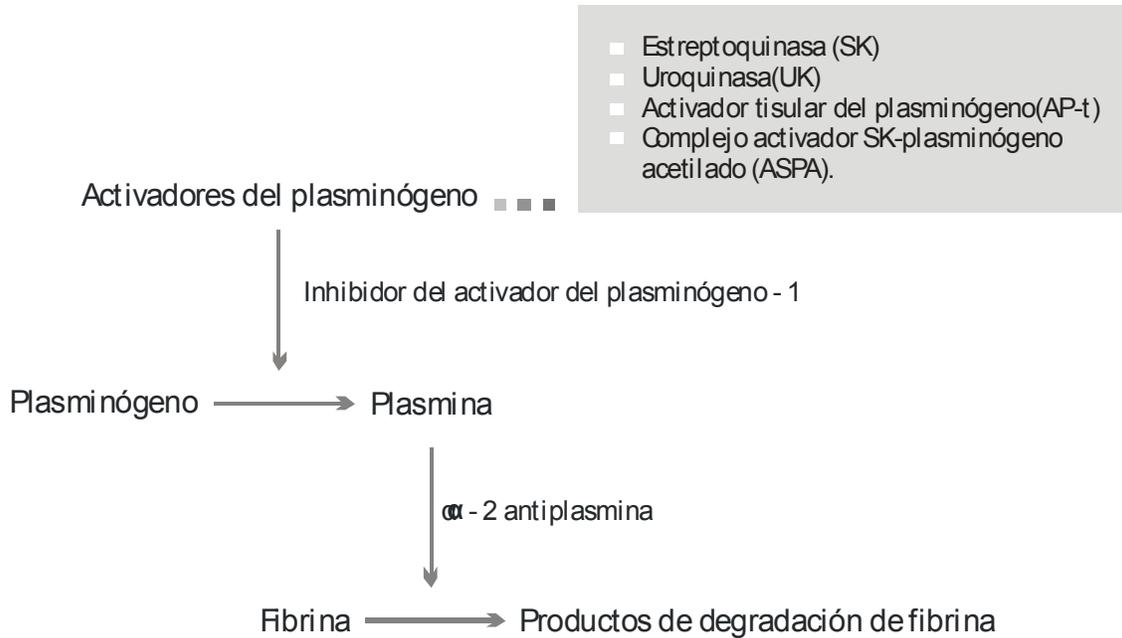
Esquema del mecanismo de acción de los IFN α/β



El mecanismo de acción de los interferones α y β se inicia con su unión al dominio extracelular del receptor superficial ifnar, constituido por dos subunidades: ifnar-1 y la ifnar-2. Las quinasas Tyk2 y JAK1 están asociadas a las subunidades ifnar-1 e ifnar-2, respectivamente. La interacción de los interferones α y β con el receptor provoca la fosforilación de estas quinasas y la consecuente fosforilación de los dominios intracelulares de ambas subunidades del receptor. Estos residuos fosforilados sirven como sitio de reclutamiento de las proteínas transportadoras de señales y activadores transcripcionales STAT. Estas proteínas activadas forman homodímeros y heterodímeros y componen finalmente un gran complejo activador transcripcional denominado factor génico 3 (ISGF3). Este complejo de proteínas está formado fundamentalmente por STAT1 α o p91, STAT1 β , STAT2 o p113 y la p48. El complejo ISGF3 penetra en el núcleo celular y se une con alta afinidad a secuencias génicas específicas (AGTTTN₃TTTCC), llamadas elementos de respuesta estimulada por interferón (ISRE), activando la transcripción génica de numerosas proteínas efectoras. Tomado de Walter¹⁶⁰ y modificado por el autor.

ANEXO 3

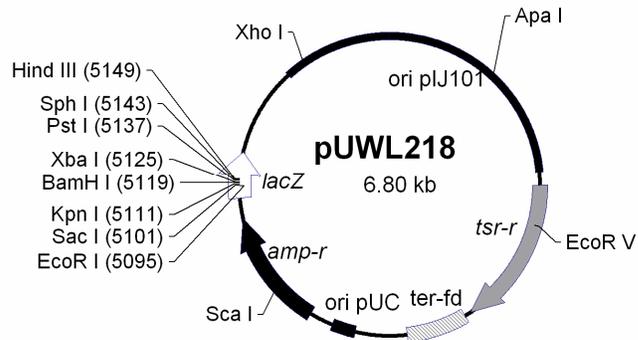
Representación esquemática del proceso de fibrinólisis



Los activadores del plasminógeno se unen a él en proporción 1:1 y se forma un complejo de alta afinidad. Este complejo no es afectado por la α -2-antiplasmina, la cual es un inhibidor de la plasmina y forma un complejo irreversible con esta. El complejo activador-plasminógeno hidroliza el resto del plasminógeno circulante y lo transforma en plasmina, la cual es la serino proteasa responsable de la degradación de los coágulos de fibrina de la sangre. Tomado de Banerjee y Banerjee³⁶ y modificado por el autor.

ANEXO 4

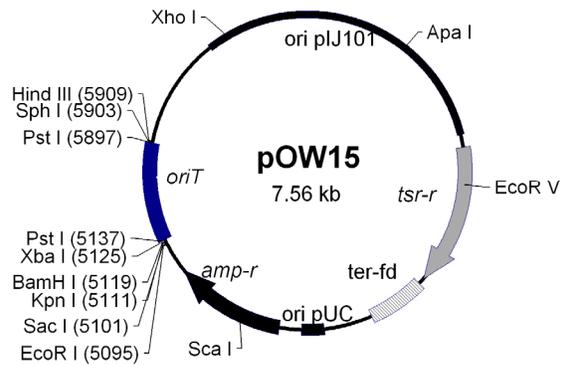
Mapa físico del plasmidio pUWL218



Abreviaturas: *amp-r* es un gen que confiere resistencia a ampicilina, *tsr-r* confiere a resistencia a tioestreptona y *lacZ* es gen codificador del fragmento α de la β -galactosidasa de *E. coli*. Se simbolizan los *ori* de la construcción. El fragmento ter-fd simboliza el terminador de la transcripción del fago fd. Solamente se incluyen los sitios únicos de restricción más significativos. Tomado de Wehmeier²²² y modificado por el autor.

ANEXO 5

Mapa físico del plasmidio pOW15



Abreviaturas: *amp-r* es un gen que confiere resistencia a ampicilina, *tsr* confiere a resistencia a tioestreptona y *lacZ* es gen codificador del fragmento α de la β -galactosidasa de *E. coli*. Se simbolizan los *ori* de la construcción, incluyendo el *oriT* para la transferencia conjugativa de ADN entre especies. El fragmento *ter-fd* simboliza el terminador de la transcripción del fago fd. Solamente se incluyen los sitios únicos de restricción más significativos. Rosabal G., resultados no publicados.