



ANÁLISIS DE LOS PRINCIPALES TRABAJOS PROTEOMICOS REALIZADOS PARA EXAMINAR LOS COMPONENTES MICOBACTERIANOS.

Susana Flores-Villalva^a, E. Rodríguez^a, Y. Rubio^b, G. Canto^b, F. Milián^b.

^aCENID Fisiología, INIFAP. Ajuchitlán, Colón, Qro., flores.susana@inifap.gob.mx, rodriguez.elba@inifap.gob.mx.

^bFacultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Qro., yez.rubio@hotmail.com, feliciano.milian@uaq.mx, gcanto07@uaq.mx

RESUMEN

La tuberculosis es la segunda causa de muerte por un agente infeccioso, después del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); es causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*, miembro del complejo *M. tuberculosis*. La enfermedad típicamente afecta los pulmones y linfonodos asociados pero puede afectar cualquier órgano del cuerpo. La infección se establece en aproximadamente un tercio de los individuos expuestos al bacilo; sin embargo, solo el 10% desarrollará la enfermedad. Diversos autores han realizado diferentes análisis en donde se analiza la compleja respuesta inmune hacia *M. tuberculosis* detallando los principales componentes micobacterianos asociados a la infección. Sin embargo, el proteoma de *M. tuberculosis* y *M. bovis* permanece pobremente definido, especialmente en términos de virulencia y patogénesis, esto a pesar del interés en identificar antígenos inmunodominantes que mejoren el diagnóstico de la enfermedad. Antes de la década de los 90, muchas proteínas micobacterianas se identificaron utilizando métodos basados esencialmente en el fraccionamiento bioquímico y en la detección inmunológica con anticuerpos monoclonales. En ese momento, proteínas importantes, como el complejo Ag85, MPB64, MPB70, y algunas proteínas citoplasmáticas como, DnaK, groEl, SodA, fueron identificadas. Los estudios clásicos de proteómica involucran el uso de la electroforesis bidimensional (2-DE). Los puntos o spots de las proteínas identificadas son aislados y digeridos con tripsina para producir péptidos que luego son sometidos a técnicas como la espectrometría de masas. Con estas herramientas han sido identificadas y caracterizadas diversas proteínas de secreción, proteínas de membrana e intracelulares. Así mismo ha sido posible describir su función y contribución en la patogénesis de la enfermedad, lo cual puede abrir el camino en la generación de nuevas vacunas o tratamientos para la tuberculosis. En esta revisión se resumen el estado del arte sobre los estudios de proteómica de *M. tuberculosis*.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es la segunda causa de muerte por un agente infeccioso. En el año 2013, 9.0 millones de personas desarrollaron la enfermedad mientras que 1.5 millones murieron, 25% de los cuales eran pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La tuberculosis es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, un miembro del complejo *M. tuberculosis*, el cual también incluye a *M. bovis*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. canetti* y *M. africanum* (24); muchos de los cuales son capaces de causar enfermedad en el humano. Normalmente, *M. tuberculosis* afecta los pulmones y los linfonodos asociados pero puede afectar cualquier parte del cuerpo. A pesar de que la infección se establece en cerca de un tercio de los individuos expuestos, solamente un 10% de ellos desarrollará la enfermedad. Diversos estudios se han enfocado al análisis de la compleja respuesta inmune hacia *M. tuberculosis* y las interacciones que se llevan a cabo entre el bacilo y la célula huésped. Así mismo, se ha analizado cuales son los principales componentes



micobacterianos que participan en el proceso de infección. No obstante, el proteoma de *M. tuberculosis* está pobremente definido, sobre todo en términos de virulencia y patogénesis.

Estudios pioneros en proteómica permitieron basados esencialmente en el fraccionamiento bioquímico y en la detección inmunológica con anticuerpos monoclonales permitieron la identificación de proteínas como el complejo Ag85, MPB64, MPB70, y algunas proteínas citoplasmáticas como, DnaK, groEl, SodA. Posteriormente con el uso de electroforesis bidimensionales y la identificación de los spots obtenidos mediante espectrofotometría de masas fue posible crear los primeros mapas 2-DE del proteoma de *M. tuberculosis*. Sin embargo, fue hasta que se describió el genoma completo de este patógeno que los análisis proteómicos permitieron un mayor entendimiento de esta bacteria.

2. ESTUDIOS PROTEOMICOS

El análisis de los componentes celulares permite la identificación de las proteínas secretadas por el bacilo, los cuales son potencialmente marcadores de virulencia o antígenos inmunogénicos útiles para el desarrollo de vacunas o reactivos diagnósticos. Así mismo, es posible identificar que proteínas son importantes en la interacción del bacilo con la célula huésped o cuales son necesarias en los mecanismos de adaptación al ambiente de la bacteria. En este caso, las proteínas de membrana y de pared celular juegan un papel muy importante al estar involucradas en la resistencia del patógeno a un daño externo.

En la interacción inicial entre *M. tuberculosis* y el huésped están involucradas diversas proteínas de membrana activas en la interacción célula-célula, transporte de iones o señalización celular, por lo que se sugiere que más de la mitad de las proteínas de membrana de *M. tuberculosis* sean blancos farmacéuticos. Así mismo, una gran proporción de las proteínas relacionadas a diversos mecanismos de patogenicidad son proteínas de membrana involucradas en el metabolismo de lípidos y en el transporte a través de la membrana. Por ejemplo, algunas lipoproteínas y glicolipoproteínas como la proteína de 19 kDa, LprG, PstS1 interactúan con los receptores TLR2 y modulan la respuesta inmune afectando la presentación de antígenos por parte del macrófago. Desafortunadamente, la caracterización de las proteínas de membrana es difícil, ya que estas proteínas están compuestas de una región hidrofóbica y una región hidrofílica por lo que no hay un solo solvente o combinación de solventes que permitan solubilizar adecuadamente este grupo de proteínas. No obstante, se han hecho grandes avances en la caracterización de las proteínas de membrana usando la tecnología de SDS-PAGE de una dimensión. Gu., et al fueron capaces de identificar 739 proteínas de membrana usando un método de centrifugación diferencial. Así mismo, otros autores han reportado métodos para evitar la contaminación de la fracción membranal con proteínas del citosol al tratar la fracción membranal con Urea 5 M y una solución de carbonatos seguido por una ultracentrifugación. Con este método, los autores pudieron identificar 349 proteínas, 100 de las cuales eran proteínas transmembranales. La identificación de lipoproteínas también ha sido un área de gran interés, pues estas proteínas son consideradas importantes antígenos inmunodominantes útiles en el diagnóstico serológico de la tuberculosis, con el uso de un método basado en Triton X-114 fue posible identificar las 10 lipoproteínas más abundantes en la membrana de *M. tuberculosis*.

Debido a la complejidad del proteoma de *M. tuberculosis*, los estudios proteómicos aún son limitados en su habilidad de identificar y cuantificar todas las proteínas. Sin embargo, recientemente se reportó la identificación de 3434 proteínas de *M. bovis* BCG, incluyendo 512 proteínas transmembranales. Esto representa cerca del 87% de proteínas expresadas en *M. bovis* BCG. En este estudio, tres fracciones subcelulares fueron separadas: la pared celular, la membrana plasmática y el citoplasma. Las proteínas extraídas de cada fracción fueron separadas por electroforesis de una dimensión, posteriormente cada línea fue cortada y digerida y los péptidos fueron separados por cromatografía fase reversa y analizados usando LTQ Orbitrap



Velos. Hasta el momento este es el estudio más amplio sobre el proteoma de *M. bovis* BCG y seguramente ayudará en el diseño de nuevas vacunas y en la identificación de antígenos inmunodominantes para el control de la tuberculosis.

Por otra parte, para el análisis de las proteínas de secreción fue necesario el uso de una cepa de *M. tuberculosis* que no sufre el proceso normal de autólisis con el objetivo de obtener una fracción de filtrado de cultivo enriquecido con proteínas de secreción. Con esta cepa fue posible la identificación de las principales proteínas que forman parte del filtrado de cultivo: (Ag85A, Ag85B, Ag85C y MPT51 o Ag85D), MPT63, MPT64, MPT32, MTC28, ESAT-6, CFP10 y otros miembros de la familia ESAT-6. Recientemente se reportaron otras 103 proteínas de secreción los cuales representan antígenos potencialmente predominantes en respuestas humorales y celulares.

De la misma forma se han realizado estudios comparativos para identificar proteínas presentes en *M. tuberculosis* pero ausentes en *M. bovis* BCG con el objetivo de identificar nuevos blancos vacunales. Los estudios comparativos han mostrado que la composición proteómica entre las cepas es muy similar; sin embargo, se observan claras diferencias en la intensidad de los spots y en la presencia, ausencia o posición de los spots. Se identificaron seis spots únicos a *M. tuberculosis*: L-alanine dehydrogenase (Rv2780), isopropyl malate synthase (Rv3710), nicotinate-nucleotide pyrophosphatase (Rv1596), MPT64 (Rv1980c) y dos proteínas hipotéticas conservadas (Rv2449c, Rv0036c). Así mismo, se identificaron cambios en las proteínas LpqH, Icl1 y GlcB. De la misma forma se observó que los niveles de ESX-3 en *M. bovis* BCG están reducidos en comparación con *M. tuberculosis* y debido a que el sistema ESX-3 es esencial en *M. tuberculosis* con una aparente función en la homeostasis del hierro y zinc, se ha planteado la posibilidad de que la vacunación con *M. bovis* BCG puede ser mejorada al incrementar los niveles del sistema ESX-3 en esta cepa.

En un esfuerzo por determinar las diferencias proteicas entre cepas de *M. tuberculosis* resistentes y susceptibles a la isoniazida, Jiang et al. Compararon las proteínas extraídas de nueve cepas monoresistentes a isoniazida y siete cepas susceptibles. De esta forma, se observó que cinco proteínas están sobre expresadas en cepas resistentes, siendo: Rv1446c, Rv3028c, Rv0491, Rv2145c and Rv2971. El gen Rv0491 codifica la proteína regX3, que pertenece al sistema de dos componentes senX3-regX3, el cual permite que el bacilo responda a los cambios en su medio ambiente y es necesario para la virulencia de *M. tuberculosis*.

M. tuberculosis es un patógeno intracelular que ha desarrollado diversos mecanismos para resistir el ambiente hostil dentro del macrófago. Estos mecanismos involucran factores de virulencia así como importantes proteínas necesarias para la interacción con la célula huésped. No obstante hay muy pocos trabajos que analizan las proteínas expresadas *in vivo*. El estudio de las proteínas intracelulares es muy limitado debido a las dificultades de recuperar suficiente cantidad de proteínas micobacterianas libres de proteínas contaminantes de la célula huésped. Recientemente se ha descrito la primera caracterización proteómica de *M. tuberculosis* durante una infección *in vivo* en el modelo de infección por aerosol en puerco de guinea. En este estudio describieron 500 proteínas presentes en los días 30 y 90 post-infección. Dos grupos funcionales representaron cerca de la mitad del total de proteínas identificadas: categoría 3 (pared celular y procesos celulares), categoría 7 (metabolismo intermediario y respiración). Estas proteínas mostraron gran heterogeneidad, lo que indica importantes procesos biológicos necesarios en diferentes etapas de la infección. Muchas proteínas identificadas en este estudio pueden servir de base para el diseño racional de diversos fármacos.

4. CONCLUSIONES

M. tuberculosis es un patógeno muy exitoso que tiene una interacción muy compleja con la célula huésped, donde puede persistir durante largos periodos de tiempo sin causar ningún síntoma de la enfermedad. La OMS estima que casi un tercio de la población mundial presenta una infección



latente por *M. tuberculosis* y esta latencia es una fuente constante de reactivación de la enfermedad. Del cinco al diez por ciento de las personas infectadas desarrollan TB activa durante toda su vida, los defectos en la inmunidad celular, la coinfección por VIH, la malnutrición, la administración de la quimioterapia o la terapia del factor de necrosis antitumoral y diabetes predisponen a las personas con infección latente de desarrollar tuberculosis. Por lo tanto, es muy importante desarrollar nuevos reactivos de diagnóstico, vacunas nuevas e identificar nuevos blancos farmacéuticos. La proteómica puede tener un impacto significativo en nuestra comprensión actual de *M. tuberculosis*, especialmente sobre la patogenicidad, virulencia, y las interacciones con las células huésped.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bell C, Smith T, Sweredoski MJ, Hess S. 2012. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* Proteome by Liquid Chromatography Mass Spectrometry-based Proteomics Techniques: A Comprehensive Resource for Tuberculosis Research. *J. Proteome Res.* 11:119–130.
2. Daniel TM, Janicki BW. 1978. Mycobacterial Antigens: A Review of Their Isolation, Chemistry, and Immunological Properties. *Microbiol. Rev.* 42:84–113.
3. Deenadayalan A, Sundaramurthi JC, Raja A. 2010. Immunological and proteomic analysis of preparative isoelectric focusing separated culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Exp. Mol. Pathol.* 88:156–62.
4. Fukui Y, Hirai T, Uchida T, Yoneda M. 1965. Extracellular proteins of tubercle bacilli. IV. Alpha and beta antigens as major extracellular protein products and as cellular components of a strain (H37Rv) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biken J.* 8:189–199
5. González-Zamorano M, Mendoza-Hernández G, Xolalpa W, Parada C, Vallecillo AJ, Bigi F, Espitia C. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* glycoproteomics based on ConA-lectin affinity capture of mannosylated proteins. *J. Proteome Res.* 8:721–33.
6. Gu S, Chen J, Dobos KM, Bradbury EM, Belisle JT, Chen X. 2003. Comprehensive proteomic profiling of the membrane constituents of a *Mycobacterium tuberculosis* strain. *Mol. Cell. proteomics* 2:1284–96.
7. Gunawardena HP, Feltcher ME, Wrobel JA, Gu S, Miriam B, Chen X. 2013. Comparison of the Membrane Proteome of Virulent *Mycobacterium tuberculosis* and the Attenuated *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine Strain by Label-Free Quantitative Proteomics. *J. Proteome Res.* 12:5463–5474.
8. Jiang XIN, Zhang W, Gao F, Huang Y, Lv C, Wang H. 2006. Comparison of the Proteome of Isoniazid-Resistant and -Susceptible Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb. Drug Resist.* 12:231–238.
9. Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Zimny-Arndt U, Raupach B, Mattow J, Halada P, Lamer S, Hagens K, Kaufmann SHE. 1999. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol. Microbiol.* 33:1103–1117.
10. Kruh NA, Trout J, Izzo A, Prenni J, Dobos KM. 2010. Portrait of a pathogen: the *Mycobacterium tuberculosis* proteome in vivo. *PLoS One* 5:e13938.
11. Målen H, Berven FS, Fladmark KE, Wiker HG. 2007. Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Proteomics* 7:1702–18.
12. Målen H, Berven FS, Søfteland T, Arntzen MØ, D'Santos CS, De Souza GA, Wiker HG. 2008. Membrane and membrane-associated proteins in Triton X-114 extracts of *Mycobacterium bovis* BCG identified using a combination of gel-based and gel-free fractionation strategies. *Proteomics* 8:1859–70.



13. Målen H, Pathak S, Søfteland T, de Souza G a, Wiker HG. 2010. Definition of novel cell envelope associated proteins in Triton X-114 extracts of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. BMC Microbiol. 10:132.
14. Mattow J, Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf H, Lamer S, Zimny-arndt U, Hagens K, Müller E, Kaufmann SHE. 2001. Identification of proteins from *Mycobacterium tuberculosis* missing in attenuated *Mycobacterium bovis* BCG strains. Electrophoresis 22:2936–2946.
15. Nagai S, Wiker HG, Harboe M, Kinomoto M. 1991. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. 59:372–382.
16. Parish T. 2003. The senX3-regX3 two-component regulatory system of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence. Microbiology 149:1423–1435.
17. Rifat D, Belchis DA, Karakousis PC. 2014. senX3- independent contribution of regX3 to *Mycobacterium tuberculosis* virulence. BMC Microbiol. 14: 265.
18. Rosenkrands I, King A, Weldingh K, Moniatte M, Moertz E, Andersen P. 2000. Towards the proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. Electrophoresis 21:3740–3756.
19. Sinha S, Kosalai K, Arora S, Namane A, Sharma P, Gaikwad AN, Brodin P, Cole ST. 2005. Immunogenic membrane-associated proteins of *Mycobacterium tuberculosis* revealed by proteomics. Microbiology 151:2411–9.
20. Sonnenberg MG, Belisle JT. 1997. Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing , and electrospray mass spectrometry. Infect. Immun. 65:4515-24.
21. Xiong Y, Chalmers MJ, Gao FP, Cross TA, Marshall AG. 2005. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Integral Membrane Proteins by One-Dimensional Gel Electrophoresis and Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. J. Proteome Res. 4:855–861.