EVALUACIÓN DEL SISTEMA TAT DE *B. SUBTILIS* PARA LA SECRECIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS

Subils, T.; Rodriguez, F.

Laboratorio de Investigación y Desarrollos Biotecnológicos (LIDEB). Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.

Palabras clave: sistema Tat; *Bacillus subtilis*; secreción de proteínas; péptido señal de PhoD; proteína fluorescente verde

Introducción y objetivo

La secreción de proteínas simplifica la recuperación y la purificación de proteínas recombinantes. El sistema **Tat** (*Twin-Arginine Translocation*, translocación de arginina gemela) exporta proteínas **correctamente plegadas** a través de la membrana citoplasmática. En *B. subtilis* está formado solo por **TatA y TatC** y su potencial para secretar proteínas heterólogas está poco explorado.

Objetivo: evaluar la expresión y la eficiencia de secreción de proteínas heterólogas mediante el sistema Tat de *B. subtilis*, con el péptido señal de PhoD fusionado a la proteína fluorescente verde (GFP) y a la roja (mCherry).

Metodología

- **Cepas:** *B. subtilis* 3NA y 168; *Escherichia coli* TOP10 y DH5α.
- **Construcciones génicas** con y sin *tatAd-tatCd*, y deleción del operón *phoD* (Figura 1).
- Fluorescencia en **células** y **sobrenadante**; *western blot* de TatCd; tinción de Gram.

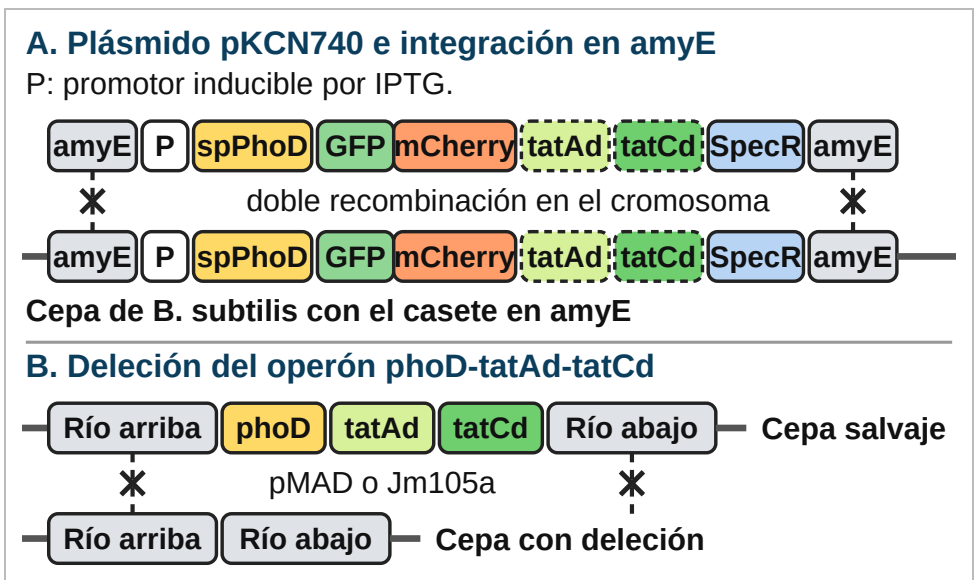


Figura 1. Construcciones génicas. A: casete con GFP o mCherry, con y sin tatAd-tatCd, integrado en amyE. B: deleción del operón phoD. SpecR: resistencia a espectinomicina.

Resultados

- **GFP:** se detectaron expresión y secreción; cerca del **50 %** de la fluorescencia se encontró en el sobrenadante (Figura 2).
- Agregar TatAd-TatCd **no aumentó de forma consistente** la secreción, y TatCd no se detectó por inmunodetección (*western blot*).
- **mCherry:** no se detectó en *B. subtilis*, pero se expresó correctamente en *E. coli*. La limitación estaría asociada al hospedador y no a la construcción.
- **Mutantes:** se obtuvieron cepas con deleción del operón *phoD*; las diferencias con las salvajes son leves y requieren más estudios (Figura 3).

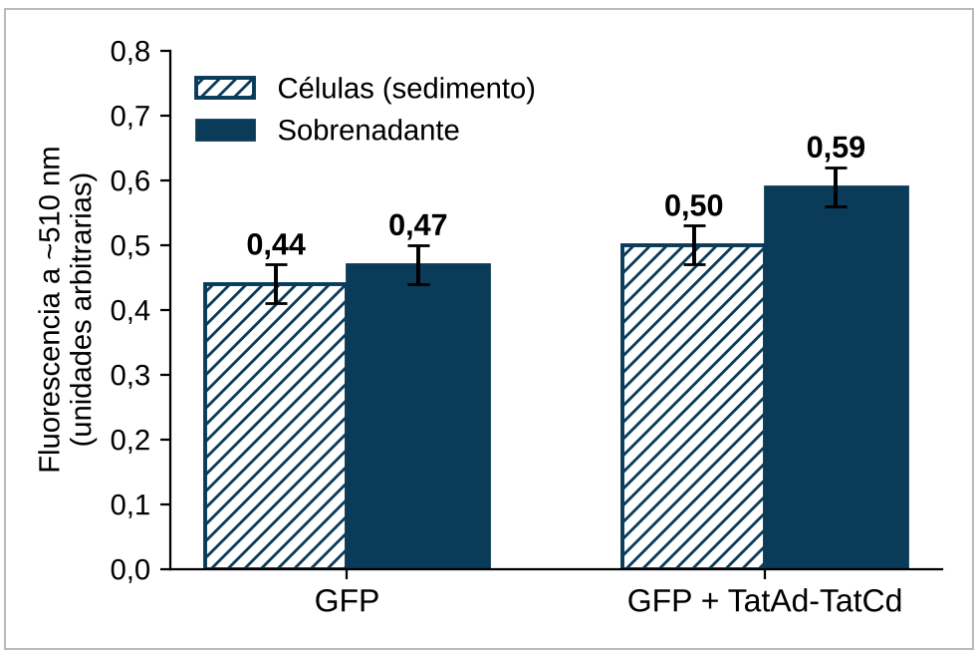


Figura 2. Fluorescencia de GFP en células y sobrenadante. Valores aproximados; barras de error de ±0,03.

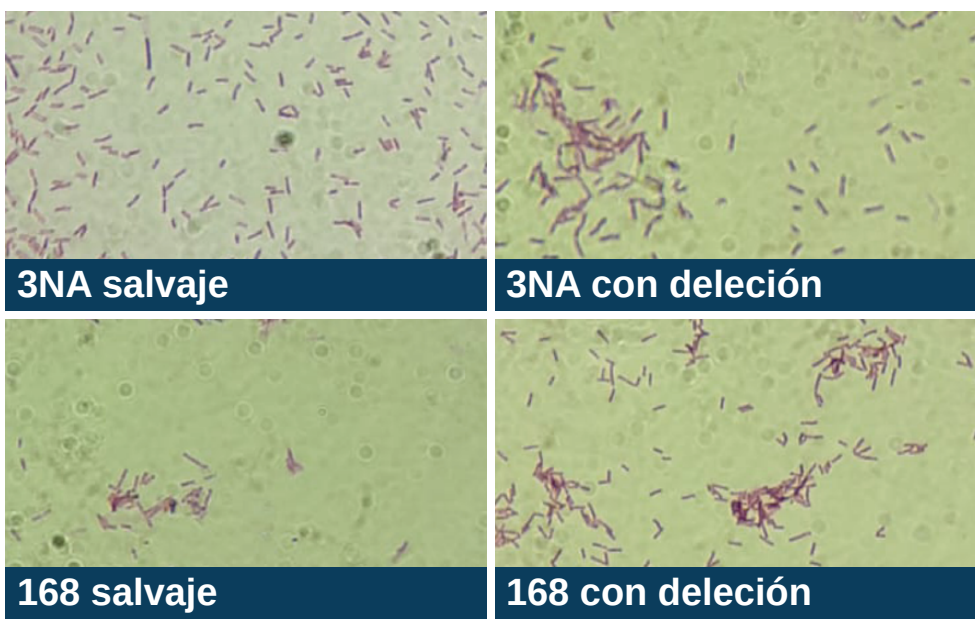


Figura 3. Tinción de Gram (100X). Arriba, cepa 3NA; abajo, cepa 168. A la izquierda, salvaje; a la derecha, con deleción del operón phoD.

Conclusiones

- **spPhoD-GFP** permitió detectar expresión y secreción: es un **marcador adecuado** para estudiar la secreción en *B. subtilis*.
- **spPhoD-mCherry** no se detectó en *B. subtilis*; la expresión en *E. coli* indica una limitación del hospedador.
- Las **cepas con deleción** del operón *phoD* son herramientas para futuros estudios funcionales y para el uso del sistema Tat como plataforma de secreción de proteínas recombinantes.